



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE LA ENZIMA 1-DEOXI-D-XILULOSA 5-FOSFATO SINTASA, INVOLUCRADA EN LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES PLASTÍDICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

GABRIELA ITZETL MEDINA RUIZ

TUTOR:

DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. DAVID ROMERO CAMARENA  
[Instituto de Ciencias Genómicas](#)  
DR. ENRIQUE SALAS VIDAL  
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre, 2016



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.

*A mis padres por todo el cariño y apoyo incondicional*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia León por brindarme la oportunidad de realizar la tesis de licenciatura y de maestría en su laboratorio, le agradezco por la paciencia y las correcciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Cordoba por la infinidad de aportaciones durante la tesis de la licenciatura y la maestría, así como el aprendizaje y dirección a mi formación académica y personal.

A mi comité tutorial el Dr. Enrique Salas y el Dr. David Romero por sus observaciones al presente trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Svetlana Shishkova, el Dr. Victor Humberto Bustamante Santillán, la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera, al Dr. Arnaud Ronceret y al Dr. Francisco Campos, por su tiempo brindado y por las correcciones en la tesis que fueron esenciales en la dirección del escrito.

A mis compañeros del laboratorio, Luis de Luna, Marel Chenge, María I. Cruz, Jesús S. López, Maricela Ramos y al Dr. Arturo Guevara, por sus sugerencias e ideas críticas en la realización y presentación de este proyecto. A mis amigas Tatiana Luna y Daniela Carmona que me han brindado su amistad desde hace muchos años. A Diego R. Hernández quien me ayudó en el formato final y presentación de las gráficas. A Oscar Villafranco que siempre me ha brindado apoyo y comprensión en todo momento.

A la M. en C. Guadalupe Maricela Ramos Vega por el apoyo técnico en el laboratorio para poder llevar a cabo este proyecto.

A toda mi familia y sobre todo a mis padres Rocío Ruiz y Arturo Medina por su ayuda incondicional durante mi vida personal y académica. Asimismo, agradezco a mis hermanos Itzcóatl y Ehecatzin por su paciencia.

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se contó con la beca para maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (2012-2014) con número de becario 446824/270606. Así como, el apoyo para el XV Congreso Nacional de Bioquímica Biología Molecular de Plantas otorgado por CONACYT (CVU 446824).

## ABREVIATURAS

Amp	Antibiótico ampicilina
°C	Grados Celsius
Cm	Antibiótico cloranfenicol
Coo	Tinción de geles con colorante Coomassie
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DXS	deoxi-D-xilulosa 5 fosfato sintasa
DO	Densidad óptica
FPP	Farnesil pirofosfato
Fosm	Fosmidomicina
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
GGPP	Geranil geranil difosfato
GPP	Geranil pirofosfato
6XHis	Epítotope de 6 histidinas
IPP	Isopentenil pirofosfato
Km	Kanamicina
L-ara	L-arabinosa
LB	Medio Luria Broth
MVA	Vía del mevalonato
MEP	Vía del metil eritritol fosfato
P	Tinción con Ponceau
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
TPP	Tiamina pirofosfato

## CONTENIDO

I.	ABSTRACT.....	10
II.	RESUMEN.....	11
III.	INTRODUCCIÓN.....	12
IV.	MARCO TEÓRICO.....	13
	LOS ISOPRENOIDES.....	13
	LOS ISOPRENOIDES PROCEDEN DE DOS MOLÉCULAS ESTRUCTURALES:	
	EL IPP Y EL DMAPP.....	16
	VÍAS DE SÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS ESTRUCTURALES, IPP Y DMAPP.....	18
	<i>La vía del MVA</i> .....	19
	<i>La vía del MEP</i> .....	20
	<i>Variaciones de la vía MEP en los microorganismos</i> .....	24
	REGULACIÓN DE LA VÍA MEP.....	24
	<i>Inhibidores específicos de la vía MEP</i> .....	25
	<i>La vía MEP es regulada por mecanismos de retroalimentación en     respuesta a la demanda de los bloques estructurales de isoprenoides</i> .....	25
	REGULACIÓN DE DXS EN <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
	<i>Regulación post-traducciona</i> l.....	26
	LA PROTEÍNA DXS ESTÁ CONSERVADA EN LA EVOLUCIÓN.....	28
	DXS ES UNA ENZIMA LIMITANTE DE LA VÍA MEP EN PLANTAS Y BACTERIAS.....	29
	<i>Escherichia coli</i> COMO MODELO DE ESTUDIO.....	32
	LA VIDA MEDIA DE LAS PROTEÍNAS ESTÁ REGULADA POR PROTEASAS.....	34
	<i>La vida media de las proteínas en E. coli</i> .....	34
	<i>Proteasas en E. coli</i> .....	35

V.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	37
VI.	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
	<i>Objetivo general</i> .....	37
	<i>Objetivos particulares</i> .....	37
VII.	<b>ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES</b> .....	38
	AISLAMIENTO DEL GEN DXS de <i>E. coli</i> .....	38
	EXPRESIÓN DE DXS EN EL VECTOR PBADA/MYC-6XHIS.....	40
	ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN <i>E. coli</i> .....	41
	ELECTROFORESIS SDS PAGE.....	42
	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA WESTERN-BLOT.....	42
VIII.	<b>RESULTADOS</b> .....	43
	ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN FASE EXPONENCIAL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	43
	ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	50
	ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN LA AUSENCIA DE LAS PROTEASAS Lon Y Ompt.....	53
IX.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	55
	LA PROTEÍNA DXS SE ESTABILIZA DURANTE LA FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	55
	LA PROTEÍNA DXS SE ESTABILIZA EN LA CEPA BL21.....	57
X.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
XI.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	59
	REEMPLAZO GENÉTICO DE Lon Y Clpp EN <i>E. coli</i> MEDIANTE EL SISTEMA DE DATSENKO Y WANNER, 2000.....	59

XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
XIII.	ANEXO.....	76

## FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Las unidades isoprenicas.....	16
<b>Figura 2</b>	Biosíntesis de isoprenoides a partir de IPP y DMAPP.....	17
<b>Figura 3</b>	Síntesis de isoprenoides por la vía MVA.....	19
<b>Figura 4</b>	Primera reacción de la vía MEP.....	21
<b>Figura 5</b>	Biosíntesis de isoprenoides por la vía MEP.....	23
<b>Figura 6</b>	Análisis de los niveles de la proteína DXS en distintas mutantes de la vía MEP.....	27
<b>Figura 7</b>	La vida media de DXS aumenta en tratamientos con Fosmidomicina.....	28
<b>Figura 8</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína DXS, De <i>E. coli</i> y <i>A. thaliana</i> .....	29
<b>Figura 9</b>	El cultivo monofásico sigue una curva de crecimiento típica de una población bacteriana graficada en función de las células viables en un tiempo determinado.....	33
<b>Figura 10</b>	Aislamiento del gen <i>DXS</i> .....	38
<b>Figura 11</b>	Confirmación de la construcción pBADA/Myc- <i>DXS</i> -6XHis.....	39
<b>Figura 12</b>	Análisis de proteína por medio de Western-blot anti His.....	40
<b>Figura 13</b>	Procedimiento para el análisis de la vida media de DXS en <i>E. coli</i> .....	41
<b>Figura 14</b>	Análisis por Western-blot de la proteína DXS para ensayos de vida media....	42
<b>Figura 15</b>	Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial (OD <sub>600</sub> =0.3) con Cm (200 µg/ml).....	45



<b>Figura 16</b> Vida media de DXS en la fase exponencial ( $OD_{600}=0.3$ ), con Cm (200 $\mu\text{g/ml}$ ).....	46
<b>Figura 17</b> Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial ( $OD_{600}=0.3$ ) con Cm (400 $\mu\text{g/ml}$ ).....	47
<b>Figura 18</b> Vida media de DXS en la fase exponencial ( $OD_{600}=0.3$ ) con Cm (400 $\mu\text{g/ml}$ ).....	48
<b>Figura 19</b> Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial ( $OD_{600}=0.5$ ) con Cm (200 $\mu\text{g/ml}$ ).....	49
<b>Figura 20</b> Vida media de DXS en la fase exponencial ( $OD_{600}=0.5$ ) con Cm (200 $\mu\text{g/ml}$ ).....	50
<b>Figura 21</b> Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase estacionaria ( $OD_{600}=1.4$ ) con Cm (200 $\mu\text{g/ml}$ ).....	51
<b>Figura 22</b> Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase estacionaria ( $OD_{600}=1.4$ ) con Cm (800 $\mu\text{g/ml}$ ).....	52
<b>Figura 23</b> Vida media de DXS en la fase estacionaria ( $OD_{600}=1.4$ ) con Cm (800 $\mu\text{g/ml}$ ).....	52
<b>Figura 24</b> Análisis de los niveles de la proteína DXS en la cepa BL21.....	53
<b>Figura 25</b> Vida media de DXS en la cepa BL21.....	54
<b>Figura 26</b> Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos purificados que se utilizaron para reemplazo genético.....	59
<b>Figura 27</b> Análisis por PCR del cassette que contiene resistencia a Km a partir del vector pKD4.....	60
<b>Figura 28</b> Sistema de reemplazo genético por Datsenko y Wanner, 2000.....	61

<b>Figura 29</b> Selección de mutantes $\Delta ClpP$ y $\Delta Lon$ .....	62
---	----

## TABLAS

<b>Tabla 1</b> Importancia Biológica y Biotecnológica de los isoprenoides.....	14
<b>Tabla 2</b> Nomenclatura de las enzimas y genes de la vía MEP en <i>A. thaliana</i> y <i>E. coli</i> ....	23
<b>Tabla 3</b> DXS es una enzima limitante en las plantas.....	30
<b>Tabla 4</b> Aplicaciones en la producción de metabolitos de isoprenoides utilizando DXS.....	31

## I. ABSTRACT

Isoprenoids are indispensable for life survival, they form part of cell walls and cell membranes, also are components of energy metabolism. *Escherichia coli* synthesize their isoprenoids through the MEP pathway. The enzymes of the MEP pathway are regulated at multiple levels in all living organisms. DXS, the first enzyme of the MEP pathway is one of the limiting enzymes of this pathway, in eukaryotic organisms is regulated at the transcriptional and post-translational levels. However, the protein regulation in bacteria such as *E. coli* is unknown. In this study was to measure the half-life of DXS protein in different phases of bacteria growth. In this work we used chloramphenicol as translation inhibitor to analyze the half-life of DXS protein without protein synthesis. Our data indicate that half-life DXS protein was longer during stationary phase of the *E. coli* growth in contrast to exponential phase. During stationary phase the bacteria require a rearrangement of cell membranes and synthesis of isoprenoid compounds. These data suggest that DXS protein is probably important to survival in stationary phase. One mechanism of the post-translational control of the proteins is through proteases degradation. In this investigation we suggest that DXS could be degraded through the Lon or OmpT proteases because the half-life DXS protein is longer in *E. coli* BL21 strain. These data open new questions regarding of DXS degradation mechanisms by construct mutants lacking the specific proteases in *E. coli* for subsequent analysis.

## II. RESUMEN

Los isoprenoides en *Escherichia coli* son sintetizados a través de la vía MEP, los cuales son indispensables para su supervivencia, ya que forman parte de la membrana y pared celular, así mismo, son componentes del metabolismo energético, entre otros. DXS es la primera enzima y un componente limitante de la vía MEP en *E. coli*. En este trabajo analizamos la estabilidad de DXS mediante la determinación de la vida media de la proteína en ensayos donde la traducción fue inhibida con cloranfenicol. Nuestros datos indican que la vida media de la proteína DXS aumenta considerablemente durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano en contraste con la fase exponencial. Se sugiere que ésta proteína podría tener una mayor importancia biológica durante la fase estacionaria, ya que las bacterias requieren un cambio en la conformación de las membranas así como la síntesis de diversos isoprenoides. Como parte del análisis de DXS, también determinamos su vida media en la cepa BL21, deficiente en proteasas. Nuestros datos sugieren que DXS podría ser regulada a través de la proteasa Lon u OmpT, o ambas. Estos análisis preliminares dan pie al estudio más detallado de la degradación de DXS y su regulación a nivel post-traducciona, por esta razón construimos mutantes que carecen de específicas proteasas en *E. coli* para análisis subsecuentes.

### III. INTRODUCCIÓN

Los isoprenoides son un grupo de metabolitos con una gran diversidad funcional y estructural (Croteau *et al.*, 2000; Bouvier *et al.*, 2005; Tholl y Lee, 2011; Hemmerlin *et al.*, 2012; Vranová *et al.*, 2013), estos compuestos son producidos en todos los organismos vivos; sin embargo, su abundancia y su variedad son mayores en las plantas. Se ha determinado que los isoprenoides se derivan de dos moléculas precursoras de cinco carbonos: el IPP y su isómero, el DMAPP (Figura 1) (Rodríguez-Concepción, 2014). El IPP y el DMAPP son sintetizados por dos vías evolutivamente no relacionadas, la primera vía es mediante la formación del ácido mevalónico (MVA) a partir del acetil-CoA (Goldstein y Brown, 1990). La segunda vía es la del 2-C-metil-eritritol 4-fosfato (MEP) a partir del piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (Lois *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Lange y Ghassemian, 2003; Rodríguez-Concepción, 2014).

La vía MEP está conservada desde organismos unicelulares como *E. coli* hasta organismos multicelulares como *A. thaliana*. Inicialmente, todos los genes de la vía MEP fueron identificados en *E. coli* y posteriormente se determinaron sus ortólogos en las plantas superiores (Sprenger *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1998; Lois *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Lange y Ghassemian, 2003; Rodríguez-Concepción, 2014).

Dada la alta similitud que presentan las proteínas DXS en los organismos a diferentes niveles evolutivos (Lois *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2007), en el presente trabajo, se planteó como objetivo estudiar la vida media de la 1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), que es la primera enzima de la ruta y un componente limitante. En este trabajo, se determinó la vida media de DXS en *E. coli* en diferentes momentos del crecimiento bacteriano, la cual fue mayor durante la fase estacionaria del crecimiento (>4 h) en comparación con la vida media durante la fase exponencial (~ 35 min). Asimismo, nuestros datos preliminares sugieren que la degradación de DXS podría ser regulada a través de las proteasas Lon u OmpT, ya que la vida media de DXS se estabiliza en la cepa BL21, deficiente en estas dos proteasas.

## IV. MARCO TEÓRICO

### LOS ISOPRENOIDES

Los isoprenoides o terpenos son una variedad de compuestos orgánicos, que fueron aislados por primera vez de la terpentina ("terpentin" en alemán, un compuesto derivado del aguarrás) (Croteau *et al.*, 2000), estos compuestos poseen una amplia variedad de funciones fisiológicas en todos los seres vivos. Actualmente se conocen más de 30,000 diferentes isoprenoides en la naturaleza; sin embargo, más del 80% son de origen vegetal (Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Eisenreich *et al.*, 2004).

Los isoprenoides son requeridos para el crecimiento y supervivencia de todos los seres vivos, incluyendo a las bacterias como *E. coli*, ya que participan en la formación de la pared celular, la biosíntesis de las membranas celulares (bactoprenol, hopanoides y los esteroides), el transporte de electrones (ubiquinona y menaquinona), entre otros. En los organismos fotosintéticos como las cianobacterias, las algas y las plantas, los isoprenoides son los precursores de los pigmentos para la absorción de luz (clorofilas, bacterioclorofilas, rodopsinas y carotenoides) (Schwender *et al.*, 1997; Eisenreich *et al.*, 1998; Rohmer, 1999; Lichtenthaler, 2000). Asimismo, algunos isoprenoides se utilizan en procesos de modificación post-traducciona l de proteínas como la prenilación (grupos prenil) y la glucosilación (dolicoles) (McGarvey y Croteau, 1995; Croteau *et al.*, 2000; Pérez-Gil y Rodríguez-Concepción, 2013), estas modificaciones afectan la actividad de las proteínas que la presentan.

Desde el punto de vista biotecnológico, los isoprenoides tienen propiedades relevantes como bactericidas, provitaminas, antioxidantes, herbicidas, anticancerígenos, etc., (Tabla 1) por lo tanto tienen un alto valor comercial (Croteau *et al.* 2000; Hirschberg, 2001; Martin *et al.*, 2003; Fraser y Bramley, 2004; Reiling *et al.*, 2004; Withers y Keasling, 2007). Varios grupos de isoprenoides son empleados en la industria como fuente natural de pigmentos, aromas, fibras o ceras, así como fármacos (por ejemplo, artemisina y taxol), agroquímicos y precursores de vitaminas (por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno) (Tabla 1).

**Tabla 1. Importancia biológica y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides**

Moléculas isoprenicas	No. de carbonos	Usos de los isoprenoides
<b>Hemiterpenos</b>	5	El IPP y su isómero DMAPP son hemiterpenos y actúan como moléculas estructurales de todos los compuestos isoprenoides conocidos. También son utilizados como agentes alquilantes en la formación de meroterpenoides como los alcaloides, el shikimato, el acetato, entre otros. El isopreno se produce en las hojas de las plantas, se libera en forma de gas y puede ser tóxico para los humanos (Guenther <i>et al.</i> , 1995; Wagner <i>et al.</i> , 1999; Croteau <i>et al.</i> , 2000). Asimismo, el isopreno tiene gran importancia en la aviación como combustible (Zhao <i>et al.</i> , 2011).
<b>Monoterpenos</b>	10	Los monoterpenos son derivados del geranil pirofosfato y en general son esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de las hierbas y especias. Ejemplos: el linalil acetato, valtrato, limoneno, citral, cineol, linalol, mentol, alcanfor, carvona, pinenos, piretrinas, cinerinas entre otros, son utilizados como saborizantes, carminativos, antisépticos, diuréticos, sedantes, insecticidas, entre otros. Todos ellos son extraídos de diversas especies de plantas (Croteau <i>et al.</i> , 2000; Dewick, 2002).
<b>Sesquiterpenos</b>	15	Los sesquiterpenos usualmente son derivados del farnesil pirofosfato. Muchos son encontrados en aceites esenciales como las fitoalexinas, que tienen propiedades antimicrobianas. Ejemplos: el farnesol (C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O), un pesticida natural que actúa como feromona de insectos y utilizado como fijador en perfumes y saborizantes en cigarros. También están otros como el bisabolol, zingibereno, partenólida, santonina, matricina, camazuleno, cadineno, ácido artemisínico, gossypol (Eisenreich <i>et al.</i> , 2001; Dewick, 2002; Croteau <i>et al.</i> , 2000).
<b>Diterpenos</b>	20	Los diterpenos son derivados del geranil geranil pirofosfato. Ejemplos: el fitol (La cadena hidrofóbica de la clorofila), las fitohormonas giberelinas, los ácidos de las resinas de coníferas y leguminosas, las fitoalexinas. Particularmente el forbol y el taxadieno son usados como anticancerígenos; el casbeno y el abietadieno son compuestos antifúngicos; la forskolina actúa como antiespasmódico; el esteviol es usado como endulzante y los ginkgolidos usados como vaso reguladores (Croteau <i>et al.</i> , 2000; Dewick, 2002).

<b>Sesterpenos</b>	25	Derivado del geranil farnesil pirofostato. Los sesterpenos son relativamente raros al resto de los isoprenoides. Ejemplo: la ofiobolina A es un sesteterpeno usado por su amplio espectro de actividad biológica contra bacterias, hongos y nematodos (Dewick, 2002).
<b>Triterpenos</b>	30	Los triterpenos son derivados del acoplamiento de dos moléculas de farnesil pirofosfato, los cuales son principalmente componentes de las membranas celulares y hormonas. Ejemplos: los hopanoides, en bacterias; el escualeno, un ingrediente del aceite de hígado de tiburón, el cual es procesado a lanosterol, un precursor estructural de todos los esteroides; Otros son compuestos como los brasinoesteroides que son fitohormonas, el fitosterol, ciertas fitoalexinas, varias toxinas, elementos disausivos de alimento y componentes de superficie como ceras, ácido oleanólico de uvas (Flesch y Rohmer, 1988; Croteau <i>et al.</i> , 2000; Dewick, 2002; Rohmer, 2008).
<b>Tetraterpenos</b>	40	Están formados por ocho unidades de isopreno y son producidos normalmente por la condensación de dos moléculas de geranil geranil pirofosfato. La mayoría de los tetraterpenos son carotenoides y pigmentos, en los organismos fotosintéticos ayudan a la protección contra el daño foto-oxidativo (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Rodríguez-Concepción, 2014)
<b>Politerpenos</b>	>40	Los politerpenos contienen más de 8 unidades isoprenicas, incluyen acarreadores de electrones como la plastoquinona y ubiquinona; la cadena larga de los poliprenoles involucrados en las reacciones de transferencia de azúcares y polímeros enormes como el caucho a menudo se encuentran en el látex y hule (Croteau <i>et al.</i> , 2000).

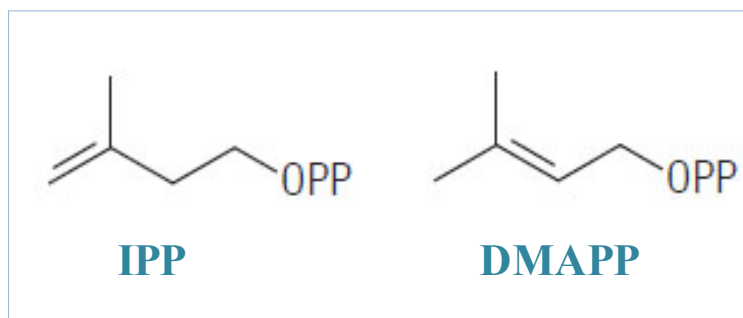


## LOS ISOPRENOIDES PROCEDEN DE DOS MOLÉCULAS ESTRUCTURALES: EL IPP Y EL DMAPP

La investigación inicial de la estructura de los isoprenoides fue realizada en gran parte por Otto Wallach y colaboradores, quienes formularon "La regla del isopreno", la cual postuló que la mayoría de los terpenoides estaban constituidos por unidades isoprénicas repetidas (Premio Nobel de Química, 1910), este principio provee el primer marco conceptual de una relación estructural entre los diversos terpenoides (Ruzicka, 1953; Christmann, 2010).

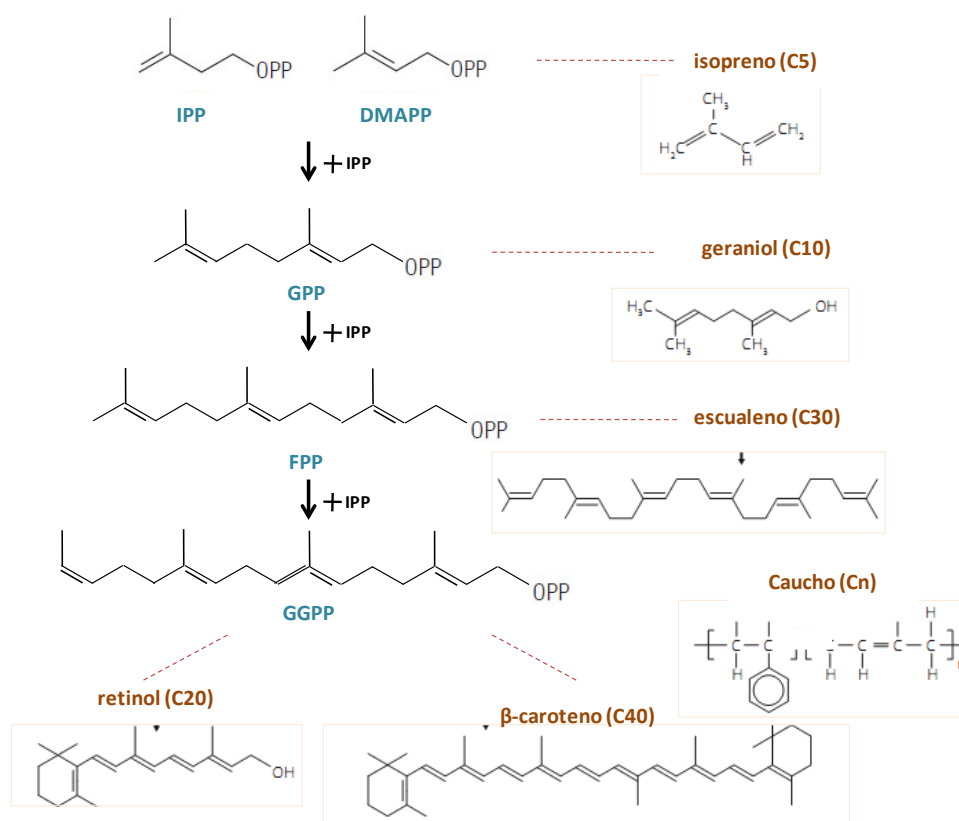
A pesar de la inmensa variedad de los isoprenoides, posteriormente se corroboró que todos ellos derivan de dos moléculas estructurales: el IPP (isopentenil pirofosfato) y el DMAPP (dimetilalil difosfato) (Figura 1). La idea de Wallach fue refinada en 1930, cuando Leopold Ruzicka (Premio Nobel de Química, 1939), y colaboradores formularon "La regla biogénica del isopreno" (Ruzicka, 1953). Esta regla se centra en diferenciar la síntesis de isoprenoides por sus modificaciones como oxidaciones, ciclizaciones, hidroxilaciones, desaturaciones y reordenamientos (Figura 2) (Croteau *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004).

Los terpenoides más pequeños están formados por una sola unidad de isopreno (5C), éstos son llamados hemiterpenos (Croteau *et al.*, 2000). Sin embargo, los primeros isoprenoides aislados de la terpentina en 1850 fueron los monoterpenos y consisten en dos unidades isoprénicas (Croteau *et al.*, 2000).



**Figura 1** Las unidades isoprénicas. El IPP y DMAPP son las unidades estructurales de los isoprenoides.

Actualmente se ha corroborado que el IPP y el DMAPP se unen por medio de las enzimas preniltransferasas que involucran condensaciones de cabeza con cola de una o varias unidades de IPP o DMAPP, generando el geranyl difosfato (GPP, C10), farnesil difosfato (FPP, C15), geranylgeranyl difosfato (GGPP, C20), y otras moléculas de prenil difosfato menos abundantes que incrementan el tamaño de la cadena como el octaprenil difosfato (C40) y el nonaprenil (solanesil) difosfato (C45) (Rodríguez-Concepción, 2014). Estos son los puntos de inicio para la producción de la gran diversidad de compuestos isoprenoides (Figura 2) (Croteau *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004; Rodríguez-Concepción, 2014).



**Figura 2** Biosíntesis de isoprenoides a partir de IPP y DMAPP. Abreviaturas: IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranyl difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato. Ejemplos: isopreno, geraniol (C10), escualeno (C30), Caucho (Cn), retinol (C20),  $\beta$ -caroteno (C40).

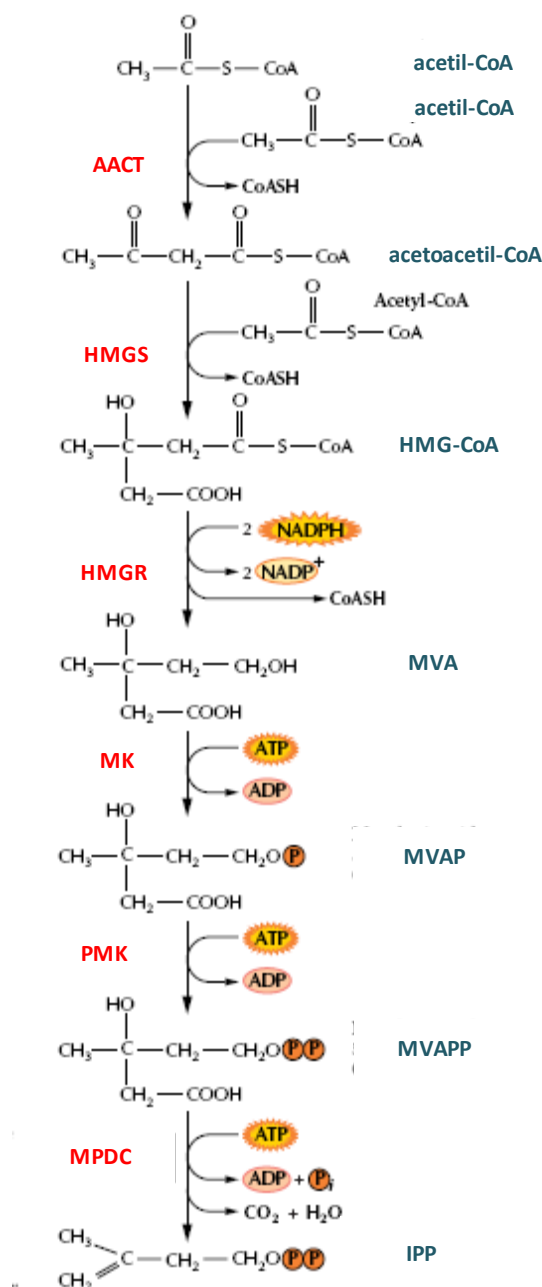
## VÍAS DE SÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS ESTRUCTURALES, IPP Y DMAPP

Actualmente se conocen dos vías que han evolucionado de forma independiente para la síntesis de los precursores estructurales IPP y DMAPP: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 2 C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP), identificada en los años 90s por experimentos de marcaje radioactivo en *E. coli* y en plantas (Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993).

La vía MVA está presente en arqueas, en bacterias Gram positivas y en el citoplasma de todos los organismos eucariontes (Hemmerlin *et al.*, 2003; Ershov, 2007). Por otro lado, las enzimas de la vía MEP se encuentran en la mayoría de las bacterias incluyendo a las bacterias Gram negativas como *E. coli* y las cianobacterias; en los cloroplastos de algas verdes y plantas; en los apicoplastos de los protistas como *Plasmodium falciparum* que ocasiona malaria en los humanos (Hemmerlin *et al.*, 2003).

En contraste con la mayoría de los microorganismos que solo poseen una vía para la síntesis de IPP y DMAPP, las plantas y las algas verdes, poseen tanto la vía MVA como la vía MEP. Ambas vías actúan de forma independiente y se encuentran en distintos compartimentos celulares (Hemmerlin *et al.*, 2003). Por un lado, la vía MVA se encuentra en el citosol, mientras que la vía MEP se encarga de la síntesis de isoprenoides en los plástidos. Asimismo, se ha confirmado que los bloques isoprénicos sintetizados por ambas vías tienen un intercambio mínimo, ya que una vía no es capaz de proveer los precursores isoprénicos de la otra (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000). A continuación, se describen los pasos biosintéticos de las dos vías en la síntesis de IPP/DMAPP.

## La vía del MVA



Las enzimas de la vía MVA están localizadas en el citosol, esta vía es la encargada de sintetizar compuestos de naturaleza esteroide, los sesquiterpenos, dolicoles y grupos prenil que son indispensables para el crecimiento y desarrollo de los organismos, ya que conforman la estructura básica de algunas hormonas y son parte de las membranas celulares (Schwender *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 2000; Vranová *et al.*, 2013). La vía MVA inicia con la condensación de tres moléculas de acetil-coenzima A (CoA) a β-hidroxi-β-metilglutaril CoA por medio de la acetil-coenzima A C-acetiltransferasa, también llamada acetoacetil-CoA tiolasa (AACT; EC 2.3.1.9). La AACT es una clase de tiolasa II, que condensa dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA en una reacción tipo Claisen y otras reacciones de corte reversibles (Figura 3) (Miziorko, 2011; Vranová *et al.*, 2013).

**Figura 3.** Síntesis de isoprenoides por la vía MVA. Las enzimas de la vía son la acetil-coenzima A C-acetiltransferasa o acetoacetil-CoA tiolasa, AACT; 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa, HMGS; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, HMG-CoA; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, HMGR; mevalonato cinasa, MK; fosfo-mevalonato cinasa, PMK; difosfo-mevalonato descarboxilasa, MPDC. Los metabolitos de la vía son acetil coenzima A, acetil-CoA; acetoacetil coenzima A, acetoacetil-CoA; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, HMG-CoA; mevalonato, MVA; mevalonato 5-fosfato; mevalonato 5-difosfato, MVAPP; isopentenil difosfato, IPP. Modificado de Croteau *et al.*, 2002.

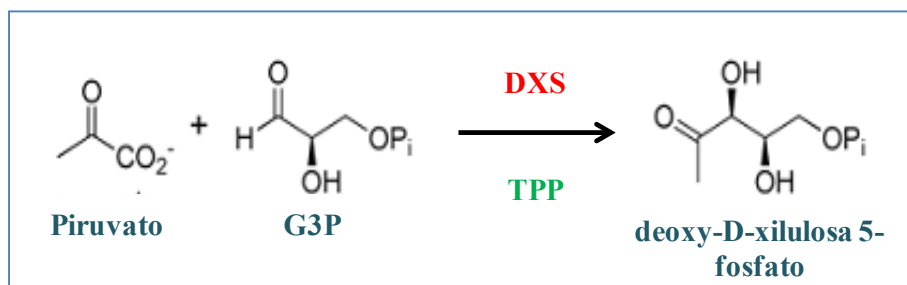
En el siguiente paso, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (HMGS; EC 2.3.3.10) cataliza la condensación del acetoacetyl-CoA con el acetyl-CoA para la biosíntesis de 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, esta segunda reacción de la vía, es fisiológicamente irreversible (Miziorko, 2011). Posteriormente, el 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) es reducido a mevalonato (MVA) por medio de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductasa (HMGR; EC 1.1.1.34). Esta reacción es el paso limitante de la vía e involucra la formación del MVA en dos reducciones sucesivas del HMG-CoA usando dos moléculas de NADPH como cofactor (Miziorko, 2011).

Los siguientes pasos para la transformación del MVA en IPP comprenden dos reacciones de fosforilación, catalizadas por la mevalonato cinasa (MK; EC 2.7.1.3.6) y la fosfo-mevalonato cinasa (PMK; EC 2.7.4.2), dando lugar al mevalonato 5-difosfato. Posteriormente, una descarboxilación catalizada por la difosfo-mevalonato descarboxilasa (MPDC; EC 4.1.1.33) da lugar al IPP (Hemmerlin *et al.*, 2003; Miziorko, 2011). Finalmente, el DMAPP se forma a partir de IPP por la acción de la enzima IPP-DMAPP isomerasa (IDI). La enzima IDI se encuentra en el citoplasma; sin embargo, también existen isoformas de IDI en las mitocondrias, en donde se importa IPP derivado del MVA para la biosíntesis de ubiquinona y otros isoprenoides mitocondriales (Holstein y Hohl, 2004; Vranová *et al.*, 2013).

### ***La vía del MEP***

La vía MEP fue elucidada inicialmente en bacterias y comprende 7 pasos biosintéticos (Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 2001; Eisenreich *et al.*, 2004; Rohmer, 2008; Pérez-Gil y Rodríguez-Concepción, 2013). El primer paso de la vía MEP involucra una reacción de condensación del tipo tranacetolasa entre el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) para formar 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). Este paso es catalizado por la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS; EC 2.2.1.7), en una reacción dependiente de pirofosfato de tiamina (TPP) (Figura 4) (Flesch y Rohmer, 1988; Lange *et al.*, 1988; Rohmer *et al.*, 1993; Lois *et al.*, 1988). La enzima DXS cataliza una secuencia de reacciones, en un primer momento se produce la formación del intermediario hidroximetiltiamina por unión del TPP al piruvato, acompañado de una descarboxilación de este último (Patel *et al.*, 2012).

Posteriormente, tiene lugar la condensación del G3P con el intermediario hidroximetiltiamina unido a la enzima, resultando en la formación de DXP (Figura 4) (Patel *et al.*, 2012). En las bacterias, DXP no solo actúa como sustrato de la vía MEP sino que también es una molécula precursora de la biosíntesis de las vitaminas B1 (tiamina) y B6 (piridoxal) (Julliard y Douce, 1991; Rohmer, 1999). Estudios recientes han demostrado que el DXP como precursor de la vitamina B6 en *E. coli* es parte de una nueva vía en la evolución, con respecto a la mayoría de los microorganismos, los cuales sintetizan esta vitamina de manera independiente a DXP (Fitzpatrick *et al.*, 2007; Cordoba *et al.*, 2009).

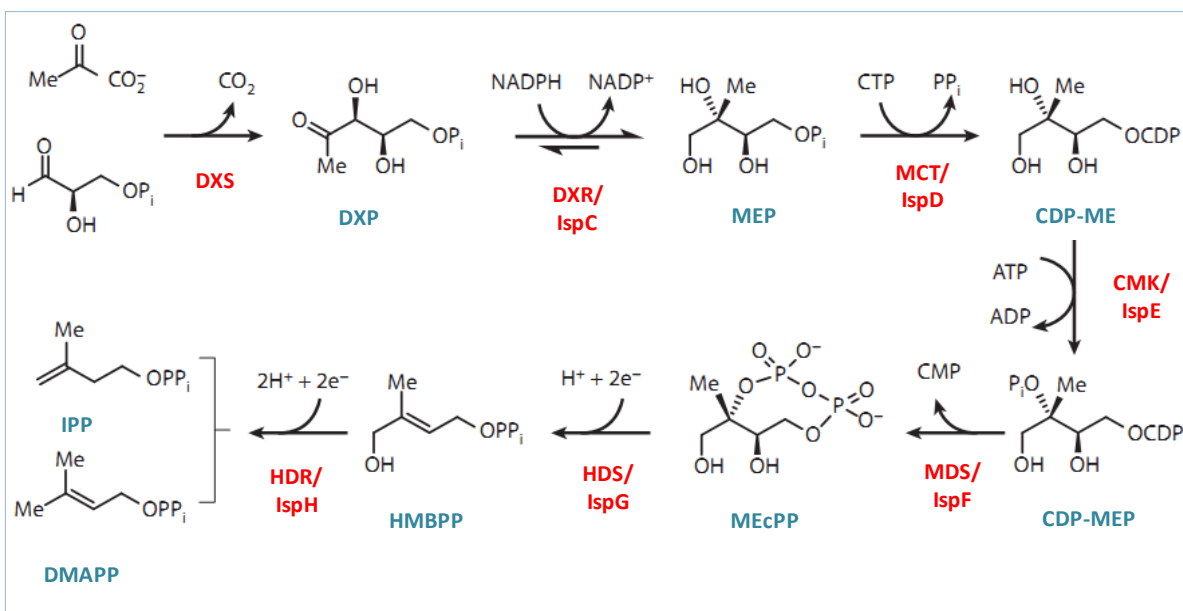


**Figura 4** Primera reacción de la vía MEP. Reacción de condensación entre el piruvato y el D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P) catalizada por la 1deoxi-D-xilulosa 5-fosfato Sintasa (DXS), utilizando como cofactor la tiamina pirofosfato (TPP). Modificado de Patel *et al.*, 2012.

La enzima DXS actúa como un homodímero y su reacción guarda reminiscencia con las transcetolasas y las descarboxilasas. Sin embargo, a pesar de la alta homología con éstas, la DXS sigue un mecanismo cinético ordenado y no de 'ping pong', como ocurre en las transcetolasas típicas (Xiang *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2012). Análisis estructurales de la proteína DXS indican que su sitio activo está localizado entre dominios del mismo monómero, en contraste con transcetolasas típicas, en donde su sitio activo está formado en la interfase del dímero. Se considera que la DXS define una nueva familia de proteínas tipo transcetolasas que están altamente conservadas en la evolución (Lois *et al.*, 1998; Querol *et al.*, 2001).

El segundo paso de la vía MEP es catalizado por la enzima deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR; EC 1.1.1.267) que transforma el DXP en 2-C-metil-eritritol 4-fosfato (MEP) (Takahashi *et al.*, 1998). Éste es el primer compuesto comprometido de la vía y el que le da nombre a la vía MEP, esta reacción requiere NADPH y  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  como cofactores (Takahashi *et al.*, 1998; Rohmer, 1999). Recientemente se ha demostrado que algunas bacterias (por ejemplo, *Brucella abortus*) carecen de genes que codifican para DXR convencionales y contienen una clase diferente de óxido-reductasas que catalizan la conversión de DXP en MEP (Figura 6) (Hemmerlin *et al.*, 2012).

Posteriormente, en el tercer paso se produce la conversión del 2-C-metil-eritritol 4-fosfato en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por la enzima 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa (MCT; EC 2.7.7.60), después el CDP-ME es fosforilado en una reacción dependiente de ATP por la enzima 4-(citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa (CMK; EC 2.7.1.148), formando CDP-ME 2-fosfato (CDP-MEP) que es transformado en 2-metileritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) por la enzima 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS; EC 4.6.1.12) (Figura 5) (Kuzuyama *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001). Los últimos pasos de la vía consisten en una reducción catalizada por la 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa (HDS; EC 1.17.7.1) para la producción de hidroximetilbutenil difosfato (HMBPP), el cual es transformado finalmente en una mezcla de IPP/DMAPP (en una proporción aproximada de 5:1) por la enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR; EC 1.17.1.2) (Lange *et al.*, 1998; Lange y Croteau, 1999; Withers y Keasling, 2007). Las enzimas HDS y HDR son reductasas de hierro-azufre que requieren un grupo  $(4Fe-4S)^{+1}$  y NADPH como agente reductor para su actividad enzimática (Figura 5) (Tabla 2) (Rohdich *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2003; Vranová *et al.*, 2013).



**Figura 5** Biosíntesis de isoprenoides por la vía MEP. Las enzimas de la vía son 1 deoxy-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, DXS; deoxy-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, DXR; 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato citidiltransferasa, MCT; 4-(citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa, CMK; 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa, MDS; 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa, HDS; 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa, HDR. Los metabolitos de la vía son deoxy-D-xilulosa 5-fosfato, DXP; 2-C-metil-eritritol 4-fosfato, MEP; 2-C-metil-eritritol 4-fosfato en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol, CDP-ME; CDP-ME 2-fosfato, CDP-MEP; 2-metileritritol 2,4-ciclodifosfato, MEcPP; hidroxi metil butenil difosfato, HMBPP; isopentenil difosfato, IPP; dimetilalil difosfato, DMAPP. Modificado de Zhao *et al.*, 2013.

**Tabla 2.** Nomenclatura de las enzimas y genes de la vía MEP en *A. thaliana* y *E. coli*

Actividad enzimática	<i>A. thaliana</i>	<i>E. coli</i>
1-deoxy-D-xilulosa 5 fosfato sintasa	DXS	Dxs
1-deoxy-D-xilulosa 5 fosfato reductoisomerasa	DXR	YaeM/IspC
2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato citidiltransferasa	MCT	YgbP/IspD
4-(citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa	CMK	YchB/IspE
2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	MDS	YgbB/IspF
4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa	HDS	GpcR/IspG
4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	HDR	LytB/IspH



### ***Variaciones de la vía MEP en los microorganismos***

Se ha corroborado que algunas enzimas de la vía MEP también catalizan otras reacciones en las células de diversos microorganismos (Herz *et al.*, 1999; Gabrielsen *et al.*, 2004; Gabrielsen *et al.*, 2004; Testa *et al.*, 2006). Por ejemplo, la enzima IspF puede catalizar la conversión de CDP-ME al producto MEcPP, saltándose un paso de la biosíntesis convencional. No obstante, la frecuencia de esta reacción es del 1% en condiciones fisiológicas en *E. coli* y de 10% en el parásito de malaria (*P. falciparum*) (Rohdich *et al.*, 2001). Asimismo, se han encontrado proteínas bifuncionales IspD-IspF en otras bacterias como en *Campylobacter jejuni* y *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual es muy interesante debido a que no son enzimas consecutivas de la vía (Gabrielsen *et al.*, 2004).

### **REGULACIÓN DE LA VÍA MEP**

Avances recientes han permitido el desarrollo de procesos de fermentación microbiana a gran escala para la producción de isoprenoides (Zhao *et al.*, 2013). Las limitaciones iniciales para la producción de estos compuestos a partir de la vía MEP han sido atribuidas, en parte, al desconocimiento del control regulatorio de esta vía, además de que requiere sustratos esenciales para el metabolismo energético como el piruvato y el G3P. Sin embargo, la producción de isoprenoides a partir de la vía MEP en bacterias ofrece algunas ventajas, incluyendo mejor rendimiento estequiométrico y menor consumo de oxígeno, lo cual es económicamente benéfico para fermentaciones a gran escala (Zhao *et al.*, 2013). En la actualidad, la producción de isoprenoides a partir de la vía MEP se ha combinado con la manipulación de genes de otras vías, como la vía Entner-Doudoroff, utilizada para incrementar la producción de algunos carotenoides como el licopeno (Liu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Es de gran importancia el estudio de la regulación de cada una de las enzimas que controlan el flujo metabólico de la vía MEP, por lo que se han conjuntado esfuerzos para dilucidar la regulación tanto en las bacterias como en las plantas.

### ***Inhibidores específicos de la vía MEP***

El uso y estudio de inhibidores de la vía MEP es particularmente importante, ya que esta ruta bioquímica podría ser diana para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, herbicidas y antimaláricos, debido a que son inocuos para los humanos (Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). En las plantas, el uso de inhibidores de la vía MEP produce un fenotipo de despigmentación como resultado de la disminución de isoprenoides plastídicos como carotenos y clorofilas (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). La caracterización de la fosmidomicina (FR-31564) como inhibidor de la segunda enzima de la vía MEP (DXR), se realizó inicialmente en bacterias (Leon *et al.*, 2006). Asimismo, se han identificado otros inhibidores como clomazona que afecta a la enzima DXS (Ferhatoglu y Barrett, 2006).

Aunque en un inicio se postuló que el inhibidor fosmidomicina afecta la enzima DXR, análisis recientes de la respuesta metabólica a fosmidomicina en *P. falciparum* y en *E. coli*, sugieren que la enzima MCT también es un blanco de inhibición de este compuesto (Zhang *et al.*, 2011). No obstante, algunos estudios sugieren que las bacterias como *E. coli* han desarrollado mecanismos para evadir al inhibidor fosmidomicina (Sakamoto *et al.*, 2003; Hemmerlin *et al.*, 2012; Pérez-Gil y Rodríguez-Concepción, 2013), por lo que es necesario encontrar nuevos blancos de regulación en la vía.

#### ***La vía MEP es regulada por mecanismos de retroalimentación en respuesta a la demanda de los bloques estructurales de isoprenoides***

De manera similar a lo que ocurre en otras rutas biosintéticas, la vía MEP presenta mecanismos de regulación por retroalimentación de sus productos finales, se ha demostrado que en *E. coli*, el IPP y el DMAPP inhiben a la enzima DXS por competencia con la tiamina difosfato (Banerjee *et al.*, 2013). Por otra parte, en algunas especies de plantas como el tomate se ha propuesto que la adición exógena del producto deoxy-xilulosa 5-fosfato (DX) modula la expresión del gen *DXS* (Lois *et al.*, 1998; Querol *et al.*, 2001; Hunter, 2007). Concordante con esto, se ha demostrado que la alteración de los niveles de los productos finales IPP y DMAPP o la interrupción del flujo metabólico, regula a nivel

post-transcripcional algunas enzimas de la vía MEP incluyendo DXS, DXR y HDR, en las plantas (Guevara-García *et al.*, 2005; Sauret-Güeto *et al.*, 2006).

### **REGULACIÓN DE DXS EN *A. thaliana***

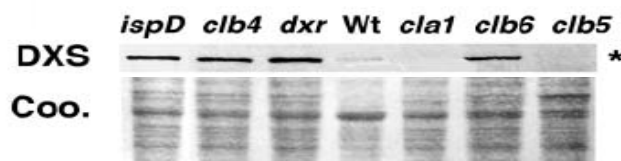
En bacterias se ha investigado poco sobre la regulación de DXS; sin embargo, diversos análisis en las plantas sugieren que DXS está regulada a nivel transcripcional y a nivel post-traducciona (Guevara-García *et al.*, 2005). En general, se sugiere que el control transcripcional regula a *grosso modo* la expresión en procesos específicos de desarrollo, en contraste la respuesta rápida a cambios ambientales requiere un control a nivel de las proteínas de la vía, como DXS (Guevara-García *et al.*, 2005; Sauret-Güeto *et al.*, 2006; Fraser *et al.*, 2007; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2015).

#### ***Regulación a nivel post-traducciona***

Estudios iniciales en nuestro laboratorio han determinado que DXS presenta una regulación a nivel post-transcripcional, mediante el estudio de la mutante *clb6* de *A. thaliana*, la cual es una mutante que está afectada en el gen *HDR* que codifica para la última enzima de la vía MEP (Guevara-García *et al.*, 2005). En estos estudios se observó que la proteína DXS está aumentada casi diez veces en la mutante *clb6*, en comparación con las plantas tipo silvestres y no así, los niveles de transcrito (Figura 6) (Guevara-García *et al.*, 2005). La abundancia de DXS también se observa en otras mutantes que interrumpen otros pasos de la vía MEP (por ejemplo, *dxr*, *clb4*, *sipD*), sugiriendo que ésta acumulación podría deberse por la disminución de los productos finales IPP y DMAPP. De manera contraria, el aumento de la proteína DXS no es observado en otras mutantes que afectan pasos río debajo de la vía MEP, tal es el caso de la mutante *clb5* que carece de la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), involucrada en la producción de carotenoides.

De manera similar a lo que ocurre en las mutantes que afectan algún paso de la vía MEP, se ha determinado que el uso de inhibidores de la vía MEP, como la fosmidomicina (inhibidor de DXR), también ocasiona una mayor abundancia en los niveles de la proteína DXS respecto a las que no tienen este inhibidor (Guevara-García *et al.*, 2005). En conjunto, estos datos permitieron concluir que la proteína DXS se encuentra regulada a nivel post-

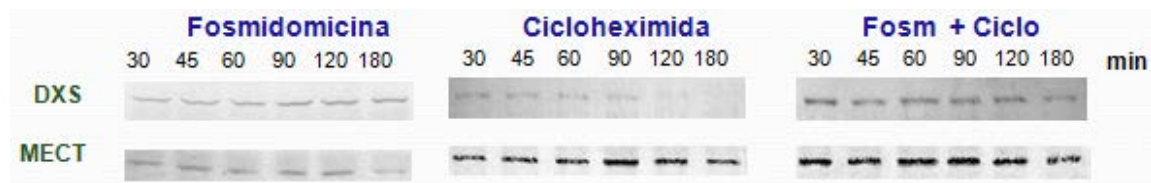
transcripcional y se sugiere que la alteración de los productos finales de la vía MEP, estabiliza los niveles de proteína DXS por un mecanismo de retroalimentación de la vía (Guevara-García *et al.*, 2005).



**Figura 6** Análisis de los niveles de la proteína DXS en distintas mutantes de la vía MEP (Guevara-García *et al.*, 2005).

Análisis posteriores en nuestro laboratorio confirmaron la regulación post-transcripcional descrita en la sección anterior corresponde a una regulación post-traducciona de DXS. Mediante el análisis de la vida media de la proteína DXS en plantas de *A. thaliana* incubadas con cicloheximida (inhibidor de la traducción en eucariontes), se determinó que la vida media de DXS es de aproximadamente 80 min; sin embargo, en las plantas tratadas con cicloheximida y fosmidomicina (inhibidor de DXR), la vida media de DXS aumenta a más de 12 horas.

Se ha propuesto que esta regulación post-traducciona podría incrementar la estabilidad de DXS en respuesta a un mayor requerimiento de los productos finales de la vía MEP (Figura 9). Estudios de la proteína DXS en geles de dos dimensiones, sugieren que hay una posible modificación post-traducciona, la cual podría estar involucrada en cambios de la estabilidad de esta proteína. (Chenge, 2012) (Figura 7). En análisis previos, se han observado modificaciones a nivel post-traducciona de algunas enzimas de las vías MVA y MEP, incluyendo fosforilación, glicosilación o ubiquitinación (Xie *et al.*, 2008). Asimismo, las enzimas DXS y HDS de la vía MEP se han encontrado en estudios fosfoproteómicos en plantas, sugiriendo que esta modificación podría afectar su estabilidad (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001; Reiland *et al.*, 2009).



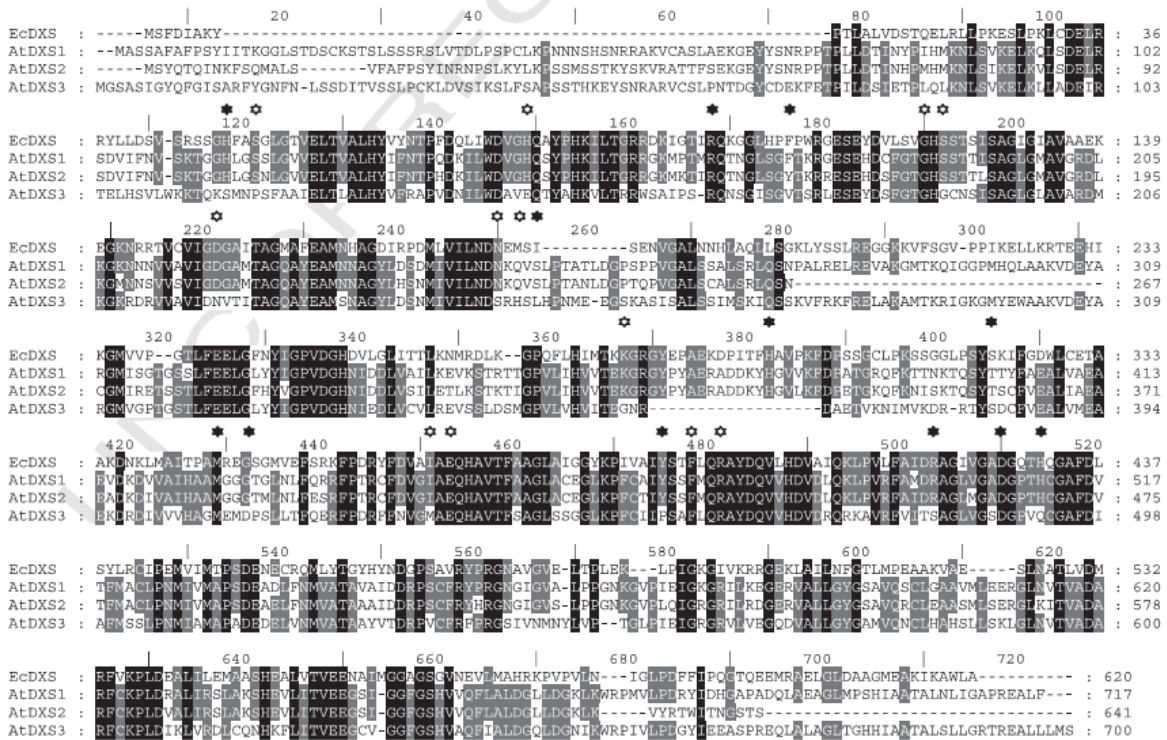
**Figura 7** La vida media de DXS aumenta en tratamientos con fosmidomicina (Extraída de Cheng, 2012).

## LA PROTEÍNA DXS ESTÁ CONSERVADA EN LA EVOLUCIÓN

Las enzimas DXS se encuentran altamente conservadas en la evolución desde bacterias hasta las plantas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Estévez *et al.*, 2001; Cordoba *et al.*, 2011). Se ha determinado que la secuencia de la proteína DXS de *E. coli* y DXS1 de *A. thaliana* presenta cerca de 49% de identidad (Figura 8). La comparación de las secuencias de aminoácidos de DXS muestran regiones altamente conservadas a lo largo de toda la proteína, lo que sugiere que los residuos conservados podrían jugar un papel importante en la conformación estructural y/o en las propiedades catalíticas de la enzima (Lois *et al.*, 1998).

Asimismo, se ha confirmado que la proteína DXS de *A. thaliana* complementa la mutante de *E. coli*, lo que demuestra que su actividad biosintética se encuentra igualmente conservada (Xiang *et al.*, 2007) (Figura 8). La diferencia más grande entre los genes de la vía MEP entre plantas y de *E. coli*, es la presencia de una extensión N-terminal en la secuencia de la proteína, la cual funciona como un péptido señal a cloroplasto en las plantas y que está ausente en las proteínas bacterianas (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

Se ha determinado que la mutante nula de DXS en bacterias, es letal (Sauret-Güeto *et al.*, 2003). A diferencia de las bacterias que solo poseen un gen de *DXS*, se ha confirmado que las plantas como *A. thaliana* y maíz, las proteínas DXS están codificadas por una familia génica (Carretero-Paulet *et al.*, 2013; Cordoba *et al.*, 2011). No obstante, la interrupción de uno de dichos genes (*DXS1*) en la mutante nula *cla-1* de *A. thaliana* es suficiente para impedir la síntesis de isoprenoides plastídicos como clorofilas, carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol y la hormona ácido absísico (ABA) (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2001).



**Figura 8** Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína DXS, de *E. coli* (Ec) y *A. thaliana* (At). Se muestran los porcentajes que cada una conserva de identidad respecto a *AtDXS1*. *AtDXS2* (72%), *AtDXS3* 52%, 54%*EcDXS*. *EcDXS* (DXS de *E. coli*), *AtDXS1* (DXS1 de *A. thaliana*), *AtDXS2* (DXS2 de *A. thaliana*), *AtDXS3* (DXS3 de *A. thaliana*) (Xiang *et al.*, 2006).

## DXS ES UNA ENZIMA LIMITANTE DE LA VÍA MEP EN PLANTAS Y BACTERIAS

Diversos estudios han confirmado que DXS es una enzima limitante tanto en plantas como en bacterias. En las plantas, particularmente en *A. thaliana* se ha comprobado que la sobreexpresión de DXS incrementa los niveles de diversos isoprenoides como clorofilas, carotenoides, tocoferoles, fitohormonas como el ácido abscísico, entre otros (Tabla 3). Concordante con esto, la disminución de los niveles de DXS genera el efecto inverso (Estévez *et al.*, 2001; Botella-Pavía *et al.* 2004; Enfissi *et al.*, 2005). El papel de DXS como enzima limitante se ha observado en diversas especies de plantas incluyendo tomate, Ginkgo biloba y la papa (Lois *et al.*, 1998; Enfissi *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006; Morris, 2006).

En estos reportes hay una correlación entre los niveles de proteína DXS y sus productos finales, pero no a nivel de transcrito (Estévez *et al.*, 2001; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Enfissi *et al.*, 2005; Guevara-García *et al.*, 2005; Carretero-Paulet *et al.*, 2006).

**Tabla 3. DXS es una enzima limitante en las plantas**

<b>Especies de plantas</b>	<b>Papel de DXS</b>	<b>Referencias</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Produce acumulación de productos finales de isoprenoides como clorofilas, carotenoides, tocoferoles, algunas fitohormonas como ABA.	Estévez <i>et al.</i> , 2001
<i>Antirrhinum majus</i>	Produce acumulación de isoprenoides volátiles que correlaciona con un patrón de oscilación de ritmo circadiano.	Dudareva <i>et al.</i> , 2005
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Produce acumulación de carotenoides en las flores.	Kishimoto y Ohmiya, 2006
<i>Elaeis guinensis</i>	Aumenta la biosíntesis de $\beta$ -caroteno en los frutos.	Khemvong y Suvachittanont, 2005
<i>Ginkgo biloba</i>	Aumenta la producción de ácido araquidónico, ácido salicílico, etc, en tejidos fotosintéticos.	Gong <i>et al.</i> , 2006
<i>Lavandula latifolia</i>	Aumenta la producción de aceites esenciales en plantas transgénicas de lavanda.	Munoz-Bertomeu <i>et al.</i> , 2006
<i>Pinus densiflora</i>	Acumulación de la resina en la madera.	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Populus trichocarpa</i>	Aumenta la producción del isopreno volátil durante el día.	Wiberley <i>et al.</i> , 2009
<i>Solanum lycopersicum</i> ,	Aumenta la producción de carotenoides en tejidos fotosintéticos y en el fruto.	Enfissi <i>et al.</i> , 2005; Lois <i>et al.</i> , 2000
<i>Vitis vinifera</i>	Produce acumulación de altos niveles de terpenoides	Duchêne <i>et al.</i> , 2009

En *E. coli* se ha confirmado que un aumento de la expresión de DXS es concordante con el aumento de su actividad enzimática y esto incrementa proporcionalmente la acumulación de productos finales de isoprenoides endógenos como los monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, hopanoides y las cadenas prenil de la ubiquinona 8 (UQ-8) (Harker y Bramley, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003; Reiling *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). Se ha sobreexpresado el gen *DXS* en bacterias con fines biotecnológicos, los trabajos más destacados han sido la síntesis de compuestos de interés comercial como el taxadieno, el isopreno, el ácido artemisínico y los carotenoides (Tabla 3) (Harker y Bramley, 1999;

Miller *et al.*, 1999; Matthews y Wurtzel, 2000; Huang *et al.*, 2001; Morrone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Kim y Keasling, 2001). Asimismo, se ha corroborado que la sobreexpresión de DXS incrementa casi 10 veces la acumulación de carotenoides como licopeno y zeaxantina en *E. coli* (Matthews y Wurtzel, 2000). Por otro lado, se ha determinado que la sobreexpresión de otros genes de la vía también aumentan la producción de carotenoides; sin embargo, este aumento es menor que el alcanzado mediante la sobreexpresión de DXS (Tabla 3) (Sandmann *et al.*, 1999; Cunningham y Gantt, 2000; Kim y Keasling, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2006). Actualmente, también existen diversas aproximaciones en la producción de compuestos de importancia económica en *E. coli* a través de ingeniería genética sobreexpresando los genes de la vía MVA y la vía MEP (González-Cabanelas D *et al.*, 2016). Sin embargo nuestro trabajo está enfocado a la regulación de la vía MEP.

**Tabla 4. Aplicaciones en la producción de metabolitos de isoprenoides utilizando DXS**

Productos	Comentarios	Referencia
<b>Taxadieno</b>	El taxadieno es producido naturalmente en las plantas de <i>Taxus cuspidata</i> , el cual es un precursor del diterpeno que genera la droga anticancerígena de taxol. Los primeros estudios para la producción de taxadieno por medio de ingeniería metabólica en <i>E. coli</i> se realizaron mediante la sobreexpresión de DXS, IDI, GGPP (geranil geranil difosfato) sintasa y la taxadieno sintasa. Se confirmó que DXS aumenta los productos finales de isoprenoides, en comparación con otras enzimas de la vía. Actualmente se ha logrado producir taxadieno a nivel industrial utilizando diversas combinaciones de cuatro enzimas de la vía: DXS, HDS, HDR e IDI.	Ajikumar <i>et al.</i> , 2011; Huang <i>et al.</i> , 2001; Zhao <i>et al.</i> 2013
<b>Ácido Artemisínico</b>	Se ha utilizado ingeniería metabólica de la vía MEP para la producción de este diterpeno (20C) mediante la sobreproducción de tres genes, <i>Dxs</i> , <i>Dxr</i> e <i>Idi</i> . Asimismo, la sobreexpresión de DXS se ha utilizado para la producción de ácido artemisínico, un precursor de sesquiterpenos antimaláricos,	Morrone <i>et al.</i> , 2010

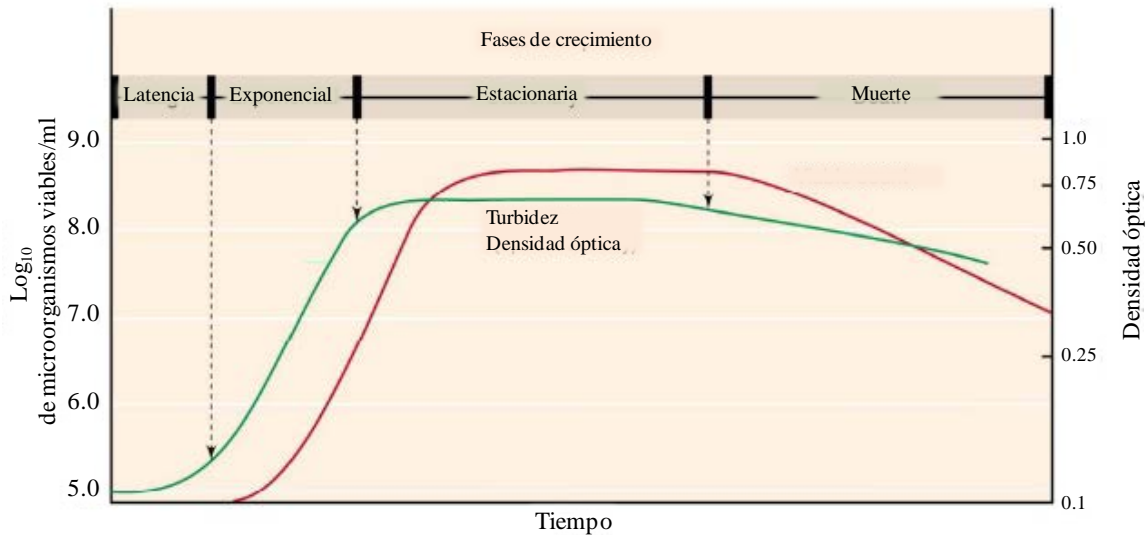


<b>Carotenoides</b>	Los carotenoides tienen diversas funciones, ya que actúan como antioxidantes, sirven como pigmentos y son las unidades estructurales para el aparato fotosintético. La sobreexpresión de DXS en la vía MEP, causa un aumento en la producción de carotenoides en <i>E. coli</i> , este incremento es mayor, respecto a otras enzimas de la vía. Se ha determinado que la sobreexpresión de DXS aumenta de 2-7 veces los niveles de acumulación de licopeno.	Abrecht <i>et al.</i> , 1999; ; Harker and Bramley, 1999; Cunningham <i>et al.</i> , 2000; Matthews y Wurtzel, 2000; Miller <i>et al.</i> , 2000; Kim y Kleasling, 2001; Reiling <i>et al.</i> , 2004; Kang <i>et al.</i> , 2005; Yuan <i>et al.</i> , 2006
<b>Isopreno</b>	La sobreexpresión de DXS o DXR de <i>Bacillus subtilis</i> en <i>E. coli</i> , resulta en un aumento de 2 veces la producción de isopreno, el cual actúa como un combustible.	Zhao <i>et al.</i> , 2011

### ***Escherichia coli* COMO MODELO DE ESTUDIO**

*E. coli* es una bacteria Gram negativa que ha sido un modelo de estudio por su tiempo corto de duplicación y por su facilidad de crecimiento en el laboratorio, asimismo ha sido utilizada en biología molecular como hospedero de vectores de clonación de genes y de expresión de diversas enzimas, así como en la producción de metabolitos de importancia industrial y biotecnológica (Matthews y Wurtzel, 2000; Kang *et al.*, 2005; Croteau *et al.*, 2006; Jin y Stephanopoulos, 2007; Yoon *et al.*, 2008; Ajikumar *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Flux *et al.*, 2012).

El crecimiento de cultivos bacterianos de *E. coli* se ha estudiado ampliamente, éste presenta un tiempo estimado de duplicación de 20 min en un sistema cerrado o medio de cultivo no renovado, también llamado cultivo monofásico. El cultivo monofásico tiene una curva de crecimiento típica de una población bacteriana que puede dividirse en cuatro fases: la fase de latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte (Figura 9) (Madigan *et al.*, 2003).



**Figura 9** El cultivo monofásico sigue una curva de crecimiento típica de una población bacteriana graficada en función de las células viables en un tiempo determinado. El número de células viables puede determinarse a través de la densidad óptica medida con una longitud de onda de 600 nm. La curva de crecimiento tiene cuatro fases: la fase de latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte (Madigan *et al.*, 2003).

La fase de latencia es el tiempo en que tarda en comenzar el crecimiento microbiano en un cultivo nuevo, en esta fase no hay duplicación de las bacterias. Posteriormente, la fase exponencial ocurre cuando cada célula se duplica en un periodo determinado de tiempo, el cual inicia a partir de una densidad óptica de aproximadamente 0.2 (Figura 9). Las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico óptimo y, por ello, en su punto medio son las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales de las proteínas (Madigan *et al.*, 2003). Posteriormente, la población alcanza la fase estacionaria que inicia a partir de una densidad óptica de 0.7, durante esta fase los nutrientes esenciales del medio son limitantes, asimismo suelen acumularse algunos productos del desecho metabólico que inhiben un crecimiento óptimo (Figura 9). Durante la fase estacionaria no hay un aumento, ni decremento neto del número celular (Nyström *et al.*, 2004). Cuando el cultivo pasa a la fase estacionaria, las bacterias presentan una gran cantidad de cambios fisiológicos y morfológicos, incluyendo, disminución del volumen del citoplasma, cambio en la forma celular, compactación del nucleóide, cambios en la composición de la pared y membrana

celular y cambios en los constituyentes del citoplasma (Wagner *et al.*, 1999; Makinoshina *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2010; Sáenz *et al.*, 2015). Si la población continúa después de que haya alcanzado la fase estacionaria, algunas células pueden morir por intoxicación de los desechos metabólicos o por la falta de nutrientes, en este caso comienza la fase de muerte (Madigan *et al.*, 2003).

En la actualidad se han desarrollado cultivos microbianos capaces de producir múltiples compuestos a nivel industrial tales como insulina humana, hormona de crecimiento humano, interferón, diversas vacunas, enzimas industriales y metabolitos de interés comercial como los carotenoides o isoprenoides (Goeddel *et al.*, 1979; Matthews y Wurtzel, 2000). Entre algunos de los productos isoprenoides que se han producido con gran eficacia en *E. coli*, incluyen el taxol, algunos carotenoides como el licopeno, el  $\beta$ -caroteno, la zeoxantina, entre otros (Matthews y Wurtzel, 2000; Kang *et al.*, 2005; Croteau *et al.*, 2006; Jin y Stephanopoulos, 2007; Yoon *et al.*, 2008; Ajikumar *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Flux *et al.*, 2012).

## **LA VIDA MEDIA DE LAS PROTEÍNAS ESTÁ REGULADA POR PROTEASAS**

La degradación de las proteínas es un proceso esencial para responder a cambios en el ambiente, ya que controla los niveles de múltiples enzimas involucradas en diferentes vías biosintéticas. Se ha determinado que la proteólisis limita el tiempo de vida de las proteínas, las cantidades de la disponibilidad de las enzimas clave y elimina proteínas mal plegadas. Sin embargo, en las bacterias, los elementos de reconocimiento para proteasas en los diferentes sustratos no están bien definidos, mientras que en el citoplasma de los eucariontes existen múltiples ubiquitín ligasas que reconocen sustratos específicos para dirigirlos a una proteasa en común (Maurizi, 1987; Gottesman, 1996).

### ***La vida media de las proteínas en E. coli***

La vida media de las proteínas es el tiempo que tarda en degradarse el 50% de una proteína, esto depende del estado energético y de los requerimientos celulares. *E. coli* presenta diversos estados fisiológicos y morfológicos a lo largo del cultivo de crecimiento, y esto está dado por cambios en la expresión genética pero también cambios en la regulación post-

traduccional de algunas proteínas. En la fase inicial del crecimiento bacteriano empieza la síntesis de proteínas principalmente relacionadas al metabolismo de azúcares y componentes de ensamblaje del proto-anillo para comenzar la división celular (Baev *et al.*, 2006<sup>a</sup>; Rico *et al.*, 2013). Durante la fase exponencial, la vida media de las proteínas es menor a 40 min aproximadamente, la mayor parte de las proteínas durante esta fase de crecimiento son enzimas relacionadas al metabolismo de carbohidratos, utilización de glicerol y algunos aminoácidos (Baev *et al.*, 2006<sup>a,b,c</sup>). Por otra parte, durante la fase de crecimiento estacionario hay un cambio en la expresión genética dado principalmente por un cambio en la subunidad sigma de la RNA polimerasa ( $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{38}$ ), esta subunidad es la encargada del reconocimiento de genes relacionados a estrés y genes que ayudan a contener la fase estacionaria. La vida media de las proteínas en la fase estacionaria, es diversa, por un lado comienza la degradación de proteínas relacionadas al metabolismo del carbono y por otro, la vida media de las proteínas aumenta durante la fase estacionaria cuando son importantes durante esta fase de crecimiento. Tal es el caso de RpoS ( $\sigma^{38}$ ), la cual es una proteína que presenta diversos tipos de regulación y su vida media aumenta durante la fase estacionaria (Battesti *et al.*, 2004).

### ***Proteasas en E. coli***

La proteólisis en *E. coli* se da en parte por las proteasas dependientes de ATP, incluyendo a Lon, ClpXP y HflB (Gottesman, 1996). Algunos de los sustratos de estas proteasas incluyen a los factores sigma de la RNA polimerasa  $\sigma^{32}$  y RpoS, los cuales actúan en respuesta a choque térmico y durante la fase estacionaria, respectivamente (Gottesman, 1996; Hengge, 2009; Bougdour *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2010; Battesti *et al.*, 2011). En *E. coli*, Lon es la principal proteasa de este tipo y se encarga de la degradación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, la proteólisis selectiva bajo ciertas condiciones es un aspecto del cual se desconoce en bacterias y plástidos, a diferencia del sistema ubiquitín ligasa del citoplasma en eucariontes.

ClpXP es otra proteasa importante presente en *E. coli*, la cual tiene su homólogo que se encuentra en los cloroplastos y mitocondrias de las plantas. La proteasa Clp es una serin proteasa formada por un complejo de tres anillos con varias subunidades y proteínas reguladoras formando un complejo tipo barril: ClpA es un péptido regulatorio con actividad

de chaperona y ATPasa con dos sitios de unión a ATP. La subunidad ClpX también contiene actividades de ATPasa y chaperona, la cual tiene homología con la secuencia ClpA. Finalmente, la subunidad ClpP es la subunidad catalítica y actúa como peptidasa asociada a una subunidad con función de ATPasa. La estructura del complejo ClpP ha sido determinada por microscopía electrónica y se ha comprobado que es similar al sistema de proteasoma en eucariontes. En *E. coli*, la subunidad ClpX está codificada río debajo de ClpP en el mismo operón y la degradación de las proteínas generalmente requiere la participación de ambas (Kim *et al.*, 2009; Alexopoulos *et al.*, 2012).

Existen otras proteasas dependientes de ATP en *E. coli.*, tales como HSLV/CLPQ y HSLU/CLPY, sin embargo, estas proteasas son menos abundantes (Gottesman, 1996). Algunas de las proteasas que no requieren energía son: OmpT y su homólogo OmpP (OmpX), las cuales se encargan de la degradación principalmente de proteínas de virulencia como VirG, en bacterias patógenas (Gottesman, 1996). Mediante ingeniería genética, algunas cepas de *E. coli* han sido mutadas en genes que codifican para proteasas, con el fin de producir altas cantidades de proteínas de interés. Por ejemplo, mutaciones en la proteasa OmpT puede ayudar a prevenir la degradación de proteínas durante la purificación. Asimismo, mutaciones en HTPR permiten obtener agregados de proteínas insolubles. Por otro lado, en ausencia de Lon y ClpP no se observa degradación de proteínas anormales, lo cual ayuda a la producción de proteínas exógenas en el sistema de *E. coli* (Gottesman, 1996).

En *A. thaliana*, el estudio de la mutante *rif1* permitió proponer el papel de Clp, la cual se ha sugerido que es importante en la regulación de los niveles proteicos de algunas enzimas de la vía MEP (Koussevitzky *et al.*, 2007; Flores-Pérez *et al.*, 2008). La actividad de ClpP está afectada en las mutantes *rif* y se ha propuesto que las proteínas DXS, DXR y HDR podrían ser sustratos de degradación de esta proteasa (Sauret-Güeto *et al.*, 2006; Flores-Pérez *et al.*, 2008; Vranová *et al.*, 2013). Asimismo, se ha sugerido que la acción de ClpP sobre DXS, DXR y HDR podría regular la biosíntesis de isoprenoides, en diferentes momentos del estado fisiológico y funcional de los cloroplastos (Flores-Pérez *et al.*, 2008).

## **V. HIPÓTESIS**

La vida media de DXS en *Escherichia coli* será modulada en diferentes fases del cultivo bacteriano, similar a lo que ocurre en las plantas.

## **VI. OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

Analizar la vida media de la proteína DXS en *E. coli* durante el crecimiento bacteriano.

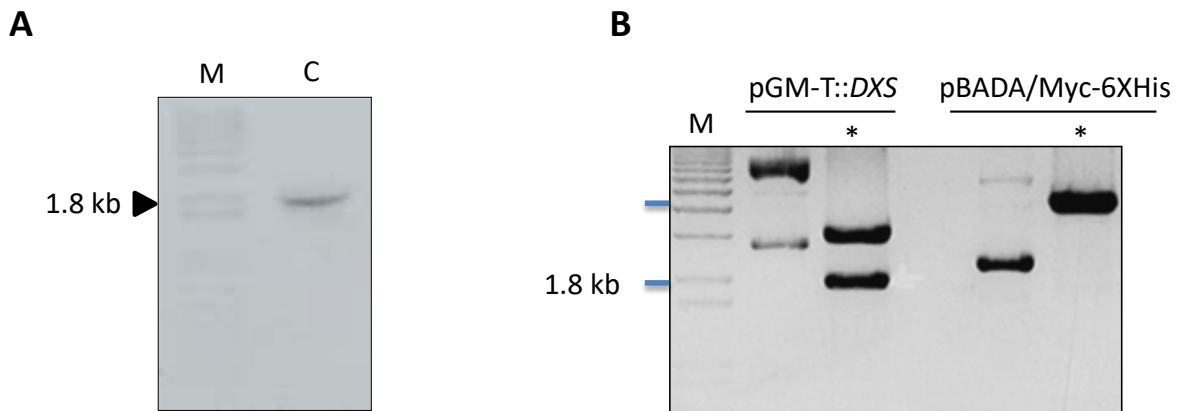
### ***Objetivos particulares***

1. Clonar el gen DXS de *E.coli* DH5 $\alpha$  y etiquetar la proteína en el sistema de expresión bacteriano.
2. Determinar la vida media de DXS en *E. coli* en la cepa DH5 $\alpha$  durante el crecimiento bacteriano.
3. Determinar la vida media de DXS en *E. coli* en la cepa BL21, deficiente en proteasas.

## VII. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

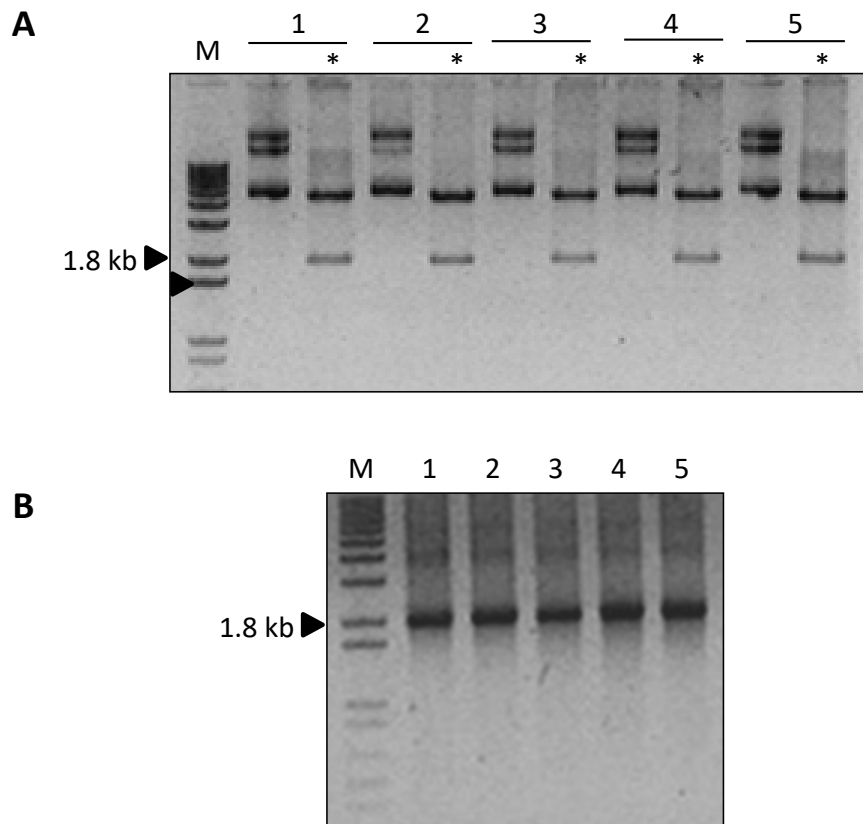
### AISLAMIENTO DEL GEN DXS DE *E. coli*

Con el fin de expresar la proteína DXS en *E. coli* se utilizó una etiqueta química (6XHis) que permitió su detección y purificación. El gen *DXS* de *E. coli* se amplificó por PCR a partir de una construcción previa que contenía al gen *DXS* en el vector pENTR/D/TOPO, para esto se diseñaron los oligonucleótidos dxspENTR\_fw 5' y dxspENTR\_rv 3', los cuales contienen los sitios de restricción *Nco*I y *Eco*RI, respectivamente (Ver anexo). Una vez amplificado, el gen *DXS* fue introducido al vector de clonación pGEM-T. La construcción pGEM-T-*DXS* fue digerida con enzimas *Nco*I y *Eco*RI y el fragmento que contiene al gen *DXS* se ligó en el vector pBADA/Myc-6XHis (Figura 10).



**Figura 10** Aislamiento del gen *DXS*. **A.** Electroforesis del producto de PCR utilizando los oligonucleótidos dxspENTR\_fw y dxspENTR\_rv (~ 1.8 kb, carril C). **B.** Electroforesis de las digestiones de la construcción pGM-T::*DXS* y del vector vacío pBADA/Myc-6XHis con las enzimas *Nco*I y *Eco*RI. Las líneas azules indican el tamaño de las bandas que fueron purificadas (—); M, marcador de peso molecular. El asterisco indica las muestras que fueron digeridas (\*). Geles de agarosa 1%.

Una vez obtenidos los fragmentos por la digestión (*NcoI* y *EcoRI*) de la construcción pGM-T::*DXS*, se realizó una reacción de ligación al vector pBADA/Myc-6XHis. Con el producto de la ligación, se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes (Ver anexo). Se analizaron 5 colonias que crecieron en el medio de incubación LB con antibiótico ampicilina (Amp) en una concentración de 100  $\mu$ g/ml. La presencia del plásmido pBADA/Myc-*DXS*-6XHis en estas colonias, fue confirmada por su patrón de digestión con *NcoI* y *EcoRI* y por PCR en colonia (Figura 11). Finalmente, el plásmido fue purificado y secuenciado en la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM, confirmando que la construcción se encuentra en fase.

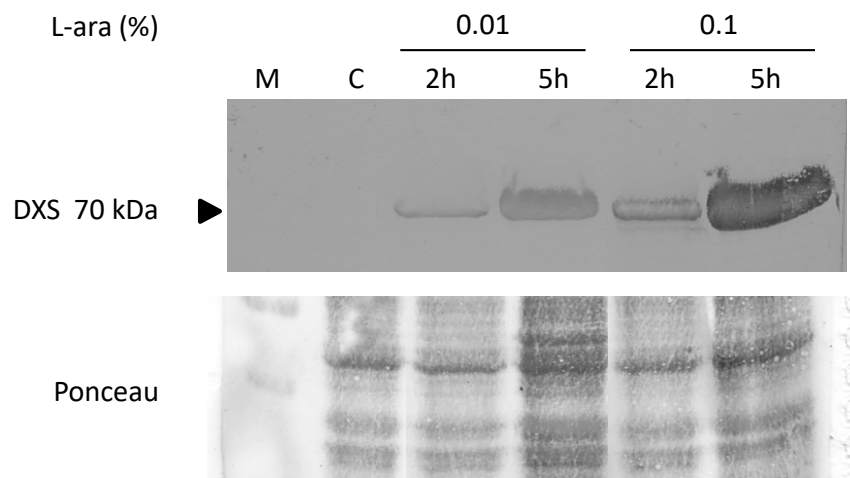


**Figura 11** Confirmación de la construcción pBADA/Myc-*DXS*-6XHis. **A.** Electroforesis de los productos de digestión de cinco colonias independientes. **B.** Productos de PCR en colonia, utilizando los oligonucleótidos dxspENTR\_fw y dxspENTR\_rv (~ 1.8 kb). M, indica el marcador de peso molecular; 1-5 indican las colonias analizadas; el asterisco (\*) indica las muestras que fueron digeridas con *NcoI* y *EcoRI*.



## EXPRESIÓN DE DXS EN EL VECTOR PBADA/MYC-6XHIS

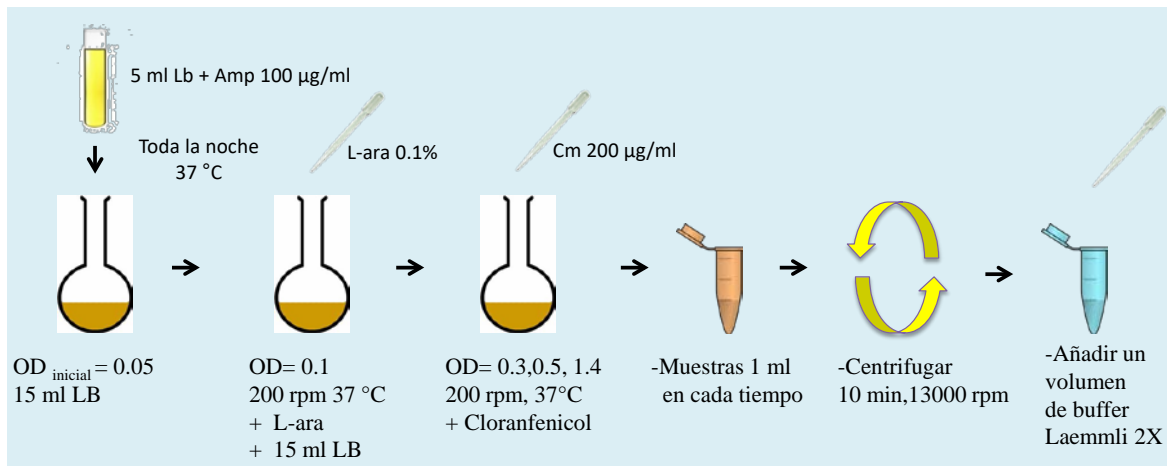
Para los análisis de la vida media de DXS se utilizó la construcción pBADA/Myc-DXS-6XHis contenida en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  crecidas en medio líquido LB Amp 100  $\mu$ g/ml toda la noche (16 h) a 37 °C, 200 rpm. Al siguiente día, se inoculó un cultivo con 1% del precultivo para un volumen final de 50 ml de medio LB nuevo. El vector de expresión pBADA/Myc-6XHis contiene un promotor inducible con arabinosa (L-ara), con el propósito de estandarizar las condiciones para el análisis de vida media, se probaron dos concentraciones de L-ara (0.01 y 0.1%). De acuerdo al análisis de la proteína por Western-blot, se decidió utilizar la concentración 0.1% de L-ara para análisis posteriores de la vida media de DXS (Figura 12).



**Figura 12** Análisis de proteína por medio de Western-blot anti His. Se probaron dos concentraciones de L-ara: 0.01 y 0.1%. Se tomaron muestras a las 2 y a las 5 h después de añadir L-ara. ► indica la banda que corresponde a DXS en un tamaño de ~ 70 kDa. La tinción de la membrana con rojo Ponceau se utilizó como control de carga. M, indica el marcador de peso molecular; C, indica el carril control sin L-ara.

## ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN *E. coli*

En los análisis de vida media se determinó el tiempo en que se degrada el 50% de la proteína de DXS en *E. coli* para esto, utilizamos cloranfenicol (Cm) como inhibidor de la traducción (Bougdour *et al.*, 2008; Takaya *et al.*, 2005). Con este objetivo, se realizó un precultivo de bacterias conteniendo la construcción de interés en medio LB suplementado con Amp 100  $\mu\text{g/ml}$  toda la noche (16 h) a 37 °C y 200 rpm, 0.5 ml de este cultivo se inoculó en un matraz de 50 ml. La vida media de DXS se determinó en dos fases de crecimiento en cultivo, durante la fase exponencial ( $\text{DO}_{600}=0.3$  y 0.5) y en la fase estacionaria ( $\text{DO}_{600}=1.5$ ). Una vez crecido el cultivo a la densidad óptica deseada, las células fueron tratadas con 200  $\mu\text{g/ml}$  de Cm como concentración final, para inhibir la traducción bacteriana. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos, las cuales fueron centrifugadas por 10' a 13 000 rpm para posteriormente añadir el buffer Laemmli 2X a la pastilla celular, que fue homogenizada con vórtex para la obtención de las proteínas (Figura 13). Las muestras de proteína analizadas por Western-blot, no fueron cargadas con la misma cantidad de proteína, sino que las muestras fueron ajustadas para cargar la proteína correspondiente al mismo número celular, puesto que nuestro análisis se basa en la inhibición de la traducción.



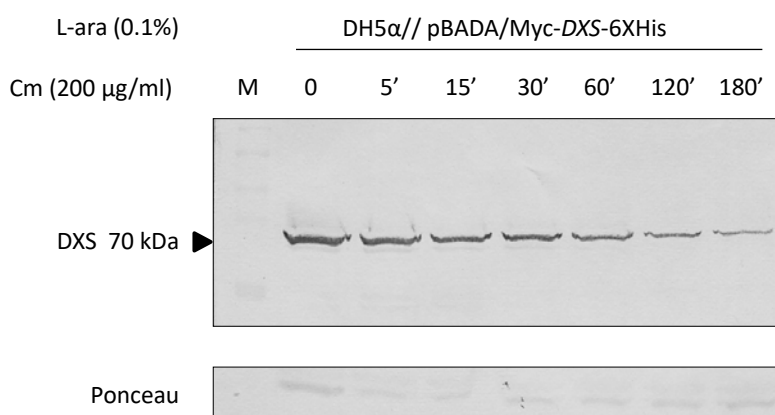
**Figura 13** Procedimiento para el análisis de la vida media de DXS en *E. coli*.

## ELECTROFORESIS SDS PAGE

Las muestras de proteínas totales fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes SDS-poliacrilamida 10%, utilizando el buffer Tris-glicina y se separaron por tamaño en una corrida a 120 V por 2 h, aproximadamente (Bolt y Mahoney, 1997).

### ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA WESTERN-BLOT

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 60 min a un amperaje de 0.3 A, en una cámara de transferencia a 4 °C. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se corroboró la transferencia a través de teñir la membrana con rojo de Ponceau al 0.2% (Ver anexo). El patrón de la tinción se utilizó como control de carga. Posteriormente, la misma membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS toda la noche. Posteriormente, el exceso de leche se eliminó con tres lavados de 5 min, utilizando la solución de PBS. Como siguiente paso, se agregó el anticuerpo primario (Anti-His) durante 2 h en agitación y se lavó la membrana con 3 lavados de 5 min con la solución de PBS. Después se agregó el anticuerpo secundario (anti HRP para ratón), durante 1 h, a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con la solución PBS. La membrana se reveló por la reacción de fosfatasa alcalina (Figura 14).



**Figura 14** Análisis por Western-blot de la proteína DXS para ensayos de vida media. Western-blot anti-His usando la construcción DH5 $\alpha$ //pBADA/Myc-DXS-6His. Arabinosa (L-ara) al 0.1%; cloranfenicol (Cm) al 200  $\mu$ g/ml; 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 indican los minutos después de añadir el cloranfenicol. Membrana teñida con rojo Ponceau, como control de carga.  $\blacktriangleright$  indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.

## VIII. RESULTADOS

La deoxy-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) es la primera enzima de la vía MEP y uno de los componentes limitantes de la vía (IPP/DMAPP). En nuestro laboratorio se ha investigado la regulación de la proteína DXS en plantas y se ha corroborado que DXS es una enzima regulada a nivel post-traducciona, la cual cambia su vida media en respuesta al estado metabólico del plástido (Chenge, 2012; Cordoba *et al.*, 2009; Guevara-García *et al.*, 2005; Sauret-Güeto *et al.*, 2006). Con base en la alta homología que presentan las proteínas DXS entre plantas y de *E. coli*, en este trabajo se decidió analizar la vida media de la proteína DXS en diferentes fases del crecimiento del cultivo bacteriano.

Como primer objetivo se aisló el gen *DXS* de *E. coli* y se clonó en el vector de expresión pBADA/Myc-6XHis, bajo el control de un promotor inducible por L-ara y en fase con una secuencia de DNA que codifica para seis histidinas, lo cual permitió la detección de DXS-X6His mediante ensayos de Western-blot usando anticuerpos anti-His. Posteriormente, analizamos la vida media de la proteína DXS en diferentes fases del cultivo bacteriano. La primera fue en la fase exponencial ( $DO_{600}=0.3$  y  $DO_{600}=0.5$ ), en la cual las células se duplican rápidamente. La segunda, es la fase estacionaria ( $DO_{600}=1.4$ ), donde las células se duplican con mayor lentitud como consecuencia del crecimiento poblacional y la poca disponibilidad de nutrientes (Navarro *et al.*, 2010; Battesti *et al.*, 2011).

### ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN FASE EXPONENCIAL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

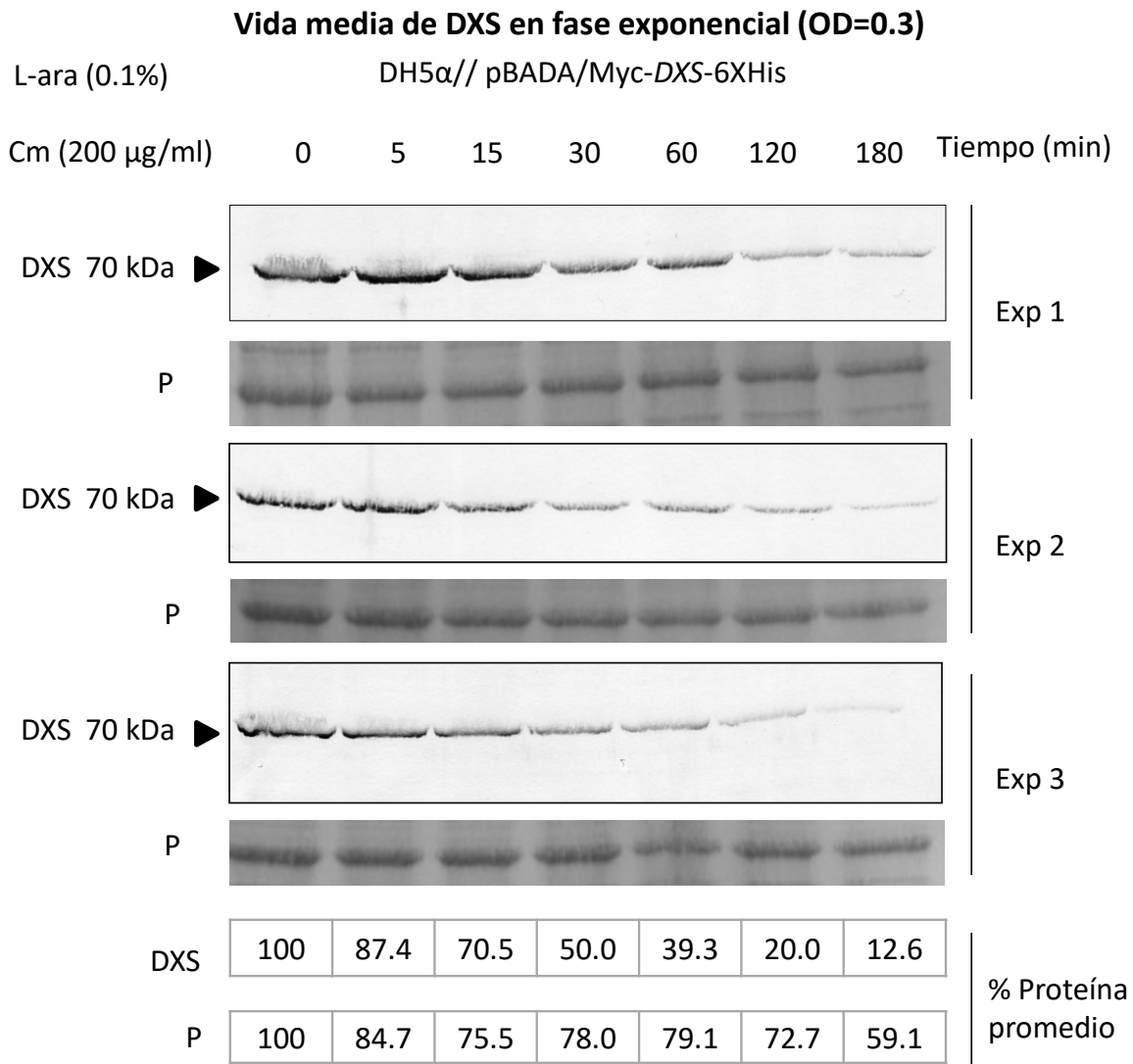
El primer análisis de vida media de DXS se realizó durante el crecimiento exponencial ( $DO=0.3$ ) de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que contienen la construcción pBADA::Myc-DXS-6XHis. Con este propósito, las células fueron crecidas en medio LB suplementado con L-arabinosa (L-ara) al 0.1% para permitir la expresión del gen *DXS* (Figura 15) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 medida con una longitud de onda de 600 nm ( $OD_{600}=0.3$ ). Posteriormente, se inhibió la traducción en el cultivo a través de la adición de 200  $\mu$ g/ml de cloranfenicol (Cm) y a partir de este momento se tomaron muestras de 1 ml a los 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min, siendo el tiempo cero el momento en que se agregó el Cm.

Finalmente, se extrajo proteína total de cada muestra para su análisis mediante ensayos de Western-blot, usando anticuerpos anti-His (Figura 15).

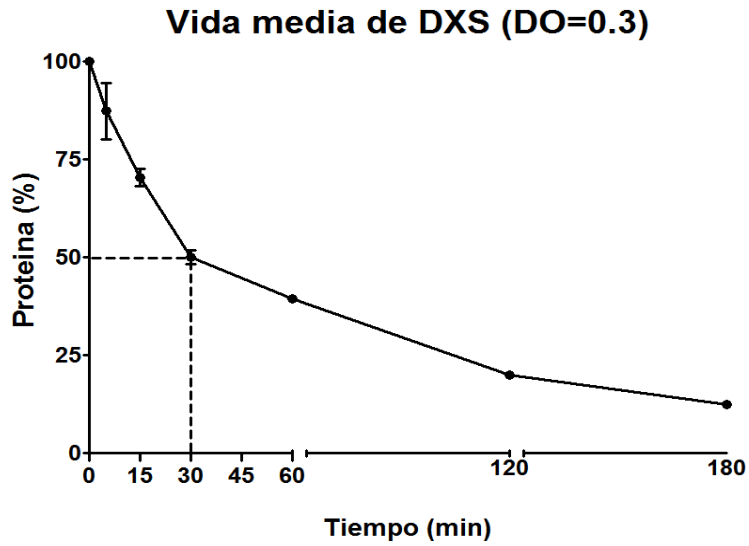
Las muestras de proteínas para cada tiempo se cargaron en un gel desnaturizante SDS PAGE al 10%. El cargado del gel no se realizó utilizando la misma cantidad de proteína, sino se cargó la proteína correspondiente al mismo número celular. Las muestras se ajustaron de manera proporcional a la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, como se encuentra descrito en ensayos donde se inhibe la traducción de proteínas (Zhou, 2004). En cada tiempo se analizó la abundancia de la proteína DXS mediante el programa Image J, en el cual los datos fueron normalizados tomando como 100%, el tiempo cero (Figura 15).

Nuestros datos muestran que la proteína DXS disminuye (~84%) a los 180 min después del tratamiento con Cm (Figura 15). Asimismo, en la figura 16 se muestra en gráfico la vida media de DXS, la cual se calculó en alrededor de ~30 min durante la fase exponencial ( $DO_{600}=0.3$ ). Con el fin de confirmar si la condición usada para la inhibición de la traducción era la óptima, se probó el doble de la concentración de Cm (400  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figuras 17 y 18). En este segundo experimento se inhibió ~91% la abundancia de proteína DXS a los 120 min y se obtuvo una vida media de ~33 min (Figura 18).

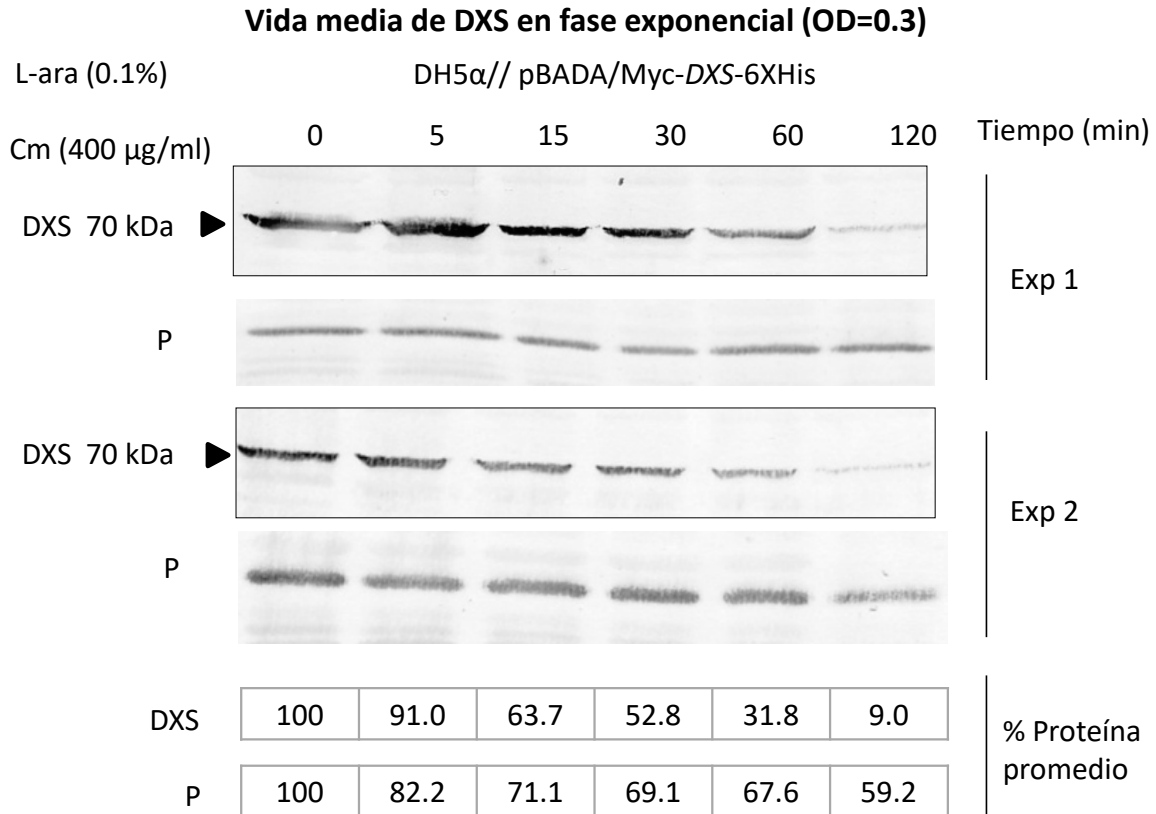
Por lo tanto ambos experimentos, usando diferentes concentraciones de Cm para inhibir la traducción, la cantidad relativa de una de las proteínas presentes en el extracto total usado en los ensayos de Western-blot, fue afectada en menor grado que la DXS, desde los 15 a los 180 min (Figuras 15-18). En conjunto, estos datos confirman que la vida media de DXS es alrededor de 30 min durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano, a una densidad óptica de 0.3.



**Figura 15** Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial (DO=0.3) en células crecidas con Cm (200  $\mu$ g/ml). Tres experimentos independientes (Exp 1, 2, 3) de análisis por Western-blot anti-His de los ensayos de la vida media y la cuantificación de la proteína por Image J (% proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 0.1%; Cm, cloranfenicol; 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de añadir el cloranfenicol; P, membrana teñida con rojo Ponceau; ► indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.

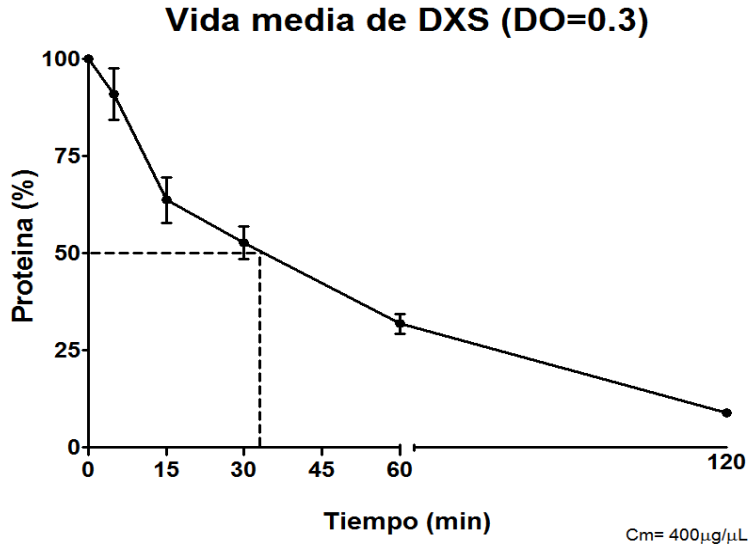


**Figura 16** Vida media de DXS en la fase exponencial (OD=0.3), con Cm (200 µg/ml). En el eje Y se graficó el porcentaje de proteína normalizado a 1 en el tiempo cero. En el eje X se muestra el tiempo en minutos. La línea punteada indica el 50% de proteína alrededor de 30 min.



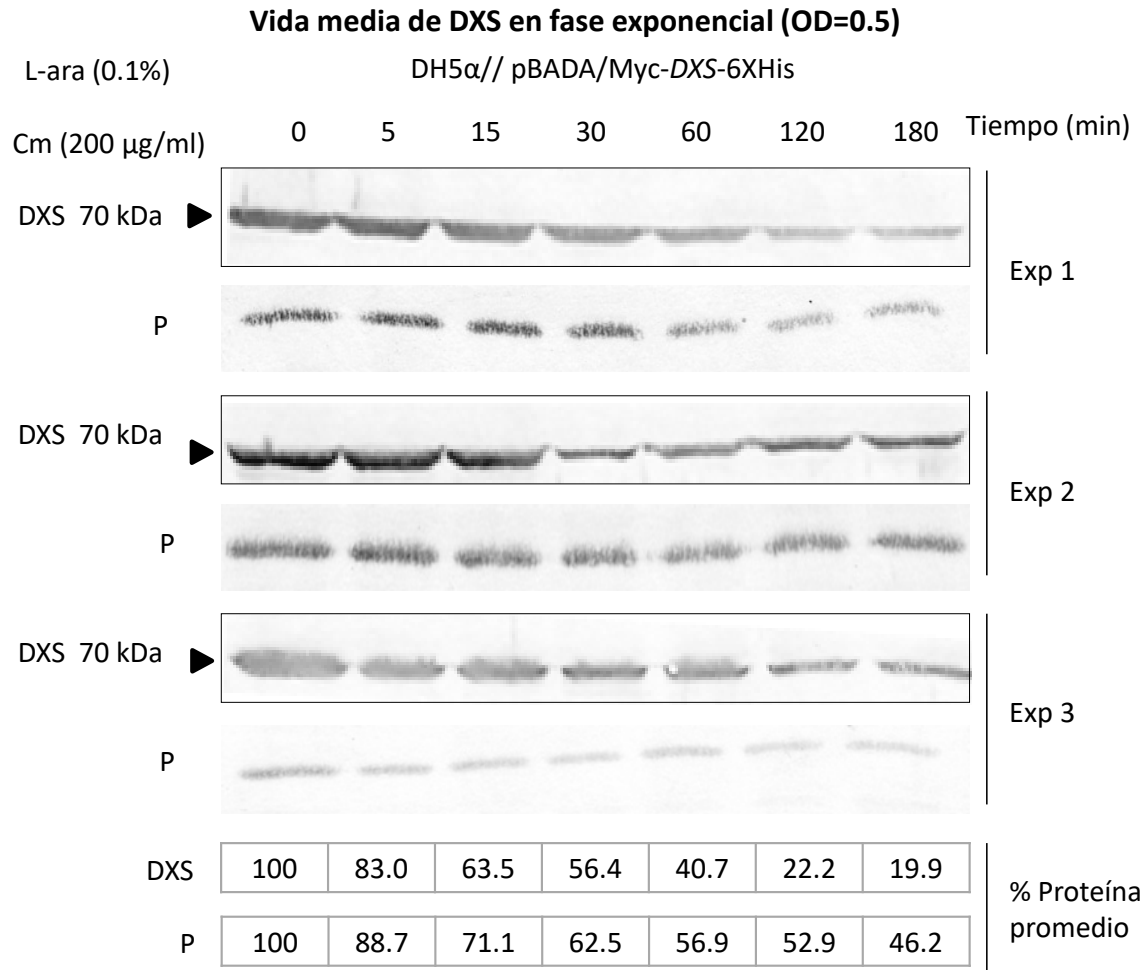
**Figura 17** Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial (OD=0.3) con Cm (400 µg/ml). Dos experimentos independientes (Exp 1, 2) de análisis por Western-blot anti-His de los ensayos de la vida media y la cuantificación de la proteína por Image J (% proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 1%; Cm, cloranfenicol; 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min después de añadir el cloranfenicol; P, membrana teñida con Ponceau; ▶ indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.



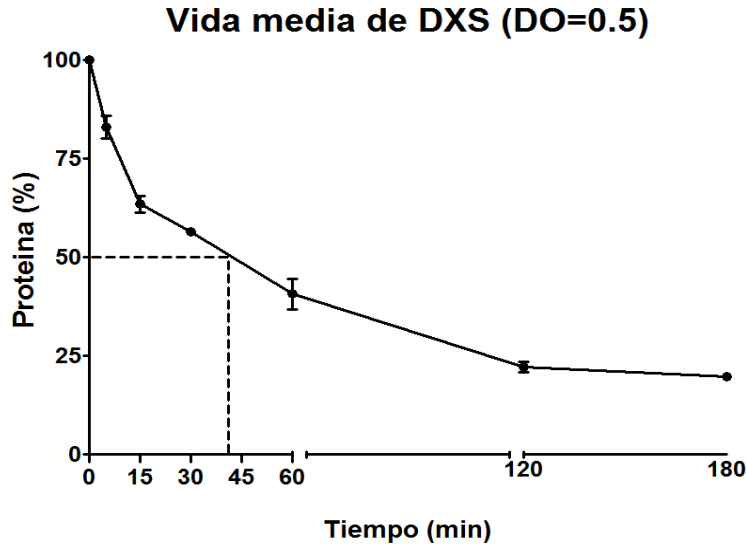


**Figura 18** Vida media de DXS en la fase exponencial (OD=0.3) con Cm (400 µg/ml). En el eje Y se graficó el porcentaje de proteína normalizado a 1 en el tiempo cero. En el eje X se muestra el tiempo en minutos. La línea punteada indica el 50% de proteína alrededor de 30 min.

Para determinar si la vida media de DXS es igual en momentos diferentes de la fase exponencial, se decidió analizar la vida media de DXS en otro momento de la misma fase (DO<sub>600</sub>=0.5). En la figura 19, se muestra la abundancia de la proteína DXS de tres experimentos independientes, aquí se observó que la vida media es alrededor de 40 min a una densidad óptica de 0.5 medido a la misma longitud de onda (600 nm), esto es diferente a lo que habíamos obtenido con una densidad óptica de 0.3 (Figuras 19 y 20).



**Figura 19** Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase exponencial (OD=0.5) con Cm (200  $\mu$ g/ml). Tres experimentos independientes (Exp 1, 2, 3) de análisis por Western-blot anti-His de los ensayos de la vida media y la cuantificación de la proteína por Image J (% proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 1%; Cm, cloranfenicol; 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de añadir el cloranfenicol; P, membrana teñida con rojo Ponceau; ► indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.



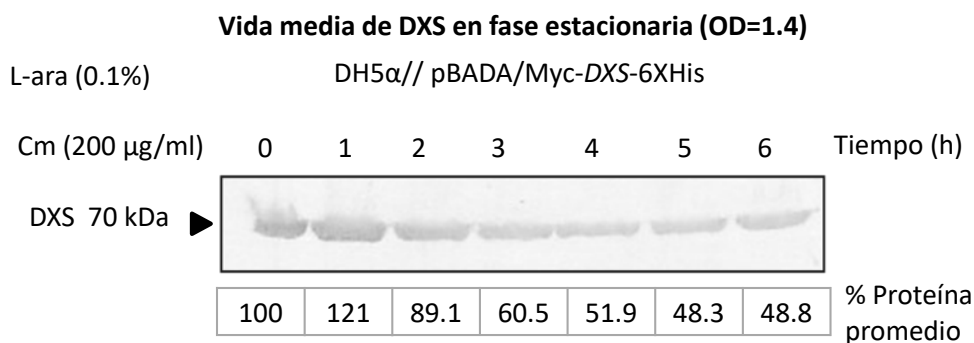
**Figura 20** Vida media de DXS en la fase exponencial (OD=0.5) con Cm (200 µg/ml). En el eje Y se graficó el porcentaje de proteína normalizado a 1 en el tiempo cero. En el eje X se muestra el tiempo en minutos. La línea punteada indica el 50% de proteína alrededor de 40 min.

### ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

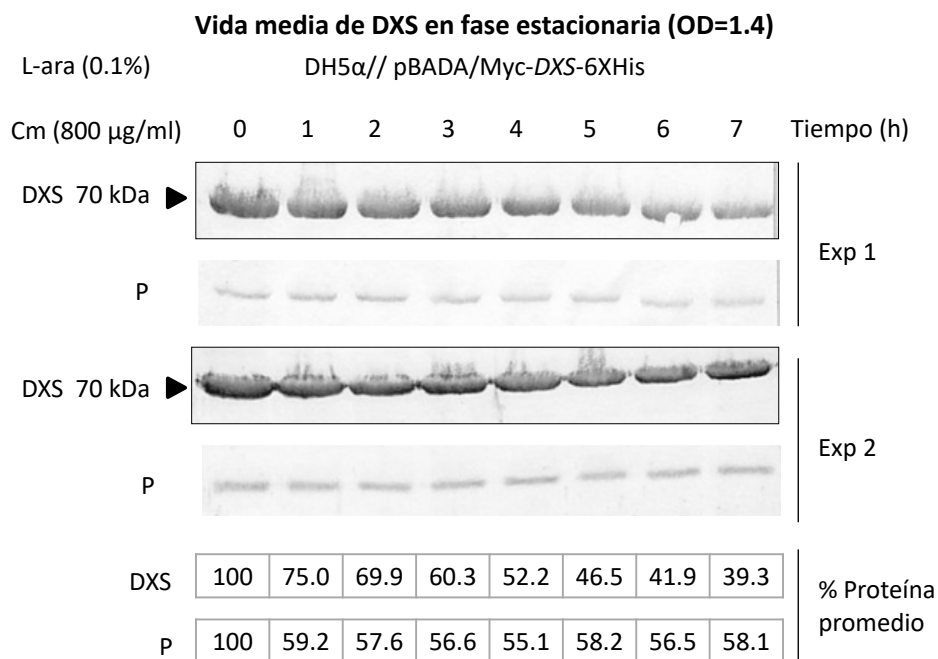
En el siguiente experimento se evaluó la vida media de DXS en fase estacionaria ( $DO_{600}=1.4$ ). Inicialmente se utilizaron los mismos parámetros experimentales que los usados en la determinación de la vida media durante en la fase exponencial que incluyen: L-ara a 0.1% y Cm a 200 µg/ml (Figura 21). Sin embargo, en estos nuevos experimentos observamos que la vida media de DXS parecía aumentar dramáticamente, incluso en las muestras tomadas hasta las 6 h (Figura 21). Para corroborar este resultado, se decidió incrementar la concentración de Cm a 800 µg/ml para asegurar que el sistema de inhibición de la traducción haya sido eficiente dado el número celular que existe en esta fase de crecimiento (Figuras 22 y 23). Con estos datos se determinó que la estabilidad de la proteína DXS aumentó en la fase estacionaria ( $DO_{600}=1.4$ ), siendo mayor a 4 h.

A pesar de la alta concentración de Cm utilizada, se observaron bajos niveles de degradación de DXS (~ 61%) incluso hasta 7 h después del tratamiento, por lo que la vida media es claramente mayor (>4 h) (Figura 23). Es importante mencionar que el crecimiento del cultivo se detuvo, observado por los datos obtenidos de la densidad óptica (Anexo).

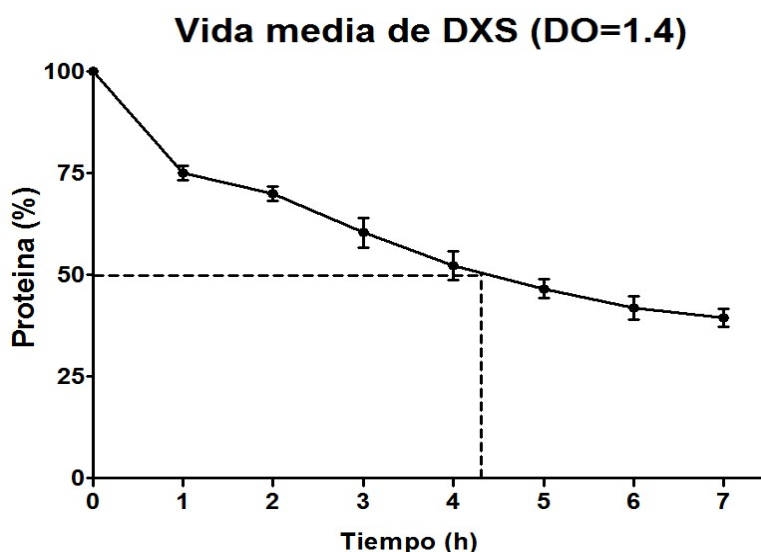
Confirmando que la estabilidad de la proteína DXS es consecuencia de un mecanismo de regulación a nivel de proteína durante la fase estacionaria y no por aumento del crecimiento del cultivo bacteriano o por algún problema con el tratamiento con Cm que no inhibiera la síntesis de proteínas.



**Figura 21** Análisis de los niveles de la proteína DXS durante la fase estacionaria (OD=1.4) con Cm (200 µg/ml). Análisis por Western-blot anti-His de un ensayo de la vida media y cuantificación de la proteína por Image J (% de proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 1%; Cm, cloranfenicol; 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h después de añadir el cloranfenicol; ► indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.



**Figura 22** Acumulación de la proteína DXS durante la fase estacionaria (OD=1.4) con Cm (800 µg/ml). Dos experimentos independientes (Exp 1, 2) de Western-blot anti-His a partir de ensayos de la vida media y la cuantificación de la proteína por Image J (% proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 1%; Cm, cloranfenicol; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h después de añadir el cloranfenicol; P, membrana teñida con rojo Ponceau, como control de proteínas más estables; ► indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.

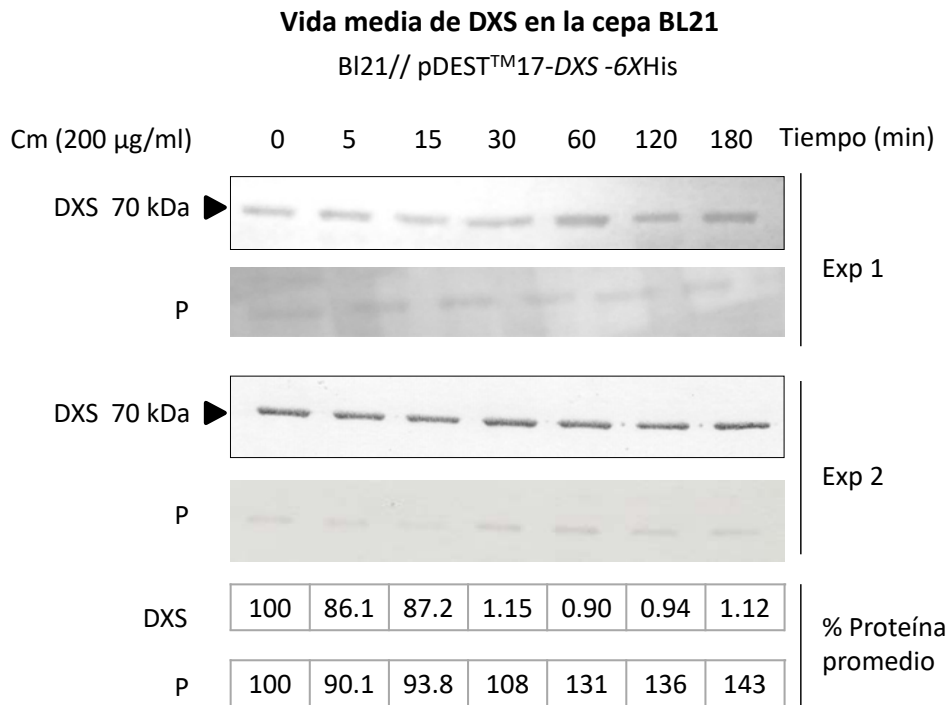


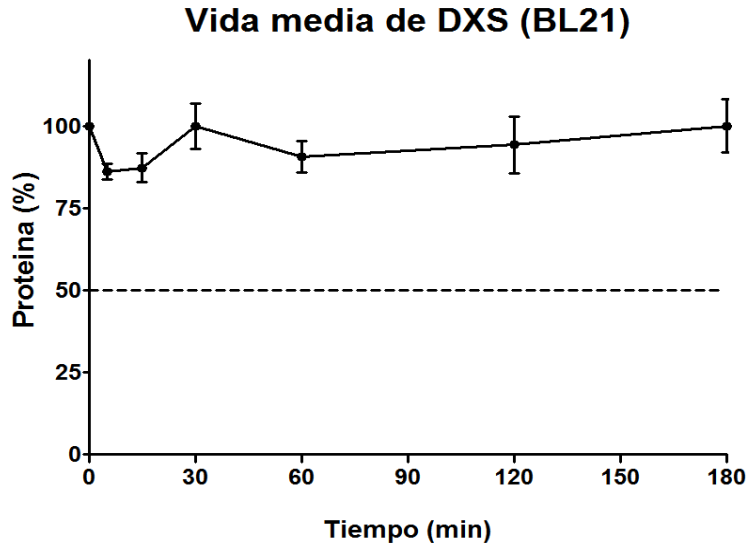
**Figura 23** Vida media de DXS en la fase estacionaria (OD=1.4) con Cm (800 µg/ml). En el eje Y se graficó el porcentaje de proteína normalizado a 1 en el tiempo cero. En el eje X se muestra el tiempo en horas. En azul indica el 50% de proteína alrededor de 4 h.

## ANÁLISIS DE LA VIDA MEDIA DE DXS EN LA AUSENCIA DE LAS PROTEASAS Lon y OmpT

El equilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas se logra gracias a la participación de diversas proteasas que actúan en momentos específicos del crecimiento y en respuesta a diversos factores ambientales. La cepa BL21 carece de las proteasas Lon y OmpT; Lon es una proteasa dependiente de ATP que degrada casi el 50% de las proteínas totales en las bacterias, mientras que OmpT se encarga de la degradación de proteínas extrañas, principalmente.

Para determinar si Lon u OmpT pudieran estar involucradas en la degradación de DXS, se analizó la vida media en la cepa BL21 durante la fase exponencial ( $DO_{600}=0.3$ ). Como se observa en las Figuras 25 y 26, en esta cepa no fue posible medir la vida media de DXS, ya que los niveles de proteína se encontraron constantes a lo largo del tiempo del tratamiento, incluso en las muestras tomadas después de 3 h. Estos datos indican que Lon, OmpT o ambas parecen estar involucradas en la degradación de DXS. Por lo tanto, estos datos preliminares conllevan a realizar un análisis más detallado de la vida media de la proteína DXS bajo un fondo mutante específico de cada una de estas proteasas.





**Figura 25** Vida media de DXS en la cepa BL21 durante la fase exponencial ( $DO=0.3$ ) con Cm ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). En el eje Y se graficó el porcentaje de proteína normalizado a 1 en el tiempo cero. En el eje X se muestra el tiempo en minutos. La línea punteada indica donde se ubicaría el 50% de la proteína en la gráfica.

**Figura 2 4** Análisis de los niveles de la proteína DXS en la cepa BL21 durante la fase exponencial ( $OD=0.3$ ) con Cm ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). Dos experimentos independientes (Exp 1, 2) de análisis por Western-blot anti-His de los ensayos de la vida media y la cuantificación de la proteína por Image J (% Proteína promedio); L-ara, L-arabinosa 0.1%; Cm, cloranfenicol; 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de añadir el cloranfenicol; P, membrana teñida con Ponceau, como control de proteínas más estables; ► indica la banda correspondiente a DXS de ~70 kDa.

## IX. DISCUSIÓN

El crecimiento bacteriano presenta diferentes fases que se encuentran divididas por el estado fisiológico de las células, lo cual está muy relacionado con la disponibilidad de nutrientes en un medio de cultivo no renovado (Madigan *et al.*, 2003). Las bacterias como *E. coli*, entran a una fase de crecimiento nulo o fase estacionaria al agotarse los nutrientes del medio, en esta fase la forma de las células se redondea, la pared celular se engrosa, se incrementa la resistencia celular, entre otros cambios (Madigan *et al.*, 2003). Algunos de los compuestos necesarios para la supervivencia, son derivados de isoprenoides de la vía MEP como los componentes de las membranas celulares, tales como los hopanoides y bactoprenoles (Flesch y Rohmer, 1988; Eisenreich *et al.*, 2004; Rohmer, 2008; Hemmerlin *et al.*, 2012).

La vía MEP es la única vía encargada de la síntesis de isoprenoides en la mayoría de las bacterias y la enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) es un componente limitante de esta vía (Sandmann *et al.*, 1999; Cunningham y Gantt, 2000; Kim y Keasling, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2006). Se ha determinado que la proteína DXS se encuentra altamente conservada en la evolución y se ha comprobado que los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP en plantas fueron adquiridos por simbiosis en la evolución a partir de bacterias tipo cianobacterias (Sprenger *et al.*, 1997). Asimismo, se ha determinado que las proteínas DXS de *E. coli* y *A. thaliana* presentan 43% de identidad (Lois *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2007), lo cual sugiere que algunos de los mecanismos importantes en su regulación, podrían estar conservados.

### LA PROTEÍNA DXS SE ESTABILIZA DURANTE LA FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

La proteína DXS es una enzima limitante de la vía MEP, ya que el aumento de esta proteína incrementa proporcionalmente la acumulación de productos finales de isoprenones como los monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, hopanoides y las cadenas prenil de la ubiquinona 8 (UQ-8) en *E. coli* (Harker y Bramley, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003; Reiling *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Sáenz *et al.*, 2015), por lo tanto, entender los procesos de regulación de DXS es de gran relevancia. En este trabajo se determinó que



la proteína DXS de *E. coli* tiene una vida media de ~ 30 min durante la fase exponencial (Figuras 15-20), mientras que durante la fase estacionaria del crecimiento, su vida media aumenta a más de 4 h (Figura 21-23). Asimismo, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la estabilidad de la proteína DXS durante la fase estacionaria ayuda a la viabilidad de las células, mediante un incremento de isoprenoides derivados de la vía MEP. Se ha observado que durante la fase estacionaria cambia la composición de ácidos grasos de la membrana citoplásmica (Kang *et al.*, 2005; Ramírez Santos *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010; Sáenz *et al.*, 2015; Boronat *et al.*, 2015). Asimismo, en la pared celular aumenta el peptidoglicano, mientras que en la membrana externa aumenta la cantidad de lipopolisacáridos (Nyström *et al.*, 2004), sugiriendo que podría haber una regulación positiva de la vía MEP como consecuencia de la estabilización de DXS durante esta fase del crecimiento del cultivo bacteriano. Por otro lado, durante la fase estacionaria se presentan cambios en el metabolismo general, como un aumento de los compuestos de reserva y de osmoprotección, lo cual contribuye a mantener la viabilidad celular y resistencia a diversos factores de estrés, como la radiación ultravioleta, el calor, etc., (Boronat *et al.*, 2015; Ramírez Santos *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010).

Resulta interesante que a pesar de que, durante la fase estacionaria disminuye la tasa global de síntesis de diversas macromoléculas como DNA, RNA, péptidos, etc, (Gottesman, 1996; Ramírez Santos *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010), la proteína DXS en contraste presenta una mayor estabilidad (Figura 22). Sugiriendo una vez más que DXS podría tener mayor importancia en la supervivencia bacteriana durante esta fase de crecimiento.

Anteriormente a este trabajo, no se había reportado que DXS en bacterias tuviera un mecanismo de regulación a nivel de la estabilidad de su proteína como ocurre en las plantas. Nuestros datos sugieren que DXS podría cambiar su vida media como ocurre en las plantas, en respuesta a los niveles de los productos finales de la vía, IPP y DMAPP (Guevara-García *et al.*, 2005; Cheng, 2012).

## LA PROTEÍNA DXS SE ESTABILIZA EN LA CEPA BL21

En este trabajo inicialmente empleamos la cepa BL21 de *E. coli*, en la cual no fuimos capaces de determinar la vida media de DXS, ya que la proteína parece ser muy estable en esta cepa (Figuras 24 y 25), incluso hasta las 7 h después del tratamiento con Cm cuando la densidad óptica del cultivo va decayendo (Ver anexo). Dado que la cepa BL21 es una cepa deficiente en Lon y OmpT, sugerimos que DXS podría ser regulada por alguna de estas proteasas.

Estudios previos, han determinado que la cepa BL21 de *E. coli* ha sido la cepa más eficiente para la producción de carotenoides, en comparación con otras cepas como K12MG1655, se sugiere que esto podría deberse a las modificaciones genéticas de la cepa BL21 que ha sido utilizada ampliamente para la expresión de proteínas (Rodríguez-Villalón *et al.*, 2008). Diversos estudios han determinado que la sobreexpresión de DXS en la cepa BL21, incrementa los niveles de productos finales de isoprenoides, con una mayor producción respecto a otras cepas (Querol *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011, 2013) .

## X. CONCLUSIONES

En este trabajo utilizamos un sistema de expresión de la proteína DXS de *E. coli*, expresada bajo un promotor inducible por L-ara. DXS presentó un aumento en la vida media de la proteína durante la fase estacionaria (>4 h), en comparación con la fase exponencial (30-40 min). Lo cual sugiere que DXS se estabiliza en condiciones de estrés, posiblemente por los requerimientos de isoprenoides que son necesarios durante esta fase, similar a lo observado en las plantas. Asimismo, sugerimos que la proteína DXS podría ser regulada a través de la proteasa Lon, OmpT o ambas, ya que la vida media de esta proteína se estabiliza en la cepa BL21.

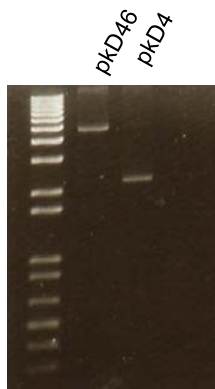
## XI. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, faltaría probar si la proteína DXS endógena es regulada por mecanismos de retroalimentación de sus productos finales, similar a lo que ocurre en plantas y qué hace que esta proteína se estabilice en estados fisiológicos particulares. Relacionado a esta incógnita, estudios recientes han demostrado que el IPP y el DMAPP inhiben a la enzima DXS por competencia con la tiamina difosfato en condiciones *in vitro* (Banerjee *et al.*, 2013), sugiriendo que la proteína podría ser regulada por las moléculas estructurales de los isoprenoides cuando hay un exceso.

De acuerdo a los análisis de la vida media de DXS en la cepa BL21, se sugiere que DXS es degradada por la proteasa Lon o OmpT. Como perspectiva, creemos que sería necesario analizar la vida media de DXS, bajo el fondo mutante de una proteasa específica. Las dos proteasas principales en *E. coli*, son Lon y ClpP, las cuales son proteínas altamente conservadas en la evolución. Se ha propuesto que el homólogo de ClpP en plantas podría ser responsable de la degradación de DXS (Rodríguez-Villalón *et al.*, 2008). Con la idea de estudiar con mayor detalle sobre estas posibilidades se construyeron mutantes de las dos proteasas principales, Lon y ClpP, por el sistema de reemplazamiento genético.

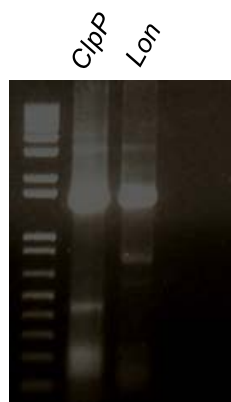
### REEMPLAZO GENÉTICO DE LON Y CLPP EN ESCHERICHIA COLI MEDIANTE EL SISTEMA DE DATSENKO Y WANNER, 2000

Se reemplazaron los genes de *Lon* y *ClpP* de *E. coli* DH5 $\alpha$  por una secuencia que confiere resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>). Para esto, primero se purificaron los plásmidos pKD46 y pKD4 donados por el laboratorio de Edmundo Calva en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Los plásmidos fueron analizados en un gel de agarosa 1% (Figura 26).



**Figura 26** Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos purificados que se utilizaron para reemplazo genético. PkD46, plásmido que contiene la recombinasa termosensible; PkD4, plásmido que contiene el cassette con resistencia a Km.

Como primer paso, se amplificó por PCR el cassette de Km<sup>R</sup> contenido en el plásmido pKD4 utilizando oligonucleótidos específicos a los que se añaden secuencias tanto homólogas a los genes de cada una de las proteasas de interés (H1 y H2) como al vector pKD4 (P1 y P2) (Anexo). Una vez obtenidos los productos de PCR de 4 reacciones independientes, se purificaron por fenol-cloroformo y cada reacción se resuspendió en un volumen final de 7 µl de agua mili-Q que fue analizado por PCR (Figura 27).

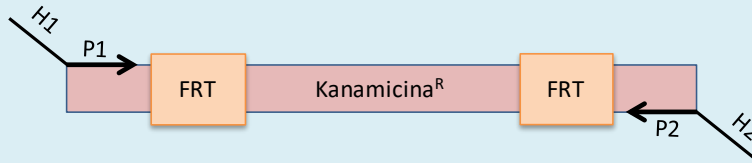


**Figura 27** Análisis por PCR del cassette que contiene resistencia a Km a partir del vector pKD4. Amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para el reemplazo de *ClpP* y *Lon* (Ver anexo).

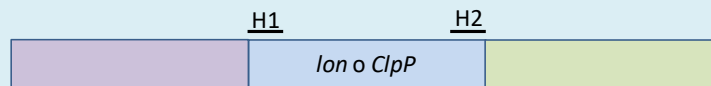
Subsecuentemente, se realizó una recombinación homóloga utilizando el sistema de recombinación del fago λ Rojo. La recombinasa del fago se encuentra bajo el control de un promotor inducible por L-ara en un plásmido de bajo número de copia (pKD46), este plásmido es sensible a temperatura. Se transformaron bacterias DH5α con el plásmido pKD46 y a partir de esta construcción se generaron nuevas células electrocompetentes que fueron transformadas con los productos de PCR descritos en el párrafo anterior. En este procedimiento, la recombinasa del fago λ Rojo reemplaza al gen de interés por la secuencia de resistencia mediante una recombinación homóloga (Figura 28).

### Sistema de reemplazo genético por Datsenko y Wanner, 2000

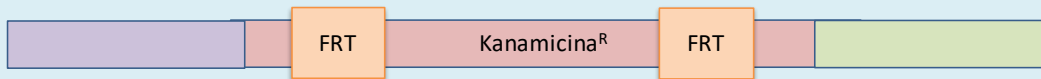
**Paso 1.** Se amplifica por PCR la secuencia de resistencia, usando oligonucleótidos que contienen en su región 5' secuencias homólogas (H1 y H2) al gen que se desea deletar.



**Paso 2.** Se generan células competentes que expresan la recombinasa  $\lambda$  Rojo bajo un promotor inducible y las células se transforman con los productos de PCR.

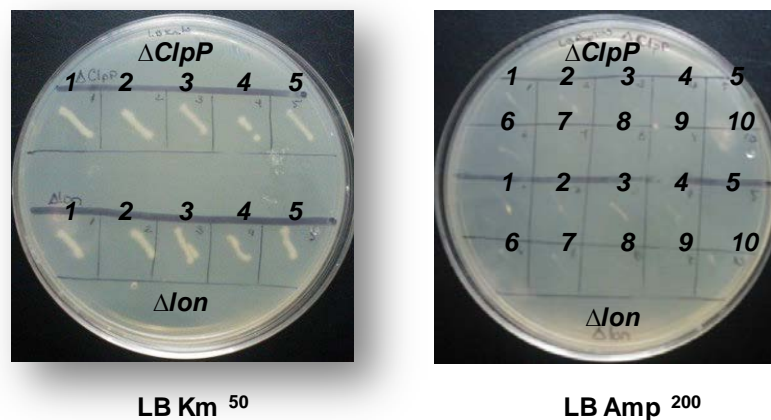


**Paso 3.** Se seleccionan las transformantes resistentes al antibiótico y se inactiva la recombinasa  $\lambda$  Rojo termosensible a 42°C.



**Figura 28** Sistema de reemplazo genético por Datsenko y Wanner, 2000. H1 y H2 indican las secuencias homólogas al gen que se desea reemplazar (*Lon o ClpP*). P1 y P2 son los sitios que se aparean con la secuencia que confiere resistencia a kanamicina. FRT son los sitios de recombinación reconocidos por la  $\lambda$  Rojo. Figura modificada de Datsenko y Wanner, 2000.

Finalmente, se aislaron 40 colonias de cada mutante ( $\Delta Lon$  y  $\Delta ClpP$ ) que fueron resistentes al medio de selección LB con Km 50 $\mu$ g/ml y crecidas a 42°C toda la noche (16 horas) para inducir la pérdida del plásmido pKD46 termosensible. Las colonias fueron pasadas 5 veces a una caja nueva en las mismas condiciones de selección. Por último, se probó el crecimiento de las colonias en medio LB con Amp 200 $\mu$ g/ml, en este último medio no crecieron, confirmando la pérdida del plásmido pKD46 (Figura 29). Las construcciones generadas se dejaron en glicerol y se extrajo DNA cromosómico de las bacterias que se quedó a disposición del laboratorio con el fin de continuar el trabajo y analizar la vida media de la proteína DXS bajo los fondos mutantes  $\Delta Lon$  y  $\Delta ClpP$ .



**Figura 29** Selección de mutantes  $\Delta ClpP$  y  $\Delta Lon$ . De lado izquierdo se observa la selección de cinco colonias obtenidas de la recombinación, las cuales fueron resistentes al medio LB con Km 50 $\mu$ g/ml. Del lado derecho se muestran las mismas colonias en medio LB con Amp 200 $\mu$ g/ml, las cuales no crecieron en este medio, corroborando la pérdida del plásmido pKD46.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ajikumar P, Xiao W, Tyo K, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon T, Pfeifer B, Stephanopoulos G. (2011). Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. **Science**.6000(330):70-74.
- Alexopoulos J, Guarné Ay Ortega, J.(2012). ClpP: a structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. **J Struct Biol**. 179(2):202–10.
- Ayala-Ochoa A, Vargas-Suarez M, Loza-Tavera H, Leon P, Jimenez-Garcia L, Sanchez-De-Jimenez E. (2004). In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. **Biochimie**.86:439-449.
- <sup>a</sup>Baev M, Baev D, Radek A, Campbell J. (2006) Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71(3):310-6.
- <sup>b</sup>Baev M, Baev D, Radek A, Campbell J. (2006) Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: determining metabolic strategy with transcriptional microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71(3):323-8.
- <sup>c</sup>Baev M, Baev D, Radek A, Campbell J. (2006) Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of amino acids, peptides, and nucleotides with transcriptional microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71(3):317-22.
- Banerjee A, Wu Y, Banerjee R, Li Y, Yan H. y Sharkey T.(2013). Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase regulates the methylerythritol 4-phosphate pathway. **J Biol Chem**. 288(23):16926–16936.
- Battesti A, Majdalani N. y Gottesman S.(2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. **Annu Rev Microbiol**. 65(1):189–213.
- Bolt M, Mahoney P. (1997). High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal Biochem**. 247(2):185-92.
- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodríguez-Concepción M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: Evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. **Plant J**. 40(2):188–199.
- Boronat A, Rodríguez-Concepción M. (2015) Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 148:3-18.



- Bougdour A, Cuning C, Baptiste P, Elliott T y Gottesman S. (2008). Multiple pathways for regulation of  $\sigma$ S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. **Mol Microbiol.** 68(2):298–313.
- Bouvier F, Rahier A, y Camara B.(2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **Progr Lipid Res.** 44(6):357–429.
- Campos N, Rodríguez-Concepción M, Sauret-Güeto S, Gallego F, Lois L, y Boronat A.(2001). *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis.**Biochem J.** 353(Pt 1):59–67.
- Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodríguez-Concepción M. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. **Plant Mol Biol.** 62(4-5):683–695.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway.**Plant Physiol** 129(4):1581–1591.
- Carretero-Paulet L, Cairó A, Talavera D, Saura A, Imperial S, Rodríguez-Concepción M, Campos N, Boronat A. (2013). Functional and evolutionary analysis of DXL1, a non-essential gene encoding a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase like protein in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 524(1):.40–53.
- Chappell J.(2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. **Curr Opin Plant Biol.** 5(2):151–7.
- Christmann M.(2010). Otto Wallach: founder of terpene chemistry and Nobel Laureate 1910. **Angew Chem.** 49(50):9580–6.
- Cordoba E, Porta H, Arroyo A, San Román C, Medina L, Rodríguez-Concepción M, León P. (2011). Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize. **J Exp Bot.** 62(6):2023–38.
- Cordoba E, Salmi M y León P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. **J Exp Bot.** 60(10):2933–2943.
- Croteau R, Ketchum R, Long R, Kaspera Ry Wildung M.(2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics.**Phytochem Rev.** 5(1):75–97.

- Croteau R, Kutchan Ty Lewis N. (2000). Secondary Metabolites. **Biochem Mol Biol Plants**. 7(7):1250–1318.
- Cunningham F y Gantt E, (2000). Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. **Plant Cell Physiol**. 41(1):119–123.
- Dewick P.(2002). The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways : terpenoids and Steroids. (Cap 5). **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2da Edición.167-289
- Duchêne E, Butterlin G, Claudel P, Dumas V, Jaegli N, Merdinoglu D. (2009). A grapevine (*Vitis vinifera L.*) deoxy-d-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content. **Theor Appl Genet**. 118(3):541–552.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proc Natl Acad Sci U S A** , 102(3):933–938.
- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cell Mol Life Sci**. 61(12):1401–1426.
- Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk M, Bacher A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. **Chem Biol**. 5(9):221–R233.
- Eisenreich W, Rohdich F y Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends Plant Sci**. 6(2):78–84.
- Enfissi E, Fraser P, Lois L, Boronat A, Schuch W, Bramley P.(2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. **Plant Biotechnol J**. 3(1):17–27.
- Ershov IuV. (2007). 2-C-Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis as a target in identifying of new antibiotics, herbicides, and immunomodulators (Review). **Prikl Biokhim Mikrobiol**. 43(2):133–157.
- Estévez J, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P.(2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **J Biol Chem**. 276(25):22901–9.
- Estévez J, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez L, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, León P. (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-

- deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. **Plant physiol.** 124(1):95–104.
- Farmer Wy Liao J(2001). Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in escherichia coli. **Biotechnol Progr.** 17(1):57–61.
- Ferhatoglu Yy Barrett M.(2006). Studies of clomazone mode of action. **Pest Biochem Phys** 85(1):7–14.
- Fitzpatrick T, Amrhein N, Kappes B, Macheroux P, Tews I, Raschle T. (2007). Two independent routes of *de novo* vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis: not that different after all. **Biochem J.** 407(1):1–13.
- Flesch G y Rohmer M.(1988). Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. **Eur JBiochem.** 175(2):405–11.
- Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, Jarvis P, Rodríguez-Concepción M.(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(5):1303–15.
- ChengQ(2012). Microbial Metabolic Engineering.**Methods Mol. Biol.** 834:49–62.
- Fraser P y Bramley, P.(2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog Lipid Res.** 43(3):228–265.
- Fraser P, Enfissi E, Halket J, Truesdale M, Yu D, Gerrish C, Bramley P. (2007). Manipulation of Phytoene Levels in Tomato Fruit: Effects on Isoprenoids, Plastids, and Intermediary Metabolism. **Plant Cell.** 19(10):3194–3211.
- Gabrielsen M, Rohdich F, Eisenreich W, Gräwert T, Hecht S, Bacher A, Hunter W. (2004). Biosynthesis of isoprenoids: a bifunctional IspDF enzyme from *Campylobacter jejuni*.**Eur J Biochem.** 271(14):3028–3035.
- Gabrielsen M, Bond C, Hallyburton I, Hecht S, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F, Hunter W.(2004). Hexameric Assembly of the Bifunctional Methylerythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase and Protein-Protein Associations in the Deoxy-xylulose-dependent Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. **J Biol Chem,** 279(50):52753–52761.
- Goeddel D, Kleid D, Bolivar F, Heyneker H, Yansura D, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs A. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin.**Proc Natl Acad Sci U S A.** 76(1):106-10.

- Goldstein Ly Brown M (1990). Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**. 343(6257):425–430.
- Gong Y, Liao Z, Guo B, Sun X, Tang K (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(4):329–35.
- González-Cabanelas D, Hammerbacher A, Raguschke B, Gershenzon J, Wright L. (2016). Quantifying the Metabolites of the Methylerythritol 4-Phosphate (MEP) Pathway in Plants and Bacteria by Liquid Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Methods Enzymol**. 576:225-49.
- Gottesman S.(1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. **Annu Rev Genetics**, 30:465–506.
- Guenther A, Nicholas C, Fall R, Klinger L, Mckay W, Scholes B, Steinbrecher R, Tallamraju R, Taylor J, Zimmerman P.(1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. **Journal o f G eophysical R esearch**.D5(100):8873–8892.
- Guevara-García A, San Román C, Arroyo A, Cortés ME, de la Luz Gutiérrez-Nava M, León 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(2):1–16.
- Hahn F, Hurlburt A y Poulter C.(1999). *Escherichia coli* Open Reading Frame 696 Is idi, a Nonessential Gene Encoding Isopentenyl Diphosphate Isomerase. **J B acteriol**. 181(15):4499–4504.
- Harker M y Bramley P.(1999). Expression of prokaryotic 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. **FEBS Lett**. 448(1):115–119.
- Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, Bach T. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. **J BiolChem**. 278(29), pp.26666–76.
- Hemmerlin A, Harwood J y Bach T.(2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis?.**Prog Lipid Res**. 51(2):95–148.
- Hengge R. 2009. Proteolysis of Ss(RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. **Res Microbiol**. 160(9):667–676.

- Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr C, Hecht S, Luttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A, Rohdich F.(2000). Biosynthesis of terpenoids : YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl- D -erythritol 2-phosphate to 2C-methyl- D -erythritol 2 , 4-cyclodiphosphate.**Proc Natl Acad Sci U S A** . 97(6):2486-90
- Hirschberg J.(2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Op Plant Biol*. 4(3):210–218.
- Holstein S y Hohl R.(2004). Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. **Lipids**. 39(4):293–309.
- Huang Q, Roessner C, Croteau R, Scott A. 2001. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. **Bioorg Med Chem**. 9(9):2237–2242.
- Hunter W(2007). The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. **J Biol Chem**. 282(30), pp.21573–21577.
- Jin Y y Stephanopoulos G.(2007). Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*.**Metab Eng**. 9(4):337–347.
- Julliard J y Douce R.(1991). Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts.**P Natl Acad Sci USA**. 88(6):2042–2045.
- Kang M, Lee Y, Yoon S, Kim J, Ock S, Jung K, Shin Y, Keasling J, Kim S. (2005). Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. **Biotechnol Bioeng**. 91(5):636–642.
- Khemvong S y Suvachittanont W.(2005). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. **Plant Sci**. 169(3):571–578.
- Kim J, Rudella A, Ramirez Rodriguez V, Zybaylov B, Olinares P, van Wijk K. (2009). Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in *Arabidopsis*. **Plant cell**. 21(6):1669–92.
- Kim S, Kim M, Choi J, Kim S, Ryu Y, Seo J.(2006). Amplification of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase level increases coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biot**. 72(5):982–985.
- Kim S y Keasling J.(2001). Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production. **Biotechnol Bioeng**. 72(4):408–415.

- Kishimoto S y Ohmiya A. (2006). Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Physiol Plantarum**. 128(3):436–447.
- Kobayashi K, Suzuki M, Tang J, Nagata N, Ohyama K, Seki H, Kiuchi R, Kaneko Y, Nakazawa M, Matsui M, Matsumoto S, Yoshida S, Muranaka T.(2006). LOVASTATIN INSENSITIVE 1, a Novel Pentatricopeptide Repeat Protein, is a Potential Regulatory Factor of Isoprenoid Biosynthesis in Arabidopsis.**Plant Cell Physiol**. 48(2):322–331.
- Koussevitzky S, Stanne T, Peto CA, Giap T, Sjögren L, Zhao Y, Clarke A, Chory J.(2007). An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development.**Plant Mol Biol**. 63(1):85–96.
- Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, Seto H. (2000). Cloning and Characterization of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Synthase from *Streptomyces sp.* Strain CL190, Which Uses both the Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis.**J Bacteriol**.182(4):891-7.
- Lange B, Wildung M, McCaskill D, Croteau R.(1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway.**Proc Natl Acad Sci U S A**. 95(5):2100–4.
- Lange B y Croteau, R.(1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 96(24):13714–9.
- Lange B y Ghassemian M.(2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Mol Biol**. 51(6):925–48.
- Leon A, Liu L, Yang Y, Hudock M, Hall P, Yin F, Studer D, Puan K, Morita C, Oldfield E.(2006). Isoprenoid biosynthesis as a drug target: bisphosphonate inhibition of *Escherichia coli* K12 growth and synergistic effects of fosmidomycin.**J Med Chem**. 49(25):7331–41.
- Lichtenthaler H.(2000). Sterols and Isoprenoids. **Biochem Soc T**.28(6):785–789.
- Lichtenthaler H.(1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants.**Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. 50:47–65.
- Liu H, Sun Y, Ramos K, Nisola G, Valdehuesa K, Lee W, Park S, Chung W. (2013). Combination of entner-doudoroff pathway with MEP increases isoprene production in

- engineered *Escherichia coli*. **PloS one**. 8(12):e83290.
- Lois L, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A.(2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. **Plant J**. 22(6):503–513.
- Lois L, Campos N, Putra S, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A. (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 95(5):2105–2110.
- Mahmoud S y Croteau R.(2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 98(15):8915–8920.
- Makinoshima H, Nishimura A, Ishihama A. (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. **Mol Microbiol**. 43(2):269-79.
- Makinoshima H, Aizawa S, Hayashi H, Miki T, Nishimura A, Ishihama A. (2003) Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**. 185(4):1338-45.
- Mandel M, Feldmann K, 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(5):649–658.
- Martin D, Gershenzon Jy Bohlmann J.(2003). Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiol**. 132(3):1586–1599.
- Matthews P y Wurtzel E.(2000). Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. **Appl Microbiol Biot**. 53(4):396–400.
- Maurizi M. (1987). Degradation in Vitro of Bacteriophage X N Protein by Lon Protease.**J Biol Chem** 262(6):2696–2703.
- McGarvey D y Croteau R.(1995). Terpenoid metabolism. **Plant cell**. 7(7):1015–1026.
- Miller B, Heuser T y Zimmer W.(1999). A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate

- synthesis. **FEBS Lett.** 460(3):485–90.
- Miziorko H.(2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Arch Biochem Biophys.** 505(2):131–143.
- Morris W.(2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. **J Exp Bot.** 57(12):3007–3018.
- Morrone D, Lowry L, Determan M, Hershey D, Xu M, Peters R. (2010). Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering. **Appl Microbiol Biotechnol.**85(6):1893–906.
- Mueller C, Schwender J, Zeidler J, Lichtenthaler H. 2000. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochem Soc T.** 28(6):792–3.
- Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R y Segura J.(2006). Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. **Plant Physiol.** 142(3):890–900.
- Navarro Llorens J, Tormo A. y Martínez-García E.(2010). Stationary phase in gram-negative bacteria.**FEMS Microbiol Rev.** 34(4):476–495.
- Nyström T. (2004) Stationary-phase physiology. **Annu Rev Microbiol.** 58:161-81.
- Patel H, Nemeria N, Brammer L, Freil Meyers C, Jordan F.(2012). Observation of thiamin-bound intermediates and microscopic rate constants for their interconversion on 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase: 600-Fold rate acceleration of pyruvate decarboxylation by D- glyceraldehyde-3-phosphate.**J Am Chem Soc.** 134(44):18374–18379.
- Pérez-Gil J y Rodríguez-Concepción M.(2013). Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. **Biochem J.** 452(1):19–25.
- Querol J, Rodríguez-Concepción M, Boronat A, Imperial S. (2001). Essential role of residue H49 for activity of Escherichia coli 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the enzyme catalyzing the first step of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid Synthesis.**Biochem Biophys Res Commun.** 289(1):155–60.
- Querol J, Grosdemange-billiard Cy Rohmer M.(2002). Enzymatic synthesis of 1-deoxysugar-phosphates using *E. coli* 1-deoxy- D -xylulose 5-phosphate synthase. **Tetrahedron Lett.**43(46):8265–8268.
- Ramírez Santos J, Contreras Ferrat Gy Gómez EichelmannM.(2005). La fase estacionaria



- en la bacteria *Escherichia coli*. **Rev Lat Microbiol.**47(3-4):92–101.
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W, Baginsky S.(2009). Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. **Plant Physiol.** 150(2):889–903.
- Reiling K, Yoshikuni Y, Martin V, Newman J, Bohlmann J, Keasling J.(2004). Mono and diterpene production in *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng.** 87(2):200–212.
- Rico A, Krupka M, Vicente M. (2013). In the beginning, *Escherichia coli* assembled the proto-ring: an initial phase of division. **J Biol Chem.** 288(29):20830-6.
- Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Güeto S, Lois L, 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(3):213–222.
- Rodríguez-Concepción M, Forés O, Martínez-García J, González V, Phillips M, Ferrer A, Boronat A.(2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development.**Plant cell.** 16(1):144–56.
- Rodríguez-Concepción M.(2006). Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. **Phytochem Rev.** 5(1):1–15.
- Rodríguez-Concepción M.(2014). Plant Isoprenoids: A General Overview,
- Rodríguez-Concepción M y Boronat A.(2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids . A Metabolic Milestone Achieved through Genomics.**Plant Physiol.** 130(3):1079–1089.
- Rodríguez-Concepción M y Boronat A.(2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. **Curr Opin Plant Biol.** 25:17–22.
- Rodríguez-Villalón A, Pérez-Gil Jy Rodríguez-Concepción M.(2008). Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. **J Biotechnol.** 135(1):78–84.
- Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W.(2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: Genes, enzymes and intermediates. **Curr Opin Chem Biol.** 5(5):535–540.
- Rohmer M.(2008). From Molecular Fossils of Bacterial Hopanoids to the Formation of Isoprene Units: Discovery and Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway.

**Lipids.** 43(12):1095–1107.

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H.(1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **BiochemJ.** 295(Pt2):517–524.

Rohmer M.(1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **NatProd Rep.** 16(5):565–574.

Ruzicka L.(1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia.** 9(10):357–367.

Sáenz J, Grosser D, Bradley A, Lagny T, Lavrynenko O, Broda M, Simons K. (2015) Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. **Proc Natl Acad Sci USA.** 112(38):11971-6.

Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M.(2003). Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of *Escherichia coli*. **Biosci B iotechnol Biochem.** 67(9):2030–2033.

Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G, Knörzer O, Böger P.(1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.** 17(6):233–237.

Sauret-Güeto S, Ramos-Valdivia A, Ibáñez E, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2003). Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. **Biochem B iophys R es Commun.**307(2):408-15.

Sauret-Güeto S, Botella-Pavía P, Flores-Pérez U, Martínez-García J, San Román C, León P, Boronat A, Rodríguez-Concepción M.(2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 141(1):75–84.

Schwender J, Zeidler J, Gröner R, Müller C, Focke M, Braun S, Lichtenthaler F, Lichtenthaler H.(1997). Incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. **FEBS Lett.** 414(1):129–134.

Sprenger G, Schörken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf A, Taylor S, Begley T, Bringer-Meyer S, Sahm H.(1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. **Proc N atl A cad S ci U S A .** 94(24):12857–62.

Sun T, Miao L, Li Q, Dai G, Lu F, Liu T, Zhang X, Ma Y.(2014). Production of lycopene

- by metabolically-engineered *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett.** 36(7):1515–1522.
- Takagi M, Kuzuyama T, Kaneda K, Watanabe H, Dairi Ty Seto H. (2000). Studies on the nonmevalonate pathway : formation of 2-C-methyl- D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol. **Tetrahedron Lett.** 41:3395–3398.
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. **Tetrahedron Lett.** 39(43):7913–7916.
- Takaya A, Kubota Y, Isogai E, Yamamoto T. (2005). Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. **Mol Microbiol.** 55(3):839–52.
- Testa C, Lherbet C, Pojer F, Noel J, Poulter C. (2006). Cloning and expression of IspDF from *Mesorhizobium loti*. Characterization of a bifunctional protein that catalyzes non-consecutive steps in the methylerythritol phosphate pathway. **Biochim Biophys Acta.** 1764(1):85–96.
- Tholl D y Lee S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Arabidopsis Book.** 9:e0143.
- van der Fits L. y Memelink J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. **Science** 289(5477):295–297.
- Vranová E, Coman D y Grussem W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. **Annu Rev Plant Biol.** 64(1):665–700.
- Wagner W, Nemecek-Marshall M y Fall R. (1999). Three distinct phases of isoprene formation during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 181(15):4700–4703.
- Walter M, Fester T y Strack D. (2000). Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the “yellow pigment” and other apocarotenoids. **Plant J.** 21(6):571–578.
- Walter M, Hans J, yStrack D. (2002). Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. **Plant J.** 31(3):243–54.
- Wiberley A, Donohue A, Westphal M, Sharkey T. (2009). Regulation of isoprene emission from poplar leaves throughout a day. **Plant Cell Environ.** 32(7):939–947.

- Withers S y Keasling J.(2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. **Appl Microbiol Biot.** 73(5):980–990.
- Wolfertz M, Sharkey T, Boland W, Kühnemann F.(2004). Rapid regulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway during isoprene synthesis. **Plant Physiol.** 135(4):1939–1945.
- Wolff M, Seemann M, Tse Sum Bui B, Frapart Y, Tritsch D, Garcia Estrabot A, Rodríguez-Concepción M, Boronat A, Marquet A, Rohmer M.(2003). Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: The (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. **FEBS Lett.** 541(1-3):115–120.
- Xiang S, Usunow G, Lange G, Busch M, Tong L.(2007). Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis. **J Biol Chem.** 282(4):2676–2682.
- Yoon S, Park H, Kim J, Lee S, Choi M, Kim J, Oh D, Keasling J, Kim S.(2008). Increased  $\beta$ -Carotene Production in Recombinant *Escherichia coli* Harboring an Engineered Isoprenoid Precursor Pathway with Mevalonate Addition. **Biotechnol Prog.** 23(3):599–605.
- Yuan L, Rouvière P, Larossa R, Suh W.(2006). Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. **Metab Eng.** 8(1):79–90.
- Zhang B, Watts K, Hodge D, Kemp L, Hunstad D, Hicks L, Odom A.(2011). A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. **Biochemistry.** 50(17):3570–7.
- Zhang Y, Primavesi L, Jhurrea D, Andralojc P, Mitchell R, Powers S, Schluempmann H, Delatte T, Wingler A, Paul M.(2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. **Plant Physiol.** 149(4):1860–1871.
- Zhao L, Chang Wei-chen, Xiao Y, Liu Hy Liu P.(2013). Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. **Annu RevBiochem.** 82(1):497–530.
- Zhou P. (2004). Determining Protein Half-Lives. **Methods Mol Biol.** 284:67-77.
- Zhao Y, Yang J, Qin B, Li Y, Sun Y, Su S, Xian M..(2011). Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. **Appl Microbiol Biotechnol.** 90(6):1915–22.

### XIII. ANEXO

#### Diseño de oligonucleótidos para amplificar *DXS* de *E. coli*

##### *NcoI*

CCTTCACCA**ATGGG**TTTTGATATTGC**TTTTTTGGG**CTAACAGGAGGAATTA**CCATGAG**TTTTGATATTGCCAAATACCCG  
 ACCCTGGCACTGGT**CGACTCCACCCAGGAGTTACGACTGTTGCCG**AAAAGAGAGTTTACCGAAACTCTGCGACGAAC**TGCGC**  
 CGCTATTTACTCGACAGCGT**GAGCCGTTCCAGCGGGCACTTCGCC**TCCGGGCTGGGCACGGT**CGAACTGACCCGTGGCGTG**  
 CACTATGTCTACAACACCCCGTTTGACCAATTGATTTGGGATGTGGGGCATCAGGCTTATCCGCATAAAAATTTGACCGGA  
 CGCCGCGACAAAATCGGCACCATCCGTCAGAAAGGCGGTCTGCACCCGTTCCCGTGGCGCGGCGAAAGCGAATATGACGTA  
 TTAAGCGTCGGGCATTCATCAACCTCCATCAGTGCCGGAATTGGTATGCGGTTGCTGCCGAAAAAGAGGCAAAAATCGC  
 CGCACCGTCTGTGTCA**TGGCGATGGCGCGATTACCGCAGGCATGGCGTTTGAAGCGATGAATCACGCGGGCGATATCCGT**  
 CCTGATATGCTGGT**GATTTCTCAACGACAATGAAATGTCGATTTCCG**AAAATGTCCGGCGCGCTCAACAACCATCTGGCACAG  
 CTGCTTTCCGGTAAGCTTTACTCTTCACTGCGCGAAGGCGGGAAAAAGTTTTCTCTGGCGTGCCGCAATTAAGAGCTG  
 CTAACACGACCGAAGACATATTAAGGCATGGTAGTGCCTGGCACGTTGTTTGAAGAGCTGGGCTTTAACTACATCGGC  
 CCGGTGGACGGT**CACGATGTGCTGGGGCTTATCACCACGCTAAAGA**ACATGCGCGACCTGAAAGGCCCGCAGTTCTCGCAT  
 ATCATGACCAAAAAAGGTCGTGGTTATGAACCGGCAGAAAAAGACCCGATCACTTTCCACGCCGTGCCTAAATTTGATCCC  
 TCCAGCGTTGTTTGGCGAAAAGTAGCGGCGTTTGGCGAGCTATCAAAAATCTTTGGCGACTGGTGTGCGAAACGGCA  
 GCGAAAGACAACAAGCTGATGGCGATTACTCCGGCGATGCGTGAAGGTTCCGGCATGGTCGAGTTTTACGTAATTTCCCG  
 GATCGTACTTCGACGTGGCAATTGCCGAGCAACACGCGGTGACCTTTGCTGCGGGTCTGGCGATTGGTGGGTACAAACCC  
 ATTTGTCGCGATTTACTCCACTTTCC**TGCAACGCGCCTATGATCAGGTGCTGCATGACGTGGCGATTCAA**AGCTTCCGGTC  
 CTGTTCCGCATCGACCGCGCGGCATGTTGGTGTGCTGACGGTCAAACCCATCAGGGTCTTTTGATCTCTCTTACCTGCGC  
 TGCATACCGGAAATGGTCATTATGACCCCGAGCGATGAAAACGAATGTCGCCAGATGCTCTATACCGGCTATCACTATAAC  
 GATGGCCCGTCAGCGGTGCGCTACCCGCGTGGCAACGCGGTGCGCGTGGAACTGACCGCGCTGGAAAACTACCAATTTGGC  
 AAAGGCATGTGAAGCGTCGTGGCGAGAACTGGCGATCC**TTAAC**TTGGTACGCTGATGCCAGAAGCGGCGAAAGTCGCC  
 GAATCGTGAACGCCACGCTGGTGCATATGCGTTTTGTGAAACCGCTTGATGAAGCGTTAATTTGGAAATGGCCGCCAGC  
 CATGAAGCGCTGGTCA**CCG**TAGAAAGAAAACGCCAT**TATGGGCGGCGCAGGCAGCGGCGTGAACGAAGT**GCTGATGGCCAT  
 CGTAAAC**CAGTACCCGTGCTGAACAT**TGGCCTGCCGACTTCTTTATCCGCAAGGAACTCAGGAAGAAATGCGCGCCGAA  
 CTCGGCCTCGATCCGCTGGTATGGAAGCCAAAATCAAGGCCTGGCTGGCATAAAAATTCAGTCGTCGACTGGATCCGGTAC  
 CGAATTCGCCAAGGCC**TGGCTGGCAAGAATTCTGG**

##### *EcoRI*

**Figura anexo 1** Diseño de oligonucleótidos con los sitios de restricción *NcoI* y *EcoRI* de la secuencia del gen *DXS* a partir de la construcción pENTR/D/TOPO-*DXS*. Inicio de la traducción, en negritas.

**Tabla anexo 1. Oligonucleótidos para aislar el gen *DXS***

Oligonucleótido	Secuencia
dxspENTR_fw	5' CCTTCACCA <b>ATGGG</b> TTTTGATATTGC 3'
dxspENTR_rv	3' CCA GAATTC TTT GCC AGA CAG GCC TTG5' GGT CTTAAG AAA CGG TCT GTC CGG AAC

Las regiones de las secuencias subrayadas indican los sitios de restricción *NcoI* y *EcoRI* para dxspENTR\_fw y dxspENTR\_rv, respectivamente. Los tripletes en negritas indican el inicio y el final de la traducción.

**Tabla de anexo 2. Densidad óptica de muestras de cultivo a OD<sub>600</sub>= 0.3 (DH5α)  
pBADA::Myc-DXS-6XHis.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Exp1 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp2 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp3 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp4 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp5 (OD<sub>600</sub>)</b>
0	0.3610	0.3516	0.33128	0.3464	0.3255
5	0.3634	0.3732	0.3639	0.3795	0.3630
15	0.4085	0.4023	0.3848	0.4176	0.3929
30	0.4230	0.4175	0.4027	0.4344	0.4125
60	0.4459	0.4292	0.4133	0.4480	0.4259
120	0.4466	0.4368	0.4209	0.4034	0.4337
180	0.4123	0.4207	0.4116	0.4012	0.4171

Muestras de 1ml de medio LB (Amp 100 µg/ml, 0.1% L-ara), tiempos = 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min del tratamiento Cm 200 µg/ml.

**Tabla de anexo 3. Densidad óptica de muestras de cultivo a OD<sub>600</sub>= 0.3 (DH5α)  
pBADA::Myc-DXS-6XHis.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Exp1 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp2 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp3 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp4 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp5 (OD<sub>600</sub>)</b>
0	0.2903	0.3214	0.3090	0.3384	0.3499
5	0.3071	0.3408	0.3201	0.3449	0.3612
15	0.3244	0.3582	0.3548	0.3796	0.3970
30	0.3350	0.3665	0.3730	0.3999	0.4182
60	0.3563	0.3267	0.3886	0.4169	0.4383
120	0.3560	0.3862	0.3678	0.3944	0.4188
180	0.3434	0.3673	0.3647	0.3996	0.4170

Muestras de 1ml de medio LB (Amp 100 µg/ml, 0.1% L-ara), tiempos = 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min del tratamiento Cm 400 µg/ml.

**Tabla de anexo 4. Densidad óptica de muestras de cultivo a OD<sub>600</sub>= 1.5 (DH5α)  
pBADA::*Myc-DXS-6XHis*.**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Exp1 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp2 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp3 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp4 (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Exp5 (OD<sub>600</sub>)</b>
0	1.4957	1.5331	1.5437	1.5897	1.4126
1	1.5524	1.5492	1.5645	1.6385	1.5194
2	1.5569	1.5683	1.5604	1.5883	1.5603
3	1.5385	1.5430	1.5408	1.5938	1.5528
4	1.5312	1.5475	1.5208	1.5752	1.5723
5	1.5127	1.5267	1.5053	1.5711	1.5747
6	1.5106	1.5267	-	1.5418	1.5910

Muestras de 1ml de medio LB (Amp 100 µg/ml, 0.1% L-ara), tiempos =  
0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h del tratamiento Cm 800 µg/ml.

**Tabla de anexo 5. Densidad óptica de muestras de cultivo a OD<sub>600</sub>= 0.3 (BL21)  
pBADA::*Myc-DXS-6XHis*.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Exp1</b>	<b>Exp2</b>	<b>Exp3</b>	<b>Exp4</b>
0	0.3607	0.3259	0.3564	0.3835
5	0.3618	0.3656	0.4026	0.4131
15	0.3961	0.3917	0.4222	0.4393
30	0.4198	0.4311	0.4474	0.4670
60	0.3633	0.4181	0.4110	0.4444
120	0.3190	0.3473	0.3596	0.3603
180	0.2481	0.3051	-	0.3389

Muestras de 1ml de medio LB (Amp 100 µg/ml), tiempos = 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min  
del tratamiento Cm 200 µg/ml.

**Tabla de anexo 6. Densidad óptica de muestras de cultivo a  $OD_{600} = 0.3$  (BL21)  
 pBADA::*Myc-DXS-6XHis*.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Exp 1 Cm= 300 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Exp 1 Cm = 400 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Exp 1 Cm = 500 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
0	0.3510	0.3336	0.3061
5	0.4042	0.3898	0.3558
15	0.3993	0.4118	0.4349
30	0.4420	0.4187	0.4118
60	0.4041	0.3951	0.4098
120	0.3432	0.3449	0.3569
180	0.2916	0.2911	0.3487

Muestras de 1ml de medio LB (Amp 100  $\mu\text{g/ml}$ ), tiempos = 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min de diferentes tratamientos Cm 300, 400 y 500  $\mu\text{g/ml}$ .



- Oligonucleótidos para *ClpP* (H1/H2)
- Oligonucleótidos para *Lon* (H1/H2)
- Oligonucleótidos para la confirmación del reemplazo genético

tttacgcagcataaacgcgctaatttcgcacaaaggcccgtcaccgcccagggtgggcttttttttgcacgaatttttgcacggaaccgctgc  
gaaaa**gcctcttttcgggtgttagcgtaac**aacaaaagattggtatgcttgaaatatgggtgatgcccgtacccataaacacaggggactagctgata  
atccgtccataaaggttacaatcggtacagcaggtttttt**caattttatccaggagacggaaATGTCATACAGCGCGCAACG**AGATAACTTTG  
CACCCATATGGCGCTGGTGCCGATGGTCATTGAACAGACCTCACGGGTGAGCGCTCTTTTGATATCTATTCTCGTCTACTTAAGGAACGC  
GTCATTTTTCTGACTGGCCAGGTTGAAGACCACATGGCTAACCTGATTGTGGCGCAGATGCTGTTCTTGGAAAGCGGAAAACCCAGAAAAAGA  
TATCTATCTGTACATTAACCTCCCAGGCGGGGTGATCACTGCCGGGATGTCTATCTATGACACCATGCAGTTTATCAAGCCTGATGTCAGCA  
CCATCTGTATGGGCCAGGCGGCCTCGATGGGCGCTTTCTGTGACCCGAGGGGCAAAAGGTAACGTTTTTGCCTGCCGAATTCGCGCGTG  
ATGATTCACCAACGTTGGCGGGTACCAGGGCCAGGCCACCGATATCGAAATTCATGCCCGTGAAATTCGAAAGTTAAAGGGCGCATGAA  
TGAACCTATGGCGCTTACACGGGTCAATCATTAGAACAGATTGAACGTGATACCCAGCGCATCGCTTCCTTTCCGCCCTGAAGCGGTGG  
AATACGGTCT**GGTCGATTTCGACCCATCGTAATGATGCCAGAGGC**caactgtgcccgtataacttatccaggggcgcacaacgctg  
taagcggcttgcgctgagaatggcatttgcgctcgtcgtgctgctgcgcaaaagaacaaagaagaggttttgacc**ATG**ACAGATAAACGCAAA  
GATGGCTCAGGCAAAATGCTGTATGCTCTTTTTGCCGCAAAAGCCAGCATGAAGTGCAGCAAGCTGATGGCGGTCATCCGTTGATATCTG  
CGACGAATGTGTTGATTTATGTAACGACATCATTCCGGAAGGATTAAGAAGTTGCACCCGATCGTGAACGCGTCCGCTACCCAGCGTCCG  
ATGAAATTCGCAACCTGGACGATTACGTTATCGGCCAGGAACAGGCGAAAAAGTGTGGCGGTTCGCGGTATACAACTTACAAACGT  
CTGCCAACGGCGATACCAGCAATGGCGTCGAGTTGGGCAAAAGTAACATTTCTGTGATCGTCCGACCGGTTCCGGTAAACCGTCTGTGGC  
TGAACCGTGGCGCCCTGCTGGATGTTCCGTTCCACATGGCCGACGCGACTACACTGACCGAAGCCGGTTATGTGGGTGAAGACGTTGAAA  
ACATCATTAGAAGCTGTTGACGAAATGCGACTACGATGTCCAGAAAGCACAGCGTGGTATTGCTACATCGATGAAATCGACAAGATTTCT  
CGTAAGTCAGACAACCCGTCATTACCCGAGACGTTCCGGTGAAGCGTACAGCAGGCACCTGTTGAAACTGATCGAAGGTACGGTAGCTGC  
TGTTCCACCGCAAGGTGGCGTAAACATCCGACAGCAATCTTGCAGGTTGATACCTCTAAGATCCTGTTTATT**GTGGCGGTTCGGTTTTG**  
**CCGGTCTG**GATAAAGTGATTCCACCCGTGTAGAAACCGGCTCCGGCATTGGTTTTGGCGCAGCGTAAAAGCGAAGTCCGACAAAGCAAG  
GAAGCGAGCTGCTGGCGAGGTTGAACCGGAAGATCTGATCAAGTTTGGTCTTATCCCTGAGTTTATGGTCTGCTCCCGTGTGTCGCAAC  
GTTGAATGAACTGAGCGAAGAAGCTCTGATTAGATCTCAAAGAGCGGAAAAACGCCCTGACCAAGCAGTATCAGGCGCTGTTAATCTGG  
AAGCGTGGATCTGGAATCCCGTACGAGGCGCTGGATGCTATCGCTAAGAAAGCGATGGCGCGTAAAACCGGTGCCCGTGGCCTGCGTTCC  
ATCGTAGAAGCCGACTGCTCGATACCATGTACGATCTGCCCTCCATGGAAGACGTCGAAAAAGTGGTTATCGACAGTCCGTAATGATGG  
TCAAAGCAAACCGTTGCTGATTTATGGCAAGCCGGAAGCGCAACAGGCATCTGGTGA**ATA**taaccattcccatacaattagttaacaaa  
aaggggggattttatctccccttaatttttctctctatctctcggcgtgaaatgggggaaacatcccataactgacgtacatgttaata  
gatggcgtgaagcacagctgctgctgattacctggcggaatt**aaactaagagagagctctATGAAATCCTGAGCGTCTGAAACCG**ATTG  
AAATCCCGTATTGCCGCTGGCCGATGTGGTGGTTATCCGCAATGGTTCATCCCTTATTTGTCGGCGGGAAAAATCTATCCGTTGTCG  
GAAGCGCGATGGACCATGATAAAAAATTATGCTGGTCCGCGAAGAAAGCTTCAACGGATGAGCCGGGTGTAACGATCTTTCCACCGT  
CGGACCGTGGCCCTATATGTCAGATGCTGAACTGCCTGACGGCCCGTCAAAGTGTGTCGAGGGGTTACAGCGCGCCGATTTCTG  
CGCTCTGACAAATGGCGAACACTTTTCTGCGAAGGCGAGTATCTGAGTCCGCGACCATTTGATGAGCGGGAACAGGAAGTGTGTCCTG  
ACTGCAATCAGCCAGTTCGAAGGCTACATCAAGCTGAACAAAAAATCCCACCAGAAGTGTGACGTCGCTGAATAGCATCGACGATCCGGC  
CGCTCTGGCGGATACCATTGCTGCACATATGCCGCTGAACTGGCTGACAAACAGTCTGTTCTGGAGATGTCGACGTTAAGCAACGCTG  
AATATCTGATGGCAATGATGAAATCGGAAATCGATCTGCTGCAAGTTGAGAAACGCATTCCGAACCCGCTTAAAAAGCAGATGGAGAAATCC  
CAGCGTGAATCTGAAACGAGCAAAATGAAAGCTATTCCAGAAAGAACTCCGTGAAATGGAACGACCGCGCGGCAAAACGAAACCCGTA  
GGCAAAATCGACGCGCGAAGATGCCGAAAGAGGCAAAAGAGAAAGCGGAAGCAGAGTGCAGAACTGAAAATGATGCTCCGATGTCGG  
CAGAAGCGACCGTATGCGTGGTTATATCGACTGGATGTTACAGGTGCCGTGGAATGCCGCTAGCAAGGTCAAAAAAGACCTCCGTCAGGCG  
CAGAAATCCTTGATACCGACCATTATGGTCTGGAGCGGTGAAAGATCGAATCCTTGAGTATCTTGCGGTTCAAAGCCGCTCAACAAAA  
CAAGGACCGCATCTCTGCTGGTAGGGCCCGGGGTAGGTAAAAACCTCTCTGGTCACTCCATTGCCAAAGCCACCGGCGATAAATG  
TCCGTATGGCGCTGGGCGCGTGGCTGATGAAGCGAAATCCGTGGTACCAGCGTACTTACATCGGTTCTATGCCGGTAAACTGATCCAG  
AAAATGGCGAAAGTGGCGGTGAAAAACCGCTGTTCTGCTGATGAGATCGACAAAAATGCTTCTGACATGCGTGGCGATCCGGCCTCTG  
ACTGTTGAAGTCTGATCCAGAGCAGAACGTAGCGTTACAGCAGCCACTACTGGAAGTGGATTACGATCTCAGCAGCTGATGTTGTGCG  
CGACGTCGAACTCCATGAACATTCGGCACCGCTGCTGGATCGTATGGAAGTATTCCGCTCTCCGGTTATACCGAAGATGAAAACTGAAC  
ATCGCCAAACGTCACCTGCTGCCGAAGCAGATTGAACGTAATGCACTGAAAAAGGTGAGCTGACCGTCCGACGATAGCGCCATTATCGGCAT  
TATTGTTACTACCCGTTGAGGCGGGCGTGGCTGGTCTGGAGCGTGAATCTCCAACTGTGTCCGAAAGCGGTTAAGCAGTTACTGCTCG  
ATAAGTCATTAACATATCGAAATTAACGGCGATAAACCCTGCATGACTATCTCGGTGTTTACCGTTCGACTATGGTCGCGCGGATAACGAA  
AACCGTGTGGTCAGGTAACCGGTTGCGGTGGACGGAAGTGGGCGGTGACTTGTGACCATTGAAACCGCATGTGTTCCGGTAAAGGCAA  
ACTGACCTATACCGGTTCCGTCGGCGAAGTGTGACAGGAGTCCATTACGGCGCGTTAACCGTGGTTCCGTGCGCGTGGGAAAAACTGGGG  
TCAACCTGATTTTTACGAAAAACGTGACATCCACGTCCACGTACCGGAAGTGCACGCGGAAAGATGGTCCGAGTCCCGTATTGCTATG  
TGCACCGCGTGGTTTTCTGCTGACCGGTAACCCGTTCCGTGCCGATGTGGCAATGACCGGTGAGATCACTCTGCGTGGTCAGGTACTGCC  
GATCGGTGGTTTGAAGAAAACTCCTGGCAGCGCATCGCGCGGGATTAAAAACAGTCTAATCCGTTCCGAAAATAACCGCATCTGGAAG  
AGATCTCTGACAACGTAATTGCCGATCTGGACATTCATCCTGTGAAGCGCATGAGGAAGTTCTGACTCTGGCGTGC AAAATGAACC**GTCT**  
**GGTATGCAGGTTGTGACTGCAAAAATAGTgacctcgcg**aaaaatgcaactaataaaaaacagggctggcaggctaatctgggcttgcagcctt  
ttttgtctcgtaagtttagatggcggtatcggttgccttataaaggggtgtgtgaagggatggctggcctgatataactgctgcgctt  
cgtaccttgaaggttcaagtgctgataataattataaagaggaagaaagagTGAATAAATCTCAATTGATCGACAAGATTCTGCAGGGGC  
TGATATCTTAAGCTCCGGCTGGCCGTGGTTAGATGCTATTATGCTTCCGTAACGTAATCTCTGAAAGAGGGGATGATGTAGCACTGG  
TAGGTTTTGGTACTTTTGGCGTTAAAGAGCGTGTGCCGTA**CTGGCCGCAAGCCGACAGCCGGT**AAAGAGATCCACATCGCTGCTGCTAA  
GTACCGAGCTTCCGTGCAGGTAAAGCACTGAAAGACGCGGTAACATA

**Figura 27** Diseño de oligonucleótidos para el reemplazo genético de *Lon* y *ClpP* mediante el sistema de Datsenko y Wanner, 2000.

**Tabla de anexo 7. Oligonucleótidos para reemplazo genético**

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia</b>
$\Delta ClpP$ -H1P1	5' CAA TTT TAT CCA GGA GAC GGA AAT GTC ATA CAG CGG CGA ACG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG 3'
$\Delta ClpP$ -H2P2	5' CGC CTC TGG CAT CAA TTA CGA TGG GTC AGA ATC GAA TCG ACC CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG 3'
$\Delta Lon$ -H1P1	5' AAA CTA AGA GAG AGC TCT ATG AAT CCT GAG CGT TCT GAA CGC TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG 3'
$\Delta Lon$ -H2P2	5' GCG CGA GGT CAC TAT TTT GCA GTC ACA ACC TGC ATA CCA GTC CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG 3'

**Tabla de anexo 8. Oligonucleótidos para la corroboración del reemplazo genético  $\Delta Lon$  y  $\Delta ClpP$**

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia</b>
<i>ClpPFW</i>	5' GCC TCT TTC GGT GTT AGC GTA AC 3'
<i>ClpXRv</i>	5' CAG ACC GGC AAA CGC ACC GCC AC 3'
<i>LonRV</i>	5' ACC GGT CTG CGG GTT GCG GCC AG 3'

### **Obtención de plásmido en pequeña escala por TENS**

Para la obtención de plásmidos en pequeña escala se partió de 1.5 ml de un cultivo bacteriano crecido ~18 h en medio líquido Luria Broth (LB), el cual se centrifugó por 4 minutos a 7 000 rpm para sedimentar las células. La pastilla celular se resuspendió en 300 µl de TENS. Posteriormente, se adicionó 150 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) que fue mezclado vigorosamente y centrifugado para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el plásmido se precipitó con 0.9 ml de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C. Finalmente, la pastilla del plásmido se obtuvo por centrifugación (10 000 rpm por 2 min), se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se secó por 2-3 min y se resuspendió en agua ultrapura estéril.

### **Transformación por electroporación**

Para transformar células de bacterias el DNA de interés se mezcló con una alícuota de las células electrocompetentes de *E. coli* (DH5α). La mezcla se transfirió a una celda de electroporación (BioRad) enfriada previamente y se le aplicó un pulso eléctrico de 2.5 V. Inmediatamente después se agregó 1 ml de medio SOC (Tabla) y las células se transfirieron a tubos de ensayo estériles para su recuperación durante 1 h a 37 °C con agitación. Posteriormente 0.2 L de ellas fueron sembradas en el medio de selección correspondiente (LB + antibiótico), y se incubaron a 37 °C durante 12 h. Para la selección de células transformadas de *E. coli* con el vector pBADA/Myc-6XHis se usó LB adicionado con Amp (100 µg/µl).

**Tabla de anexo 9. Soluciones y medios de cultivo**

Nombre	Composición	Comentarios
LB	Bacto-Triptona, 10 g/l Extracto de levadura, 5 g/l NaCl, g/l	pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave a 120°C.
LB agar	Triptona, 10 g/l Extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 1% Agar 1.5%	pH 7.0 Se esteriliza en autoclave y se deja enfriar ~50°C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°.
Ponceau	Ácido acético 2% Ponceau 1mg/ml	