



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Caracterización a nivel molecular de los genes
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
de *Arabidopsis thaliana***

Lorenzo Carretero Paulet



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

043
UB
CAR
CAR

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Div. de Ciències Exp. i Mat.
Afers Generals
E 13 FEB. 2003
NÚMERO: *LL*



DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE QUÍMIQUES

CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LOS GENES 1-DESOXI-D-XILULOSA 5- FOSFATO SINTASA Y 1-DESOXI-D-XILULOSA 5-FOSFATO REDUCTOISOMERASA DE ARABIDOPSIS THALIANA

Memoria presentada por Lorenzo Carretero Paulet, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada e inscrito en el programa de doctorado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona durante el bienio 1997/1999, para aspirar al grado de Doctor en Biología.
El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Químicas de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección de los Dres. Albert Boronat i Margosa y Narciso Campos Martínez.

Barcelona, Febrero de 2003

Directores:

Dr. Albert Boronat i Margosa
Dr. Narciso Campos Martínez

Autor:

Lorenzo Carretero Paulet



I.1.PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.	3
I.1.1.LOS ISOPRENOIDES: NATURALEZA BIOQUÍMICA E IMPORTANCIA BIOLÓGICA.	3
1.2.OBJETIVOS.	6
I.2.BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	7
I.2.1.NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ISOPRENOIDES.	7
I.2.2.LA RUTA DEL ACETATO/MEVALONATO: LA "VÍA CLÁSICA" DE SÍNTESIS DE IPP.	8
I.2.3.LA VÍA DEL METILERITRITOLFOSFATO (MEP) DE SÍNTESIS DE IPP.	9
I.2.3.1. Antecedentes históricos en la elucidación de la vía del MEP. Los organismos procariotas como modelo.	10
I.2.3.2.La 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa: primera enzima de la vía MEP.	10
I.2.3.3.La 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa es responsable de la producción del primer intermediario exclusivo de la vía de Rohmer.	11
I.2.3.4.Las síntesis de IPP vía MEP en plantas: Las dos primeras etapas.	12
I.2.3.5.La vía MEP de síntesis de IPP en otros organismos fotosintéticos:	14
I.2.3.6.Etapas enzimáticas posteriores a la DXR en la síntesis vía MEP del IPP.	15
I.2.3.7.La vía del MEP de síntesis de IPP representa una atractiva diana para el ensayo de antibióticos y herbicidas.	19
I.2.4.LAS DOS RUTAS DE SÍNTESIS DE IPP ESTÁN INTEGRADAS EN PUNTOS CENTRALES DEL METABOLISMO DE LAS CÉLULAS VEGETALES.	20
I.2.5.ETAPAS ENZIMÁTICAS POSTERIORES A LA SÍNTESIS DE IPP EN LA FORMACIÓN DE ISOPRENOIDES.	22
I.2.5.1.Las preniltransferasas.	22
I.2.5.2.Las terpenosintasas.	25
2.5.3.Reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos.	26
I.2.6.ORIGEN EVOLUTIVO Y SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXISTENCIA DE LA RUTA DEL MEP Y DEL MVA DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	29
I.3.ORGANIZACIÓN/LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	31
I.3.1.LOCALIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	31
I.3.1.1.Compartimentación espacial y temporal de la biosíntesis de isoprenoides. Una perspectiva histórica.	31
I.3.1.2.Otros orgánulos subcelulares implicados en la biosíntesis de isoprenoides.	35

I.3.2. ¿EXISTE INTERACCIÓN ENTRE LAS DOS VÍAS DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES?..	37
I.4. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	39
I.4.1. LA EXISTENCIA DE FAMILIAS MULTIGÉNICAS CONSTITUYE UN PRIMER PUNTO DE CONTROL EN LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES CITOSÓLICOS: DOS EJEMPLOS.	39
I.4.2. FAMILIAS MULTIGÉNICAS Y CANALES METABÓLICOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES CITOSÓLICOS.	43
I.4.3. LAS ENZIMAS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES CITOSÓLICOS RESPONDEN A MUY DIVERSAS SEÑALES AMBIENTALES O DE DESARROLLO.	46
I.4.3.1. El papel de la luz:	46
I.4.3.2. Respuestas a otros factores ambientales.	47
I.4.3.3. Regulación por fitohormonas:	47
I.4.3.4. Correlación con procesos de desarrollo:	48
I.4.3.5. Mecanismos de regulación feed-back:	48
I.4.3.6. Diversos mecanismos de regulación postraduccional modulan el estado de activación de las enzimas implicadas en la ruta del MVA.	49
I.4.4. LA ENZIMA HMGR CATALIZA LA ETAPA LIMITANTE EN LA REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES CITOSÓLICOS EN PLANTAS, AUNQUE PODRÍAN EXISTIR PUNTOS ADICIONALES DE CONTROL.	49
I.4.5. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS ISOPRENOIDES PLASTÍDICOS. EL PAPEL DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA MEP ESTÁ POCO ESTUDIADO.	51
I.4.5.1. La DXS y la DXR en la regulación de la biosíntesis de carotenoides.	51
I.4.6.2. La DXS y la DXR en la regulación de la biosíntesis de otros isoprenoides plastídicos.	56
I.5. ELECCIÓN DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COMO MODELO DE ESTUDIO.	56

II. RESULTADOS

61

II.1. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES <i>DXS1</i> , <i>DXS2</i> Y <i>DXR</i> .	63
II.1.1. CLONAJE DEL GEN <i>DXS1</i> QUE CODIFICA PARA LA 1-DESOXI-D-XILULOSA 5-FOSFATO SINTASA (DXS) DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	63
1.2. ESTUDIO DE LA COMPLEJIDAD GENÓMICA DEL GEN <i>DXS</i> DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> : ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL.	66
II.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS <i>DXS1</i> , <i>DXS2</i> Y <i>DXS3</i> .	71
II.1.4. IDENTIFICACIÓN DEL GEN 1-DESOXI-D-XILULOSA 5-FOSFATO REDUCTOISOMERASA (<i>DXR</i>) DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	77

II.1.5. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA DXR.	80
II.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DXS1, DXS2 Y DXR.	84
II.2.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DXS1, DXS2 Y DXR MEDIANTE LA PROTEÍNA MARCADORA GFP.	84
II.2.2. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DXS1 Y DXR SOBRE CORTES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	87
II.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DXS1 Y DXR DE ARABIDOPSIS.	89
II.3.1. LOS GENES <i>DXS1</i> Y <i>DXR</i> SE EXPRESAN DE FORMA GENERALIZADA EN DISTINTOS TEJIDOS Y ÓRGANOS DE <i>A. THALIANA</i> .	89
3.1.1. La expresión de los genes <i>DXS1</i> y <i>DXR</i> durante el desarrollo vegetativo. Estudios de <i>northern-blot</i> y <i>western-blot</i> .	89
II.3.1.2. La expresión de los genes <i>DXS1</i> y <i>DXR</i> en la planta adulta. Estudios de <i>northern</i> y <i>western-blot</i> .	91
II.3.1.3. Análisis del patrón de tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de los genes quiméricos <i>DXS1:GUS</i> y <i>DXR:GUS</i> .	93
II.3.1.4. Análisis y cuantificación de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras de las construcciones (-1738/+217) <i>DXS1:GUS</i> y (-1158/+94) <i>DXR:GUS</i> crecidas en luz y en oscuridad.	98
II.3.2. EL ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ACTIVIDAD GUS DIRIGIDA POR DELECCIONES SERIADAS DE LA REGIÓN -1738/+217 DEL GEN <i>DXS1</i> PERMITIÓ DEFINIR LA REGIÓN MÍNIMA DEL PROMOTOR NECESARIA PARA SU EXPRESIÓN.	99
II.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA DXS1, DXS2 Y DXR.	103
II.4.1. COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE MUTANTES INSERCIONALES DE <i>E. COLI</i> CON LA DXS1, DXS2 Y DXR DE <i>A. THALIANA</i> .	103
II.4.1.1. La DXR de <i>Arabidopsis thaliana</i> rescata al mutante letal de <i>E. coli</i> defectivo en dicho gen.	103
II.4.1.2. La DXS1 de <i>Arabidopsis</i> complementa al mutante <i>dxs</i> de <i>E. coli</i> , no así la DXS2.	104
II.4.2. LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN <i>DXS2</i> NO REVIERTE EL MUTANTE <i>CHS5 (DXS1)</i> DE ARABIDOPSIS.	107
II.4.3. MUTANTES E INHIBIDORES EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA DXS1 Y LA DXR	108
II.4.3.1. La expresión del gen <i>DXR</i> es inducida transitoriamente en respuesta a la presencia de los inhibidores fosmidomicina y mevinolina.	108
II.4.3.2. Mutantes e inhibidores como herramientas para el estudio de la función de las	

proteínas DXS1 y DXR en el desarrollo de los plástidos.	112
II.4.4.LA GENÉTICA REVERSA EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS GENES <i>DXS1</i> Y <i>DXR</i> .	116
II.4.4.1.La sobreexpresión de la DXR conduce a un significativo incremento en los niveles de clorofilas y carotenoides.	116
II.4.4.2.La línea 35S: <i>DXR</i> -b1.A manifiesta un fenotipo variegado.	120
II.4.4.3.La línea 35S: <i>DXR</i> -b1.A posee alteraciones en los plástidos análogas a las del mutante <i>chs5</i> y a aquellas provocadas por el tratamiento con Fm o Nf.	121
II.4.4.4.Expresión del gen <i>DXS1</i> bajo el control del promotor inducible pTA7002.	124
II.4.5.APROXIMACIONES AL ESTUDIO DEL INTERCAMBIO DE INTERMEDIARIOS ENTRE LAS DOS RUTAS DE SÍNTESIS DE IPP EN LA CÉLULA VEGETAL.	126
II.4.5.1.El fenotipo originada por la mevinolina puede ser revertido con MVA..., y con DX.	126
II.4.5.2.La sobreexpresión de la HMGR1 de <i>A. thaliana</i> conduce a un ligero incremento en la resistencia a la fosmidomicina.	128
II.4.5.3. El fenotipo albino de las plantas 35S: <i>DXR</i> -b1.A no puede ser revertido con ME.	130
II.4.5.4.El mutante termosensible <i>chs5</i> pudo ser rescatado con la DX, no así con el ME ni con el MVA.	131

III.DISCUSIÓN

III.1.CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES <i>DXS</i> Y <i>DXR</i> Y LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS CORRESPONDIENTES EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>.	135
III.1.1.CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DXS.	135
III.1.1.1.EL GEN <i>DXS1</i> POSEE DOS SECUENCIAS ALTAMENTE HOMÓLOGAS EN <i>A. THALIANA</i> .	135
III.1.1.2.El análisis de la secuencia peptídica de la <i>DXS1</i> y <i>DXS2</i> resulta coherente con la función bioquímica propuesta.	136
III.1.1.3.Las particularidades de la secuencia peptídica de la <i>DXS3</i> apuntan a una función de esta proteína distinta del resto de <i>DXS</i> .	139
III.1.2.CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA DXS.	140
III.1.3.LA <i>DXR</i> DE <i>A. THALIANA</i> , ENZIMA RESPONSABLE DE LA PRIMERA ETAPA EXCLUSIVA DE LA RUTA DEL MEP, ESTÁ CODIFICADA POR UN ÚNICO GEN.	142
III.2. LA <i>DXS1</i>, <i>DXS2</i> Y <i>DXR</i> SE ENCUENTRAN LOCALIZADAS EN LOS PLÁSTIDOS.	143
III.3.ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>DXS1</i> Y <i>DXR</i>.	145
III.3.1. LOS GENES <i>DXS1</i> Y <i>DXR</i> SE EXPRESAN DE MANERA GENERALIZADA EN <i>ARABIDOPSIS</i>	

THALIANA.	145
III.3.2.EL PAPEL DE LA LUZ EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>DXS1</i> Y <i>DXR</i> .	152
III.3.3.EL ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN <i>DXS1</i> REVELA LA PRESENCIA DE NUMEROSOS MOTIVOS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON SU FUNCIÓN.	153
3.4.LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>DXR</i> RESPONDE AL BLOQUEO DE LA SÍNTESIS DE IPP, TANTO A TRAVÉS DE LA RUTA MEP COMO DEL MVA.	161
III.4.FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA <i>DXS1</i> Y LA <i>DXR</i>.	162
III.4.1.LAS DOS PRIMERAS ETAPAS DE LA RUTA DEL MEP RESULTAN ESENCIALES PARA EL DESARROLLO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	162
III.4.1.1.Mutantes e inhibidores en el estudio de la función biológica de la <i>DXS1</i> y la <i>DXR</i> .	162
III.4.1.2.La actividad de la <i>DXS1</i> y la <i>DXR</i> resulta necesaria para el correcto desarrollo de los cloroplastos.	163
III.4.1.3.La línea 35S: <i>DXR</i> -b1.A presenta un característico fenotipo variegado.	164
III.4.2.REGULACIÓN DEL FLUJO METABÓLICO DE LA RUTA DEL MEP: EL PAPEL DE LA <i>DXS1</i> Y LA <i>DXR</i> .	167
III.5.NUEVAS EVIDENCIAS ACERCA DE LA INTERACCIÓN BIOQUÍMICA ENTRE LAS RUTAS DEL MVA Y DEL MEP EN LA CÉLULA VEGETAL.	169
III.5.1.LA PRESENCIA DE DX ES CAPAZ DE REVERTIR LA INHIBICIÓN PROVOCADA POR LA MEVINOLINA.	170
III.5.2.TRANSPORTE DE INTERMEDIARIOS DE LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES DESDE EL CITOSOL A LOS PLÁSTIDOS.	172
5.3.HACIA UN CAMBIO DE PARADIGMA EN LA COMPRESIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS.	173
IV.CONCLUSIONES	175
IV.CONCLUSIONES:	177
V.MATERIALES Y MÉTODOS	181
V.1.MATERIAL BIOLÓGICO.	183
V.1.1.MATERIAL VEGETAL.	183
V.1.2.CEPAS BACTERIANAS.	183
V.1.3.VECTORES PLASMÍDICOS.	183
V.2.MEDIOS DE CULTIVO.	184
V.2.1.MEDIOS DE CULTIVO DE PLANTAS:	184

V.2.1.1. Suplementos al medio de cultivo:	185
V.2.2. MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS.	188
V.3. CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>.	189
V.3.1. CULTIVO ESTÉRIL DE <i>ARABIDOPSIS</i> .	190
V.3.1.1. Cultivo estéril en medio sólido	190
V.3.1.2. Cultivo estéril en medio líquido:	191
V.3.2. CULTIVO DE <i>ARABIDOPSIS</i> EN TIERRA.	191
V.3.3. MANTENIMIENTO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DE LA LÍNEA T87.	192
V.4. BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>: TÉCNICAS ESPECÍFICAS.	192
V.4.1. GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	192
V.4.1.1. Descripción de los vectores utilizados para generar las plantas transgénicas.	192
V.4.1.2. Construcciones utilizadas para la generación de transgénicas:	194
V.4.1.3. Transformación de <i>A. thaliana</i> .	196
V.4.2. TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	201
V.4.2.1 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	201
V.4.3. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE TEJIDOS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	203
V.4.3.1. Obtención de ADN genómico nuclear.	203
V.4.3.2. Obtención de ARN.	205
V.4.4. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE TEJIDOS DE <i>ARABIDOPSIS</i> .	207
V.4.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> PARA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.	208
V.4.5.1. Obtención de cortes ultrafinos para ultraestructura.	208
V.4.5.2. Obtención de cortes ultrafinos para inmunocitoquímica.	211
V.4.5.3. Reacción de inmunocitoquímica:	214
V.4.5.4. Observación de las muestras al microscopio:	215
V.4.6. BIOLÍSTICA SOBRE TEJIDOS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	215
V.4.6.1 Descripción de las construcciones utilizadas para los experimentos de microbombardeo.	215
V.4.6.2. Protocolo de microbombardeo:	216
V.4.6.3. Observación de las muestras microbombardeadas.	219
V.4.7. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD GUS.	220
V.4.7.1. Análisis histoquímico de la actividad GUS.	220
V.4.7.2. Medición de la actividad GUS.	221

V.4.8.CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN ARABIDOPSIS.	223
V.5.TÉCNICAS CLÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	224
V.5.1.TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE:	224
V.5.1.1.CONSTRUCCIONES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO:	225
V.5.1.2.Preparación de células competentes:	226
V.5.2.TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	228
V.5.2.1.Sondas utilizadas para los experimentos de <i>Southern-blot</i> .	228
V.5.2.2. <i>Southern-blot</i> .	228
V.5.2.3.Sondas utilizadas para los experimentos de <i>northern-blot</i> .	232
V.5.2.4. <i>Northern-blot</i> .	234
V.5.2.5.Detección quimioluminiscente.	238
V.5.3. HIBRIDACIÓN DE PROTEÍNAS: <i>WESTERN-BLOT</i> :	239
V.5.3.1.Anticuerpos utilizados.	239
V.5.3.2. <i>SDS-PAGE</i> .	239
V.5.4.TÉCNICAS BASADAS EN LA UTILIZACIÓN DE ADN POLIMERASAS TERMOESTABLES.	245
V.5.4.1.Reacción en cadena de la polimerasa (<i>PCR</i>).	245
V.5.4.2.RT-PCR.	248
V.5.4.2.Secuenciación.	250
V.6.INFORMÁTICA.	251
V.6.1.BIOINFORMÁTICA:	251
V.6.2.OFIMÁTICA:	251
V.7.OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS.	252

ABREVIATURAS

aas	aminoácidos
ABRE	Elemento de Resuesta a ABA
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AACT	Aceto acetil-coenzima A tiolasa (enzima)
AAT	Aceto acetil-coenzima A tiolasa (<i>gen</i>)
ABA	Ácido abscísico
ADNc	ADN codificante
ADN-T	ADN de transferencia
Amp	Ampicilina
ANA	Ácido 2-naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
Br-Et	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovina
Col. 3	Columbia 3
C/COOH-terminal	Extremo Carboxi terminal
cols.	colaboradores
c.p.m.	cuentas por minuto
c.s.p.	cantidad suficiente para
CTAB	Bromuro de cetriltrimetilamonio
CTP	Citidín trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptica
DX(P)	1-Desoxi-D-xilulosa-5-(fosfato)
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EST	" <i>Expressed Sequence Tag</i> "
est	Esterilizar
FAD	Flavinadenín dinucleótido
FCS	Suero Fetal Bovino
Fm	Fosmidomicina
FPP	Farnesil pirofosfato
GA3P	Gliceraldehído 3-fosfato
GAs	Giberelinas
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GFPP	Geranilfarnesil pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
GUS	β -Glucuronidasa
H20d	H2O destilada
Hg	Higromicina
HMG	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (<i>gen</i>)
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMGR	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (enzima)
HMS	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa (enzima y <i>gen</i>)
IDI	Isopentenilpirofosfato isomerasa (enzima y <i>gen</i>)
IPP	Isopentenilpirofosfato
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	KiloDaltons
Km	Kanamicina

MAE	MOPS-Acético-EDTA
ME(P)	2-C-Metil-D-eritritol 4-(fosfato)
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico
min	minutos
MOPS	Ácido morfolino propanosulfónico
MU	4-metilumbeliferona
MUG	4-metilumbeliferil β -glucurónido
Mv	Mevinolina
MVA	Mevalonato
MVD	Mevalonato Difosfato Descarboxilasa (enzima y <i>gen</i>)
MVK	Mevalonato Kinasa
NAD(P)	Nicotinaminoadenosin dinucleótido (fosfato)
N/NH ₂ -terminal	Extremo amino terminal
Nf	Norflurazón
OAA	Ácido oxalacético
ORF	Marco abierto de lectura
pb	pares de bases
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDS	Fitoeno Desaturasa (enzima y <i>gen</i>)
PEP	Fosfoenol piruvato
3-PGA	3-fosfoglicerato
PMK	Fosfomevalonato kinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
PSA	Persulfato amónico
PSY	Fitoeno Sintasa: enzima y <i>gen</i>
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
p:v o p/v	peso:volumen
RACE	Amplificación rápida de extremos de ADNc
RE	Réticulo endoplasmático
Rf	Factor de retención
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS
SQS	Escualeno sintasa (enzima y <i>gen</i>)
SSC	Sal de citrato sódica
T ^a A	Temperatura Ambiente
TAE	Tris-Acético-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TK	Transcetolasa
TLC	Cromatografía en capa fina
Tm	"Melting Temperature"
Tp	Tampón
TPP	Pirofosfato de tiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UTR	Región transcrita no traducida
UV	Ultravioleta
var.	variedad
vit.	vitamina
vol.	volumen
v:v o v/v	volumen:volumen
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indonil β -glucurónido
ZA	Ácido Zaragóxico
ZDS	ζ -caroteno desaturasa (enzima y <i>gen</i>)

I. INTRODUCCIÓN

I.1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.

I.1.1. Los isoprenoides: Naturaleza bioquímica e importancia biológica.

Los isoprenoides (o terpenoides) constituyen una vasta familia de compuestos de muy diversa naturaleza estructural y funcional presentes en todos los seres vivos. Los isoprenoides sintetizados por las plantas representan la inmensa mayoría de los 29000 identificados hasta el momento, constituyéndose en la mayor familia de productos naturales conocidos [51].

Esta gran variedad de estructuras y funciones que singulariza a los compuestos isoprenoides resulta tanto más asombrosa cuando aprendemos que todos ellos, independientemente de su origen, derivan del mismo intermediario común, el isopentenil pirofosfato (IPP, C_5). En efecto, mediante condensaciones secuenciales del IPP con su isómero alílico el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), y en una serie de reacciones llevadas a cabo por enzimas específicas, tiene lugar la formación de los llamados prenildifosfatos, de longitud creciente. Estos esqueletos carbonados son los metabolitos iniciadores a partir de los cuales, y tras diversas modificaciones, tiene lugar la miríada de productos isoprenoides que se conocen.

Estructura química y función biológica son los criterios por los que han venido clasificándose convencionalmente todos los compuestos isoprenoides. En efecto, si podemos, por un lado, catalogarlos en función del grado de complejidad química que asuman, también podemos dividirlos en dos clases según se trate de metabolitos primarios o secundarios para la bioquímica de la célula vegetal donde, de hecho, son escasos los procesos metabólicos o de desarrollo en los que no esté directamente implicado un producto de naturaleza isoprenoide. Así, entre los que podríamos clasificar como primarios se incluyen algunos metabolitos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. Por su parte, conformando los denominados metabolitos secundarios aparecen compuestos isoprenoides con funciones no esenciales, y con frecuencia específicos de determinados grupos de plantas.

La unidad más sencilla a partir de la cual se forman los restantes terpenoides es referida como isopreno, de ahí el origen etimológico del término isoprenoide para referirse colectivamente a estos compuestos, caracterizados muchos de ellos por la capacidad de descomponerse térmicamente en ese gas. El isopreno forma parte de los isoprenoides más sencillos, los llamados hemiterpenos (C_5). Adiciones secuenciales de unidades de isopreno dan lugar a isoprenoides más complejos. En primer lugar, los monoterpenos de 10 carbonos (C), que fueron los primeros terpenoides caracterizados y en los que se basa la nomenclatura. Seguidamente, los sesquiterpenos (C_{15}) y los diterpenos de 20 carbonos. Estos tres últimos grupos son los que distinguen a los sistemas vegetales como productores de la fabulosa variedad de isoprenoides conocidos. Se trata generalmente de metabolitos secundarios

fundamentalmente implicados en la interacción planta-entorno. Algunos de ellos actúan como sustancias atrayentes para la polinización como los aceites esenciales y los aromas, o en las respuestas de defensa frente a agresiones biológicas como las fitoalexinas o las piretrinas. Otros diterpenos incluyen las giberelinas (GAs) o la cadena lateral de la clorofila y las filoquinonas. A continuación, aparecen los triterpenos, de 30 carbonos, entre los que encontramos los fitoesteroles, fundamentales para el mantenimiento de la estructura y fluidez de las membranas biológicas, y los brasinosteroides, derivados de estos últimos. Por su parte, los tetraterpenos, que contienen 40 carbonos, desarrollan importantes funciones en la fotosíntesis de la mano de los carotenoides, los más abundantes de entre todos los terpenoides sintetizados por las plantas. El ácido abscísico (ABA) es, asimismo, un derivado de los carotenoides. Los denominados politerpenos se encuentran formados por más de 8 unidades isopreno, entre los que se incluyen las fracciones terpénicas de las quinonas implicadas en los sistemas de transferencia de electrones (plastoquinonas o ubiquinonas), o los dolicoles, asociados a la glicosilación de proteínas. Algunos de estos compuestos pueden formar polímeros tan complejos como los del caucho, de hasta 1500 carbonos. Finalmente, los compuestos de naturaleza mixta tales como las proteínas preniladas o las citoquininas reciben el nombre de meroterpenos.

Muchos de estos compuestos eran conocidos y apreciados desde muy antiguo como aromatizantes, sustancias medicinales, perfumes, pigmentos o narcóticos. Consecuentemente, numerosos productos isoprenoides representan un indudable interés económico. Entre ellos destacan el caucho, aromas como el de la uva variedad moscatel, el mentol o el limoneno, nutraceúticos como las vitaminas A, D₃, K y E o los fitoesteroles y compuestos farmacológicamente activos como el taxol o la digitonina. Recientemente han sido registrados los carotenos licopeno y luteína como agentes oncoprotectores.

Animales, hongos y arqueobacterias sintetizan el IPP en exclusiva a partir del acetil-CoA a través de la ruta del mevalonato (MVA). De hecho, esta ruta, descubierta en los años 50, se consideraba proveedor único para la síntesis del intermediario común a todos los isoprenoides también en organismos fotosintéticos y eubacterias. Sin embargo, la última década ha sido testigo del descubrimiento de una nueva vía de síntesis de IPP. Efectivamente, se ha constatado la capacidad de utilizar el gliceraldehído 3-fosfato y un derivado C₂ del piruvato para su síntesis. Estos precursores son utilizados en una reacción dependiente de la pirofosfato de tiamina (TPP) catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) que produce la pentosa 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP), la cual, y mediante una original capacidad catalítica que implica una reordenación del esqueleto carbonado y una reducción, origina 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). La enzima responsable de este proceso, la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) cataliza el primer paso específico de esta nueva ruta en tanto que la DXP será a su vez precursora de los cofactores tiamina y piridoxol [131, 145]. Las siguientes etapas han sido caracterizadas recientemente, en el esfuerzo sinérgico de diversos grupos de investigación (revisado en [94, 238]). Una particularidad de esta ruta es la capacidad para

sintetizar simultáneamente IPP y DMAPP, en contraste con la del mevalonato que conduce exclusivamente hasta la síntesis de IPP.

Esta nueva vía biosintética, recientemente bautizada como del MEP, fue puesta de manifiesto originalmente en eubacterias y ha sido confirmada en diversos organismos autótrofos fotosintéticos, como las plantas superiores, las algas (excepción hecha de las euglenofitas) o las briofitas (revisado en [171, 173, 247]). Nuestro grupo ha sido pionero, en colaboración con el del Dr. Rohmer de la "Université Louis Pasteur" de Estrasburgo, en verificar la existencia de la ruta MEP en plantas, probablemente una de las últimas grandes ruta anabólicas por dilucidar. Adicionalmente, esta ruta ha sido confirmada también en los apicoplastos del organismo responsable de la malaria (*Plasmodium falciparum*) [142], así como en otros muchos organismos patógenos. Por todo ello, esta nueva ruta se erige en una diana ideal para el desarrollo de nuevos herbicidas y antibióticos.

El nuevo paradigma enunciado para la síntesis de isoprenoides en las células vegetales contempla la coexistencia de dos rutas biosintéticas de IPP localizadas en compartimentos distintos dentro de la célula vegetal. Según este modelo, los triterpenos y los sesquiterpenos son sintetizados en el retículo endoplasmático (RE)/citósol a partir del IPP producido vía MVA, mientras que mono, di y tetraterpenos lo harán desde el IPP originado a través de la ruta MEP, confiriéndole autonomía plena a los plástidos para la síntesis del IPP. Evidencias crecientes apuntarían hacia la cooperación de estas dos rutas biosintéticas en la consecución de procesos biosintéticos y morfogénicos particulares, aunque la relación entre ellas está aún pendiente de clarificarse convenientemente.

A pesar de la importancia de las funciones señaladas desempeñadas por los isoprenoides, y del evidente interés que despierta su estudio, muchos aspectos de la bioquímica de estos productos y en particular de la regulación de su propia biosíntesis son relativamente poco conocidos, particularmente en lo que se refiere a aquellos sintetizados por la vía plastídica del MEP. La extrema complejidad de su metabolismo, por un lado, y la ocasionalidad de su biosíntesis tanto a nivel espacial como temporal, por otro, justifican la dificultad de su estudio.

Este trabajo pretende ser una introducción al estudio de los genes que codifican para las enzimas (DXS y DXR) que catalizan las dos primeras etapas de la ruta MEP de síntesis de IPP, utilizando para ello *Arabidopsis thaliana*, modelo universal de la genética molecular vegetal. De acuerdo con estos antecedentes se han planteado los siguientes objetivos que enunciamos a continuación.

I.1.2. Objetivos.

- 1.-Identificar, aislar y caracterizar los genes *DXS* y *DXR* de *A. thaliana*.
- 2.-Resolver la función de las proteínas *DXS* y *DXR* en relación con las dos primeras etapas enzimáticas de la recientemente descubierta ruta MEP de síntesis de IPP.
- 3.-Analizar el patrón de expresión de los genes *DXS* y *DXR*.
- 4.-Determinar la localización subcelular de las proteínas *DXS* y *DXR*.
- 5.-Generar y examinar plantas transgénicas de sobreexpresión *DXS* y *DXR*, con el propósito de obtener información acerca de posible papel regulador en la biosíntesis de los isoprenoides plastídicos.
- 6.-Introducir el estudio de la interacción entre las vías MEP y del MVA de síntesis de IPP coexistentes en la célula vegetal.

I.2. BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.

I.2.1. Naturaleza química de los isoprenoides.

Los isoprenoides, también llamados terpenos o terpenoides (derivado del inglés "turpentine", trementina [127]) representan la mayor familia de productos naturales conocidos [51]. En consecuencia, la diversidad química estructural de estos compuestos es enorme. A pesar de ello, todos derivan de una unidad estructural común de 5 átomos de C, observación que, en 1910, le valió al Profesor Otto Wallach para ser galardonado con el premio Nóbel. No obstante, el modelo postulado no permitía justificar la enorme complejidad de los compuestos de naturaleza isoprenoide. De esta manera, L. Ruzicka y cols. propusieron hacia 1953 la "regla biogénica del isopreno", modelo de racionalización del origen biosintético de todos los isoprenoides por el que en 1939 recibieron el premio Nóbel de Química. Dicha regla hacía énfasis en los mecanismos de reacción bioquímica ignorando la propia estructura del precursor. Asumía la implicación de reacciones electrofílicas que generaban intermediarios carbocatiónicos a partir de aquel precursor C₅. De este modo, las diversas subfamilias de compuestos isoprenoides derivarían de un único intermediario común siguiendo una compleja y ramificada ruta bioquímica que incluía ciclaciones, reordenamientos y conjugación de diversos grupos funcionales, modificaciones todas ellas perfectamente conocidas por la química orgánica. Como verificaría años después F. Lynen, es el **isopentenilpirofosfato** (2-metil-1,3-butadienofosfato: IPP, Figura I.1) la molécula de 5 C considerada el precursor biosintético activo, originándose todos los isoprenoides a partir de la condensación secuencial de unidades de IPP sobre su isómero alílico el **dimetilalilpirofosfato** (DMAPP).

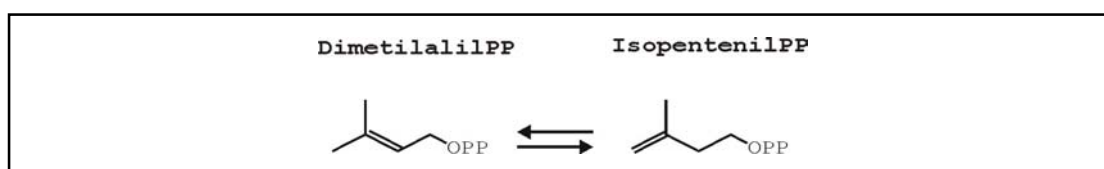


Figura I.1: El isopentenilpirofosfato y su isómero alílico, el dimetilalilpirofosfato:

Cada subfamilia de isoprenoides se clasifica en función del grado de complejidad química que asuma, esto es, del número de unidades de isopreno que han debido adicionarse para construir el esqueleto básico correspondiente. Estas moléculas parentales tendrán, por lo tanto, un número de carbonos múltiplo de 5. Los miembros de una misma subfamilia han venido designándose convencionalmente sobre la base de los monoterpenos (C₁₀), primeros isoprenoides identificados ya a mediados del siglo XIX, de ahí la nomenclatura empleada y que aparece reflejada en la Tabla I.1.

C _N	NOMBRE	MOLÉCULA PARENTAL	SUBFAMILIAS
5	Hemiterpenoides	IPP	Isopreno, citoquininas e isopentenil-ARNT
10	Monoterpenoides	GPP	Iridooides y aceites esenciales.
15	Sesquiterpenoides	FPP	Fitoalexinas, piretrinas y fracción terpénica de proteínas preniladas.
20	Diterpenoides	GGPP	Giberelinas, vit. A, fracción terpénica de proteínas preniladas, cadena lateral de las clorofilas (fitol) y de la vit. K (filoquinona) y E (tocoferol) y resinas de gimnospermas.
25	Sesterpenoides	GFPP	Ceras.
30	Triterpenoides	Escualeno	Fitoesteroles y derivados esteroidicos (brasinosteroides y saponinas), triterpenos pentacíclicos.
40	Tetraterpenoides	Fitoeno	Carotenoides, xantófilas y ABA.
>40/10 ³ -10 ⁴	Politerpenoides	GGPP	Caucho, látex, dolicol y fracción terpénica de la plastoquinona y la ubiquinona.

Tabla I.1: Clasificación de los terpenoides y las subfamilias correspondientes presentes en el reino vegetal (adaptado de [52, 315]).

I.2.2. La ruta del acetato/mevalonato: la “vía clásica” de síntesis de IPP.

Siguiendo un criterio meramente histórico, estudiaremos en primer lugar algunos aspectos relativos a la síntesis de IPP por la llamada **ruta del mevalonato**, para centrarnos a continuación en la **ruta alternativa o del MEP**, objeto de esta memoria. La vía anabólica de síntesis de IPP a partir del acetato/mevalonato lleva siendo ampliamente estudiada desde hace décadas, razón por la cual es referida también como vía clásica. Bloch y Rittenberg establecieron las bases para la elucidación de esta ruta biosintética al confirmar al acetil-CoA como precursor para la síntesis de esteroides [230], trabajos por los cuales se hicieron merecedores del premio Nobel de Medicina en 1964. El **mevalonato** es formado a partir de la condensación secuencial de 3 moléculas de **acetil-CoA** en dos pasos enzimáticos que rendirán sucesivamente acetoacetil-CoA y **3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA)**, seguidos por un paso de reducción catalizado por la enzima **3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR)**. A esta enzima se le ha atribuido el papel de catalizar la etapa limitante de esta ruta bioquímica. Se trata de la primera reacción irreversible y responsable de la producción del primer intermediario específico de la ruta, razón por la cual se ha venido designando convencionalmente como ruta del mevalonato. A partir de este compuesto, y mediante dos pasos sucesivos de fosforilación dependientes de ATP seguidos de una descarboxilación, tiene

lugar la formación del IPP. La Figura I.2 ilustra todas las reacciones implicadas así como las enzimas involucradas en la ruta del MVA de síntesis de IPP.

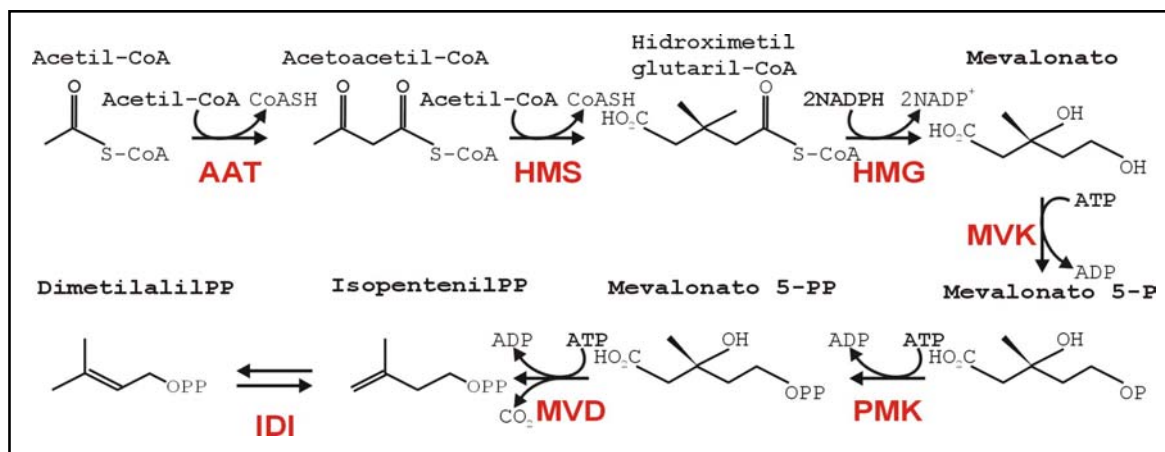


Figura I.2: Representación esquemática de las reacciones implicadas en la biosíntesis de IPP por la denominada ruta del mevalonato. Las abreviaturas de las distintas enzimas involucradas reflejan la notación acordada para cada una de los genes correspondientes en *Arabidopsis thaliana*. AAT: AcetoacetilCoA-Tiolasa, HMS: HMG-CoA Sintasa, HMG: HMG-CoA reductasa, MVK: Mevalonato kinasa, PMK: fosfomevalonato Kinasa, MVD: difosfomevalonato kinasa, IDI: isopentenildifosfato isomerasa. Sin embargo, está comúnmente aceptado HMGR y AACT para los productos de los genes HMG y AAT respectivamente. PP, pirofosfato.

I.2.3. La vía del metileritritolfosfato (MEP) de síntesis de IPP.

Desde los años 50, en los que se estableció la vía del acetato/mevalonato en levaduras y animales, esta ruta metabólica se ha considerado como exclusiva para la síntesis del IPP además de ubicua en toda de la escala evolutiva [279]. Los últimos años, y gracias al esfuerzo sinérgico de muchos investigadores, han permitido clarificar la que es considerada como la última gran ruta bioquímica por caracterizar, y que permite la síntesis independiente del mevalonato del intermediario común a todos los isoprenoides, el IPP. El congreso celebrado en Barcelona del 21 al 23 de abril de 1999 ("4th European Symposium on Plant Isoprenoids") acordó denominar a esta ruta, ruta del MEP (metileritritolfosfato), por analogía con la ruta del mevalonato, tomando ambas así el nombre del primer intermediario específico. No obstante, la bibliografía utiliza indistintamente vía de Rohmer, del DXP, alternativa, mevalonato independiente o plastídica para referirse a esta nueva ruta de síntesis de IPP.

I.2.3.1. Antecedentes históricos en la elucidación de la vía del MEP. Los organismos procariontes como modelo.

Los primeros trabajos que apuntaban hacia la no universalidad de la vía del mevalonato

en la síntesis de IPP aparecieron en los años 60 [171, 173], tempranamente después del descubrimiento de la misma, pero no fue hasta 1981 cuando un primer modelo alternativo fue propuesto [218]. Éste se basaba en la imposibilidad de seguir el marcaje radioactivo sobre las cadenas laterales de la **ubiquinona** de modo coherente a lo esperado según la ruta del acetato/mevalonato, utilizando para ello diferentes especies procariotas (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas sesami*, ***Escherichia coli*** y *Rhodopseudomonas capsulata*) suplementadas con ^{14}C -acetato. Los autores sugerían una vía alternativa a través del acetolactato, utilizando el equipo enzimático implicado en el metabolismo de la leucina y la valina, para sintetizar HMG-CoA a partir de piruvato y acetaldehído. Con posterioridad, Zhou y White refutaron ese modelo basándose en observaciones realizadas sobre experimentos de marcaje en los que combinaban diferentes sustratos radioactivos, concretamente $^{13}\text{C}_2$ -acetato y $^{13}\text{C}_6$ -glucosa [331]. Los resultados por ellos obtenidos relativos a la síntesis de ubiquinona en *E. coli*, apuntaban ya hacia el piruvato más que hacia el acetyl-CoA como precursor en la síntesis de IPP en esta especie. Se añadían así evidencias que excluían al mevalonato como intermediario en la biosíntesis de isoprenoides en estos organismos. Otras de estas evidencias derivarían de los trabajos con células de *E. coli* permeabilizadas para la entrada del IPP o el mevalonato, que confirmaron la imposibilidad de éste para incorporarse a los isoprenoides, o de la ausencia de efecto paralizador en el crecimiento de *E. coli* de la **mevinolina**, inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa [107]. Finalmente, diversos autores intentaron infructuosamente detectar in vitro actividades enzimáticas relacionadas con la ruta del mevalonato a partir de extractos crudos de distintas bacterias como *E. coli* y *Zymomonas mobilis* utilizando como sustratos los intermediarios desde el HMG-CoA hasta el MVAPP (Figura I.2) [134].

I.2.3.2. La 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa: primera enzima de la vía MEP.

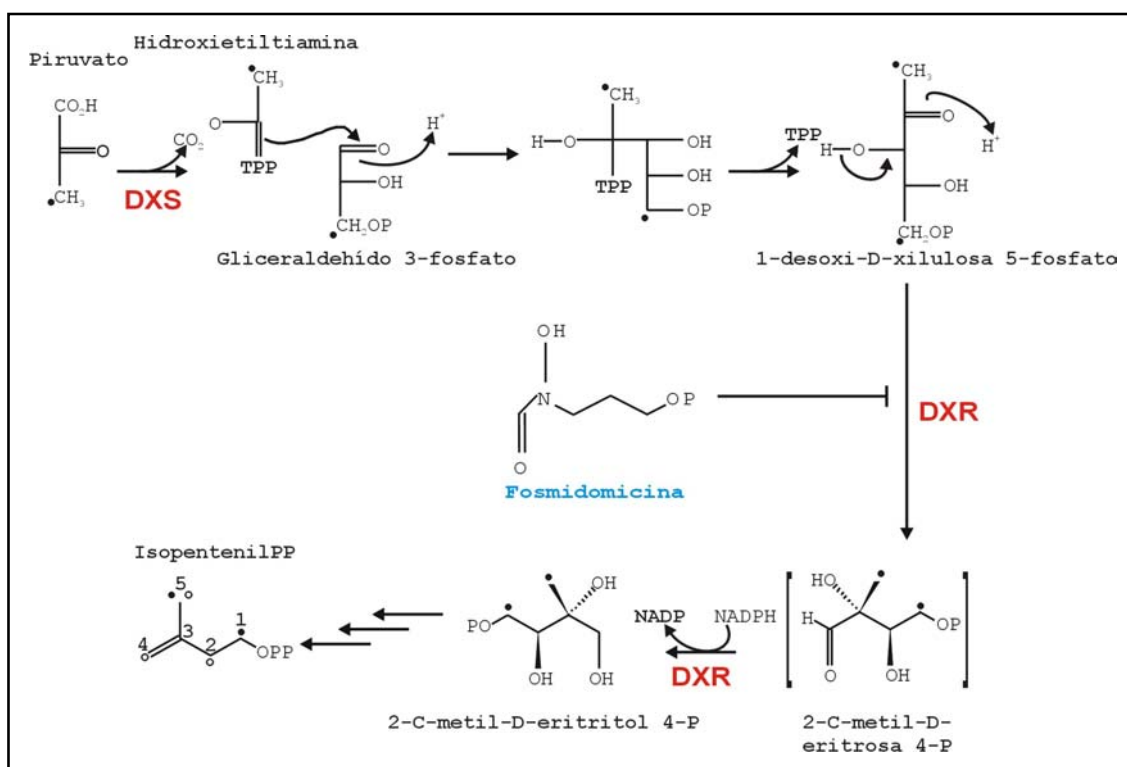
En la línea de los experimentos descritos en el epígrafe anterior, fue observado un marcaje de los hopanoides y la cadena lateral de la ubiquinona incompatible con el acetato/mevalonato como precursores. Los hopanoides son triterpenoides bacterianos que constituyen los análogos funcionales de los esteroides propios de las membranas eucariotas. Fueron los estudios de incorporación de distintos precursores marcados (^{13}C -glucosa, -acetato, -eritrosa y -piruvato) en aquellos isoprenoides, efectuados sobre cultivos celulares de diversas eubacterias (*E. coli*, *Methylobacterium organophilum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *acidophila*), los que llevaron a Rohmer a proponer un modelo alternativo de síntesis de IPP que implicaba a las triosas fosfato [248]. Pero no sería hasta 1996 cuando se confirmaría la naturaleza exacta de los precursores de esta nueva vía, postulándose el origen preciso de los carbonos presentes en la molécula de IPP así sintetizada. Para ello, utilizaron mutantes de *E. coli* defectivos para enzimas del metabolismo de las triosas-fosfato. Basándose en aquellos estudios se propuso que el esqueleto isoprénico pentacarbonado original se formaría en una reacción enzimática dependiente de tiamina similar a las de las transcetolasas y que implicaría la condensación de la hidroxietiltiamina (C_2) derivada del piruvato con el grupo aldehído de la

subunidad C₃ del gliceraldehído 3-fosfato (Figura I.3) [249]. El producto así formado sería la **1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP)**, sustrato ya conocido como precursor en la biosíntesis de **tiamina** y **piridoxina**: vitaminas B1 y B6 respectivamente [131, 145]. Este descubrimiento permitió explicar el marcaje preferencial de los átomos de C en posición 1 y 5 observado hasta el momento para la unidad IPP en numerosos productos isoprenoides, tal y como muestra la Figura I.3, y que resultaría incompatible con el marcaje en los C 2, 3 y 4 esperable de originarse vía acetato/mevalonato. La enzima responsable de aquella actividad enzimática se denominó **1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS)**, y el gen responsable ha sido identificado y clonado en *E. coli* incluido en un operón que codifica por al menos otra enzima implicada en la síntesis de isoprenoides [177, 278].

I.2.3.3. La 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa cataliza la producción del primer intermediario exclusivo de la vía de Rohmer.

Experimentos de incorporación utilizando [¹³C]-1-desoxi-D-xilulosa confirmaron el esquema biogénico apuntado ya por Rohmer y colaboradores y que anticipaba que el esqueleto carbonado lineal de la pentosa DXP sería modificado para dar lugar a los precursores ramificados de la unidad isoprenoide [14, 91, 249]. Se propuso un proceso que implicaba un reordenamiento intramolecular de la DXP en el intermediario hipotético de reacción **2-C-metileritrosa 4-fosfato** el cual a su vez, y tras un paso de reducción dependiente de NADPH, se convertiría en el **2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP)**, siguiente intermediario y primer metabolito específico de la vía de síntesis de IPP independiente de MVA [91] (Figura I.3). La actividad enzimática responsable de la catálisis de esta segunda etapa en la nueva ruta de síntesis de IPP sería similar a la observada en las cetoácido reductoisomerasas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada tales la valina, la leucina o la isoleucina, que fue designada como **1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR)**. La identificación de mutantes auxótrofos para el producto de reacción defosforilado, el metileritritol (ME), permitió el aislamiento e identificación del gen correspondiente en *E. coli* [158, 291]. La elección de ME en lugar de MEP vino motivada por la capacidad probada de la forma defosforilada para incorporarse eficientemente en las cadenas laterales de las quinonas en *E. coli* [91].

Figura I.3: Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las dos primeras enzimas en la biosíntesis de IPP por la ruta del MEP. El marcaje originado por la ¹³C-glucosa aparece representado por puntos negros, apareciendo en los C 1 y 5 de la molécula final de IPP. Por su parte, los C en las posiciones 2, 4 y 5 enriquecidas en ¹³C correspondientes al IPP derivado del acetato/mevalonato aparecen señalados por círculos. Aparece también representada la estructura del inhibidor específico de la reacción catalizada por la DXR, la fosmidomicina. TPP, pirofosfato de tiamina.



I.2.3.4. Las síntesis de IPP vía MEP en plantas: Las dos primeras etapas.

Una vez confirmada la viabilidad bioquímica de la síntesis de IPP de manera independiente del mevalonato por esta nueva ruta del MEP, se revisaron los abundantes trabajos que apuntaban en esta dirección en organismos vegetales [94, 171-173]. Entre ellos destacaban los relacionados con la utilización de la mevinolina. Así, a principios de los 80 se observó como este inhibidor afectaba el desarrollo de plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) y rábano (*Raphanus sativus*), bloqueando la síntesis de **esteroles**, mientras que la producción plastídica de pigmentos fotosintéticos permanecía inalterada [20, 19, 259]. Resultados similares fueron también obtenidos con *Sylibum marianum* [88].

Otro conjunto de evidencias se basó en los resultados relativos a los estudios de incorporación de precursores radioactivos en isoprenoides, en una aproximación análoga a la seguida para las bacterias. Así se observó como **plástidos** aislados de narciso (*Narcissus pseudonarcissus*) y espinaca (*Spinacea oleracea*) eran incapaces de producir IPP a partir de mevalonato o sus derivados fosforilados ([153, 182] y revisado en [150]). Más aún, en cultivos de *Ginkgo biloba* y *Salvia miltiorrhiza* suplementados con ^{13}C -mevalonato fue encontrada una incorporación preferencial del marcaje en los esteroides respecto de la observada en los ginkgólidos [264]. En cambio, en presencia de glucosa marcada en diferentes posiciones con ^{13}C se observó un patrón de incorporación coherente con el observado en eubacterias según la recién descubierta ruta MEP. Otro tanto se constató para el esqueleto terpénico de los taxanos en *Taxus chinensis* [93], y para la marrubina sintetizada por la lamiácea *Marrubium vulgare*

[151].

Pero fueron los trabajos en otras especies vegetales (*Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* y *Daucus carota*) los que pusieron definitivamente en evidencia el origen independiente del mevalonato del IPP implicado en la síntesis del **fitol** (cadena lateral de la **clorofila**), el **β -caroteno** y la cadena poliprenílica de la **plastoquinona**, al contrario de lo que ocurriría para los esteroides citosólicos [174]. Se demostraba de esta forma la coexistencia de las dos vías de síntesis de IPP en células vegetales, confirmando la autonomía de los plástidos para su síntesis. Por medio de una aproximación similar se mostró como varios de los **aceites esenciales** de naturaleza monoterpénica sintetizados por *Mentha x piperita*, como el geraniol, la mentona, la pulegona y el timol eran producidos siguiendo la ruta del MEP [95].

A continuación, y una vez identificada la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato como primer intermediario en esta nueva ruta de síntesis de IPP, se sucedieron los experimentos que estudiaban su incorporación en distintos isoprenoides. Se confirmó de este modo como la vía del DXP sería también la responsable de la biosíntesis de β -caroteno, luteína y fitol sobre cultivos celulares de *Catharanthus roseus* [14]. Igualmente, y mediante la administración directa del precursor radioactivo en las flores de la manzanilla (*Matricaria recutita*), se constató su incorporación en algunos sesquiterpenos específicos [2]. Sin embargo, en este caso, se observó como las unidades isoprenílicas tenían un origen mixto derivado de ambas vías de síntesis de IPP, aspecto sobre el que incidiremos en el apartado I.3.2. Algo parecido ocurría con el isopreno liberado por el álamo (*Populus nigra*), el sauce (*Salix viminalis*) y la celidonia (*Chelidonium majus*), producido primariamente vía IPP plastídico, pero con una contribución significativa de la vía del MVA [330].

Aproximaciones de otro orden se han seguido con el objeto de obtener evidencias directas de la presencia de los genes que codifican para las enzimas de la ruta MEP de biosíntesis de IPP en plantas. En 1996 se describía un mutante albino de *Arabidopsis thaliana* (**mutante *cla1-1***), con importantes alteraciones en el desarrollo morfológico de los **cloroplastos** debidas, presumiblemente, a un déficit en la síntesis de pigmentos fotosintéticos [187]. Aunque originalmente no se relacionó al gen *CLA1* con la vía del MEP, la homología de la proteína con DXS bacterianas y vegetales clonadas posteriormente confirmaron que efectivamente se trataba de un mutante de las DXS de *Arabidopsis* [101]. El **mutante *chs5*** ha sido también identificado como afectado en la DXS y posee un fenotipo albino singular, que únicamente se manifiesta cuando es crecido a temperaturas restrictivas, esto es, por debajo de 16 °C [11]. En los últimos años hemos asistido al clonaje y caracterización de ADNc correspondientes al gen *DXS* en diversas especies vegetales, como en *Mentha x piperita* [165], *Capsicum annuum* [30], *Lycopersicon esculentum* [178] *Catharanthus roseus* [50, 303], *Medicago truncatula* [308, 309] y *Tagetes erecta* [198].

Por su parte, ortólogos de la DXR de *E. coli* han sido clonados y caracterizados en mayor o menor detalle en varias especies vegetales como *Mentha x piperita* [161, 185], *Arabidopsis thaliana* [48, 266], *Oryza sativa* [308], *Catharanthus roseus* [303] o *Lycopersicon esculentum* [237]. No obstante, y aún a pesar de constatar la actividad enzimática DXR en hojas de *Liriodendron tulipifera* [254], no ha sido posible incorporar el producto de la reacción correspondiente en su forma defosforilada (ME) marcado radioactivamente en especies de plantas. Las razones esgrimidas apuntan a la no traslocación del ME a plástidos, o bien a la ausencia o ineficacia de la kinasa responsable de su fosforilación. Esta segunda hipótesis parece ser la más fundada tras conseguir incorporar MEP a isoprenoides presentes en **cromoplastos** aislados de *Capsicum annuum* entre otras especies [102].

Un denominador común a todas las enzimas DXS y DXR vegetales identificadas hasta el momento es la presencia en el extremo amino-terminal de un dominio con características de péptido de tránsito a plástidos, no presente en los homólogos procariotas, y que resultaba coherente con la localización subcelular que se había asignado a la ruta de MEP en plantas.

I.2.3.5. La vía MEP de síntesis de IPP en otros organismos fotosintéticos:

Con el propósito de estudiar la distribución de la vía del MEP en organismos fotosintéticos distintos de las plantas superiores, diversos autores plantearon una estrategia para evitar el reciclaje del CO₂ que tiene lugar como consecuencia de la fotosíntesis y que podía alterar los resultados. Para ello, se crecían los sistemas a estudio bajo condiciones heterotróficas suministrando una fuente de carbono marcada en condiciones de luminosidad tales que, si bien no permitían la fotosíntesis, eran aún compatibles con la morfogénesis de los plástidos y, consecuentemente, con la producción de todos sus compuestos isoprenoides. Los primeros resultados basados en estas aproximaciones se obtuvieron con el alga verde *Scenedesmus obliquus*, siguiendo el marcaje en ¹³C de la glucosa y el acetato. Los datos obtenidos ratificaron el origen independiente del mevalonato de diversos isoprenoides, incluyendo los esteroides [267, 268]. El mismo comportamiento fue posteriormente observado con *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella fusca* [87] y recientemente se hizo extensivo a muchas otras especies del taxon Chlorophyta [265]. Estos y otros resultados permitieron a los autores presentar a las clorofitas como el único grupo de organismos eucarióticos fotosintéticos que utilizan exclusivamente la recientemente descubierta vía MEP de síntesis de IPP [265]. Entre estos resultados destacaban, adicionalmente, las observaciones efectuadas sobre la incapacidad del inhibidor mevinolina para alterar el crecimiento y multiplicación de estas algas [267], unido a la imposibilidad de aislar, mediante técnicas de biología molecular, ninguno de los genes implicados en la vía del mevalonato de síntesis de IPP [265].

Por su parte, la misma dualidad observada en las plantas superiores en cuanto a la síntesis de IPP fue también encontrada en las algas rojas de la especie *Cyanidium caldarium* y la

crisófito *Ochromonas danica* [87]. Algo parecido ocurre con las diatomeas marinas de los géneros *Phaeodactylum* o *Nitzschia* [79]. Para la euglenofita *Euglena gracilis* sin embargo, esta dicotomía estaba ausente. Todos los isoprenoides analizados, tanto plastídicos como citoplasmáticos, aparecían sintetizados a través de la vía del acetato/mevalonato [87].

No abundan los trabajos referidos a especies de briofitas y helechos. No obstante, se ha observado el mismo comportamiento que las plantas superiores en cuanto a la síntesis del IPP en diversas especies de hepáticas [3, 137, 204, 295] o musgos [137]. Las hepáticas tienen el interés añadido de producir, al igual que las plantas, grandes cantidades de aceites esenciales. Coherentemente con ello, la DXS y varias preniltransferasas de *Marchantia polymorpha* han sido identificadas como asociadas a estructuras celulares especializadas en la síntesis de los isoprenoides específicos de dichas hepáticas (apdo. I.3.1.2.; [286]).

I.2.3.6. Etapas enzimáticas posteriores a la DXR en la síntesis vía MEP del IPP.

Durante el último lustro se han identificado las reacciones enzimáticas, más allá de la catalizada por la DXR, que conducen hacia la síntesis de IPP por esta nueva vía del MEP (Figura I.4). Diversos sistemas bacterianos han constituido, en todos los casos, el modelo de origen. Una de las mejor estudiadas, *E. coli*, se ha desvelado como un poderoso sistema para la identificación de los diversos genes implicados en la ruta del MEP. A partir de ahí, el esfuerzo multidisciplinar de diversos grupos de investigación ha rentabilizado el conocimiento de genomas completamente secuenciados y las colecciones de secuencias genéticas expresadas (*ESTs*) para la rápida dilucidación de la ruta del MEP en distintas especies de bacterias y plantas. Las aproximaciones bioinformáticas y de genómica comparativa, sumadas a las estrategias basadas en la ingeniería genética, han tenido un papel determinante en la consecución con éxito de esta empresa. Asimismo, sistemas vegetales como el de los cromoplastos purificados de pimiento (*C. annuum*) o narciso (*Narcissus pseudonarcissus*) se han revelado como extremadamente versátiles para el seguimiento del marcaje de intermediarios de esta ruta, previamente identificados en los sistemas bacterianos, en diversos isoprenoides, tales como los carotenoides.

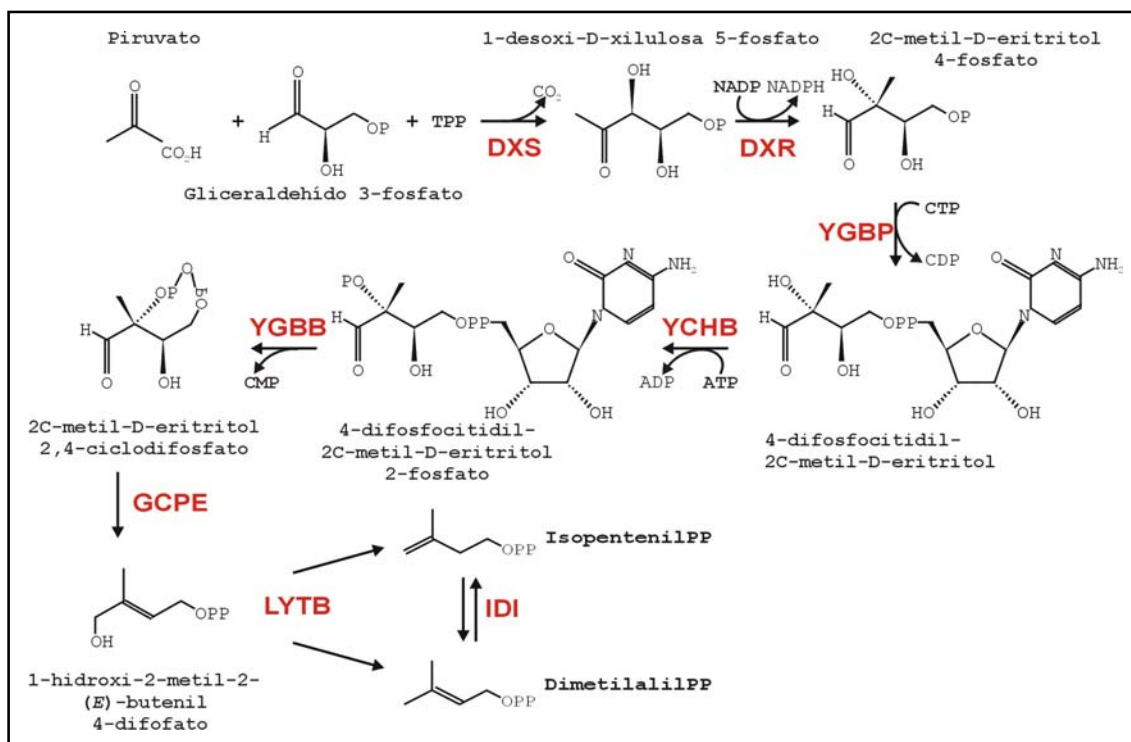


Figura I.4: Ruta del metileritritol fosfato de síntesis de IPP. Aparecen representados todos los pasos desde los precursores gliceraldehído 3-fosfato y piruvato hasta isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato. Cada etapa enzimática, excepción hecha de las catalizadas por la DXS, DXR e IDI, se han denominado según la nomenclatura original del gen bacteriano correspondiente.

A pesar de que teóricamente restaba una etapa de reducción, de deshidratación y otra de fosforilación hasta la producción de IPP desde el MEP, el primer producto identificado a continuación de dicho intermediario resultaba de la transformación del MEP en una reacción dependiente de citidín trifosfato (CTP). Las búsquedas en las bases de datos de enzimas con capacidades enzimáticas como la reseñada alumbraron al gen *ygbP* (también designado *ispD*), del que se ha mostrado la capacidad de catalizar la formación de **4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol** a partir de MEP y CTP [245], recibiendo así el nombre de **4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa** (Figura I.4). Más aún, se ha confirmado la capacidad de este nuevo intermediario de incorporarse eficientemente a carotenoides de cromoplastos aislados de *C. annuum* [245]. Por su parte, el ADNc del gen correspondiente en *Arabidopsis thaliana* ha sido recientemente clonado y expresado, confirmándose la actividad del dominio catalítico [244].

La identificación de esta tercera etapa de la ruta MEP de síntesis de IPP sentó las bases para la búsqueda "in silico" de genes conservados entre las secuencias genómicas de eubacterias y plantas (en este caso con un extremo N-terminal adicional con características de péptido de tránsito a plástidos) y que estuviesen ausentes de arqueobacterias. Estas aproximaciones bioinformáticas permitieron descubrir candidatos a intervenir en esta nueva ruta de síntesis de IPP, entre los que se encontraron los responsables de las dos siguientes etapas (*ygbB*).

El producto del gen *yhb* (luego designado *ispE*) fue sobreexpresado en *E. coli*, mostrándose la capacidad de catalizar la fosforilación del grupo hidroxilo en posición 2 del 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol para formar **4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato** en una reacción con el ATP como donador de grupos P [183] (Figura I.4). El ADNc del gen ortólogo en *L. esculentum* fue clonado, expresado y la proteína correspondiente purificada confirmándose la actividad enzimática, que recibió el nombre de **4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato kinasa** [246]. Curiosamente, había sido referida, años atrás, la inducción de la expresión de este gen durante el proceso de maduración organoléptica del fruto de tomate [166]. Fue aislado en el contexto de la búsqueda de genes asociados a la morfogénesis de cromoplastos, en los que se produce la acumulación masiva de carotenoides como el **licopeno**. Por otra parte, se ha detectado la capacidad de esta enzima, residual aunque metabólicamente relevante, para fosforilar isopentenil monofosfato en *E. coli* y *M. Piperita* en una reacción propuesta en su momento como paso terminal de la vía [162]. Otros resultados refutarían esto último, ratificando la actividad enzimática propuesta originariamente [45].

A continuación se demostró la implicación del gen *ygbB* de *E. coli* (posteriormente llamado *ispF*) en la ruta MEP. De hecho su distribución se ajustaba a la de aquellos organismos donde esta ruta había sido descrita. Aparecía, además, frecuentemente unido o fusionado a los genes *ispD*. El gen correspondiente fue aislado y expresado, observándose su capacidad para catalizar la conversión de 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato en **2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato** liberando CMP (Figura I.4). La participación en la ruta MEP de dicho producto, conocido anteriormente por acumularse en algunas bacterias bajo condiciones de estrés oxidativo [217], se ha verificado por medio de experimentos de incorporación de dicho metabolito en carotenoides, realizados con el modelo de cromoplastos de *C. Annum* [103, 129] o del intermediario fitoeno, en cromoplastos de *Narcissus pseudonarcissus* [103]. El homólogo en *Plasmodium falciparum* ha sido, por su parte, recientemente clonado y la actividad catalítica de la proteína recombinante correspondiente ratificada mediante expresión en *E. coli* [242].

A todas las herramientas presentadas hasta el momento para la identificación de las etapas enzimáticas de la ruta del MEP, se sumó otra que proporcionaría una evidencia directa de la implicación de los genes correspondientes. Se trataba de cepas bacterianas modificadas genéticamente que resultaban dependientes del mevalonato en cuanto a la síntesis de IPP. Fueron obtenidas integrando un operón sintético (operón MVA) conteniendo las secuencias codificantes para la MVD de levadura, la PMK humana y la MVK de levadura (ver Figura I.2) [45]. Esta cepa, al poseer todas las etapas enzimáticas necesarias para sintetizar IPP a partir del mevalonato suplementado exógenamente, permite rescatar mutantes letales para cada una de los enzimas de la vía del DXP. Siguiendo esta elegante aproximación, se confirmó la implicación de los genes *dxs*, *dxr*, *ygbP*, *yhb* e *ygbB* de *E. coli* en la ruta de síntesis de IPP independiente de MVA [45]. La inclusión facultativa en el operón MVA del gen para la isopentenil difosfato isomerasa (IDI) permitiría discriminar la ubicación del gen en la zona troncal de la ruta, o bien

después del supuesto punto de ramificación [45, 239].

En efecto, la utilización de aquellas cepas permitió solventar una cuestión que quedaba pendiente y sobre la que se planteó cierta controversia. Se trataba de la existencia de un punto de ramificación en la parte baja de la ruta MEP de síntesis de IPP, ramificación que conduciría a la síntesis independiente de IPP y DMAPP, de modo distinto a lo que ocurre en la ruta del MVA. Ya se sabía que el DMAPP no era el precursor exclusivo del IPP plastídico en plantas [13], lo cual además resultaba coherente con que la pérdida de la actividad IDI en *E. coli* no resultase letal [239]. En este sentido, fue postulada la síntesis del IPP de modo independiente respecto de su isómero DMAPP. Esta hipótesis se propuso en base al estudio del marcaje de los isoprenoides producidos por una cepa bacteriana defectiva en la actividad DXS, la cual había sido suplementada con isómeros del ME marcados con deuterio [55]. Recientemente, y utilizando formas deuteradas de DX, ha sido corroborado la existencia de dicha ramificación en la biosíntesis de IPP y DMAPP, así como la funcionalidad de una IPP isomerasa plastidial para interconvertir ambas formas isoméricas [132].

El siguiente paso enzimático en la ruta MEP fue descubierto gracias a la constatación de que la disrupción del gen *gcpE* (también *ispG*), sobre el fondo genético de la cepa de *E. coli* portadora del operón MVA, provocaba la acumulación de 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato [269], el último producto de reacción descrito. Este hecho, sumado a la capacidad de revertir dicho mutante suplementando el medio de cultivo con mevalonato, apuntaba inequívocamente hacia la implicación del enzima codificada por el gen *gcpE* en la parte troncal de la ruta de síntesis de IPP [46]. La sobreexpresión de la proteína recombinante correspondiente permitió identificar la naturaleza del producto de reacción: se trata de la **1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato** resultante de la apertura del anillo del 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato en un paso de reducción [123] (Figura I.4). La enzima correspondiente fue denominada, consecuentemente, **1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa**. El clonaje del ADNc homólogo en *Arabidopsis*, así como la confirmación de la localización plastidial del producto correspondiente de modo coherente con la función a asumir dentro de la célula vegetal, completan la información hasta la fecha sobre el gen *GCPE* [225].

Los trabajos llevados a cabo con una cepa mutante de la cianobacteria *Synechocystis* permitieron presentar las primeras evidencias experimentales del rol de *lytB* en la vía del MEP [78]. La capacidad de revertir el mutante con análogos alcohol del IPP y el DMAPP apuntaba hacia un papel de la actividad resultante más allá o en el propio punto de ramificación de la ruta. Evidencias ulteriores sobre la función de la proteína se obtuvieron a partir del clonaje del gen correspondiente *E. coli* [6]. En efecto, el gen *lytB* (alternativamente designado *ispH*) cataliza la reacción responsable de la ramificación por la que simultáneamente se sintetizaba tanto el IPP como el DMAPP, según una relación 5:1, a partir del último intermediario reconocido 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato. No obstante, los requerimientos exactos de cofactores para el

desarrollo de esta reacción no se conocen aún totalmente. En cualquier caso, esta última etapa constituye una diferencia fundamental con la ruta de mevalonato, en la que el DMAPP es generado secuencialmente desde el IPP gracias a la enzima IDI. El papel de esta enzima, ausente por otra parte en numerosas especies bacterianas que operan según la ruta del MEP [243], sería el de balancear o equilibrar los valores de IPP y DMAPP optimizando las disponibilidades de los intermediarios en la síntesis de isoprenoides [239].

Se terminaba así la elucidación completa de los pasos biosintéticos que conducen a la síntesis de IPP, por esta ruta del MEP, de manera independiente del mevalonato. La presentación de esta nueva vía permitió, a su vez, una interpretación razonable de resultados parciales obtenidos anteriormente, y que habían sido explicados en el marco de modelos basados en la compartimentación subcelular de la vía del MVA, aspecto que será desarrollado en el apartado I.3.

I.2.3.7. La vía del MEP de síntesis de IPP representa una atractiva diana para el ensayo de antibióticos y herbicidas.

La existencia de la ruta del MEP en plantas superiores y algas hacen a las distintas enzimas implicadas dianas ideales para el ensayo de herbicidas. Más aún, la presencia de esta nueva vía de síntesis de IPP en organismos patógenos hace de todos sus inhibidores potenciales antibióticos. La ausencia de ortólogos entre los huéspedes mamíferos las hacen todavía más atractivas para dicho propósito.

En este contexto, son destacables los trabajos relativos a la **fosmidomicina**, primer inhibidor caracterizado de esta nueva ruta bioquímica (Figura I.3). Este antibiótico, originalmente aislado de *Streptomyces lavendulae*, actúa como un inhibidor competitivo de la DXR. Su analogía estructural con el intermediario propuesto de la reacción catalizada por la DXR, la 2-C-metileritrosa 4-fosfato, le permitiría competir con éste por el sitio de unión de la enzima [157, 329]. Su eficacia como potente herbicida es bien conocida a partir de trabajos desarrollados en numerosos sistemas vegetales que confirman la alteración de diversos aspectos del desarrollo y crecimiento, debidos a la inhibición en la formación de isoprenoides sintetizados a partir del IPP plastídico [102, 157, 175, 214, 237, 329]. Sus aplicaciones farmacológicas son, además, evidentes y pasan por los prometedores trabajos relativos al tratamiento contra el agente responsable de la malaria, el parásito *Plasmodium falciparum*, responsable de millones de muertes anuales en todo el mundo [142]. Diversos agentes patógenos, tales como las enterobacterias o *Mycobacterium tuberculosis* representan otras tentadoras dianas para el ensayo de este inhibidor [175].

En el mismo sentido se dirigen los estudios en torno al **clomazón**, otro herbicida conocido ya desde los años 80 y con un efecto similar al de la fosmidomicina en cuanto al

bloqueo en la acumulación de los isoprenoides plastídicos [72]. Estudios recientes apuntan a que este inhibidor, o al menos algunos de sus productos de degradación, tendrían un efecto inhibitor sobre la actividad DXS [202, 328].

En cualquier caso, el diseño racional de compuestos con capacidades inhibitoras de las enzimas responsables de la ruta del MEP pasa, necesariamente, por el esclarecimiento de los mecanismos catalíticos íntimos de las mismas. En esta línea, los últimos años han sido testigos de importantes avances en la resolución de las estructuras cristalográficas de muchas de las proteínas bacterianas de la ruta MEP (revisado en [238]). En concreto, la estructura del cristal de la proteína DXR de *E. coli* ha sido resuelta recientemente, en un caso acoplejada a los cofactores NADP(H) correspondientes [234, 324].

I.2.4. Las dos rutas de síntesis de IPP están integradas en puntos centrales del metabolismo de las células vegetales.

Las dos rutas de síntesis de IPP que coexisten en las células vegetales aparecen estrechamente relacionados con el resto de rutas bioquímicas, ocupando sus precursores puntos centrales en el metabolismo (Figura I.5).

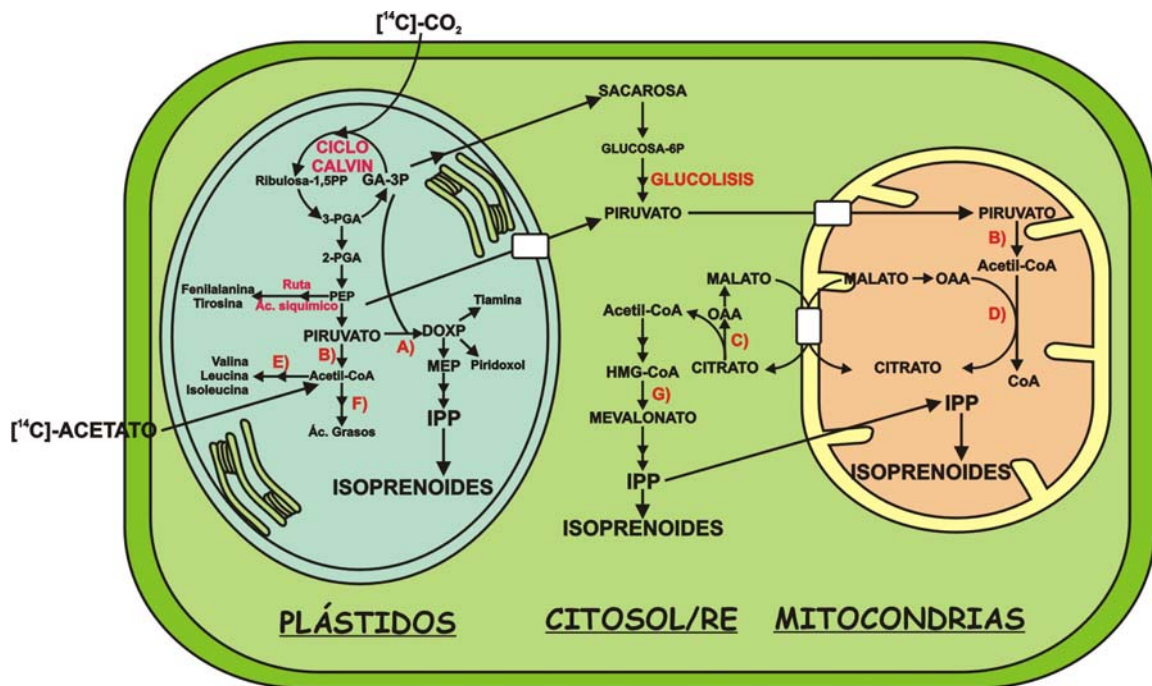
La confirmación del gliceraldehído 3-fosfato (GA3P) y del piruvato como precursores de la síntesis de DXP en la nueva ruta de síntesis de IPP ha permitido encontrar una explicación a los resultados anteriores que apuntaban al [^{14}C]- CO_2 antes que al ^{14}C -acetato como precursor de los isoprenoides producidos por plástidos (revisado en [171]). El nuevo modelo contempla que el acetato suministrado exógenamente se incorporaría, vía acetyl-CoA a través de la correspondiente ruta anabólica plastídica, a los ácidos grasos [127] (Figura I.5). Por su parte, el proceso de fijación fotosintética del carbono sería responsable de la incorporación del CO_2 en el 3-PGA y el GA3P (Figura I.5). Finalmente, el piruvato ocupa un lugar central en el metabolismo plastídico. Su origen estaría en el 3-fosfoglicerato (3-PGA) plastídico o bien en una actividad residual de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa, aunque un origen citosólico parcial también parece posible. En cualquier caso, además de servir de sustrato para la síntesis de DX, precursor a su vez de las vitaminas tiamina y piridoxina [131, 145, 160], derivará también en acetyl-CoA utilizado en la síntesis de novo de ácidos grasos o en aminoácidos ramificados tales la valina, la leucina o la isoleucina (ver Figura I.5). De este modo, la formación de IPP y DMAPP vía GA3P y piruvato explicaría la rápida incorporación del CO_2 fijado fotosintéticamente observada en los isoprenoides [171, 318].

En este sentido, es interesante anotar como la rápida incorporación del [^{14}C]- CO_2 en el **isopreno** confirma que su biosíntesis está íntimamente asociada con la fisiología plastídica a través del proceso de fijación fotosintética del C. Este esquema resultaría coherente con el hecho de que este compuesto volátil es liberado a la atmósfera por muchas plantas C3 cuando las

hojas son expuestas a radiaciones luminosas elevadas o a excesivo calor, de ahí que al isopreno se le haya atribuido una doble función protectora del aparato fotosintético, secuestrando las especies reactivas de oxígeno dañinas en el primer caso, o bien estabilizando las membranas tilacoidales en el segundo [318, 330]. Estas observaciones cuadrarían con la localización plastídica recientemente demostrada para la enzima responsable de la síntesis de isopreno a partir del dimetilalilpirofosfato: la isopreno sintasa [318]. Las emisiones foliares de isopreno resultan, por otro lado, fundamentales para la química troposférica, ya que constituye un reactivo esencial en la formación del ozono.

Más controversia plantea el origen del acetyl-CoA citosólico utilizado como precursor en la síntesis de IPP vía mevalonato. La ruta más sencilla para la formación del acetyl-CoA implicaría la conversión del 3-PGA en piruvato mediante las enzimas glicolíticas, seguido de la descarboxilación oxidativa de éste llevada a cabo por la piruvato deshidrogenasa. El problema deriva de que no se conocen formas citosólicas de esta enzima. Alternativamente, ha sido propuesta la actividad de la ATP-citrato liasa citosólica como proveedora de dicho precursor [114], aunque la activación del acetato en acetyl-CoA mediado por la enzima acetyl-CoA sintasa o su transporte desde los organelos hacia el citosol no pueden ser descartados (Figura I.5). El primer producto específico de esta ruta es el mevalonato, en tanto que el HMG-CoA es a su vez intermediario en la ruta de degradación de determinados aminoácidos, tales la leucina, la lisina o el triptófano [18].

Figura I.5: Modelo de integración de las rutas plastídica y citosólica de síntesis de IPP en el metabolismo de una célula vegetal fotosintética. Las abreviaturas corresponden a OAA: oxalacetato, PEP: fosfoenolpiruvato y PGA: fosfoglicerato. Las letras en rojas indican actividades enzimáticas, concretamente a, DXS; b, piruvato deshidrogenasa; c, ATP-citrato liasa; d, citrato sintasa; e; acetolactato sintasa; f, ácido graso sintetasa y g, HMGR.



1.2.5. Etapas enzimáticas posteriores a la síntesis de IPP en la formación de isoprenoides.

El IPP sintetizado por cualquiera de las dos rutas descritas es utilizado en la formación de los precursores inmediatos de las diferentes familias de terpenoides. El isómero alílico del IPP (DMAPP) constituye la forma reactiva de las dos gracias precisamente a la capacidad de ionizarse que le confiere su doble enlace alílico. De este modo, el isopentenil pirofosfato (IPP), mediante condensaciones secuenciales con el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) conducirá, según una secuencia de reacciones de elongación electrofílicas, hacia la producción de los denominados prenildifosfatos, de longitud creciente. El estudio del conjunto de procesos bioquímicos que a partir del IPP y el DMAPP desembocan en la síntesis de los distintos isoprenoides nos permite constatar la enorme variabilidad que caracteriza a esta numerosa familia de compuestos.

1.2.5.1. Las preniltransferasas.

Las enzimas responsables de reacciones de elongación cabeza-cola a partir de unidades prenilo que utilizan al IPP como molécula aceptora representan una primera categoría dentro de las enzimas designadas colectivamente con el nombre de **preniltransferasas**. En esta categoría se encuentran las enzimas responsables de la condensación del DMAPP con el IPP que proporcionan el primer intermediario C_{10} , el **geranildifosfato (GPP)**. Asimismo, incluye aquellas enzimas que, mediante reacciones similares de adición sobre 1 ó 2 moléculas de IPP respectivamente, producen **farnesildifosfato (FPP)** de C_{15} y **geranilgeranildifosfato (GGPP)** de C_{20} (Figura I.6). Los genes correspondientes a las enzimas **geranildifosfato sintasa**

(**GPPS**), **farnesildifosfato sintasa (FPS)** y **geranilgeranildifosfato sintasa (GGPS)** han sido clonadas y caracterizadas en diversas especies. Particularmente en *Arabidopsis* se ha aislado 1 isoforma de la GPPS [31], 2 isoformas de la FPS [84], [75] y hasta 5 de la GGPS [215], aunque el análisis de la secuencia del genoma completo ha revelado recientemente la presencia de al menos otras 7 secuencias homólogas de esta última [163]. Todas estas enzimas se caracterizan por llevar a cabo la formación de un enlace C-C entre 2 unidades prenilo en un proceso, dependiente de iones Mg^{2+} , que transcurre con una sustitución nucleofílica y que implica la liberación de un residuo de pirofosfato.

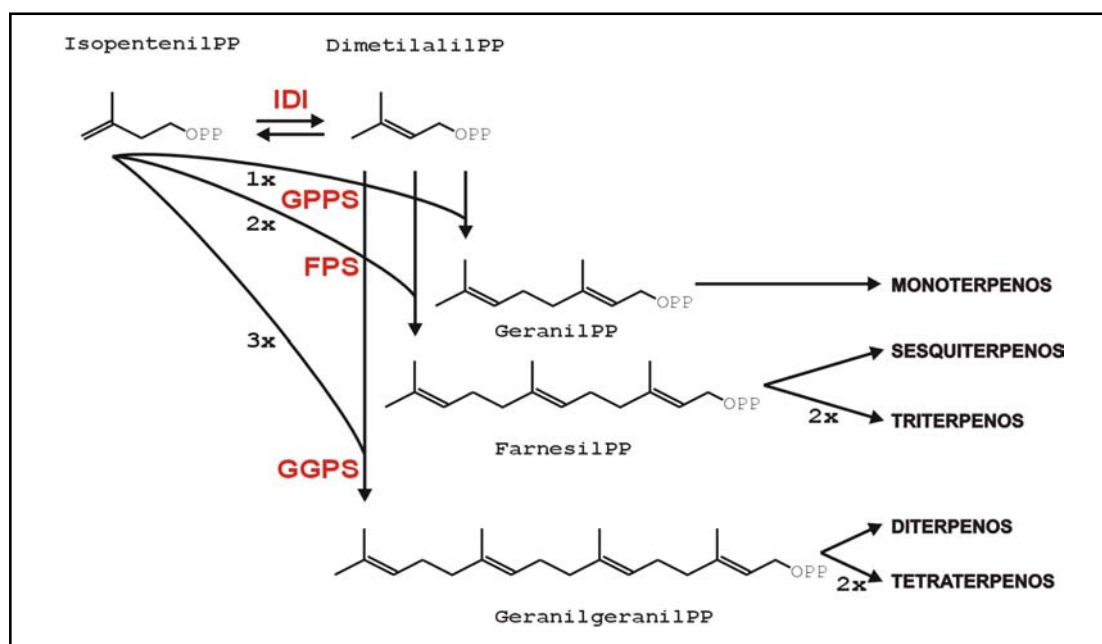


Figura I.6: Representación esquemática de la síntesis de isoprenoides a partir del IPP y el DMAPP. Los prenildifosfatos de peso molecular creciente son formados por la condensación cabeza-cola de unidades de isopreno activas en reacciones catalizadas por las correspondientes enzimas preniltransferasas (señaladas en rojo).

Pero también son destacables otras enzimas, incluidas dentro de esta primera categoría de preniltransferasas, que catalizan reacciones de adición atípicas. Tal es el caso de las enzimas involucradas en la síntesis de las cadenas laterales de las quinonas [169], o de la dehidrodolicol difosfato (dedol-PP) sintasa, responsable en plantas de la síntesis de los poliprenil difosfatos precursores de los dolicoles y que pueden llegar a formar cadenas de hasta 90 carbonos [74]. Un ejemplo más extremo viene representado por las preniltransferasas propias de los laticíferos de *Hevea brasiliensis*, que pueden llegar a condensar hasta 1500 moléculas de IPP para la producción del caucho [212]. Resta añadir que estas dos últimas enzimas son representantes de una poco conocida subcategoría de preniltransferasas capaces de catalizar la formación de enlaces en *cis*, a diferencia de las restantes, susceptibles de sintetizar compuestos isoprenoides

según una estereoquímica en *trans* [169].

Pero las enzimas preniltransferasas engloban otras dos categorías: la de aquellas encargadas de dimerizar el FPP o el GGPP y otra, más heterogénea, implicada en catalizar reacciones de condensación entre 2 unidades en la que una de ellas no es de naturaleza prenilica.

Las reacciones de dimerización representan un paso previo en la formación de triterpenos y tetraterpenos:

Efectivamente, una reacción de condensación cabeza-cabeza entre dos moléculas de FPP es la responsable de la formación del escualeno, primer precursor específico en la síntesis de los triterpenos. La preniltransferasa escualeno sintasa utiliza el NADP(H) como cofactor y constituye el primer punto de la ramificación que conduce hacia la biosíntesis de esteroides y **brasinosteroides**.

Los tetraterpenos, por su lado, se generan a través de la unión cabeza-cabeza de dos moléculas de GGPP para sintetizar fitoeno, según un mecanismo análogo al que tiene lugar para la formación del escualeno, catalizado por la **fitoeno sintasa**, y que transcurre en dos pasos con el prefitoeno como intermediario. Se trata del primer metabolito específico con la estructura en C₄₀ característica de carotenoides y **xantofilas**, adonde nos conducirá dicho esqueleto básico tras una serie de conversiones químicas que veremos más detalladamente en el apartado I.2.5.5.

Las cadenas prenilo confieren capacidad a productos de diversa naturaleza para anclarse en las membranas biológicas:

Esta última categoría de preniltransferasas es capaz de transferir cadenas laterales de naturaleza prenilica a sustratos no terpenoides. Veamos tres ejemplos:

En efecto, reacciones similares a las catalizadas por las demás preniltransferasas son las responsables de introducir cadenas prenilo de diferentes longitud a los precursores de los transportadores de electrones ubiquinona, plastoquinona y citocromo A. Gracias a ellas resultan solubles en las estructuras de membrana. Algo parecido sucede con la incorporación de las cadenas poliprenílicas en la clorofila (fitol), **tocoferol (vitamina E)** y **filoquinona (vit. K)**. Estas cadenas poliprenílicas derivan de la GGPP y se incorporan a sus sustratos respectivos tras un paso de reducción dependiente del NADP(H) [127].

Por otra parte, la unión covalente de grupos prenilo confiere mayor hidrofobicidad a las proteínas, facilitando su asociación con membranas o con otras proteínas y resultando esenciales para la función y localización subcelular de las mismas. De igual modo que en animales y

levaduras, el proceso transcurre gracias a preniltransferasas particulares que unen, por medio de enlaces tioester, derivados alcohol del FPP y GGPP a 1 ó 2 cisteínas cercanas al extremo COOH-terminal del péptido. Una peptidasa liberará los residuos terminales unidos a la última cisteína modificada, cuyo grupo carboxilo será, por último, metilado [240, 241]. Recientemente ha sido detectada una segunda categoría de procesos de prenilación dependiente, específicamente, de productos del genoma plastídico, y por lo tanto exclusiva de las plantas [219]. El isoprenoide modificante sería, aparentemente, una cadena fitol y la asociación con la proteína no tendría lugar, en este caso, a través de enlaces tioester.

Muchas proteínas de membrana están glicosiladas por oligosacáridos ramificados. Los dolicoles, isoprenoides de cadena larga asociados a las estructuras de membrana subcelulares, están involucrados en la síntesis y ensamblaje de dichas estructuras oligosacarídicas. Estos mismos compuestos promoverán, finalmente, la transferencia de los glicanos hacia residuos específicos de asparragina de la proteína de membrana diana [40].

I.2.5.2. Las terpenosintasas.

Las enzimas de esta familia reciben el nombre de **mono-, sesqui- o di-terpeno sintasas** según sea el GPP, el FPP o el GGPP el sustrato de las mismas. Estas enzimas utilizan las unidades terpénicas lineales de GPP, FPP o GGPP para sintetizar los esqueletos carbonados propios de las distintas familias de terpenoides finales. Para ello, catalizan reacciones de condensación intramolecular siguiendo una orientación cabeza-cola, aunque también son frecuentes fusiones cabeza-cabeza e incluso cabeza-medio que rendirán los llamados terpenos irregulares. La mecanística de las reacciones catalizadas por estas enzimas es básicamente la misma de las preniltransferasas, hasta el punto de mantener en su secuencia peptídica dominios conservados ricos en Asp [169]. Sin embargo, variaciones particulares en las reacciones carbocatiónicas de las que son responsables les conceden entidad propia. La mayoría de estas enzimas son capaces de producir productos cíclicos recibiendo en este caso el nombre de ciclasas. Además, en muchas ocasiones son capaces de producir más de un producto final.

Las monoterpeno sintasas son responsables de sintetizar una gran variedad de aceites esenciales y resinas en numerosas especies de angiospermas y gimnospermas respectivamente. Dos ejemplos relevantes son la limoneno sintasa [29, 320], y la pineno sintasa [29]. Las piretrinas constituyen un ejemplo de monoterpenos irregulares en tanto que se sintetizan tras una condensación cabeza-medio. Se trata de sustancias con capacidad insecticida encontradas en especies de los géneros *Chrysanthemum* y *Tanacetum* [38]. Su limitada toxicidad hacia los mamíferos, así como la escasa persistencia en el ambiente, han hecho atractivas a estas sustancias como insecticidas de uso comercial.

Las sesquiterpeno sintasas están frecuentemente relacionadas con la síntesis de diversos compuestos implicados en las respuestas de defensa de la planta, llamados genéricamente

fitoalexinas. Una de las más estudiadas es la epiaristoliqueno sintasa implicado en la síntesis de capsidiol, fitoalexina característica de la familia de las solanáceas [227].

Por su parte, las diterpeno sintasas catalizan dos tipos distintos de reacciones de ciclación. La primera tiene lugar a través de un mecanismo similar al de otras terpeno sintasas. Ejemplos interesantes serían la casbeno sintasa responsable de la síntesis de la fitoalexina específica de *Ricinus communis* [190] y la taxadieno sintasa, que cataliza el primer paso específico en la síntesis del taxol, compuesto propio de *Taxus brevifolia* de interés farmacológico por sus propiedades quimioterapéuticas en el tratamiento del cáncer [319]. La segunda clase de reacciones de ciclación pasaría por la formación de un intermediario bicíclico (copalil difosfato) y corresponde, por ejemplo, a las enzimas de localización plastídica que catalizan los 2 primeros pasos específicos en la síntesis de **giberelinas** a partir de GGPP. Se trata de la copalil-difosfato sintasa [287], y de la **ent-kaureno sintasa** [326], cuyo producto es transportado mediante un mecanismo desconocido hacia el citosol, donde se completa el conjunto de reacciones que culminan con la síntesis de las giberelinas biológicamente activas (**GA**s) [124]. Las giberelinas son hormonas vegetales relacionadas con la elongación y división celular, amén de distintos procesos morfogénicos. Finalmente, la abietadienosintasa, implicada en la síntesis de diterpenoides propios de la resina de algunas coníferas, pertenece también a este subgrupo de enzimas [305].

1.2.5.3. Reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos.

Raramente los productos de reacción de las preniltransferasas o las terpenosintasas constituyen por sí mismos los productos isoprenoides finales. Los esqueletos terpénicos sufrirán una serie de modificaciones (genéricamente reacciones redox) que conferirán las propiedades funcionales y la diversidad estructural de esta gran familia de productos naturales. Estas transformaciones secundarias comprenden oxidaciones, reducciones, isomerizaciones y reacciones de conjugación llevadas a cabo por enzimas distintas de las preniltransferasas. Entre las secuencias de reacciones más importantes para los sistemas vegetales se encuentran aquellas que conducen hacia la producción de esteroides, carotenoides o aceites esenciales.

Esteroides:

En las plantas, el escualeno es usualmente oxidado y ciclado en 2 reacciones sucesivas para dar el cicloartenol, primer intermediario específico de la compleja e interconectada secuencia de más de 30 etapas que llevan, a partir de dicho metabolito, hacia la formación de los algo más de 200 esteroides vegetales conocidos. A diferencia de en animales u hongos los esteroides más abundantes en las plantas son el sitosterol, el estigmasterol y el campesterol, éste último punto de partida a su vez para la síntesis de brassinosteroides, nutrido grupo de derivados esteroides polihidroxilados con importantes funciones reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetales [67]. Por su parte, de los esteroides mayoritarios en animales y hongos: el colesterol y

el ergosterol, se encuentran solamente trazas. Los esteroides libres son sustancias responsables del mantenimiento de la arquitectura de las membranas biológicas, gracias a su capacidad de regular la fluidez y permeabilidad de las mismas. Las formas esterificadas de esteroides pueden representar un porcentaje importante de los esteroides totales y se han adscrito a procesos de regulación, transporte y almacenamiento de los mismos [112]. La Figura I.7 ilustra la estructura básica de los esteroides.

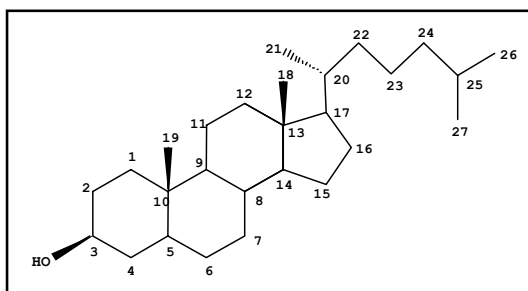


Figura I.7: Estructura de los esteroides: la ilustración representa el esqueleto carbonado básico. Se trata de un anillo perhidro-1,2-ciclopentanoperhidrofenantreno con un grupo hidroxilo substituyendo al C-3, dos grupos metilo a los C-10 y C-13 y una cadena de 8 a 10 carbonos al C-17. Los números indican la notación convencional para identificar las posiciones de los átomos de C en la cadena.

Carotenoides:

Los carotenoides de las plantas desempeñan dos grupos de funciones diferentes según el tejido en que estén localizados. En tejidos fotosintéticos aparecen formando parte de los complejos antena, en las membranas tilacoidales cloroplásticas, donde actúan como pigmentos accesorios en la captación de la energía lumínica. Adicionalmente, el papel desempeñado por los carotenoides en la fotoprotección del aparato fotosintético viene evidenciado por el fenotipo albino de los mutantes afectados en su biosíntesis [47, 187]. La energía lumínica absorbida por la clorofila puede ser transferida al oxígeno molecular, acumulándose en forma de especies reactivas que pueden provocar daño fotooxidativo en el aparato fotosintético. Los carotenoides, junto con otros compuestos y enzimas, participan en el secuestro de dichas especies reactivas [211]. Por su parte, los carotenoides que se encuentran en tejidos no fotosintéticos aparecen englobados dentro de los cromoplastos, plástidos especializados en el secuestro de moléculas lipofílicas [109]. En ausencia de clorofila, pierden sentido las funciones anteriormente descritas, especializándose fundamentalmente en la pigmentación de tejidos con el objeto de atraer insectos y otros animales para la polinización.

Bioquímicamente, una serie de 4 reacciones de desaturación sobre el fitoeno originan, gracias a la creación de los dobles enlaces conjugados que caracterizan al grupo cromóforo, los diversos intermediarios coloreados (Figura I.8). Concretamente, 2 enzimas dependientes del cofactor FAD, la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), son las responsables de llevarlo hasta el licopeno. El siguiente paso es el responsable de la estructura bicíclica de los carotenoides presentes en el aparato fotosintético de las plantas y constituye el primer punto de ramificación de esta ruta. Dicho proceso conduce, gracias a distintas licopeno ciclasas (LYC), hacia la formación de anillos en conformación β,β pero también ϵ,β y más

raramente ε,ε . De este modo, la cadena lineal del licopeno se transforma en β -, α - o finalmente ε -caroteno respectivamente. Por último, diversas reacciones de hidroxilación que corren a cargo de la carotenohidroxilasa (CHY) conducen hasta la síntesis de las xantofilas, familia de compuestos extraordinariamente diversa que se generan a través de numerosas reacciones de oxigenación, epoxi- y deepoxi-dación. Los dos compuestos principales del ciclo de las xantofilas, la violaxantina y la zeaxantina, se interconvertirán mediante la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Figura I.8). A partir de ellos, y mediante diversas reacciones de lisis oxidativa, tiene lugar la biosíntesis del **ácido abscísico (ABA)** [24, 104, 195], fitohormona relacionada, entre otros procesos, con la regulación de las disponibilidades de H_2O y el retraso de la dormancia.

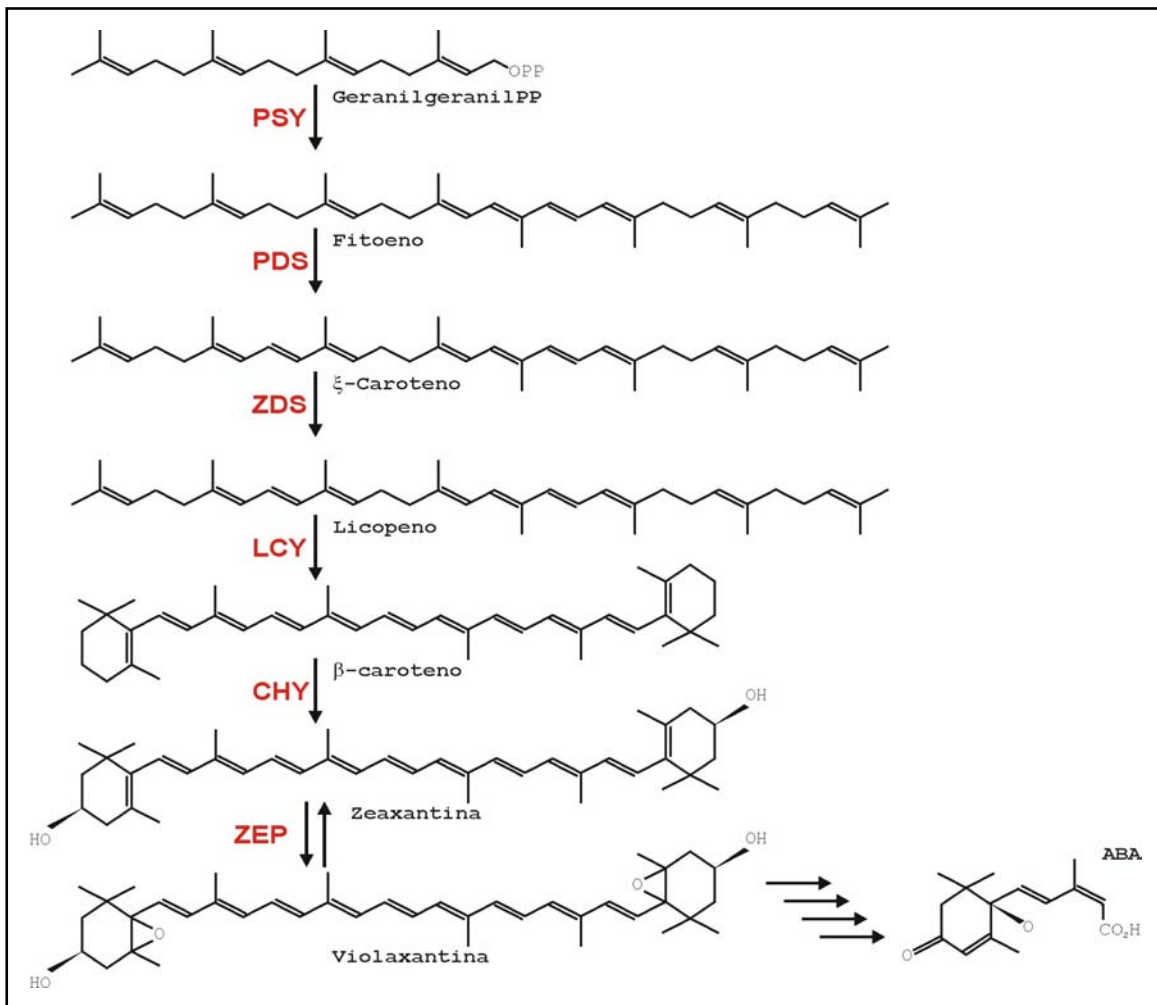


Figura I.8: Ruta simplificada de biosíntesis de los carotenoides, xantofilas y ABA. Los nombres completos de las principales enzimas involucradas (señaladas en rojo) aparecen en el texto.

Aceites esenciales:

Los aceites esenciales constituyen una amplia familia de isoprenoides, generalmente

monoterpenoides, cuya naturaleza lipídica y carácter volátil les ha hecho adoptar ese nombre genérico. Sus funciones están relacionadas con la interacción planta-entorno: defensa vegetal, interacciones alelopáticas y polinización. Todas son sustancias aromáticas, abundantes en las flores de numerosas especies, cuya biosíntesis ocurre simultáneamente al proceso de floración donde actúan como potentes atrayentes para la polinización.

Numerosas son las modificaciones químicas que dan lugar a estos productos. Algunas de ellas pasan por la hidrólisis del GPP para dar geraniol, linalol cuando aquella transformación va acompañada de un reordenamiento, y otros muchos derivados de ambos.

La enzima limoneno sintasa, a través de una ciclación acompañada de una isomerización sintetiza, a partir del GPP, limoneno como producto mayoritario, aunque la misma actividad catalítica es susceptible de producir mircenol, α - y β -pineno. Estos productos constituyen, por ejemplo, los componentes esenciales de la resina de las coníferas, mezcla de terpenos de distintos orígenes que desarrollan una función central en la defensa frente a insectos y otros herbívoros [127, 184]. Asimismo, reacciones de hidroxilación, oxigenación y reordenamientos varios a partir del limoneno conducen a la biosíntesis de una serie de metabolitos relacionados estructuralmente, entre los que destacan el mentol, la piperitona o la pulegona, componentes principales de los aceites esenciales producidos por la especie *Mentha x piperita*, aunque comunes a un gran número de especies [38]. Finalmente, otras transformaciones posibles incluyen acetilaciones, carbonilaciones y carboxilaciones, contribuyendo a la enorme diversidad estructural de esta familia de compuestos biológicamente relacionados.

I.2.6. Origen evolutivo y significado biológico de la existencia de la ruta del MEP y del MVA de síntesis de isoprenoides.

Los compuestos isoprenoides son los productos naturales más antiguos de los que se tienen conocimiento. Esta afirmación viene corroborada por el descubrimiento de sedimentos fósiles de hopanoides, tales los 2α -metilhopanos característicos de las cianobacterias, con una edad estimada en 2,7 miles de millones de años [33]. Este hecho, junto a la complejidad del entramado biosintético subyacente a la producción de los distintos isoprenoides ha hecho especialmente atractivo el estudio de su historia evolutiva, máxime considerando la interesante distribución taxonómica de las 2 rutas que conducen hacia la biosíntesis del primer precursor común, el IPP.

Se ha propuesto que las plantas superiores hayan heredado la vía plastídica de síntesis de IPP de sus ancestros procariotas fotosintéticos, de acuerdo con la teoría de la endosimbiosis [188, 284], hipótesis que se vería apoyada por la existencia de dicha vía en cianobacterias [87]. Por su parte, la célula huésped eucariota conservaría la ruta del mevalonato, del mismo origen que la presente en animales y levaduras y derivada presumiblemente de las arqueobacterias,

donde aún la conservarían como fuente exclusiva del IPP necesario para la producción de los prenol-lípidos presentes en la membrana. Dos procesos completarían este modelo. Uno vendría constituido por la transferencia en bloque hacia el núcleo de aquellos genes plastídicos implicados en la síntesis de IPP [164, 229]. Por su parte, los fenómenos de transferencia horizontal de genes explicarían las anomalías en la distribución de las vías biosintéticas entre eubacterias. Efectivamente, han sido encontradas excepciones a la existencia de la ruta del MEP de síntesis de IPP entre las eubacterias. Algunos ejemplos vienen dados por eubacterias parasíticas obligadas que utilizan el IPP de sus hospedadores [164], la especie *Streptomyces aeriovifer* que dispone de la ruta MEP para la síntesis de monoterpenos específicos y de la del MVA para producir la cadena prenilo de las quinonas [270] u otras excepciones de variada localización taxonómica [164, 247].

Se ha confirmado que la ruta del MEP está ampliamente distribuida entre todos los organismos fotosintéticos, donde es la principal responsable de la síntesis de los isoprenoides propios de los plástidos. La existencia de 2 vías independientes de síntesis del mismo intermediario multiplica las posibilidades de regulación de la biosíntesis de compuestos isoprenoides, tanto más importante en aquellos organismos donde mayor será la diversidad de dichos compuestos. Por ello, resulta chocante el uso exclusivo del IPP derivado de la vía del MEP o del mevalonato para la síntesis de todos sus isoprenoides entre las algas clorofitas o las euglenofitas respectivamente [87, 265]. Se ha sugerido que la explicación a esto venga dada por el propio desarrollo de la teoría endosimbiótica. La pérdida, en cada caso, de una u otra vía habría tenido lugar durante los reordenamientos genéticos que acompañaron a los episodios endosimbióticos secundarios que terminaron configurando la envuelta plastídica tal y como la conocemos hoy o a los terciarios, responsables de que las algas euglenofitas presenten la singularidad de poseer cloroplastos con una triple envuelta [171, 284]. Estos fenómenos exigían, por otro lado, la flexibilidad estructural de las membranas conferida por la aparición de los esteroides [229]. Parece que el linaje de las clorofitas habría perdido durante dichos eventos varias actividades enzimáticas correspondientes a distintas rutas bioquímicas citosólicas [265]. Los diferentes grupos taxonómicos de algas habrían seguido durante la evolución diferentes estrategias de reordenamiento genético y metabólico.

En cualquier caso, la diversidad de patrones de marcaje encontrados entre los isoprenoides de todos los organismos fotosintéticos, en función del origen del precursor IPP utilizado, refleja el origen polifilético de los mismos. Este extremo queda patente en la variada composición de sus pigmentos fotosintéticos, de naturaleza isoprenoide. A pesar de ello, el análisis de la distribución de ambas vías por taxones parece ajustarse a las relaciones filogenéticas actualmente aceptadas, basadas en comparaciones de secuencias de ARNr-18s y caracteres ultraestructurales [284].

Otro aspecto interesante y con indudables aplicaciones biomédicas de la distribución

taxonómica de las vías de síntesis de IPP deriva de la ausencia de la ruta del MEP en animales. Consecuentemente, los intermediarios a partir del MEP en la síntesis de IPP serán específicos de esta ruta y, por tanto, exclusivos de aquellos grupos que la posean. Algunas de ellos, como el 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato, además de otros intermediarios tales el propio metileritritol, tienen la capacidad de activar determinadas subpoblaciones de células T humanas [7]. Los autores estudiaron la estimulación de estas células implicadas en la respuesta inmune y la producción concomitante de factores de crecimiento frente a la presencia de extractos de una cepa de *E. coli* deficiente en *lytB* que acumulaba hidroximetilbutenil 4-difosfato [92]. La posesión de los intermediarios de la ruta del MEP se constituye en un carácter taxonómico añadido a la hora de establecer relaciones filogenéticas entre grupos biológicos.

I.3. ORGANIZACIÓN/LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.

I.3.1. Localización de la biosíntesis de isoprenoides.

I.3.1.1. Compartimentación espacial y temporal de la biosíntesis de isoprenoides: Una perspectiva histórica.

La localización espacial y temporal de la biosíntesis de isoprenoides ha constituido una de las áreas de investigación que mayor discusión científica ha planteado los últimos años. Ciertamente, la posibilidad de la existencia de una ruta biosintética de IPP localizada en plástidos y actuando de modo independiente a la citosólica del mevalonato ha motivado históricamente amplia controversia. Aunque varios modelos explicativos han ido sucediéndose, la información obtenida en este contexto ha ido apuntando paulatinamente hacia la autonomía plastídica en la síntesis del IPP, erigiéndose en uno de los argumentos más sólidos para la elucidación de la ruta del MEP.

El primer modelo presentado proponía la estricta segregación/compartimentación de plástidos, mitocondrias y RE/citosol para la síntesis de IPP a partir del acetil-CoA, por medio de dotaciones enzimáticas propias de la ruta del mevalonato (Figura I.10). La impermeabilidad de los plástidos para intermediarios de la ruta explicaría los resultados contradictorios de marcaje por los cuales únicamente el [¹⁴C]-CO₂, no así el ¹⁴C-mevalonato, era capaz de incorporarse a los isoprenoides propios de este orgánulo [113, 150]. Otras investigaciones abundarían posteriormente en la misma dirección (revisado en [114]).

A pesar de la existencia de varias isoformas para muchos de los genes implicados en la síntesis de IPP (aspecto sobre el que incidiremos más adelante), fue imposible detectar en plástidos actividades enzimáticas asociadas con la síntesis de IPP vía mevalonato [153, 182]. Los mismos autores comprobaron también que los cloroplastos [153] y las mitocondrias [182]

aislados eran incapaces de sintetizar isoprenoides *de novo* a partir del mevalonato o sus derivados fosforilados pero sí a partir del IPP. Todos estos elementos llevaron a postular un nuevo modelo alternativo de segregación en el que los distintos orgánulos subcelulares utilizarían el IPP sintetizado exclusivamente en el citosol (Figura I.10). Sin embargo, este modelo chocaba frontalmente con la dificultad de detectar sistemas activos de traslocación para el IPP en las envueltas plastídicas y mitocondriales [150], a pesar de los intentos realizados en este sentido [277].

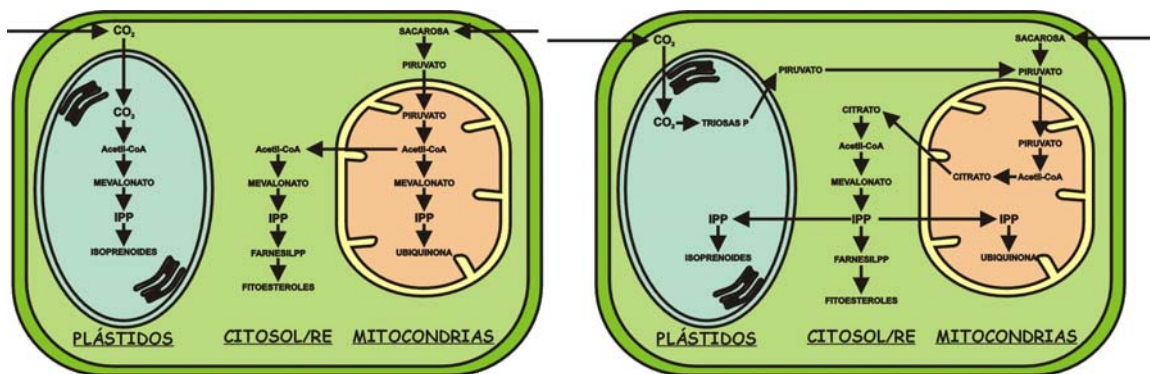


Figura I.10: Modelos preliminares de compartimentación de la biosíntesis de isoprenoides en células vegetales (adaptado de [114]). El primer modelo propone la coexistencia de 3 rutas biosintéticas independientes en cada uno de los orgánulos involucrados en la síntesis de isoprenoides [113]. El segundo propone la síntesis exclusiva de IPP en citosol y su posterior translocación al interior de plástidos y mitocondrias [153].

Sin embargo, experimentos llevados a cabo en los años 80 y basados en la utilización de la mevinolina, no encajaban en ninguno de los modelos planteados (ver apdo. I.2.3.4; [20, 19, 88, 114, 259]). Si la síntesis de isoprenoides plastídicos dependía del IPP citosólico, como se postulaba, debería verse afectada por el tratamiento con mevinolina al igual que los restantes. En aquel momento, la ausencia de efecto sobre los niveles de aquellos isoprenoides se atribuyó a una posible impermeabilidad de la envuelta plastídica para la mevinolina. Por el contrario, la cuestión relativa a la biosíntesis de ubiquinona sí estaba de acuerdo con este modelo. La síntesis de ubiquinona parecía ser dependiente del IPP citosólico en tanto que los tratamientos con mevinolina eran capaces de reducir su concentración, aunque nunca por debajo del 50%. Los autores argumentarían distintas afinidades de las enzimas preniltransferasas por sus intermediarios respectivos para explicar las diferencias en los cambios encontrados para los esteroides y la ubiquinona en respuesta a la mevinolina [259].

A finales de los años 80 se encontraron otras evidencias inexplicables desde la perspectiva de los dos modelos planteados y que empujaron hacia un cambio de paradigma. En el grupo del Dr. Schultz se observó como cloroplastos aislados de espinaca eran incapaces de

incorporar acetato o mevalonato a los carotenoides, pero sí por el contrario CO_2 , fosfoglicerato o piruvato [261]. Estos datos fueron interpretados por los autores hipotetizando la existencia de 2 subpoblaciones plastídicas de acetil-CoA originadas respectivamente por la acción de la acetil-CoA sintetasa o el complejo plastídico de la piruvato deshidrogenasa, y utilizados fundamentalmente como precursores para la síntesis de ácidos grasos o de IPP plastídico respectivamente [262]. Todos estos argumentos, en asociación con otros obtenidos tomando al alga verde *Acetabularia* como modelo, reafirmaban una vez más la autonomía de los cloroplastos en cuanto a la síntesis de IPP [200].

Basándose en estas investigaciones fue propuesto, en el año 1990, un tercer modelo dinámico de compartimentación de la síntesis de IPP que conciliaba las 2 hipótesis anteriores planteando la variación de la fuente del IPP plastídico con el estadio de desarrollo del orgánulo o tejido. Como modelo se utilizaron secciones transversales practicadas a diferentes niveles sobre hojas de cebada (*Hordeum vulgare*), desde la parte basal, donde se acumulan los cloroplastos en los primeros estadios de desarrollo, hasta la región apical, donde los cloroplastos ya están totalmente maduros tanto estructuralmente como en cuanto a eficacia fotosintética. Con este modelo observaron como la incorporación del CO_2 en distintos isoprenoides plastídicos tenía lugar de modo eficiente únicamente en los cloroplastos inmaduros de la región basal, desapareciendo hacia la zona apical paralelamente a un aumento simultáneo de la incorporación del ^{14}C -mevalonato. La maduración del cloroplasto conllevaría, según los autores, una pérdida paulatina de autonomía en cuanto a la síntesis del IPP, síntesis que se llevaría a cabo originalmente a través de un compuesto de 2 carbonos derivado de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa sobre el piruvato y diferente del acetil-CoA. El decaimiento de la actividad de dicho complejo enzimático con el desarrollo de cloroplasto y el aumento observado en la dependencia del IPP traslocado desde el citoplasma apoyarían este modelo [125, 126].

Este modelo de cooperación entre las distintas vías de síntesis de IPP en procesos y momentos concretos del desarrollo resultaba sugerente y cuadraba con las observaciones relativas, por ejemplo, a que dosis elevadas del inhibidor mevinolina, y en un proceso dependiente de la edad de la plántula, eran capaces de afectar limitadamente la acumulación de clorofilas y carotenoides sobre hojas primarias de trigo [20], o a la variación con el tiempo/estadio de desarrollo del origen del IPP utilizado en la síntesis de los terpenos propios de los aceites esenciales sintetizados por células especializadas secretoras de *Mentha piperita* [191], como estudiaremos más adelante.

La confirmación de la actuación de la nueva ruta MEP biosintética de IPP permitió reinterpretar todos estos resultados, y muchos otros, asignando autonomía metabólica plena a los plástidos en cuanto a la biosíntesis de isoprenoides. En la actualidad, está comúnmente aceptado que la biosíntesis de isoprenoides en células vegetales tiene lugar en tres orgánulos/compartimentos subcelulares distintos. En plástidos, vía MEP, tiene lugar la formación

de mono-, di- y tetraterpenos entre los que destacan los carotenoides, el ABA y las cadenas fitol de la clorofila o la nonaprenil de las plastoquinonas. El IPP sintetizado, vía MVA, a nivel de Retículo Endoplasmático (RE)/citosol conducirá hacia la síntesis vía FPP de sesquiterpenos, de triterpenos como los esteroides y los brasinosteroides o de politerpenos formados por la elongación secuencial de la cadena terpénica, como los dolicoles. Finalmente, en mitocondrias, y a partir del IPP citosólico, tendrá lugar la síntesis de la ubiquinona [86] (Figura I.9). La ubicación dentro de la célula vegetal de las preniltransferasas responsables de la síntesis de las unidades terpénicas (GPP, FPP y GGPP) precursoras de cada una de estas subfamilias de compuestos resulta coherente con este esquema [31, 73, 286]. Los crecientes estudios acerca de la localización subcelular de otras preniltransferasas corroboran este modelo, tal es el caso de la SQS, detectada en RE/citosol [83], o la PSY, asociada a las membranas tilacoidales [313].

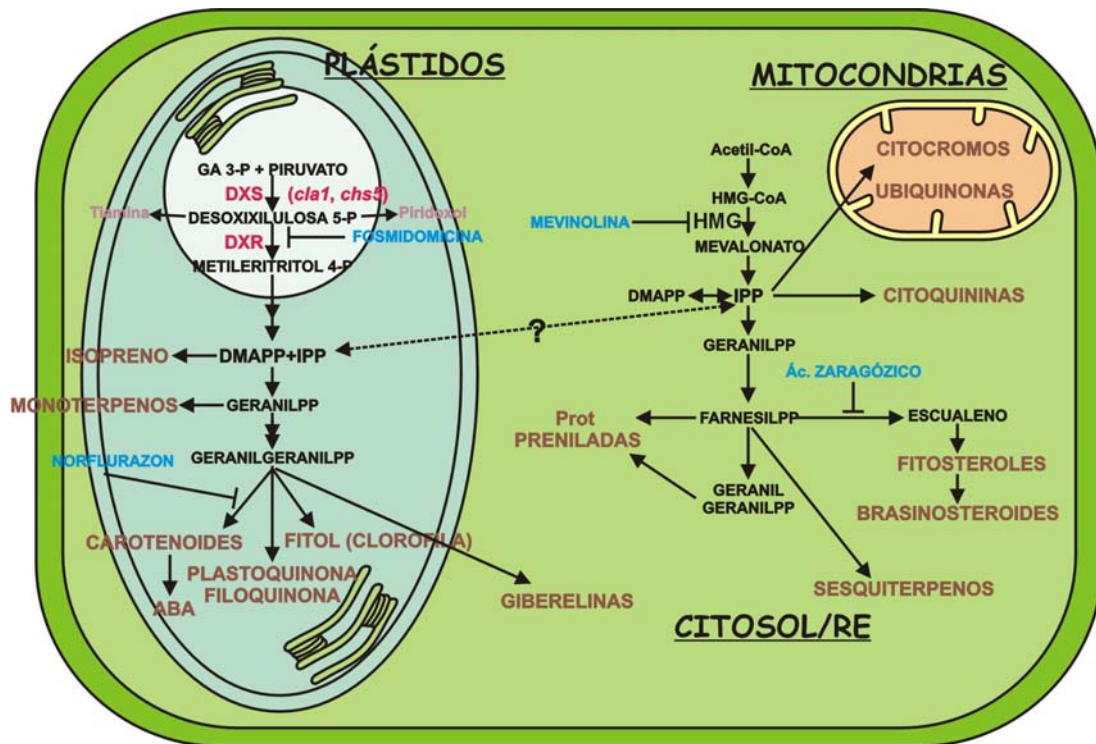


Figura I.9: Representación esquemática del modelo actual de compartimentación de la biosíntesis de isoprenoides en la célula vegetal. El color marrón corresponde a los principales productos isoprenoides sintetizados por las plantas. Las 2 primeras etapas de la vía MEP aparecen en rojo, así como los 2 mutantes conocidos afectados en la DXS: el *chs5* y el *cla1* [11, 187]. Por su parte, las vitaminas tiamina y piridoxina destacan en color violeta. Algunos de los inhibidores caracterizados de distintos pasos específicos de la biosíntesis de isoprenoides, utilizados en la parte experimental de esta memoria, están destacados en azul. Finalmente, la interrogante señala uno de los aspectos más discutidos actualmente en relación con el modelo presentado de compartimentación, y que hace referencia a la interacción entre las dos rutas de síntesis de IPP.

I.3.1.2. Otros orgánulos subcelulares implicados en la biosíntesis de isoprenoides.

Hemos apuntado en otros puntos de esta introducción al papel de las mitocondrias en la biosíntesis de isoprenoides. Efectivamente, las mitocondrias son capaces de sintetizar las cadenas prenilo de las ubiquinonas, particularmente la 9 y la 10 que son las que aparecen en plantas, así como del grupo hemo del citocromo, si bien dependiendo, en ambos casos, del mismo IPP que el utilizado para la síntesis de esteroides, formado en el RE/citosol vía MVA [86]. El bloqueo en la acumulación de las ubiquinonas como consecuencia del tratamiento con mevinolina, así como la también referida incapacidad por parte de mitocondrias aisladas de incorporar MVA o sus derivados fosforilados en los isoprenoides mitocondriales así lo corroboran [19, 182].

Una excepción a este modelo lo constituyen las algas verdes (clorofitas), cuyas ubiquinonas se producen a partir del IPP sintetizado por la ruta del MEP [87]. Quedaría por dilucidar si las mitocondrias de estos organismos poseen la maquinaria biosintética para la síntesis de IPP o si, por el contrario, éste es importado del plástido.

La reciente demostración de la presencia en los peroxisomas de mamíferos de enzimas implicadas en la síntesis mevalonato dependiente de IPP, han desvelado este organelo como una nueva ubicación para la biosíntesis del colesterol [216]. Por su parte, en plantas, ha sido sugerida la localización peroxisomal de la isoforma 2 de la AACT [4]. La existencia en plantas de determinados tipos de peroxisomas originados a partir de subdominios de membrana del RE impulsa al autor de este trabajo a proponer que aquél sería el destino de, al menos, algunas de las otras enzimas implicadas en la biosíntesis de IPP por la llamada ruta del MVA. Experimentos de inmunolocalización apuntaron originalmente hacia dichos organelos como ubicación de algunas de las isoformas de la HMGR de *A. thaliana*. Sin embargo, el uso de marcadores específicos para dicho organelo obligaron a revisar la naturaleza de las vesículas identificadas, en cualquier caso, íntimamente asociados al RE (Leivar-Rico, P., Fernández-Busquets, X., González, V., Campos, N., Ferrer, A. y Boronat, A.; resultados no publicados).

La producción y almacenamiento de monoterpenoides se venía asociando en exclusiva a estructuras plastídicas no fotosintéticas englobadas dentro de estructuras secretoras, y ello debido a la toxicidad que concentraciones elevadas de estos compuestos podrían tener para las estructuras biológicas [299]. Un ejemplo es el de la síntesis de monoterpenos para los aceites esenciales propios de *Mentha x piperita*, que tiene lugar en los leucoplastos de las células de los tricomas glandulares, estructuras foliares especializadas en funciones secretoras [191, 299]. Sin embargo, otros autores han concluido que la síntesis de monoterpenos no está necesariamente limitada a los leucoplastos, sino que también puede ubicarse en cloroplastos de células fotosintéticas. Las afirmaciones que han permitido reconsiderar el asiento de la biosíntesis de los monoterpenos se han basado en estudios de inmunohistoquímica que han

permitido detectar la enzima DXS, GPPS y monoterpensintasa en plástidos fotosintéticos y no fotosintéticos de distintos tejidos, secretores y no secretores pertenecientes a diversas especies de plantas [31].

Otros ejemplos de organelos específicos para la síntesis de isoprenoides lo constituyen los plástidos que se han observado en las raíces micorrizadas y cuya morfología inusual los sitúa más cerca de los cromoplastos. Dichas estructuras, rebautizadas como gerontoplastos [309], han sido relacionadas con la formación de los apocarotenoides, derivados de los carotenoides por rotura oxidativa cuya producción se ve estimulada durante la infección por hongos micorrízicos [308].

Por otro lado, se conocen estructuras especializadas para la síntesis de isoprenoides propias de determinados grupos taxonómicos dentro del reino vegetal. Los cuerpos oleicos son estructuras de secreción exclusivas de las hepáticas originadas a partir de las cisternas del retículo endoplasmático. Estos orgánulos subcelulares han sido propuestos como lugares donde tendría lugar la síntesis y acumulación de grandes cantidades de aceites esenciales. La identificación mediante técnicas inmunocitoquímicas de diversas prenilttransferasas en *Marchantia polymorpha* corroborarían esta afirmación [286]. No obstante, la cuestión relativa al origen del IPP utilizado por estos organelos quedaría, también en este caso, sin resolver.

En definitiva, todos estos datos enriquecen el modelo aceptado, ampliando las posibilidades de regular específicamente la biosíntesis de isoprenoides asociados a uno u otros organelos. De este modo, el análisis de la localización subcelular de las diversas enzimas implicadas en dichos procesos biosintéticos deviene un aspecto esencial para la comprensión de la regulación de la biosíntesis de isoprenoides.

1.3.2. ¿Existe interacción entre las dos vías de síntesis de isoprenoides?.

La existencia de dos rutas biosintéticas de IPP localizadas en compartimentos subcelulares independientes sugiere una segregación estricta entre ambas. Sin embargo, se añaden evidencias en el sentido de una interacción entre las dos vías durante el desarrollo de procesos morfogénicos o biosintéticos particulares.

En este sentido, la primera evidencia viene dada por los ya referidos trabajos que postulaban una pérdida de autonomía metabólica en cuanto a la síntesis del IPP necesario para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos en hojas de cebada [125]. Recordemos que el modelo propuesto planteaba que los cloroplastos maduros dependerían del transporte de IPP extraplastídico como sustrato para la síntesis de isoprenoides. Observaciones ulteriores en el sentido de la incorporación de tanto el acetato como el piruvato en los isoprenoides plastídicos de espinaca obligaron a revisar el marco propuesto, en el contexto además del descubrimiento de la nueva vía de síntesis de IPP. Los autores anticipaban la posibilidad de una cooperación

entre distintas vías de síntesis de IPP para la producción de los isoprenoides plastídicos [126].

Las investigaciones realizadas sobre los tricomas glandulares de *Mentha x piperita* constituyen otro interesante ejemplo de colaboración entre ambas vías. Estos órganos están especializados en la síntesis, acumulación y/o secreción de aceites esenciales compuestos principalmente de mono- y algunos sesqui-terpenos. Las células secretoras de estos sistemas son no fotosintéticas y únicamente contienen leucoplastos, orgánulos donde tendría lugar la síntesis del IPP necesario para la producción de ambas familias de terpenos [191]. Recordemos que, según el modelo de la Figura I.9, los sesquiterpenos se sintetizarían en el citosol. Sin embargo, en el sistema de los tricomas glandulares de *Mentha x piperita*, la ruta del mevalonato sería inoperante y el IPP necesario para la síntesis de sesquiterpenos vía FPP sería translocado desde los leucoplastos (sintetizado vía MEP) al citoplasma. Las células secretoras únicamente serían capaces de utilizar el IPP sintetizado en el citoplasma a partir del mevalonato en momentos tempranos del desarrollo, momento donde el requerimiento de esteroides para la formación de las membranas es especialmente importante. Todo este esquema sugiere, además, una compartimentación temporal en la síntesis del IPP, tal y como apuntábamos anteriormente. Posteriormente, la identificación en plantas superiores del origen vía MEP del IPP necesario para la síntesis de los aceites esenciales de *Mentha x piperita* añadió argumentos en favor del modelo [95].

Por otro lado, la naturaleza dual de la localización subcelular de la enzima GPPS de *A. thaliana*, detectada en los compartimentos plastídico y citosólico, permitió presentar un original modelo de colaboración en la producción del IPP necesario para la síntesis de monoterpenos. Los autores postulan el intercambio de IPP o GPP a través de la envuelta plastídica, preferiblemente aquél en tanto que potencialmente más resistente a la acción de las fosfatasa celulares [31]. En cada compartimento, el IPP sintetizado por una y otra vía sería encauzado, a través de la enzima GPPS, hacia la síntesis de monoterpenoides específicos.

Pero las primeras evidencias químicas a favor de una cooperación entre las dos vías en la síntesis de productos isoprenoides específicos aparecen en 1994, de la mano de los estudios efectuados acerca de la biosíntesis de los ginkgólidos en cultivos de *Ginkgo biloba* [264]. Por medio de experimentos de marcaje con ^{13}C se observó como 3 de las 4 unidades isoprenílicas/prenilo de aquellos diterpenos provenían de la ruta del mevalonato no así la 4ª, marcada de acuerdo con la vía del MEP. Aparentemente, una unidad de FPP de origen citosólico se uniría a un IPP plastídico para dar lugar al diterpeno final (C_{20}), aunque restaba por confirmar en que orgánulo tendría lugar este proceso [264]. Resultados de patrones de marcaje mixtos, análogos a los anteriormente descritos, han sido también presentados en el caso de la cadena fitol, diterpenos o carotenoides de las hepáticas *Heteroscyphus planus*, *Conocephalum conicum* o *Lophocolea heterophylla* [203, 204, 295], así como la cadena fitol de la clorofila A de *Anthocerus punctatus* [137].

Todos estos datos relativos a la cooperación de la vía del MVA en la síntesis de isoprenoides sintetizados en los plástidos integran la explicación racional definitiva para las evidencias anteriores en el sentido de la detección del ^{14}C procedente del MVA marcado en la biosíntesis de muy diversos compuestos isoprenoides, como carotenoides, monoterpénoides o diterpenoides. Un interesante ejemplo añadido se refiere a los alcaloides indol terpénicos producidos en *Catharanthus roseus*, compuesto mixto cuya fracción terpénica deriva de un intermediario de naturaleza monoterpénicoide llamado secologanina. Las trazas de ^{14}C -mevalonato encontradas en dicho metabolito han sido atribuidas al intercambio de intermediarios entre las dos rutas biosintéticas [50, 69].

Los sesquiterpenos específicos producidos por la asterácea *Maricaria recutita* presentaban 2 de las 3 unidades prenilo del FPP marcadas de acuerdo con el patrón previsto según la ruta plastídica, no así la última, que tendría un origen mixto a partir de la vía del MVA o del MEP [2]. Asimismo, ha sido encontrada una contribución menor del IPP sintetizado vía MEP para la biosíntesis de esteroides en cultivos de *Salvia miltiorrhiza* [34] y *Catharanthus roseus*.

Este solapamiento en los patrones de marcaje de diversos isoprenoides a partir de IPP de orígenes distintos, obligaba a replantear el paradigma existente en relación con la segregación en compartimentos estancos de la biosíntesis de IPP e isoprenoides. En efecto, todos estos resultados apuntan hacia un posible mecanismo de intercambio/transporte activo de IPP y/o prenilfosfatos entre los distintos orgánulos involucrados. De esta manera, va afianzándose la hipótesis de una distribución flexible y variable con el tiempo, lugar y situación fisiológica de la síntesis de isoprenoides, en consonancia con la gran diversidad de compuestos isoprenoides sintetizados por los organismos fotosintéticos.

Quedan en el aire, no obstante, muchas preguntas encontradas con este modelo aparentemente versátil de la biosíntesis de isoprenoides. Resulta paradójico el hecho de que la búsqueda de un transportador activo de IPP o algún otro intermediario común entre las dos rutas biosintéticas de IPP no se haya traducido, hasta el momento, en resultados concluyentes. También resulta difícil de explicar, de acuerdo con este modelo, la incapacidad de la ruta plastídica de síntesis de IPP de revertir la inhibición específica observada para la vía del mevalonato durante los tratamientos con el inhibidor mevinolina ([20, 259] y revisado en [114]). Finalmente, existe aún cierta controversia acerca de la existencia en plástidos de actividades enzimáticas ligadas a la síntesis de IPP vía acetato/mevalonato. No deben despreciarse los numerosos experimentos efectuados en este sentido que, bien mediante fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial, bien estudiando la respuesta al tratamiento con inhibidores enzimáticos, sugieren la existencia de isoformas plastídicas de la HMGR con propiedades cinéticas específicas [18, 114, 281].

I.4. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.

Bajo este epígrafe se pretende dar una aproximación a los diferentes aspectos concernientes a la regulación de la biosíntesis de isoprenoides. La fabulosa diversidad de compuestos isoprenoides sintetizados por las plantas, así como la multiplicidad de funciones que han de desempeñar, las han obligado a desarrollar un exquisito conjunto de mecanismos de control de la biosíntesis de estos compuestos. Sin embargo, la mayoría de los estudios al respecto se centran en las enzimas de la llamada ruta del MVA de síntesis de IPP y a los terpenoides derivados de ella. Su análisis nos servirá, sin duda, para orientarnos en el estudio de la regulación de la biosíntesis de isoprenoides plastídicos, máxime en el contexto de la cada vez más evidente interacción que habría de verificarse con la ruta MEP. La regulación de la biosíntesis de isoprenoides plastídicos, por razón de la proximidad en el tiempo transcurrido desde la elucidación de todos los pasos enzimáticos implicados, constituye uno de los aspectos más apasionantes, aún por profundizar en el futuro, dentro del campo de la biología vegetal.

I.4.1. La existencia de familias multigénicas constituye un primer punto de control en la biosíntesis de isoprenoides citosólicos: Dos ejemplos.

La existencia de múltiples isoformas para una enzima dada es un fenómeno común en plantas, derivada de la importancia que los procesos de duplicación tienen en la evolución de los genomas vegetales [197]. De acuerdo con esto, numerosas enzimas responsables de la síntesis de isoprenoides según la vía del mevalonato están codificadas por otras tantas familias multigénicas, añadiendo un punto de complejidad adicional a la del propio entramado biosintético. En lo que respecta a *Arabidopsis thaliana* se encuentran numerosas evidencias en este sentido en la literatura, tal y como aparece reflejado en la Tabla I.2.

La presencia de familias multigénicas que codifican para las distintas enzimas biosintéticas de isoprenoides se constituye en un primer nivel de control de dicho proceso biosintético. Este mecanismo permite diversificar y optimizar el control sobre la síntesis de la enorme variedad de isoprenoides producidos por las plantas, facilitando enormemente la respuesta a señales ambientales de uno u otro tipo o a coyunturas fisiológicas o de desarrollo determinadas. Para ello, cada una de las distintas isoformas de una actividad enzimática determinada sufrirá una modulación particular de su expresión y/o actividad para hacer frente a las necesidades diferenciales de intermediarios requeridos en cada momento. La localización subcelular de cada una de ellas debería, además, resultar coherente con el papel específico atribuido. Analizaremos dos ejemplos profusamente estudiados.

ENZIMA	GEN	Nº ISOFORMAS IDENTIFICADAS	REFERENCIA
Acetoacetil-CoA tiolasa	AAT	2: 1 y 2	[4]
HMG-CoA sintasa	HMS	1	[199]
HMG-CoA reductasa	HMG	3:1L, 1C y 2	[42, 98]
Mevalonato kinasa	MVK	1	[176]
Mevalonato fosfato kinasa	PMK	1	[163]
Mevalonato difosfato descarboxilasa	MVD	2	[70]
Isopentenil difosfato isomerasa	IPP	2	[43]
Geranil difosfato sintasa	GPPS	1	[31]
Farnesil difosfato sintasa	FPS	3:1L, 1C y 2	[73, 75]
Geranilgeranil difosfato sintasa	GGPS	5	[215]

Tabla 1.2: Número de isoformas de varios de los genes implicados en la síntesis de isoprenoides en *A. thaliana*.

Fue precisamente en *A. thaliana* donde se constató por primera vez la existencia de familias multigénicas codificantes para la HMGR [42, 98, 180]. A partir de entonces, se ha observado el mismo fenómeno en distintas especies, como el tomate, que contaría con 4 isoformas, o el tabaco, donde se han identificado 2, aunque los análisis de *Southern-blot* apunten hacia la existencia de isoformas adicionales. Más numerosa resulta la familia génica de *HMG* encontrada en guisante, donde se ha contabilizado un número de 5 a 7 genes o en patata, especie de la que se llevan aislados 7 clones genómicos donde han sido identificados al menos 9 genes [281], a pesar que algunos de ellos pudieran ser pseudogenes o simples variantes alélicas. Weissenborn y cols. han revisado gran número de estas familias multigénicas en diferentes especies de plantas superiores, evidenciando lo general de este fenómeno que da una idea de la importancia del paso catalizado por la HMGR en el control de la ruta del MVA de síntesis de IPP [312].

Existen abundantes trabajos que versan sobre la regulación diferencial de las distintas isoformas de los genes *HMG*. Dichas investigaciones, sobre las que insistiremos en el apartado siguiente, ponen de manifiesto como cada isoforma desarrollaría un patrón especializado de expresión en relación con un contexto fisiológico concreto o bien en respuesta a diferentes señales ambientales.

Ciñéndonos a la especie de referencia en este trabajo, encontramos abundante literatura relativa a la identificación y caracterización de las 2 copias génicas presentes en el genoma de *Arabidopsis* que codifican para la HMGR [42, 98]. Tales copias se denominan 1 y 2. La

comparación entre sus secuencias peptídicas y las correspondientes a otros homólogos vegetales revelan el alto grado de conservación evolutiva existente. De hecho, la homología será curiosamente mayor entre la HMGR1 y las HMGR de otras especies que entre las dos HMGR de Arabidopsis. La isoforma 2 de Arabidopsis parece representar una isoforma divergida menos común.

Adicionalmente, el uso de promotores alternativos permite al gen *HMG1* codificar 2 transcritos distintos cuyos inicios de transcripción están separados 121 pares de bases en el extremo 5'. Consecuentemente, tendrá lugar la traducción de dos proteínas, la llamada forma larga o HMGR1L que tendrá una extensión NH₂-terminal adicional de 50 aminoácidos respecto de la denominada isoforma corta o HMGR1C [180].

Del estudio de los patrones de expresión de las 3 isoformas del gen *HMG* se ha concluido que el transcrito responsable de codificar para la HMGR1C es abundante y aparentemente ubicuo, detectándose por *northern-blot* a niveles elevados en todos los tejidos de la planta analizados. Por el contrario, los ARNm correspondientes a las isoformas HMGR1L y HMGR2 presentan niveles más reducidos y restringidos a plántulas, raíces e inflorescencias [98, 99, 180].

Pero esta cualidad no es exclusiva del gen *HMG*. Ha sido también estudiado el patrón de expresión diferencial de las 3 isoformas conocidas para la FPS, codificadas a su vez por 2 genes [73]. En efecto, fue detectado un nuevo ARNm (*FPS1L*), derivado de la utilización de un promotor alternativo en la transcripción de *FPS1* que proporcionaría un inicio de traducción adicional situado 123 pares de bases corriente arriba de la forma anteriormente descrita (*FPS1C*) [75]. De modo similar a lo observado para *HMG*, la expresión del gen *FPS1* estaría ampliamente generalizada en diversos tejidos y estadios de desarrollo aunque más acusadamente en raíces e inflorescencias. Por el contrario, el mensajero *FPS2* aparece más restringido a inflorescencias [73, 75, 76].

Otro de los aspectos asociados a la existencia de familias multigénicas es el de la variada localización subcelular de las distintas formas isoenzimáticas codificadas. Aunque el caso de la HMGR es una cuestión objeto aún de debate, existe consenso acerca de la asociación de la enzima con membranas microsomales derivadas del RE, conclusión derivada de los experimentos de transcripción-traducción in vitro que muestran la integración cotraduccional en el RE de las 3 isoformas de la HMGR de Arabidopsis [44, 98, 180] o tomate [85]. Estas observaciones estarían de acuerdo con un mecanismo de inserción de la HMGR en las membranas del RE, como destino primario, mediado por la interacción de las 2 secuencias hidrofóbicas presentes en su secuencia peptídica con las llamadas SRP ("Signal Recognition Particle"), deviniendo así proteínas integrales de membrana. Ha sido definida también la topología que aquellas enzimas adoptarían en el RE. La proteína contendría los dos dominios

altamente hidrofóbicos anteriormente citados atravesando la membrana con una corta región conectora dispuesta hacia el lumen, mientras que los extremos N- y C-terminal se situarían hacia el lado citosólico de la membrana, este último conteniendo el dominio catalítico. Para terminar, una corta región hidrofílica se proyectaría hacia el lumen del retículo endoplasmático [44]. Las señales de retención en RE identificadas entre las secuencias peptídicas de diferentes HMGR, además del alto grado de conservación evolutiva de las regiones transmembrana de las HMGR vegetales, apuntarían a que la misma disposición espacial es adoptada por los homólogos de otras especies vegetales [44, 85, 263]. Se ha propuesto, adicionalmente, que las diferencias entre estas supuestas señales de retención en RE reflejarían destinos en subdomios específicos dentro del RE [44]. Esta subcompartimentación de las distintas HMGR en el sistema de endomembranas resulta coherente con la existencia de canales metabólicos para la síntesis de isoprenoides (ver apdo. siguiente), que sugiere la especialización de distintas regiones del RE en la síntesis de isoprenoides específicos. Por último, no puede descartarse el redireccionamiento de las HMGR desde el RE hacia otras estructuras de membrana asociadas. Este sería el caso de alguna de las isoformas de la HMGR (concretamente la 1C) que ha sido localizada adicionalmente en estructuras vesiculares de naturaleza desconocida asociadas al RE (Leivar-Rico, P., Fernández-Busquets, X., González, V., Campos, N., Ferrer, A. y Boronat, A.; resultados no publicados). En este contexto, las diferencias entre el proceso de direccionamiento de las proteínas hacia el RE/sistema de endomembranas o hacia plástidos/mitocondrias refutan los trabajos que sostenían la detección de la actividad HMGR en dichos organelos y desechan la extensión NH₂-terminal de la isoforma HMGR1L como péptido de tránsito a orgánulos subcelulares [18].

Más concluyentes son los resultados relativos a la ubicación de la FPS dentro de la célula vegetal. Las sospechas que apuntaban a la extensión NH₂-terminal de la forma isoenzimática FPS1L como péptido de tránsito a mitocondrias se han verificado siguiendo diversas aproximaciones. Éstas incluyen la capacidad de aquella extensión de dirigir la subunidad CoxIV de la citocromo C oxidasa hacia mitocondrias, rescatando mutantes de levadura disruptados en dicho marcador, o experimentos de importe *in vitro* utilizando mitocondrias purificadas de patata [75]. Más recientemente, otras aproximaciones basadas en la detección de la proteína por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-FPS, así como observaciones por microscopía confocal de células de *Arabidopsis* que expresan la proteína quimérica resultante de la fusión del supuesto péptido de tránsito con la proteína delatora GFP han afianzado la cuestión (D. Manzano-Alias y A. Ferrer; resultados no publicados). Las mismas aproximaciones han verificado la localización citosólica, en forma soluble, de los otros miembros de la familia de las FPS.

En conclusión, la regulación diferencial de los distintos genes pertenecientes a una misma familia multigénica, así como lo diverso de las localizaciones subcelulares de sus respectivos productos, sugieren la especialización funcional de las distintas isoenzimas en

relación con la síntesis de determinados isoprenoides. Más aún, ha sido evidenciada la regulación armonizada de la expresión de distintos genes implicados en la síntesis de determinados isoprenoides citosólicos, particularmente el encargado de codificar para la HMGR y aquellos otros responsables de los puntos de ramificación de la vía, como el *FPS* o el *SQS* [60, 61, 306]. Estos resultados han dado pie a un atractivo modelo de organización de las enzimas de síntesis de isoprenoides citosólicos en los llamados canales metabólicos [52].

I.4.2. Familias multigénicas y canales metabólicos en la biosíntesis de isoprenoides citosólicos.

Era conocido ya desde los años 80 cómo la biosíntesis de sesquiterpenos y esteroides (ambos derivados del precursor común FPP) estaban regulados independientemente durante los eventos de respuesta de defensa inducidos en las plantas (revisado en [52]). Un ejemplo muy estudiado es el basado en el modelo de patata (*Solanum tuberosum*). El mecanismo desencadenado en respuesta a una herida o a tratamientos con metiljasmonato (sustancia identificada como mediador de aquel mecanismo) se manifestaba con un acúmulo de esteroides en el tejido tuberoso. Por su parte, el tratamiento con un elicitador fúngico como el ácido araquidónico o la inoculación directa con el hongo patógeno *Phytophthora infestans* bloqueaban dicho acúmulo e inducían la producción de fitoalexinas sesquiterpénicas, sustancias antibióticas propias de la respuesta frente a una infección por patógeno [60, 61]. Si en aquella situación tenía lugar la inducción de la expresión del gen *HMG1*, la producción de fitoalexinas en esta otra correlacionaba con un aumento de la expresión de las otras 2 isoformas de la HMGR caracterizadas en patata. Aún más, había sido demostrada la regulación coordinada de *HMG1* con el gen responsable de codificar para la escualeno sintasa, primera enzima de la rama que dirige el FPP hacia la síntesis de esteroides, así como la inducción simultánea de la expresión de los genes *HMG2* y *HMG3* y el correspondiente a la enzima sesquiterpeno ciclasa, a su vez primera enzima específica de la síntesis de sesquiterpenos [306, 327]. La inducción de patrones de expresión diferencial de las distintas isoformas del gen *HMG* en respuesta a las diferentes situaciones de estrés planteadas representaría una estrategia coordinada para adaptarse a los requerimientos cambiantes de mevalonato destinados a la síntesis de los distintos isoprenoides celulares. Otras especies de plantas pertenecientes a la familia de las solanáceas presentan un comportamiento similar. Los 4 genes conocidos en tomate responsables de codificar por la HMGR han mostrado una separación análoga en las funciones desempeñadas. Si la isoforma 2 se veía activada en respuesta a herida o frente a la agresión de un patógeno sugiriendo su implicación en la síntesis de antibióticos de naturaleza sesquiterpénica, la isoforma 1 estará asociada con la biosíntesis de esteroles y el crecimiento celular [312]. Al tiempo, los trabajos sobre cultivos celulares de tabaco [53], y pimiento [116], han convergido hacia conclusiones similares.

Todos estos resultados, que postulan la especialización funcional de distintas isoformas de la HMGR en la síntesis de isoprenoides específicos, plantean un cambio de paradigma

respecto de la visión tradicional que entendía la biosíntesis de isoprenoides en el citosol/RE como ocurriendo en un entorno homogéneo en el que los intermediarios difundirían libremente, interaccionando entre sí y expuestos a los diferentes enzimas que competirían por ellos. Por el contrario, serían más consistentes con la idea de los canales metabólicos y los llamados "metabolones", según la cuál, en el RE habría agrupaciones de isoenzimas concretas dedicadas a la producción de isoprenoides específicos, cada una de ellas reguladas de forma independiente [52]. Cada metabolón controlaría la síntesis de familias concretas de productos isoprenoides finales mediante la inserción de enzimas en subdominios específicos del RE, la interacción entre los distintos elementos y la regulación de la actividad de las mismas por mecanismos postraduccionales comunes. Este modelo, que hasta el momento únicamente se ha observado entre las solanáceas, contemplaría la existencia de un metabolón dedicado a la síntesis de esteroides y otro asociado específicamente con la producción de fitoalexinas sesquiterpénicas. Las distintas isoenzimas implicadas en uno u otro canal metabólico no competirían así por el mismo "pool" de sustrato, confiriéndole significado biológico al modelo. La visión del RE en plantas como un sistema dinámico compuesto de numerosos subdominios con funciones especializadas dotaría de mayor peso a esta hipótesis [280]. La Figura I.10 presenta el modelo de los canales metabólicos, tal y como fue originalmente postulado, e integrando la ruta MEP de síntesis de isoprenoides.

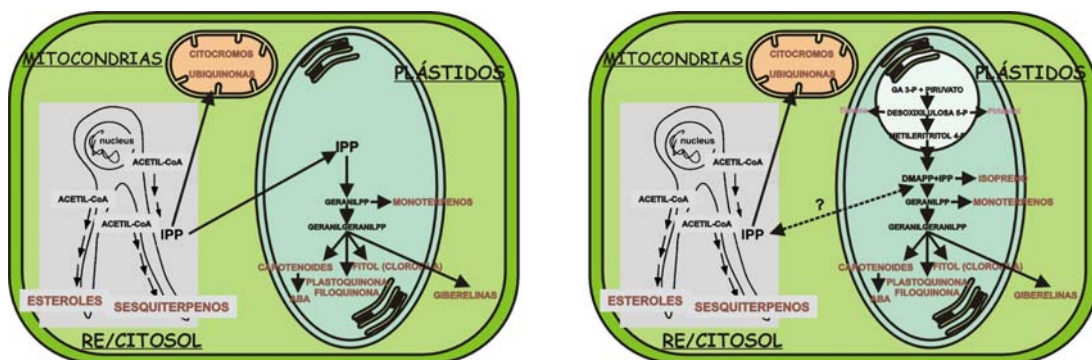


Figura I.10: Modelo de organización en canales metabólicos de la síntesis de isoprenoides. A la izquierda se representa el modelo de canales metabólicos tal y como fue presentado originalmente, con un tercer metabolón destinado a la producción del IPP necesario para la biosíntesis de los isoprenoides organelares. El esquema de la derecha representa el mismo modelo integrando el descubrimiento de la ruta MEP de isoprenoides plastídicos (adaptado de [52]). La notación es la misma que la empleada en la Figura I.9.

Numerosos resultados encontrados ad hoc pueden encuadrarse en este modelo. Entre ellos están los obtenidos con plantas transgénicas de tabaco diseñadas por Chapell y cols. que sobreexpresan la HMGR de hámster [54]. Los niveles de actividad del enzima sobreexpresado correlacionaban con limitados aunque significativos acúmulos en los niveles de esteroides; por el contrario, no ocurría lo mismo con los sesquiterpenoides. No obstante, la existencia de puntos

adicionales de regulación más allá de la HMGR en la síntesis de isoprenoides específicos no puede descartarse. El sistema responsable de la producción del látex, la euforbiácea *Hevea brasiliensis*, posee una pequeña familia génica codificante para la HMGR formada por 3 miembros. Se ha sugerido la implicación de la isoforma 1 en la producción del látex, en tanto que su expresión reacciona a la presencia del etileno y está restringida a los laticíferos, órganos responsables de la producción de dichos politerpenos. Por el contrario, el gen *HMG3* presenta un patrón de expresión constitutivo. Patrones de expresión diferenciales han sido también encontrados durante el proceso de maduración del fruto de tomate para los genes *HMG1* y *HMG2* [209], o del pimiento [116]. Aunque ninguno de estos trabajos da cuenta de la asociación física entre las distintas enzimas implicadas en la producción de terpenoides particulares, propia de los metabolones, sí apunta nítidamente hacia la imbricación de distintas enzimas HMGR en canales metabólicos concretos [64, 65].

A pesar de todo, este modelo no ha podido ser demostrado de forma concluyente. Constituye, en cualquier caso, un interesante paradigma que ha enmarcado gran número de las líneas de investigación referidas al control de la biosíntesis de isoprenoides. Ha propiciado, por ejemplo, la búsqueda de motivos estructurales implicados en interacciones proteína-proteína o proteína-subdominio del RE en un intento de descubrir elementos comunes a las distintas partes implicadas en la organización de un metabolón. Los motivos conservados, localizados en el extremo N-terminal e identificados como señales de retención en RE encontrados entre homólogos de la HMGR de distintas especies, constituirían un interesante ejemplo [263]. Por otro lado, se han identificado sitios de glicosilación comunes en subpoblaciones de HMGR asociadas con funciones específicas. Se ha sugerido un rol biológico para los glicanos, posiblemente dirigiendo al enzima hacia una región concreta dentro del RE [85].

El modelo del metabolón y los canales metabólicos estaría íntimamente ligado a la existencia de las familias multigénicas, así como a la existencia de múltiples puntos de ramificación de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, necesidad derivada de la gran variedad de isoprenoides posibles. Aunque ambas circunstancias concurren casi exclusivamente en plantas superiores, se han encontrado evidencias de la posible participación de la SQS en la organización de canales metabólicos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [154]. El extremo C-terminal, en este caso, resultaría indispensable para la localización del enzima en el lugar apropiado del RE que permita al escualeno ser utilizado eficazmente como precursor para la síntesis de esteroides. La segregación física de las dos isoformas de la HMGR presentes en dicho organismo, así como la aparente compartimentación citosólica de la síntesis de isoprenoides en células de levadura, apoyarían tal hipótesis [25, 49, 321].

I.4.3. Las enzimas implicadas en la síntesis de isoprenoides citosólicos responden a muy diversas señales ambientales o de desarrollo.

I.4.3.1. El papel de la luz:

Las condiciones de iluminación influyen decisivamente en la expresión y actividad de muchas de las enzimas relacionadas con la síntesis de isoprenoides citosólicos. Tal es el caso de los genes *HMG* de *Arabidopsis* o de *Morus alba*, para los que se ha constatado una disminución de los niveles de ARNm cuando las plantas eran crecidas en luz [98, 99, 137, 138]. Adicionalmente, el crecimiento en condiciones de oscuridad provoca una importante inducción de la actividad HMGR en plántulas de maíz (revisado en [281]), y es responsable de desencadenar el mismo efecto estimulador sobre la expresión de otros genes como el *SQS* de *A. thaliana* [83]. El desarrollo de las llamadas **plantas etioladas** es un buen ejemplo de como la ausencia de luz afecta a la morfogénesis vegetal. El papel desempeñado por los brasinosteroides así como los requerimientos de esteroides para la elongación del hipocotilo, entrenudos y pecíolos característicos de este programa de desarrollo podrían justificar los elevados niveles de expresión y actividad detectados para algunos de los genes de la ruta del MVA [67, 83, 201].

Por el contrario, se ha observado que el transcrito del gen *AAT1* de *A. thaliana* se acumula cuando la planta es crecida en luz [4]. Por su parte, la actividad HMGR de guisante resulta también estimulada en respuesta a la luz (revisado en [281]).

La ya referida especialización funcional de las distintas isoformas de la HMGR de *Arabidopsis* podría contribuir a solventar esta aparente controversia, ya que también parece tener su reflejo en el control diferencial mediado por luz. De este modo, se ha observado que los perfiles de expresión de la isoforma HMGR1 de *Arabidopsis* varían autónomamente en cada órgano de la planta en función de las condiciones de luz u oscuridad, en un complejo proceso aparentemente regulado por los brasinosteroides y mediado por el fitocromo [167].

Finalmente, ha sido descrito en tabaco como el momento de desarrollo puede determinar una variación del efecto de la luz sobre la HMGR [152]. Si en plantas jóvenes es detectable una inhibición de la actividad correspondiente, las plantas maduras verían una activación de la misma mediado por mecanismos postraduccionales.

I.4.3.2. Respuestas a otros factores ambientales:

Un interesante ejemplo, ya indicado anteriormente, viene constituido por la inducción coordinada de los genes implicados en la síntesis de sesquiterpenos y esteroides en solanáceas, en el contexto de la respuesta frente a heridas, elicitores o patógenos fúngicos [53, 60, 61, 116, 306, 312]

En tabaco, se conocen dos isoformas de la IPP isomerasa, la 1 y la 2, localizadas respectivamente en plástidos y citosol. Se han presentado resultados que muestran patrones diferenciales de inducción de la expresión de los genes correspondientes en respuesta a diferentes situaciones de estrés, como tratamientos con NaCl o exposiciones a intensidades elevadas de luz [208]. También ha sido referida la respuesta de naturaleza opuesta desarrollada por *HMS* en *Brassica juncea* en situaciones de estrés hídrico u osmótico, en este caso, además, aparentemente dependiente de ABA [5].

I.4.3.3. Regulación por fitohormonas:

La naturaleza isoprenoide de muchos de los reguladores del crecimiento vegetal hace esperable una relación con el control y actividad de las enzimas a estudio. Una vez más, se encuentran referencias en este sentido para la enzima HMGR. Por un lado, se ha observado como la inhibición por mevinolina puede ser revertida mediante la adición de ciertas citoquininas como la kinetina. Diversos autores señalan la inhibición de la actividad de la enzima como consecuencia del tratamiento con ABA, reversible con la administración combinada de la giberelina GA₃ o la citoquinina isopenteniladenina (revisado en [281]). Algunos de estos trabajos han sido efectuados sobre el fruto del aguacate (*Persea americana* Mill.) [71], o plántulas de guisante (*Pisum sativum*) [253]. Asimismo, está documentada una represión de *HMS* de *Brassica juncea* dependiente de ABA [5]. Ambas enzimas, la HMGR y la HMS, parecen responder coordinadamente al ABA con el objetivo de reducir los niveles de mevalonato y consecuentemente la actividad metabólica global, en un proceso que conduciría finalmente a la paralización del crecimiento. No obstante, ha sido observada la respuesta contraria para *HMG1* de *Morus alba* [138]. Los intensos niveles de expresión de dicho gen verificados en las células guardia estomáticas llevan a sugerir a los autores una mediación en la respuesta al estrés hídrico mediado por ABA que condujese al cierre de los estomas.

En cualquier caso, quedaría por averiguar si estos efectos estarían mediados por mecanismos "feedback" derivados de la naturaleza isoprenoide de las fitohormonas mencionadas, o bien a su acción como reguladores del crecimiento. En este contexto, se ha señalado también la inducción de *HMG1* en *Hevea brasiliensis* por el etileno, hormona gaseosa de naturaleza no isoprenoide implicada en numerosos procesos de desarrollo vegetal [65].

I.4.3.4. Correlación con procesos de desarrollo:

Se ha sugerido la especialización de alguna isoforma de la HMGR de Arabidopsis en procesos de división celular activa que requieren un aporte excepcional de esteroides para la biogénesis de membrana [98]. Concretamente, el examen detallado de plantas transgénicas *HMG2:GUS* ha revelado un patrón de expresión restringido a tejidos meristemáticos apicales de tallos y raíces, zonas de emergencia de raíces secundarias y otras regiones propias de flores, todas ellas en intensa división y crecimiento celulares [99]. Tampoco puede descartarse la

relación de la intensa expresión del gen *HMG2* observada en tejidos meristemáticos con la prenilación de proteínas, proceso que ha sido asociado con la división y el crecimiento celulares [37, 110]. Este fenómeno se hace extensible a HMGR de otras especies como la isoforma 1 de mora, la HMGR1 de tomate o la forma 2 del arroz [117, 138, 312], e incluso a otras enzimas tales la HMS de *Brassica juncea* [5].

En este contexto, el patrón de expresión desplegado por el gen *FPS2* de *A. thaliana* en las flores podría interpretarse por su dedicación a la síntesis de FPP destinado a isoprenoides con funciones específicas, como la farnesilación de proteínas relacionadas con la morfogénesis floral [76], los esteroides y brasinosteroides que acompañan al crecimiento del tubo polínico [221, 222], o los dolicoles responsables de la glicosilación de las glicoproteínas que median la interacción polen-papilas estigmáticas [293]. Algo parecido ha sido argumentado en relación con el gen *SQS*, que muestra importantes elementos de similitud en su perfil de expresión con *HMG2* y *FPS2* [83].

I.4.3.5. Mecanismos de regulación feed-back:

Este aspecto de la regulación de la síntesis de isoprenoides está poco estudiado, aunque son destacables los resultados que postulan mecanismos "feed-back" de control de la expresión de *HMG* en plantas en respuesta a los niveles intracelulares de ubiquinona o esteroides tales como el estigmasterol y el colesterol [71, 253, 281] de modo análogo a lo propuesto ya en 1980 para la enzima de mamíferos [37, 110].

I.4.3.6. Diversos mecanismos de regulación postraduccional modulan el estado de activación de las enzimas implicadas en la ruta del MVA.

Se han observado procesos reversibles de activación por defosforilación e inactivación por fosforilación mediado por fosfatasa y quinasas específicas, respectivamente, en un proceso similar al previamente observado en mamíferos (revisado en [110]). Los dominios catalíticos de la HMGR1 y 2 de *Arabidopsis* parecen estar controlados de este modo [81]. Adicionalmente, existen evidencias que presentan a la fosforilación como un mecanismo dependiente de Ca^{2+} [89].

Por otro lado, diferentes trabajos apuntan hacia la existencia de un proceso de degradación proteolítica controlado mediado por cisteín-proteasas y asociado con la existencia de secuencias PEST en las HMGR vegetales [281]. En este sentido, un mecanismo de degradación proteolítica regulada parece ser el tipo de control utilizado también en la modulación de los niveles de actividad HMGR en patata en respuesta a la luz y el estadio de desarrollo [152].

I.4.4. La enzima HMGR cataliza la etapa limitante en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides citosólicos en plantas, aunque podrían existir puntos adicionales de control.

Está ampliamente aceptado el modelo que presenta a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR) en mamíferos [110] y hongos [25] como la enzima responsable de catalizar el paso regulatorio clave en el control de la biosíntesis de isoprenoides. Este hecho justificaría el gran número de publicaciones referidos a esta enzima, habida cuenta de la evidente atención biomédica que suscitan cuestiones como el control de la colesterolhemia o la regulación de la prenilación de proteínas involucradas en el control del ciclo celular [110]. Todos estos trabajos atestiguan el fino y complejo entramado de niveles de regulación soportado por la HMGR.

En los últimos años van sumándose evidencias en la dirección de un papel análogo de la HMGR en el control global de la biosíntesis de los isoprenoides vegetales producidos en el citosol. Se han constatado abundantes elementos de similitud con sus homólogos de mamíferos, tanto en sus mecanismos de acción enzimática, comportamiento frente a diversos agentes reductores e inhibidores presentes en el medio, conformación espacial adoptada en relación con su localización subcelular, así como la existencia de mecanismos comunes de control de su síntesis y actividad, reflejo todos ellos del alto grado de conservación evolutiva existente [112]. Estos elementos permiten hipotetizar un rol de la HMGR vegetal en el control de la biosíntesis de isoprenoides citosólicos similar al acreditado para la enzima animal y fúngica. La importancia cualitativa y cuantitativa de los esteroides para la célula vegetal explican por qué la mayoría de los trabajos se centren también en aquellos isoprenoides de entre todos los producidos bajo la tutela de la HMGR.

No obstante, el papel de la HMGR como primera enzima limitante de la regulación de la biosíntesis de esteroides en plantas ha sido motivo de amplia discusión. Los resultados proporcionados por las aproximaciones de genética reversa han agitado la cuestión. Y es que si la sobreexpresión del dominio catalítico de la HMGR de hámster en plantas de tabaco no conseguía provocar grandes cambios en las concentraciones intracelulares de esteroides finales, mas si del intermediario cicloartenol [54], la misma aproximación experimental realizada sobreexpresando la HMGR1 de *Hevea brasiliensis* en plantas transgénicas de tabaco, sí se tradujo en la acumulación de diversos esteroides. Algunos de ellos eran esteroides finales como el sitosterol o el campesterol, que terminaban almacenados en forma esterificada, englobados dentro de unas vesículas específicas de naturaleza lipídica [257]. Las plantas exhibían una copia del fenotipo observado en el mutante de tabaco LAB1-4, cuyos niveles extraordinarios de esteroides han sido asociados con los valores incrementados de actividad HMGR detectados en él [111, 186]. La misma línea de investigación llevada a cabo sobre *A. thaliana* había

proporcionado resultados contradictorios. Re no fue capaz de detectar incrementos significativos de esteroides, aún cuando la actividad enzimática era 3 veces superior a la de las plantas control [232]. Finalmente, trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio bajo la dirección del Dr. Boronat han contribuido a aportar luz sobre la cuestión. Los investigadores obtuvieron plantas de *A. thaliana* modificadas genéticamente que presentaban importantes incrementos de actividad HMGR [112]. Concretamente, plantas transformadas que sobreexpresaban los dominios catalíticos de la HMGR1S y la HMGR2 presentaban valores 15 veces superiores de actividad HMGR, lo que se veía reflejado en aumentos de hasta 10 veces en el contenido de esteroides, fundamentalmente en forma esterificada. El autor concluye que la actividad enzimática HMGR es limitante para la síntesis de los esteroides en *Arabidopsis*. Además, arguye, muy probablemente el control de la misma representaría el principal punto de regulación del flujo de metabolitos entre acetil-CoA y los pasos finales de síntesis de esteroides [112].

En cualquier caso, la acumulación diferencial de distintos esteroides intermedios observados en los análisis de plantas con niveles incrementados de actividad HMGR reflejaría la existencia de puntos adicionales de regulación entre las etapas específicas a la biosíntesis de esteroides. Dicho papel ha sido atribuido, por ejemplo, a la 24-metiltransferasa responsable de catalizar la conversión del cicloartenol en 24-metilen-cicloartenol, lo cual explicaría la acumulación observada de dicho sustrato [54]. Una segunda enzima 24-metiltransferasa está en la encrucijada que dirige la ruta hacia la síntesis de etil-esteroides (como el sitoesterol y el campesterol) o los metil-esteroides (como el campesterol y los brasinosteroides). La sobreexpresión obtenida en *N. tabacum* de la enzima responsable de esta actividad catalítica conduce hacia alteraciones en la ratio entre los etil-esteroides y los metil-esteroides, amén de una reducción en el tamaño de la planta [256].

Otras enzimas situadas en puntos de ramificación de la biosíntesis de isoprenoides han sido propuestas como puntos adicionales de control. Algunas investigaciones centradas en torno a la FPS partirían de dicha premisa. En efecto, está descrito que la sobreexpresión de la FPS de *Sacharomyces cerevisiae* en plantas transgénicas de tabaco conduce a un incremento de la síntesis de esteroides de hasta un 400 %, sin que los niveles de actividad HMGR se vean modificados sustancialmente [82]. Algo parecido ha sido apreciado sobreexpresando la FPS correspondiente directamente en cepas de levadura [290]. No obstante, la observación de que plantas de *Arabidopsis* transformadas con la FPS1S bajo el control del promotor de expresión 35S-CaMV y plantas de genotipo silvestre no presentaban diferencias apreciables en los contenidos de esteroides apuntaría en sentido contrario [189]. Los autores concluyen que los niveles de esta isoforma no han de resultar limitantes para la biosíntesis de esteroides. Por el contrario, las hojas de estas plantas presentaban una reducción en las cantidades de citoquininas supuestamente responsable, al menos en parte, de las alteraciones fenotípicas observadas, y que pasaban por procesos de muerte celular y senescencia acelerada [189]. Este efecto vendría originado por una reducción de los intermedios necesarios para la biosíntesis

de estas hormonas, debidos a la competición por el sustrato entre la FPS sobreexpresada y las enzimas que dirigen el IPP y el DMAPP hacia la síntesis de citoquininas (ver Figura I.9).

Otra enzima dispuesta estratégicamente en el entramado biosintético de isoprenoides citosólicos está representado por la SQS, en tanto que situada en el punto responsable de reconducir el flujo metabólico de carbono desde la parte troncal de síntesis de IPP hacia la síntesis de esteroides (y brasinosteroides). La disrupción del gen codificante para la SQS en *S. cerevisiae* afecta a la actividad de la HMGR y la FPS, reprimiéndolos, lo cual indicaría, a juicio de los autores de este trabajo, que la SQS es la enzima responsable de modular el flujo de intermediarios de la ruta del mevalonato en levadura [290]. Sin embargo, los cambios de la actividad SQS de *A. thaliana* conseguidos en plantas transgénicas de sobreexpresión no afectaron al contenido en esteroides totales [83].

I.4.5. Regulación de la biosíntesis de los isoprenoides plastídicos. El papel de las enzimas de la ruta MEP está poco estudiado.

I.4.5.1. La DXS y la DXR en la regulación de la biosíntesis de carotenoides.

La secuencia de etapas enzimáticas que conduce hasta la formación de los compuestos conocidos como carotenos en las plantas superiores está ubicada en los plástidos. A pesar de ello, todos los genes implicados son codificados por el genoma nuclear y las proteínas correspondientes procesadas e importadas hacia dicho organelo. Asimismo, la caracterización bioquímica de estas enzimas se complica por el hecho de que algunas de ellas estén integradas en las membranas tilacoidales, dificultando su purificación. Este extremo ha llevado a postular un modelo por el que algunas de las enzimas carotenogénicas aparecen formando complejos multienzimáticos asociados con las membranas plastídicas [77], modelo que posee interesantes semejanzas con el del metabolón para las enzimas responsables de la síntesis de los isoprenoides citosólicos que examinábamos en el apartado I.4.2 ([52], Figura I.10), y que, de igual modo, permitiría optimizar la redistribución del precursor IPP hacia la producción de los diversos carotenoides.

La extraordinaria importancia de las funciones desempeñadas por los carotenoides ha sido evidenciada en otros puntos de esta introducción. Consecuentemente, los mecanismos de regulación por los que se regirá su biosíntesis serán extremadamente finos, biosíntesis que, a su vez, estará asociada a un buen número de procesos de desarrollo. A su vez, muchos de ellos están condicionados por la luz, conformando el llamado programa de **desarrollo fotomorfogénico** que englobará procesos como la diferenciación/morfogénesis de los cloroplastos durante el desarrollo de las hojas o la conversión de los etioplastos a cloroplastos que tiene lugar durante la desetiología. Ambos procesos están caracterizados por la acumulación de carotenoides y otros pigmentos que de modo coordinado se asocian con el resto

de componentes necesarios para la formación de un aparato fotosintético funcional [307]. Por otra parte, una combinación de carotenoides (y/o antocianinas) es comúnmente el responsable del color final de muchos frutos, cuya aparición está encuadrada dentro del programa de desarrollo morfológico de estos órganos y donde, frecuentemente, serán protagonistas del proceso de maduración organoléptica de los mismos [24, 109].

Los estudios sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides se han centrado, por el momento, en los dos primeras enzimas de la rama que dirige hacia su producción: la fitoeno sintasa (PSY) y la fitoeno desaturasa (PDS). De esta manera, ha podido ser observada la correlación de la expresión de los genes correspondientes en aquellos tejidos o procesos anteriormente descritos que se caracterizan por una acumulación de carotenoides [24].

En este sentido, ha sido descrita una regulación dependiente de la luz de la expresión del gen *PSY* en *A. thaliana* y *Sinapsis alba*, en un proceso mediado por el fitocromo [307]. Lo riguroso del control al que se ve sometido el gen *PSY* es patente también a nivel postraducciona. Lo acredita el sugerente modelo dinámico de regulación del estado de activación de la PSY que ha sido propuesto en *Sinapsis alba* y que estaría basado en la distribución topológica de la enzima [313]. En ausencia de luz, la proteína se deslocaliza en los llamados cuerpos prolamelares de los etioplastos en una forma enzimáticamente inactiva. Por el contrario, la iluminación de las plantas propicia un redireccionamiento de la PSY hacia las membranas tilacoidales, donde adquirirá la forma enzimáticamente activa. En lo que respecta al tomate, se ha constatado la existencia de dos isoformas de la PSY que siguen patrones de expresión órgano-específicos: mientras la isoforma 1 sigue un patrón de expresión ceñido a flores y frutos en desarrollo, la 2 está asociada a tejidos fotosintéticos [23, 109].

Investigaciones recientes han demostrado que la sobreexpresión o inhibición de la expresión del gen *PSY1* en plantas transgénicas de tomate conduce a alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas del contenido en carotenoides [106, 231]. Más aún, el fenotipo resultante incluía la aparición de enanismo, que los autores discuten como derivado de la sobreexpresión de la enzima que transforma GGPP a fitoeno y que desviaría intermediarios otrora dirigidos a la biosíntesis de giberelinas, fitol, filoquinona o tocoferol [106]. Coherentemente con esto, las plantas con este fenotipo (llamadas "dwarf") presentan niveles reducidos de GAs, cuya implicación en la regulación del crecimiento de tallos y hojas es bien conocida [229], o de clorofila, con la consiguiente disminución de la eficacia fotosintética. Finalmente, un ligero aumento en los niveles de ABA, fitohormona sintetizada a partir de los carotenoides, fue también anotado. Algo similar ha sido asimismo observado analizando plantas transgénicas de sobreexpresión de los ADNc sentido y antisentido para las dos isoformas de la PSY identificadas en *N. tabacum* [41]. Este papel clave de la PSY en la regulación de la carotenogénesis le ha sido asignado también en otros modelos tales como *A. thaliana* [307] o pimiento [251], sistemas en los que, sin embargo, solo se conoce una isoforma para dicha

actividad enzimática.

El descubrimiento de la ruta del MEP ha abierto un atractivo campo para el estudio del papel de las enzimas implicadas en la regulación de la formación del IPP necesario para la biosíntesis de los carotenoides. Los escasos trabajos presentados hasta ahora en este contexto se ciñen, en exclusiva, a las 2 primeras etapas de la ruta plastídica de síntesis de IPP y apuntan, decididamente, hacia la regulación coordinada de la expresión de los genes responsables correspondientes con aquellos otros asociados específicamente con la carotenogénesis.

De hecho, el mutante *cla1* de *Arabidopsis*, originalmente caracterizado en 1996 como un gen indispensable para el desarrollo de los cloroplastos, presenta un fenotipo albino derivado de la severa reducción en los niveles de sus pigmentos fotosintéticos, tales como los carotenoides [187]. El alto grado de homología existente con otras DXS, así como la complementación del mutante con la región codificante para la DXS confirmaron la naturaleza del paso realmente bloqueado [101]. El fenotipo manifestado por el segundo mutante del gen *DXS* identificado en *Arabidopsis*, el *chs5*, resultó similar, aunque menos acusado y dependiente de la temperatura de crecimiento [11]. Otros sistemas han dado cuenta de la correlación entre las concentraciones de carotenoides y los niveles de expresión y/o actividad DXR. Algunos se basan en el examen de plantas transgénicas de *M. Piperita* que sobreexpresa el ADNc correspondiente [185]. Otros, en las variaciones del color de las flores, del blanco al naranja oscuro, de diferentes variedades de *Tagetes erecta* (caléndula) debidas a diferencias de hasta 100 veces en su contenido en carotenoides y que estarían correlacionados, en cierta medida, con los niveles del ARNm de la *DXR* [198].

La hipótesis que postula la regulación transcripcional coordinada de los genes involucrados en la ruta MEP y aquellos otros específicos de la carotenogénesis se ha visto recientemente reforzada por el descubrimiento de un elemento actuante en *cis* común a los promotores de dichos genes, elemento que fue originalmente caracterizado en la región 5' flanqueante al gen *PSY* de *A. thaliana* [314].

Otros procesos que precisan de la biosíntesis de carotenoides específicos requieren también del concierto con las enzimas responsables de las dos primeras etapas de la ruta MEP. La colonización de las raíces de muchas plantas terrestres por endomicorrizas arbusculares constituye un proceso ampliamente estudiado [229]. Se ha observado como la toma de contacto del hongo simbionte *Glomus intraradices* con la raíz de *Medicago truncatula*, maíz, arroz, cebada o trigo huésped induce la acumulación de diversos apocarotenoides, derivados de la degradación de las xantofilas y algunos de los cuales serían responsables del color amarillo de las raíces micorrizadas. Pues bien, este fenómeno está a su vez correlacionado espacial y temporalmente con la inducción de los dos primeros genes de la vía del MEP de síntesis de IPP, *DXR* y *DXS* [308]. Particularmente, el gen *DXS2* de *M. truncatula* responde a la colonización de la raíz por

hongos del género *Glomus*, no así la otra copia caracterizada, que presentaría un patrón de expresión aparentemente constitutivo [309]. La misma especialización funcional ha sido puesta de manifiesto en raíces de maíz, tomate y tabaco, especies que también presentan, al menos, 2 copias del gen *DXS*.

Otro interesante aspecto deriva de la regulación coordinada de las dos rutas biosintéticas de IPP. Un ejemplo vendría dado por el propio proceso de desetiolación, en el que tiene lugar la conversión de etioplastos a cloroplastos. Los requerimientos de esteroides para la biogénesis de las estructuras de membrana tilacoidales justificaría la sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de esteroides, como el *HMS* de *Brassica juncea* [5] o el *AAT1* de *A. thaliana* [4]. La estimulación en respuesta a luz de la expresión del gen *DXS* observado en plantas etioladas de *A. thaliana* resulta coherente con su papel en la síntesis del IPP necesario para la producción de los pigmentos fotosintéticos indispensables para la morfogénesis de los cloroplastos maduros [187]. Por otra parte, Gruissem y cols., estudiando el proceso de maduración del fruto de tomate, efectuaron la observación de que durante estadios iniciales del mismo se producía un incremento del ARNm y actividad correspondientes a la HMG-CoA reductasa. También era notable un decaimiento de la misma en estadios avanzados del proceso de maduración, proporcional al decaimiento de la capacidad de la mevinolina para reprimir este proceso [209]. En el contexto del descubrimiento de la nueva ruta plastídica de biosíntesis de IPP, propusieron un modelo en el que las dos vías se sucederían en el suministro del precursor. Los primeros momentos de crecimiento del tomate, en el que tiene lugar un aumento del volumen del mismo, coincide con la intensa producción de fitoesteroides para la biogénesis de membranas. Coherentemente, durante esta etapa, la vía del MVA de síntesis de IPP tendría un papel protagonista. En los estadios posteriores del proceso, esto es, durante la llamada maduración organoléptica del tomate, la vía MEP se ocuparía de la síntesis de IPP [178, 237]. El proceso de maduración organoléptica del fruto de tomate (en inglés "*ripening*") lleva aparejado la transformación de los cloroplastos hacia cromoplastos, paralelamente a una acumulación masiva en estos orgánulos de pigmentos carotenoides, principalmente licopeno, responsables de la transición del color del fruto del verde al rojo.

El papel de la DXR como responsable de la primera etapa específica la ruta MEP de producción de IPP había sustentado su candidatura como primer paso regulatorio del proceso [161, 291]. Sin embargo, y basándose en la estricta correlación observada entre la acumulación del ARNm del gen *DXS* y la síntesis de carotenoides durante la maduración del fruto en tomate siguiendo un patrón similar al de la *PSY1*, ha sido propuesta la actividad enzimática *DXS* como primer paso potencialmente regulatorio [178]. Experimentos de inyección in vivo de desoxixilulosa en el fruto de tomate resultaron en una subida de la expresión de *PSY1* y *DXS*, lo cuál apoyaría dicho modelo. Éste asume un papel coordinado de la *DXS* y la *PSY1* en el control de la biosíntesis de carotenoides, al menos en lo que se refiere a los primeros pasos de la maduración organoléptica del fruto de tomate [178]. Las mismas aproximaciones constataron

que la acumulación de carotenoides durante dicho proceso no requería de una inducción de la expresión del gen *DXR*, puesto que los niveles de ARNm y proteína permanecían inalterados [237]. Los autores de este modelo discuten que algunos resultados obtenidos en procariontes modificados mediante ingeniería metabólica de isoprenoides podrían ampliar el papel limitante de la *DXS* a otros organismos. En efecto, la sobreexpresión de la *DXS* en una cepa de *E. coli* portadora de un plásmido que permite la biosíntesis de licopeno conduce a la acumulación de dicho carotenoide y, paralelamente, de ubiquinona-8 [120]. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por diferentes autores, en un caso añadiéndoles la posibilidad de incrementar la producción de licopeno al sobreexpresar simultáneamente la *DXS* y la *DXR* [22, 148] en otro, no observando variaciones sustanciales en los niveles de DMAPP al sobreexpresar en *E. coli* la *DXR* de la cianobacteria *Synechococcus leopoliensis* [196].

Pero, hasta el momento, los trabajos más reveladores en este ámbito se basan en el análisis de plantas de *A. thaliana* modificadas mediante genética reversa para sobreexpresar el ADNc sentido y antisentido del gen *DXS* [100]. Varias de estas líneas transgénicas presentaban valores alterados de diferentes isoprenoides plastídicos en comparación con los encontrados en las plantas silvestres no modificadas. En el caso de los carotenoides éstos correlacionaban perfectamente con los niveles de ARNm y proteína *DXS* detectados. Los autores asumen que la *DXS* sería una de las enzimas limitantes de la ruta del MEP de síntesis de isoprenoides en *Arabidopsis*. Lo moderado de los cambios observados, particularmente para los carotenoides, así como la variabilidad de los mismos entre las distintas familias de isoprenoides, reflejarían la gran complejidad de las distintas ramas biosintéticas que surgen del IPP plastídico y apuntarían hacia la existencia de pasos reguladores y limitantes de cada uno de ellas [100].

I.4.6.2. La *DXS* y la *DXR* en la regulación de la biosíntesis de otros isoprenoides plastídicos.

El último lustro transcurrido desde la identificación de la *DXS* y la *DXR* como enzimas responsables de los 2 primeros pasos de síntesis de IPP vía MEP ha visto algunos otros trabajos centrados en el estudio de su posible papel regulador. Los perfiles de expresión de los genes *DXS* y *DXR* en cultivos celulares de *C. roseus* serían coherentes con el papel de candidatos a enzimas reguladoras para la producción de alcaloides indol-terpénicos. Esta conclusión se deriva de la coincidencia en la acumulación de los transcritos respectivos de aquellos genes con las condiciones de cultivo de las células que estimulan la producción de dichos productos [50, 303].

El grupo del profesor Croteau ha centrado gran parte de sus esfuerzos en el estudio de la biosíntesis de monoterpenos, utilizando los aceites esenciales producidos por *M. piperita* como modelo [184]. La activación del gen *DXS* tiene lugar durante los primeros estadios de desarrollo de la hoja, precediendo al pico de producción de monoterpenos, con el objeto de suministrar una población de IPP suficiente para llevar a cabo dicho proceso biosintético [165]. Adicionalmente, el análisis fenotípico de plantas de menta que sobreexpresan el gen para la *DXR* ha demostrado

que la alteración de este primer paso específico de la ruta MEP de síntesis de IPP aumentaría el flujo metabólico global y conduciría a un incremento en la producción de monoterpenos [185], lo cual le concedería un papel regulador en este proceso biosintético.

En conclusión, del análisis de toda la información disponible hasta el momento no pueden realizarse generalizaciones sobre un posible papel regulador de las enzimas DXS y DXR en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos análogo al desempeñado genéricamente por la HMGR en la producción de isoprenoides citosólicos. No obstante, y al igual que para ellos, las evidencias apuntan hacia la existencia de etapas adicionales de control en las distintas ramas biosintéticas que divergen del IPP plastídico.

I.5. ELECCIÓN DE *Arabidopsis thaliana* COMO MODELO DE ESTUDIO.

Arabidopsis thaliana fue descubierta en las montañas Harz (Alemania) hacia el siglo XVI por Johannes Thal quien la denominó originalmente *Pilosella siliquosa*. Pertenece a la familia de las crucíferas (o brassicaceas), lo cual la emparenta con más de 3000 especies. Entre todas ellas destacan las englobadas en el género *Brassica* que incluye la mostaza negra, el nabo o la col (*B. Nigra*, *B. Napus* o *B. oleracea* var. *Oleracea*, respectivamente), la mostaza blanca (*Sinapsis alba*) o el rábano (*Raphanus sativus*). Con ellas comparte las características diferenciales del taxon entre las que destacan el carácter de plantas dicotiledóneas herbáceas que poseen flores bisexuales con un perianto de 4 elementos. El androceo estará compuesto de 6 estambres siendo los 2 externos más cortos, mientras que el gineceo consta de 2 carpelos con el ovario compartimentado. Por su parte, los frutos serán secos y dehiscentes tipo silicua (o silícula en otras especies).

Pero son otros los muchos atributos que la han erigido en un organismo atractivo para la biología vegetal. Entre ellos destacan su rápido ciclo de vida. Efectivamente, una semilla germinada y crecida en condiciones idóneas de cultivo es capaz de regenerar una planta adulta en 6-8 semanas, la cual será además capaz de producir más de 10.000 semillas. Su pequeño tamaño (alrededor de 30 cm) permite crecer docenas de individuos en una maceta. Por otra parte, su cultivo es altamente adaptable, lo cual viene reflejado por el hecho de que se haya conseguido con éxito la regeneración de plantas adultas a partir de callos e incluso células, y que además crecerán bien en medios estériles de composición química definida y bajo luz artificial. La abundancia de herramientas genéticas completaría su atractivo. En fecha tan antigua como 1873 (A. Braun) se describió un mutante de *A. thaliana*, probablemente correspondiente al gen *AGAMOUS* [135], lo cual por su parte da una idea del interés que históricamente ha despertado esta especie. F. Laibach, quien estimó por primera vez la dotación cromosómica de la especie en 1907, señaló en 1943 su potencial. Las colecciones de mutantes empezaron a generalizarse de la mano de alguno de sus discípulos a partir de los años 50 y 60. Entonces eran obtenidos bien por mutagénesis masiva de semillas por exposición a radiaciones ionizantes, bien por

tratamiento de las mismas con agentes alquilantes. La facilidad para disponer de mutantes homocigotos deriva, además, de la autofecundación como modo habitual de reproducción de esta especie.

Pero no sería hasta los años 80 y en el contexto del surgimiento explosivo de la genética molecular cuando *Arabidopsis* se confirma, en detrimento de otras especies tales como la petunia, el tomate o el tabaco, como modelo de estudio en genética molecular de plantas, alzándose así junto a la *Drosophila*, *E. coli*, el ratón o *Sacharomyces cerevisiae* al pedestal de los sistemas preferidos por los biólogos para desentrañar los procesos básicos de la vida. Lo pequeño del genoma de esta planta en relación con el de otras especies (Tabla I.3), que facilita notablemente el clonaje de cualquier secuencia genética, así como la consecución con éxito de la transformación con ADN exógeno, terminaron por inclinar la balanza a su favor. Los años siguientes verían añadir a todas estas razones el primer mapa de RFLP (siglas en inglés de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) [194], el convertirse en rutinario en cualquier laboratorio la transformación por infiltración con *Agrobacterium* [26, 66], o la identificación y clonaje de mutantes insercionales resultantes de la transformación con ADN-T, "transposon tagging" o "activation tagging" [39, 311].

ORGANISMO	TAMAÑO DEL GENOMA	Nº GENES	DENSIDAD GÉNICA MEDIA
<i>Homo sapiens</i>	3000 megabases	>30000	1 gen/100000 bases
<i>Mus musculus</i>	3000 megabases	30000	1 gen/100000 bases
<i>Drosophila melanogaster</i>	135,6 megabases	13061	1 gen/13781 bases
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125 megabases	25500	1 gen/4900 bases
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97 megabases	19099	1 gen/5079 bases
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,1 megabases	6034	1 gen/2005 bases
<i>Escherichia coli</i>	4,67 megabases	3237	1 gen/1443 bases
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,8 megabases	1740	1 gen/1034 bases
<i>Zea mays</i>	3900 megabases	-	-
<i>Vicia faba</i>	14500 megabases	-	-

Tabla I.3: Tabla comparativa de los tamaños de los genomas de distintos organismos completamente secuenciados y de diversas especies vegetales. Se acompaña también la estimación en el número de genes y la densidad génica media. Nótese que el tamaño del genoma no correlaciona necesariamente con el status evolutivo de la especie.

Por todo esto, no es de extrañar que el de *Arabidopsis* haya sido el primer genoma vegetal completamente secuenciado. En efecto, a finales del año 2000 se completó la secuenciación de su genoma, desvelando la secuencia de 125 megabases que contendrá unos 25.500 genes correspondientes a 11.000 familias [136] (Tabla I.3). Toda la información contenida resultará obviamente un recurso incomparable para estudios en todos los ámbitos de la biología vegetal y la mejora genética de cultivos de interés agroalimentario. Ha propiciado además la creación de bases de datos específicas con secuencias y librerías de ADNc y genómico

o de cajas consenso identificadas en promotores de genes de plantas, recursos con información integrada sobre expresión basados en micromatrices de ADN o chips génicos y bancos de semillas silvestres y mutagenizadas. Muchas de ellas utilizan potentes y versátiles herramientas de búsqueda tales BLAST o FASTA, están integradas en las bases de datos públicas y son accesibles en su mayoría desde la dirección electrónica del TAIR (siglas de "The Arabidopsis Information Resource"; <http://www.arabidopsis.org/>) (Tabla I.4).

ORGANISMO	DIRECCIÓN ELECTRÓNICA
<i>The Arabidopsis Information Resource</i>	http://www.arabidopsis.org/
<i>The Institute for Genomic Research (TIGR) A. thaliana database.</i>	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/
<i>LEHLE seeds.</i>	http://www.arabidopsis.com/
<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center.</i>	http://nasc.nott.ac.uk/
<i>ASPB-Publications-The Arabidopsis Book.</i>	http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/toc.cfm
<i>The Arabidopsis cDNA Sequence Analysis Project.</i>	http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/Arabidopsis/
<i>Munich Information center for Protein Sequence. A. thaliana database.</i>	http://mips.gsf.de/proj/thal/proj/thal_overview.html
<i>Arabidopsis information on the World Wide Web</i>	http://weeds.mgh.harvard.edu/atlinks.html

Tabla I.4: Relación de paginas web con información sobre *Arabidopsis thaliana*.

Para terminar, y no menos importante, las conferencias internacionales sobre Arabidopsis se han convertido en periódicas y en ellas cientos de investigadores se intercambian materiales e información de todo tipo haciendo de esta especie vegetal una herramienta biológica cada vez más potente en la que se multiplican los genes clonados y caracterizados.

II. RESULTADOS

II.1. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES

DXS2 Y DXR DE Arabidopsis thaliana.

II.1.1. Identificación del gen *DXS1* que codifica para la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS).

Con el objeto de clonar el ADNc del gen *DXS* de *Arabidopsis thaliana* se efectuó una búsqueda mediante el algoritmo TBLAST-N en las bases de datos de *ESTs* ("Expressed Sequence Tags"), utilizando como sonda la secuencia correspondiente al gen *dxs* de *E. coli* [177]. Dicha búsqueda dio como resultado el clon genómico C2814 que incluía el marco abierto de lectura del gen *DXS* incluido en la región relacionada con funciones fotosintéticas (cluster) del cromosoma de *Rhodobacter capsulatus* [119], así como la *EST* G11B5T7 de *A. thaliana*. Utilizando este último *EST* en una nueva búsqueda, fueron identificados dos *EST* más de *Arabidopsis*, el G5A12T7 y el H2A12T7. Los tres clones fueron remitidos desde el "*Arabidopsis Biological Resource DNA Stock Center*" de la Universidad de Ohio y secuenciados en su totalidad. El análisis de las secuencias reveló que únicamente el inserto correspondiente al clon H2A12T7 contenía la secuencia codificante completa del gen *DXS* de *A. thaliana*. En concreto, dicho clon presenta una longitud de 2151 pb, extendiéndose 127 pb hacia el extremo 5' desde el inicio de traducción y 325 pb por 3' desde el codon de parada. La secuencia de nucleótidos contiguas al inicio de traducción (TCCA**AT**GGC) se ajustaba a la secuencia AAC**AA**TGGC, caracterizada como consenso del entorno del inicio de traducción en genes de plantas [181], región que ha sido descrita como importante en cuanto a la eficiencia de traducción [128]. La comparación con la secuencia del gen *CLA1* (*DXS1* de *A. thaliana* var. *Wassilewskija*, WS [187]), identificado durante el transcurso de este trabajo, permitió detectar 3 substituciones nucleotídicas puntuales en las posiciones +1124, +1149 y +1393, de las cuales la primera (Val-Glu) y la segunda (Glu-Lys) representaban un cambio aminoacídico (Figura II.1).

Seguidamente, y con el propósito de determinar el extremo 5' del ARNm correspondiente al ADNc identificado, se utilizó la técnica de *RACE* 5'. La primera cadena de ADNc fue sintetizada a partir de ARN de plántulas de 12 días crecidas en día largo y al oligonucleótido DXS1.GSP1, utilizado como cebador (ver Tabla de oligonucleótidos, apdo. V.7). A continuación, y tal y como se describe en el apartado V.5.4.2 de Materiales y Métodos, le fue adicionada una cola poli-C. Como resultado de una etapa de amplificación por *PCR* a partir de la cadena de ADNc original mediante el cebador específico DXS1.GSP2 y el oligonucleótido AAP suministrado por la casa comercial, seguido de una nueva reamplificación con el juego de cebadores DXS2.GSP2/AUAP (este último también provisto por la casa), se rescató un fragmento de unos 580 pb que fue clonado en el vector pGEM-T. El análisis mediante secuenciación de 17 de los clones resultantes puso de manifiesto cierta heterogeneidad en el tamaño de los productos amplificados. Sin

embargo, dos familias de cinco clones cada uno coincidían en las posiciones más distales respecto al extremo 5' conocido, situadas entre 10 y 30 pb corriente abajo de una secuencia TATA, común a los inicios de transcripción eucariotas [127, 230]. Se confirmaron así aquellos dos residuos de citosina, ubicados a 182 y 205 pb respectivamente hacia 5' del codón ATG, como principales inicios de transcripción (Figura II.1). Este primer residuo será considerado como posición +1 del ADNc del gen *DXS1*. Adicionalmente, y como reveló el análisis de la región genómica correspondiente, tales posiciones se encontraban a 107 y 130 pb hacia 3' respectivamente de la secuencia TAATTCATC, que coincide en 8 de sus 9 posiciones con el consenso definido para la llamada caja CAAT [127].

Por su parte, y con el objetivo de analizar el extremo 3' del ADNc, se llevó a cabo una aproximación análoga. En efecto, gracias a la técnica de *RACE 3'*, y utilizando al oligonucleótido *DXS1.S8* como cebador específico, se obtuvieron 20 clones cuyos insertos finalizaban en 7 posiciones diferentes que desvelaban otros tantos sitios de poliadenilación situados entre 275 y 305 pb en dirección 3' del codón UGA de parada. En la región 3' *UTR* (región transcrita no traducida, siglas en inglés de "Untranslated Transcribed Region") fue identificada la secuencia AATAAT, localizada a su vez a 245 pb del codón UGA de parada, y coherente con el motivo canónico AATAAA frecuentemente descrito como señal responsable de dirigir la poliadenilación [21, 143, 168]. Resulta destacable la presencia de múltiples sitios de poliadenilación, coyuntura profusamente descrita para numerosos ARNm nucleares de plantas, y que ha sido relacionada con mecanismos de regulación de la expresión a nivel postranscripcional [21, 168] (Figura II.1). Alguna de los sitios de poliadenilación identificados en el extremo 3', caso de la primera citosina sombreada en gris en la Figura II.1, se repetían hasta 5 veces.

Figura II.1: Secuencia nucleotídica del ADNc correspondiente al gen *DXS1* (completado con los extremos 5' y 3' deducidos de los experimentos de *RACE*) y secuencia aminoacídica codificada. En mayúscula, aparece la secuencia codificante. En minúscula figuran las regiones *UTR 5'* y *3'* respectivamente. Sombreadas en gris aparecen las posiciones identificadas mediante el análisis de *RACE 5'* como extremos del ARNm *DXS1* y para el que fueron empleados los oligonucleótidos *DXS1.GSP1* y *DXS1.GSP2* respectivamente, cuya secuencia se encuentra subrayada. Por su parte, se resaltan, también sombreadas, las posiciones identificadas como sitios de poliadenilación por los experimentos de *RACE 3'*. La secuencia del oligonucleótido *DXS1.S8*, empleado en esta técnica, se encuentra también subrayada. La hipotética señal de poliadenilación aparece en blanco sobre fondo negro. Finalmente, resaltadas en negrita, aparecen las bases que se encontraron sustituidas respecto de la secuencia del ADNc del gen *CLA1* [187].

II. RESULTADOS

1 caactctccaccaccaccattgtaccaccacatttaaacacacacttttacttgtagtgggattcgaagtgcg
76 ttttattcatttgttttactgtttttgataaacctcaaaaatttgctaaattttattctctataaatccttatatg
151 ttttacttacattcctaaagttttcaacttttcttgagcttcaaaaagtacctccaATGGCTTCTTCTGCATTTCG
M A S S A F A
226 TTTTCTTCTTACATAATAACCAAGGAGGACTTTCAACTGATTCTTGTAAATCAACTTCTTGTCTTCTTCTAG
· F P S Y I I T K G G L S T D S C K S T S L S S S R
301 ATCTTTGGTTACAGATCTTCCATCACCATGTCTGAAACCCAACAACAATTCCCATTCAAACAGAAGAGCAAAAGT
· S L V T D L P S P C L K P N N N S H S N R R A K V
376 GTGTGCTTCACTTGCAGAGAAGGTTGAATATTATTTCAAACAGACCACCAACTCCATTACTTGACACTATTAATA
· C A S L A E K G E Y Y S N R P P T P L L D T I N Y
451 CCCAATCCACATGAAAATCTTTCTGTCAAGGAAGTGAACAACCTTTCTGATGAGCTGAGATCAGACGTGATCTT
· P I H M K N L S V K E L K Q L S D E L R S D V I F
526 TAATGTGTCGAAAACCGTGGACATTTGGGGTCAAGTCTTGGTGTGGAGCTTACTGTGGCTTCTTACTACAT
· N V S K T G G H L G S S L G V V E L T V A L H Y I
601 TTTCAATACTCCACAGACAAGATCTTTGGGATGTTGGTGCATCAGTCTTATCCTCATAAGATTTCTACTGGGAG
· F N T P Q D K I L W D V G H Q S Y P H K I L T G R
676 AAGAGAAAAGATGCTCAATGAGGCAACCAATGGTCTCTCTGGTTTCACCAACAGGAGGAGATGAACATGA
· R G K M P T M R Q T N G L S G F T K R G E S E H D
751 TTGCTTTGGTACTGGACACAGCTCAACCACAATATCTGCTGGTTTAGGAATGGCGGTAGGAAGGGATTTGAAGGG
· C F G T G H S S T T I S A G L G M A V G R D L K G
826 GAAGAACAAGATGGTGTGCTGTGATGGTGGTGCATGCGGACGGCAGGCTTATGAAGCCATGAACAA
· K N N N V V A V I G D G A M T A G Q A Y E A M N N
901 CGCCGATATCTAGACTCTGATATGATTGTATCTTAAATGACAACAAGCAAGTCTCATTACCTACAGCTACTTT
· A G Y L D S D M I V I L N D N K Q V S L P T A T L
976 GGATGGACCAAGTCCACCTGTTGGTGCATTGAGCAGTCTCTTAGTCGGTTACAGTCTAACCCGGCTCTCAGAGA
· D G P S P P V G A L S S A L S R L Q S N P A L R E
1051 GTTGAGAGAAGTCGAAAAGGTTATGACAAAGCAATAGGCGGACCAATGCATCAGTTGGCGGCTAAGGTAGATGT
· L R E V A K G M T K Q I G G P M H Q L A A K V D V
1126 GTATGCTCGAGGAATGATAAGCGGTACTGGATCGTCACTGTTTGAAGAAGTCCGGTCTTACTATATTGGTCCAGT
· Y A R G M I S G T G S S L F E E L G L Y Y I G P V
1201 TGATGGGCACAACATAGATGATTGGTAGCCATTCTTAAAGAAGTTAAGAGTACCAGAACCACAGGCTGTACT
· D G H N I D D L V A I L K E V K S T R T T G P V L
1276 TATTTCATGTTGGTGACGGAGAAAGTCTGTTTACCTTACGCGGAGAGAGCTGATGACAAAATACCATGGTGTGT
· I H V V T E K G R G Y P Y A E R A D D K Y H G V V
1351 GAAATTTGATCCAGCAACGGGTAGACAGTTCAAAACCTACTAATGAGACTCAATCTTACACAACCTTACTTTGCGGA
· K F D P A T G R Q F K T T N E T Q S Y T T F A E
1426 GGCATTAGTCGAGAAAGCAGAGGTAGACAAAGATGTGGTTGCGATTTCATGCAGCCATGGGAGGTGGAAACCGGTT
· A L V A E A E V D K D V V A I H A A M G G G T G L
1501 AAATCTCTTCAACGTCGCTTCCCAACAAGATGTTTCGATGTAGGAATAGCGGAACAACACCGCAGTACTTTTGC
· N L F Q R R F P T R C F D V G I A E Q H A V T T F A
1576 TCGGGTTTTAGCCTGTGAAGGCCCTAAACCTTCTGTGCAATCTATTGCTTTTCATGCAGCGTGTCTATGACCA
· A G L A C E G L K P F C A I Y S S F M Q R A Y D Q
1651 AGTTGTCATCTGATTTGCAAAAATACCAGTGTAGATTTGCAATGGATAGAGCTGGACTCGATTGGAGCTGA
· V V H D V D L Q K L P V R F A M D R A G L V G A D
1726 TGGTCCGACACATTGTGGAGCTTTTCGATGTGACATTTATGGCTGTCTTCCTAACATGATAGTGTGGCTCCATC
· G P T H C G A F D V T F M A C L P N M I V M A P S
1801 AGATGAAGCAGATCTTTAACATGGTTGCAACTGCTGTGCGATTGATGATCGTCTTCTTGGTTCCGTTACCC
· D E A D L F N M V A T A V A I D D R P S C F R Y P
1876 TAGAGGTAACGGTATTGGAGTTGCATTACCTCCCGAAACAAAGGTTTCCAATTGAGATTGGGAAAGGTAGAAT
· R G N G I G V A L P P G N K G V P I E I G K G R I
1951 TTTAAAGGAAGGAGAGAGTTGCGTTGTTGGGTTATGGCTCAGCAGTTTCAGAGCTGTTTAGGAGCGGCTGTAAT
· L K E G E R V A L L G Y G S A V Q S C L G A A V M
2026 GCTCGAAGAACCGGATTAAACGTAACCTGTAGCGGATGCACGGTTTTGCAAGCCATTGGACCGTGTCTCATTCG
· L E E R G L N V T V A D A R F C K P L D R A L I R
2101 CAGCTTAGCTAAGTCGCACAGGTTCTGATCACGGTTGAAGAAGGTTCCATTGGAGGTTTTGGCTCGCACGTTGT
· S L A K S H E V L I T V E E G S I G G F G S H V V
2176 TCAGTTTCTGCTCGATGGTCTTCTTGATGGCAAACCTCAAGTGGAGACCAATGGTACTGCCTGATCGATACAT
· Q F L A L D G L L D G K L K W R P M V L P D R Y I
2251 TGATCACGGTGCACCAGCTGATCAACTAGCTGAAGCTGGACTCATGCCATCTCACATCGCAGCAACCGCACTTAA
· D H G A P A D Q L A E A G L M P S H I A A T A L N
2326 CTTAATCGGTGCACCAAGGAAGCTCTGTTTTGAgagtaagaatctgttggctaaaaacatatgtatacaaacact
2327 · L I G A P R E A L F *
2401 ctaaatgcaacccaaggtttcttctaagtactgatcagaattcccgcgagagaagtcttttggcaacagctatata
2476 tatttactaagattgtgaagagaaaggcaaaaggttgcaagattagattatgataaaactggtatt
2551 tgttttgtaattttgtttaggattgtgatggagatcggtgtgtacaaataataacacctgtgtaaaaatcaatta
2626 catctttttgttatcttttatagctttgtgtgacatatttttggtagcagcagtggtttt

II.1.2. Identificación de los genes *DXS2* y *DXS3* con homología al gen *DXS1*. Organización genómica.

La técnica de *Southern-blot* permitió determinar la existencia de secuencias con similitud al gen *DXS1*. Se utilizó para ello la sonda descrita en Materiales y Métodos (apdo. V.5.2.1) y ADN genómico de *A. thaliana* digerido con las endonucleasas de restricción XhoI, XbaI, HindIII y EcoRI (Figura II.2a y b). El patrón de bandas obtenido bajo condiciones de alta (a) y baja severidad (b) reveló la presencia de bandas adicionales, no interpretables a partir del mapa de restricción de la región genómica homóloga a la sonda utilizada, región que había sido previamente identificada a partir de búsquedas bioinformáticas. El análisis de estos resultados confirma que, efectivamente, la sonda reconoce los fragmentos específicos correspondientes al gen *DXS1*. Sugiere además la existencia de al menos dos copias de genes relacionados con *DXS*, y que corresponderían (de acuerdo con la coincidencia en los patrones de restricción) con los dos genes hipotéticos *DXS2* y *DXS3*, posteriormente identificados a partir de la búsqueda de homólogos sobre la secuencia del genoma de *A. thaliana*. Sin embargo, es digno de atención el resultado de la digestión con la enzima EcoRI, donde aparecen 3 bandas de tamaño menor al esperado que no son coherentes con los mapas de restricción de las regiones de ADN genómico para ninguna de las 3 copias detectadas del gen *DXS*. Este resultado no puede ser interpretado por la ocurrencia de actividad "star" que haya podido provocar cortes sobre el ADN genómico en sitios distintos de los específicos a la enzima EcoRI, puesto que los resultados obtenidos con otras sondas sobre las mismas muestras de ADN digerido (como la correspondiente al ADNc del gen *DXR* y que veremos más adelante) no reprodujeron dicho patrón de bandas. Puede inferirse, por lo tanto, la existencia de alguna secuencia adicional homóloga a la de los genes *DXS1*, *DXS2* y *DXS3*, no identificada hasta el momento.

La búsqueda sobre la secuencia del genoma de *Arabidopsis* permitió definir la localización del gen *DXS1*. En concreto, se confirmó como éste gen aparece ubicado en la región contenida en el clon genómico p1C10AP64 del cromosoma 4, originado a su vez a partir del cósmido YUP5B11.1B1C10. De la comparación de la secuencia de ADNc obtenida con la región genómica correspondiente se dedujo la organización del gen *DXS1* como compuesto por 9 exones y 8 intrones que se extendían sobre 3,5 kb (Figura II.4a). Las secuencias limitantes entre exones e intrones están de acuerdo, en todos los casos, con las secuencias consenso para los sitios dadores (C/AAG:GUAAGU) y aceptores (UGCAG:G) [36]. Es interesante anotar que, con respecto al gen *CLA1* (*DXS1*, [187]), únicamente aparecen conservadas cinco de las posiciones señaladas de procesamiento de los intrones, reflejo de la alta variabilidad existente entre los distintos ecotipos de *A. thaliana*.

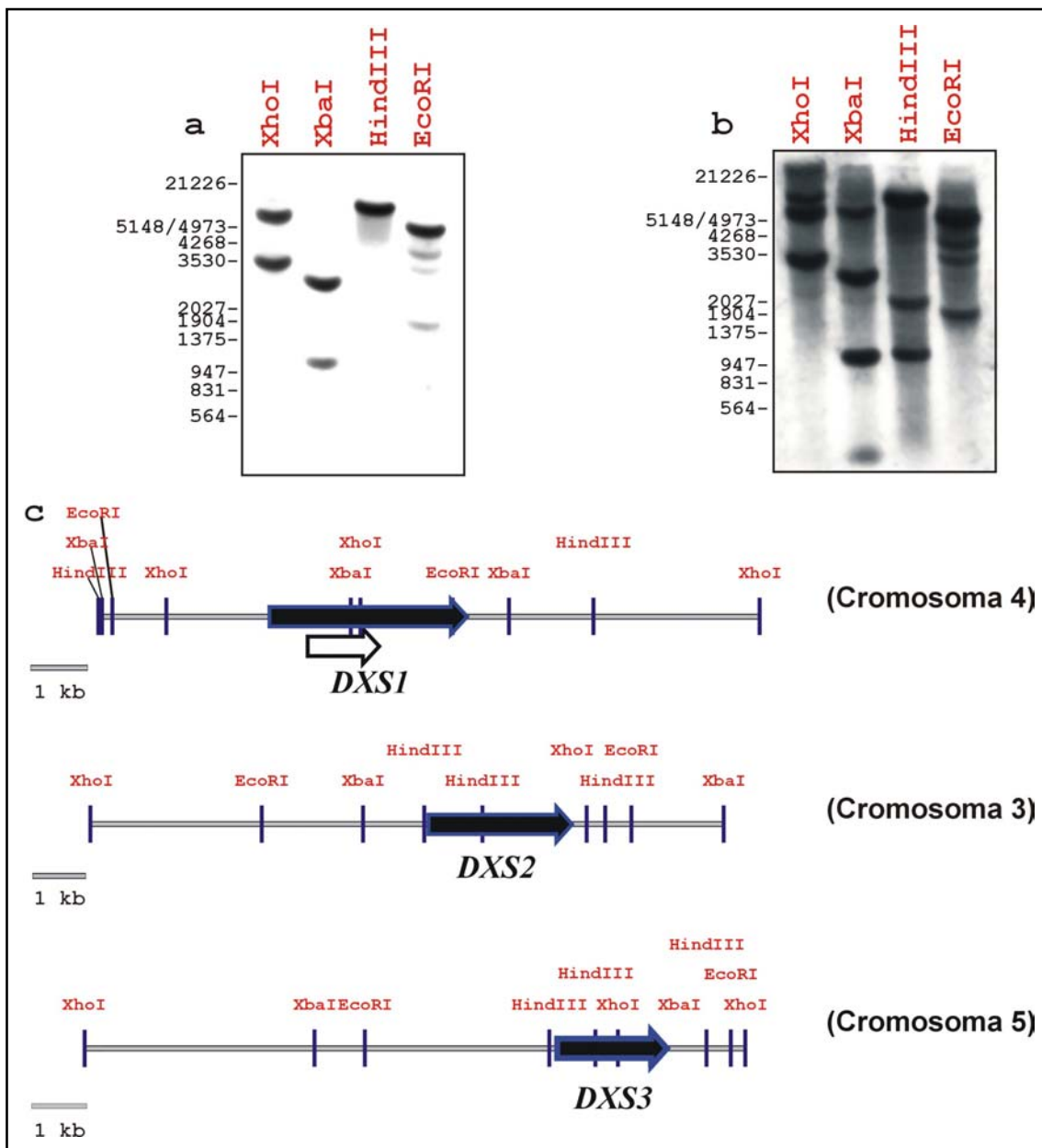


Figura II.2: Análisis mediante experimentos de Southern-blot de la complejidad genómica del gen *DXS* de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los resultados obtenidos con hibridaciones bajo condiciones de alta (a) y baja (b) severidad. El panel c muestra los mapas de restricción de las regiones genómicas correspondientes a cada una de las copias detectadas del gen *DXS*, de acuerdo, en cada caso, con el patrón de bandas obtenido. Las flechas negras indican las ubicaciones sobre las regiones genómicas correspondientes de cada uno de los genes detectados. A su vez, la región reconocida por la sonda utilizada se representa con una flecha blanca.

Seguidamente, y con el propósito de aislar la secuencia de ADNc correspondiente al gen *DXS2*, se llevaron a cabo RT-PCR utilizando como molde ARN extraído a partir de diversos tejidos de la planta adulta (Materiales y Métodos, apdo. II.5.4.2). Únicamente a partir de los

ARN precedente de inflorescencias y frutos, y tras dos amplificaciones por *PCR* encadenadas, se obtuvieron bandas del tamaño esperado. En ambos casos, y paralelamente, se efectuaron reacciones de *PCR* control con varios juegos de oligonucleótidos internos, que confirmaron en cada etapa la identidad del producto esperado. El fragmento originado a partir de la muestra de inflorescencias fue purificado y clonado en el vector pBLUESCRIPT-SK⁺, obteniéndose el plásmido pLBSDXS2.2. Finalmente, la secuenciación del inserto correspondiente confirmó la presencia de un marco abierto de lectura de 1857 pb flanqueado por 43 pb hacia el extremo 5' y 147 en dirección 3' (Figura II.3). La secuencia se correspondía con los tres clones de *ESTs* existentes en las bases de datos, que habían sido obtenidos en todos los casos a partir de muestras de silicuas inmaduras (números de acceso "GenBank", AV563200, AV557239 y 559551). Ninguno de ellos contenía el marco de lectura completo del gen *DXS2*.

Al igual que en el caso del gen *DXS1*, observamos como la secuencia de bases contiguas al triplete de inicio de traducción (TCAA**AT**GGC) se adaptaba al consenso propuesto [181] (Figura II.3). Asimismo, el análisis de la región genómica correspondiente al extremo 5' del ADNc clonado para el gen *DXS2* permitió detectar la presencia de una secuencia CAAAATACATT situada a 190 nt del extremo conocido, y que coincidía en 10 de sus 11 posiciones con la secuencia canónica de la caja CAAT, caracterizada como secuencia reguladora de la actividad transcripcional [127]. Finalmente, una caja TATATA aparecía también flanqueando el extremo 5' del ADNc clonado [127, 230].

Figura II.3: Secuencia nucleotídica del ADNc clonado del gen *DXS2* y secuencia aminoacídica codificada. Como en la Figura II.1, las posiciones en minúscula representan las regiones transcritas no traducidas, mientras que en mayúscula aparece la región codificante cuya secuencia aminoacídica correspondiente aparece también indicada. Los oligonucleótidos *DXS2.S1* (5', sentido) y *DXS2.S4* (3', antisentido) utilizados en el clonaje por RT-PCR se muestran subrayados.

II. RESULTADOS

```

1  cgttggaaatgtcatatcaaacacagattaacaaattctctctcaaATGGCTCTCTCCGTATTTGCCTTTCCTTCTTA
                                M A L S V F A F P S Y
76  CATAAATAGGAATCCCTTCACTAAAATATCTTAAACCTTCTTCTATGTCTTCTACAAAATATTCAAAAAGTAAGAGC
· I N R N P S L K Y L K P S S M S S T K Y S K V R A
151  AACAAATTTTCAGAGAAAGGTGAATATTATTCAAACAGACCACCAACTCCTTTATTGGACACAATCAACCATCC
· T T F S E K G E Y Y S N R P P T P L L D T I N H P
226  AATGCACATGAAAAATCTCTCCATCAAAGAACTCAAAGTTCTTCCGGACGAGTTGAGATCTGATGTTATTTTTAA
· M H M K N L S I K E L K V L S D E L R S D V I F N
301  TGTTTGAAAACCTGGAGACACTTGGGTTCAATCTTGGTGTGTTGTTGACCCGTTGCCCTTTCATACATCTT
· V S K T G G H L G S N L G V V E L T V A L H Y I F
376  CAATACTCCTCATGATAAGATCCTTTGGGATGTTGGTCATCAGTCTTATCCTCACAAGATTCTAACGGGAAGAAG
· N T P H D K I L W D V G H Q S Y P H K I L T G R R
451  AGGAAAGATGAAGCAATAAGGCAGACCAATGGCTCTCCGGCTACACCAAGCGAAGAGAGAGTGCAGACTC
· G K M K T I R Q T N G L S G Y T K R R E S E H D S
526  TTTTGGCACCGGGCACAGTTCGACCACACTATCTGCAGGCTTAGGGATGGCTGTAGGGAGGGATTTGAAGGGGAT
· F G T G H S S T T L S A G L G M A V G R D L K G M
601  GAACAACAGCGTGGTTTCGGTTATAGCGATGGTGGCTATGACAGCTGGACAAGCTTATGAAGCAATGAACAATGC
· N N S V V S V I G D G A M T A G Q A Y E A M N N A
676  TGGCTACTTCACTCCAACATGATGTGATTCTCAACGACAACAAAAGTATCTTTGCCTACTGCTAACTTGGGA
· G Y L H S N M I V I L N D N K Q V S L P T A N L D
751  TGGACCAACTCAACCTGTTGGAGCTCTGAGCTGTGCTCTTAGTAGGCTGCAATCTAATTGTGGAATGATTAGAGA
· G P T Q P V G A L S C A L S R L Q S N C G M I R E
826  GACTAGTTCAACTGTTTGAAGAACTTGGTTTTCACTATGTTGGTCCAGTTGATGGACACAACATAGATGATCT
· T S Y T L F E R A D D H Y V G P V D G H N I D L
901  GGTCTCCATTTGAAACATTAAGAGCACCAAAACCATAGGACCGGTTCTTATCCATGTCGTGACTGAGAAAGG
· V S I L E T L K S T K T I G P V L I H V V T E K G
976  TCGTGGATATCCTTACGCAGAGAGAGCTGATGACAAGTATCATGGAGTTTTAAAAATTTGATCCAGAAACAGGTAA
· R G Y I V A E R A D D K Y H G V L K F D P E K K
1051 ACAGTTCAAAAATATTTCCAAGACTCAGTCTTCACTTCCCTGTTTTGTGGAGGCCTTGATTCAGAAAGCAGAGGC
· Q F K N I S K T Q S Y T S C F V E A L I A E A E A
1126 AGACAAAGATATTGTTGCCATTATGCAGCCATGGGAGGTGGAACCATGTTGAATCTCTTCGAAAGCCGCTTTC
· D K D I V A I H A A M G G G G T M L N L F E S R F P
1201 TACAAGGTGTTTCGATGTCGGCATAGCAGAACAACATGCAGTTACCTTCGCTGCTGGTCTTGGCTTGGCAAGGACT
· T R C F D V G I A E Q H A V T F A A G L A C E G L
1276 TAAGCCCTTTTGTACAATCTACTCATCTTTCATGCAACGGGCATATGATCAAGTTGTACATGATGTTGATCTACA
· K P F C T I Y S F M Q R A Y D Q V V H D V L Q
1351 GAAACTGCCTGTGAGATTTGCAATAGATAGAGCAGGACTTATGGGAGCAGATGGTCCAACACATTGTGGAGCATT
· K L P V R F A I D R A G L M G A D G P T H C G A F
1426 TGATGTGACGTTTATGGCATGCTACCAAACATGATAGTAATGGCTCCATCTGATGAAGCAGAGCTTTTTAACAT
· D V T F M A C L P N M I V M A P S D E A E L F N M
1501 GGTGCAACCGCTGCAGCTATTGATGACCGTCCCTTCTTCTGATATCATAGAGGAAATGGTATTTGGTGTTC
· V A T A A A I D D R P S C F R Y H R G N G I G V S
1576 ACTTCCCTCCGTAACAAAGGTGTCCCTTCCATTTGGGAGAGGTAGGATAAAGGACGGCGAGAGGTTGC
· L P P G N K G V P L Q I G R G R I L R D G E R V A
1651 GCTTTTGGGCTATGATCAGCGGTGCAAAGATGTTTAGAGGCTGCATCTATGCTAAGCGAACCGGATTAAGAT
· L L G Y G S A V Q R C L E A A S M L S E R G L K I
1726 AACAGTAGCGGATGCAAGATTCTGTAAGCCGTTAGATGTTGCTCTCATTCGTAGCTTAGCTAAATCACACGAGGT
· T V A D A R F C K P L D V A L I R S L A K S H E V
1801 TTTGATCACGTTGAAGAAGGTTCCATTGGAGGATTTGGATCGCATGTTGACAATTTCTTGCACTTGATGGCCT
· L I T V E E G S I G F G S H V V Q F L A L D G L
1876 TCTTGATGAAAGCTCAAGTATATCGAACATGGATCACCATGGATCAACTAGCTGAagctggcctcacagcgt
· L D G K L K V Y R T W I T N G S T S *
1951 ctcacattgcagccactgcacttaacttaatgggaacacctagagaagcattgttttgggagtaacgggatctcc
2026 atgagtgctctttccacaaaaaacctatatcgagagaacccgcttagaagaaag

```

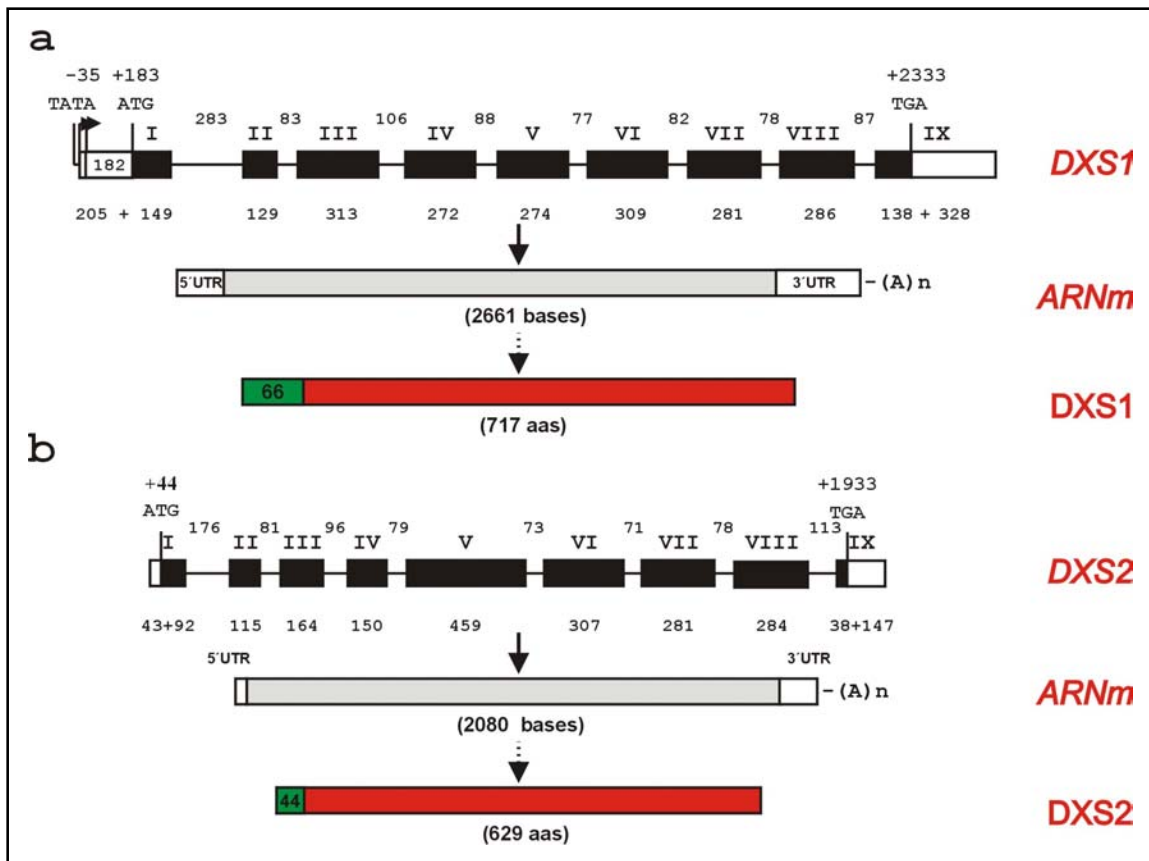
El gen *DXS2* está localizado en el clon genómico AB019232.1 perteneciente al cromosoma 3. Del alineamiento con la región genómica correspondiente se dedujo la estructura del gen *DXS2*, constituido por 9 exones y 8 intrones y ocupando 3,1 kb (Figura II.4b). Además, al igual que para la *DXS1*, las secuencias presentes en los sitios de procesamiento exón-intrón se ajustaban en todos los casos el consenso propuesto para Arabidopsis [36].

La comparación entre las secuencias nucleotídicas de los genes *DXS1* y la *DXS2* reveló un alto grado de identidad (74,5 %), si bien la organización de los exones presentaba ciertas diferencias. Los exones III y IV del gen *DXS2* se corresponden con el exón IV del gen *DXS1*

mientras que los exones IV y V del gen *DXS1* se corresponden con el exón V del gen *DXS2*. Es destacable la ausencia en este último exón del gen *DXS2* de una secuencia de 96 pb situada en la región conectora de los exones IV y V del gen *DXS1*. El hecho de que el gen *DXS2* posea el primer y último exón sensiblemente más cortos que los de su homólogo *DXS1* completan las variaciones más significativas entre ambos genes encontradas a nivel de la secuencia nucleotídica (Figura II.4).

Por su parte, la tercera copia identificada del gen *DXS* aparece localizada sobre el cromosoma 5 (Figura II.2). La secuencia nucleotídica supuesta para el ADNc correspondiente reveló un mayor grado de divergencia respecto de las otras 2 formas de la *DXS* (la identidad con la ORF de la *DXS1* se reducía hasta el 68,6%), divergencia que, como veremos mas adelante, se vio confirmada al comparar las secuencias peptídicas respectivas.

Figura II.4: Organización genómica representada a escala de los genes *DXS1* y *DXS2* de *A. thaliana*. Las cajas negras corresponden a las secuencias exónicas codificantes separadas por los intrones, que aparecen como líneas. Las cajas blancas reflejan las secuencias transcritas no traducidas de los extremos 5' y 3'. Las flechas indican, en el caso del gen *DXS1*, los inicios de transcripción principales definidos por la aproximación de RACE 5'. Aparece también representado el ARNm y la estructura de la secuencia peptídica codificada correspondiente, en la que la proteína madura aparece señalada con color rojo, y la extensión N-terminal respecto de los homólogos procariotas en verde (ver apdo. II.1.3.).



II.1.3. Caracterización de las proteínas DXS1, DXS2 y DXS3.

El ADNc clonado para el gen *DXS1* codifica para una proteína de 717 aminoácidos que corresponde a una peso molecular teórico de 76,8 kDa y un punto isoeléctrico, también teórico, de 6,9 (6,28 para la proteína madura). Por su parte, el marco abierto de lectura del ADNc de la *DXS2* codifica para un péptido teórico de 629 aminoácidos con 68,3 kDa de peso molecular y que presenta un punto isoeléctrico estimado de 7,98 (6,26 para la proteína procesada). En ambos casos, los análisis de los perfiles de hidrofobicidad pusieron de manifiesto que se trataba de dos proteínas solubles.

El alineamiento de las proteínas DXS1 y DXS2 con la secuencia hipotética de la proteína codificada por el gen *DXS3*, otras DXS de plantas publicadas hasta el momento y la DXS correspondiente de *E. coli*, puso en evidencia la elevada homología existente, reflejo a su vez del alto grado de conservación evolutiva entre todas ellas (Figura II.5). En efecto, la DXS1 y la DXS2 presentan un 72,8% de identidad (77,3% de similitud), que se ve reducida hasta el 52,9% con la DXS3, la cual, y como puede apreciarse en el alineamiento, es la que con mayor frecuencia rompe el consenso con el resto de DXS representadas. La presencia de dos dominios deletionados en el caso de la DXS2 y de uno en el de la DXS3, junto con la presencia de un extremo C-terminal más corto en la DXS2, constituyen las diferencias apreciables más

importantes en relación con la secuencia peptídica correspondiente a la DXS1. Curiosamente, el porcentaje de identidad de la DXS1 con la DXS2 y DXS3 de *Arabidopsis* es menor que con el resto de homólogos de DXS de otras especies vegetales analizadas y que alcanza, por ejemplo, hasta un 83,8% (similitud del 90,3%) con la DXS correspondiente a *Lycopersicon esculentum*.

La Figura II.5 revela además la existencia de regiones particularmente conservadas entre todas las secuencias peptídicas, algunas de las cuales corresponden a dominios característicos de las transcetolasas, familia de enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina (TPP) a las que pertenece la DXS [260]. El consenso general [Gly-Asp-Gly-(X)₇₋₈-Glu-(X)₁₁₋₁₃-Asn-Asn] (donde X representa cualquiera de los residuos hidrofóbicos Ala, Val y Met), establecido como motivo de unión al cofactor TPP de este tipo de enzimas, se mantiene también en esta nueva subfamilia de transcetolasas (residuos 217-252 de la DXS1 de *Arabidopsis*) [122]. Adicionalmente, los residuos aminoacídicos correspondientes al motivo que contiene la histidina (His114 de la DXS1 de *A. thaliana*) supuestamente implicada en la transferencia del protón durante la catálisis enzimática [226], aparecen también señalados. El alineamiento de las DXS con otras enzimas de la misma familia, tales como las transcetolasas o las subunidades E1 de la piruvato deshidrogenasa, revelan otras numerosas regiones conservadas. Particularmente aparece un dominio de 36 aminoácidos altamente conservado con las transcetolasas de plantas, designado motivo transcetolasa, que ha sido identificado como esencial para la actividad catalítica de dichas enzimas [258]. Sin embargo, la homología desaparece los cuatro primeros aminoácidos, en los que la secuencia Thr-His-Asp-Ser del motivo propio de todas las transcetolasas es sustituida por Asp-Arg-Ala-Gly (posición 498 de la DXS1 de *Arabidopsis*), común a todas las DXS, excepto, una vez más, a la DXS3. Esta singularidad de la DXS3 de *A. thaliana* es compartida únicamente por la DXS de *Plasmodium falciparum*.

Figura II.5: Alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de DXS de distintas especies. Se incluyen las secuencias correspondientes a la DXS1 y DXS2 de *A. thaliana*, la secuencia hipotética deducida para la DXS3, y todas las DXS de plantas referidas hasta el momento tales como la de *Mentha x piperita* (Nº acceso AF019383, [165]), *Capsicum annuum* (Y15782, [30]), *Lycopersicon esculentum* (AF143812, [178]), *Catharanthus roseus* (AJ014480, [50]), *Tagetes erecta* (AF251020, [198]), *Medicago truncatula* 1 (AJ430047, [309]) y 2 (AJ430048, [308, 309]) y el homólogo de *E. coli* (AF035440, [177]). Las posiciones conservadas en todas las secuencias aparecen sobre fondo negro, mientras los aminoácidos conservados en todas las secuencias salvo en una de ellas destacan sobre fondo gris. Se señala en verde los motivos conservados correspondientes de unión al cofactor, y en rojo aquellos otros implicados en la actividad catalítica (alrededor del residuo de His114 implicado en la transferencia de protón [226]). Por su parte, la punta de flecha señala el inicio de la proteína madura DXS1 de *A. thaliana* tal y como se deduce del punto de corte predicho por la aplicación ChloroP V1.1. Aparece indicado, con un punto negro sobre la posición correspondiente (Asp627-Asn, *A.thal1*), el residuo aminoacídico sustituido en la DXS1 del mutante *chs5* [11]. Los dominios ausentes en DXS2 y DXS3 respecto de DXS1 se representan con signos +. Finalmente, los cuatro primeros aminoácidos del llamado "motivo transcetolasa" aparecen señalados en cursiva y subrayada la posición correspondiente.

II. RESULTADOS

		*	20	*	40	*	60	*	80		
A. thal1	:	-MASSAFAPPSYIITKGLSDSCKSTSLSSSRSLVTDLPSPCLKPNNSHNSNRRAKVCASLAEKGE---YYSNRPTTEL								: 75	
A. thal2	:	-MALSVFAPPSYINRN+++++PSLKYLPSSMSSTKYSKVRATTFSEKGE---YYSNRPTTEL								: 54	
A. thal3	:	MGSASIGYQFISARFYGNFLSSDITVSSLPCKLDVSIKLSFAPSSTHKEYSNRARVCSLPNTDG---YCEKFEFTEI								: 76	
M. pipper	:	-MASSCGVIKSSFLPSLHS-EDSTFLSRAPTSPLKNNHKNLVVAALQDSSNDVPSGDRLSRPKSRALSFTGKPPTEI								: 78	
C. annum	:	-MALCAYAFPGLNRTG-VVDSSKATPLFSEWIGHGDLQFLFQHKLTQVKK-RSRTVQASLSESGE---YTTQRPPTTEI								: 74	
L. esculent	:	-MALCAYAFPGLNRTG-VVDSSKATPLFSEWIGHGDLQFLFQHKLTQVKK-RSRTVQASLSESGE---YTTQRPPTTEI								: 74	
C. roseus	:	-MAVSGAVIQLNPPISPAY---WTVPRLN---YTARKQFCLRASSVNSNDAAEGKMISIKKEKDGWKIDFSGEKPTEI								: 73	
T. erecta	:	-MALCGALKGGFVPIAQNYSLLNPSANAIMSNKRKFLGIVAVSKEHATNEHEDLTMDKTTSTTLKYSGDKPKTEI								: 79	
M. truncat1	:	-MDLCSLACPFSVTPCD---RRTLPLPSSSSSHSQWGHFFSHSQHNLKPKKFGVVHASLSEMGE---YYSQRPTTEL								: 72	
M. truncat2	:	-MALSSCLLPNHSLLQCHK--FKAPNPN--HGRNQFCVMASSSS-----DGERTIRKEKDEWKINFSAEKPTEI								: 68	
E. coli	:	-----MSFDIAKYET								: 10	
		*	100	*	120	*	140	*	160		
A. thal1	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 154
A. thal2	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 133
A. thal3	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 156
M. pipper	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 157
C. annum	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 153
L. esculent	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 153
C. roseus	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 152
T. erecta	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 158
M. truncat1	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 151
M. truncat2	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 147
E. coli	:	LDITINYP-IHMKNLVSKKELKQISDELRSDFVFN-S-KUGGHLGSSLCVVELLVALHYIENTPDCKLIWDVGHOSYPHKILIT									: 89
		*	180	*	200	*	220	*	240		
A. thal1	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 234
A. thal2	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 213
A. thal3	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 235
M. pipper	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 237
C. annum	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 233
L. esculent	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 233
C. roseus	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 232
T. erecta	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 238
M. truncat1	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 231
M. truncat2	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 227
E. coli	:	GRRGKMP-IROITNGLS-FTRKRESEHDFCFCTGHSSTISAGLGMVGRDLKCKNNNVAVIIGDGMATAGQAEAMNAGY									: 169
		*	260	*	280	*	300	*	320		
A. thal1	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 314
A. thal2	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 261
A. thal3	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 314
M. pipper	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 317
C. annum	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 313
L. esculent	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 313
C. roseus	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 312
T. erecta	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 318
M. truncat1	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 311
M. truncat2	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 307
E. coli	:	LDSNMIVLINDNKQVSL-TATLDGPPVPGALS-SAL-SRLSNPALRELREVA-GMTKQIGGPMHQLAAKVDYARGMISG									: 239
		*	340	*	360	*	380	*	400		
A. thal1	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 394
A. thal2	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 341
A. thal3	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 376
M. pipper	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 397
C. annum	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 393
L. esculent	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 393
C. roseus	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 392
T. erecta	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 398
M. truncat1	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 391
M. truncat2	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 387
E. coli	:	TGSSIFEEELGLYYTGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRITGPVLIHVITEKRGYPPY-ERAADKYEGVAKEDPATCKQFNTT									: 315
		*	420	*	440	*	460	*	480		
A. thal1	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 474
A. thal2	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 421
A. thal3	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 455
M. pipper	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 477
C. annum	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 473
L. esculent	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 473
C. roseus	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 472
T. erecta	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 478
M. truncat1	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 471
M. truncat2	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 467
E. coli	:	NKTQSYTYFAEALIAAEADKDIVAIIHAAMGGCTGLNLSQRFFPTRCFDVGTAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF									: 395

```

*           500           *           520           *           540           *           560
A. thal1   : MORAMDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDVTFFVACLPMNIVMAPSDEADLFN VATAVAIDDRPSCFR : 554
A. thal2   : MORAMDQVVHVDVLDKLEVVRBAIDRAGLMGADGPTCCGAFDVTFFVACLPMNIVMAPSDEAELEFN VATAAAIDDRPSCFR : 501
A. thal3   : LORAMDQVVHVDVDRKAKAVREVIITSAGLVCSDCGFCVQCGAFDIAFVSSLNMIAMAPADEDELVN VATAAYVTRDPVCFR : 535
M. pipper  : LORGVDQVVHVDVLDKLEVREMMORACVVCADGPTCCGAFDITTYVACLPMNIVMAPSDEAELEMN VATAVAIDDRPSCFR : 557
C. annum  : MORAMDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDVTFFVACLPMNIVMAPSDEAELEFN VATAAAIDDRPSCFR : 553
L. esculent : MORAMDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDVTYVACLPMNIVMAPSDEAELEFN VATAAAIDDRPSCFR : 553
C. roseus  : LORGVDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDVAYVACLPMNIVMAPSDEAELEMH VATAAKIDDRPCCFR : 552
T. erecta  : LORGVDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDITTYVACLPMNIVMAPSDEAELEMN VATAVAIDDRPSCFR : 558
M. truncat1 : LORAMDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCSDCGPTCCGAFDVTFFVACLPMNIVMAPSDEAELECH VATAAAIDDRPSCFR : 551
M. truncat2 : LORGVDQVVHVDVLDKLEVVRBAMDRAGLVCGADGPTCCGAFDITTYVACLPMNIVMAPSDEAELEMN VATAAAIDDRPSCFR : 547
E. coli    : LORAMDQVLDHVAIDKLEVLVBAIDRAGLVCGADGPTCCGAFDLSYLRCLPEMVIIMTFSDENECRO LYHGYHNDGSSAVR : 475
    
```

```

*           580           *           600           *           620           *           640
A. thal1   : YHRNGIIVSIPPGNKVPIEIQKGRILKEGERVAILGYSAVOSCLGAVMVEERGLNVTVADARFCPLDRAIIRSDA : 634
A. thal2   : YHRNGIIVSIPPGNKVPLQIGRGRILRDCGERVAILGYSAVORCLEASMSERGLKITVADARFCPLDVAIIRSDA : 581
A. thal3   : FERGSIVNMNVLVP-TLPIEIQKGRVLEVGQDVALIGYCAMVONCLHSHLSKLGGLNVTVADARFCPLDIKIVRDC : 614
M. pipper  : YHRNGIIVSIPSNKKTPLIEIQKGRILKEGSKVAILGFTIIVONOMANLEQHGISVTVADARFCPLDGDILIKIV : 637
C. annum  : YHRNGIIVSIPAGNKCIPLEVKGKRIIVEGERVAILGYSAVONCLASVVEESRGLQVTVADARFCPLDRAIIRSDA : 633
L. esculent : YHRNGIIVSIPAGNKCIPLEVKGKRIIEGERVAILGYSAVONCLDAIVVEESRGLQVTVADARFCPLDRAIIRSDA : 633
C. roseus  : YHRNGIIVSIPPNKKTPLIEIQKGRILVEGSRVAILGYSIVQOCLGAEMLKSHNVSPTVADARFCPLDGIISKTD : 632
T. erecta  : YHRNGIIVSIPANNKKTPLIEVGTGRVIKGNRVALIGYGTIVOSCLASVVEKKIGISVTVADARFCPLDGNLIIK : 638
M. truncat1 : YHRNGIIVSIPTEYKCIPIEIQKGRILIEGERVAILGYSAVONCLASVVEQHGRLRLTVADARFCPLDRSIRSDA : 631
M. truncat2 : YHRNGIIVSIPANNKKTPLIEIQKGRILIEGSRVAILGYSIVQOCLGAEMLKRAVGVVTVADARFCPLDTRIRL : 627
E. coli    : YHRNAVVEIIVSIPPL-EK--LPIKRCIVKRRCEKLAIDNFCTILMPEAAKVAESLN----ATLVDVRFVVKPLDEALILEMA : 547
    
```

```

*           660           *           680           *           700           *           720
A. thal1   : KSHVLTIVVEE-GSICGFGSHVVOFLAIDCLLDGKLRWRPVLDPDRYIDHGAPADQLAEAGTPPSHIAATNLNIGAPRE : 713
A. thal2   : KSHVLTIVVEE-GSICGFGSHVVOFLAIDCLLDGKLRVYRTWITNGSTS----- : 629
A. thal3   : QNHKELITVVEE-CVCGGFGSHVVOFLAIDCLDGNLWRPVLDPDRYIDHGASPREQLALAGTGHHIAATNLSLLGRTR : 693
M. pipper  : QEHVLTIVVEE-GSICGFSHVAISHFLSNCLLDGNLWRPVLDPDRYIDHGASQSDQIEEAGTSPKHIAAGTVVSLIGGK : 716
C. annum  : KSHVLTIVVEE-GSICGFGSHVVOFLAIDCLLDGKLRWRPVLDPDRYIDHGSPADQLAEAGTTPSHIAATVFNILGQTR : 712
L. esculent : KSHVLTIVVEE-GSICGFGSHVVOFLAIDCLLDGKLRWRPVLDPDRYIDHGSPVDQLAEAGTTPSHIAATVFNILGQTR : 712
C. roseus  : KEHVELITVVEE-GSICGFGSHVTHFLSLTCLLDGPTLRVRSLLLPDRYIDHGAPVDQIEEAGTSSRHICATNLSLLGKPE : 711
T. erecta  : NEHVELITVVEE-GSICGFSHVSFLAIDCLLDGHLWRPVLDPDRYIDHGASQSDQIEEAGTSSKHIAATVLSLIGGSKE : 717
M. truncat1 : KSHVLTIVVEE-GSICGFGSHVVOFLAIDCLLDGNLWRPVLDPDRYIDHGSPADQLCMAAGTTPSHIAATVFNILGQTR : 710
M. truncat2 : REHVELITVVEE-GSICGFGSHVVOFLSLAIDCLDPTLRVRSLLLPDRYIDHGAPNDQIEEAGTSSKHILATVLSLLDMPKE : 706
E. coli    : ASHVAIVVVEEINAMGAGSCVNEVLMHAH--RK-PVPLNIGLPDRYIDHGAPNDQIEEAGTSSKHILATVLSLLDMPKE : 620
    
```

```

A. thal1   : ALF----- : 716
A. thal2   : ----- : -
A. thal3   : ALLLMS-- : 699
M. pipper  : SLHLLNNL : 724
C. annum  : ALEVMT-- : 718
L. esculent : ALEVMT-- : 718
C. roseus  : ALKLQ--- : 716
T. erecta  : TLHALNV- : 724
M. truncat1 : ALEVMS-- : 716
M. truncat2 : ALLFK--- : 711
E. coli    : ----- : -
    
```

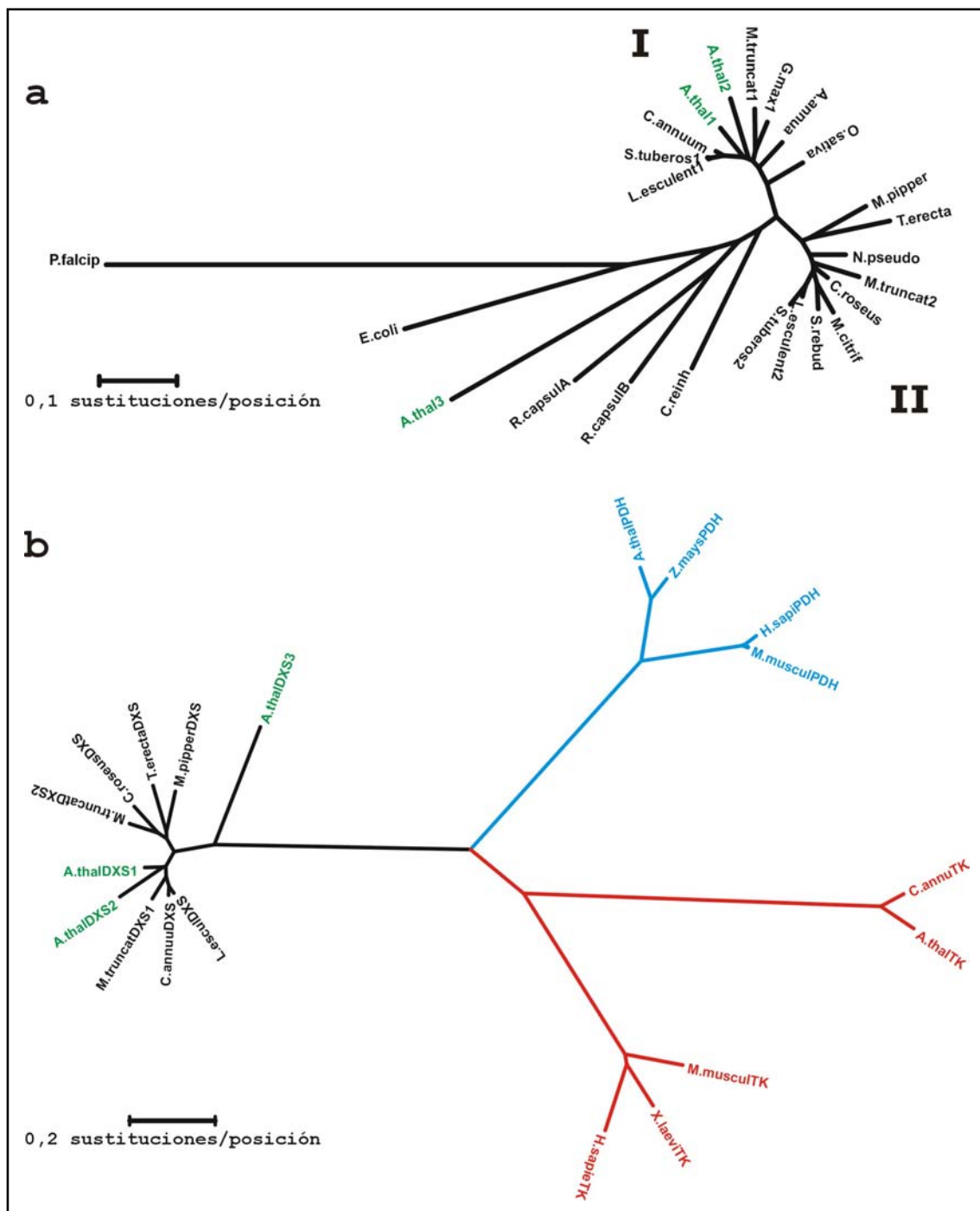
Del análisis del alineamiento se infiere también la existencia de una extensión N-terminal en todas las enzimas de plantas respecto de su homóloga procarionta, aquí representada por la DXS de *E. coli*. Estas extensiones, de 66 residuos para la DXS1 y de 44 para la DXS2, constituyen las regiones más escasamente conservadas, presentando además características propias de los péptidos de tránsito a plástidos [108]. Entre ellas, destacan una alta frecuencia de residuos de Ser, Thr y Ala (23 en total para la DXS1 y 15 para la DXS2), un escaso número de Asp, Glu y Tyr, y finalmente un extremo C-terminal con el potencial de formar una lámina β-amfífilica. Adicionalmente encontramos, próxima a dicho extremo y en ambas proteínas, secuencias similares al motivo consenso descrito como sitio de procesamiento para proteínas plastídicas (Val/Ile)-X-(Ala-Cys)-Ala, donde la flecha indica el punto de corte, y que correspondería a las posiciones 59 y 35 de la DXS1 y DXS2 respectivamente [108]. El análisis posterior mediante el programa ChloroP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) confirmó las predicciones realizadas sobre ambas secuencias peptídicas en relación con la existencia y localización del posible punto de corte [97].

El estudio filogenético de las dos isoformas de la DXS clonadas y la secuencia peptídica hipotética correspondiente al gen *DXS3* aparece reflejado en la Figura II.6. Se han incluido en el dendrograma aquellas DXS de plantas para las que los ADNc correspondientes que contenían el marco abierto de lectura completo habían sido clonadas, así como la correspondiente a la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, a la bacteria autótrofa facultativa *R. capsulatus* (que posee 2 isoformas de la DXS, [119]), a *P. falciparum*, agente responsable de la malaria, y a *E. coli* [177, 278]. Asimismo, se han considerado todas las secuencias de DXS de plantas, deducidas a partir de las EST correspondientes, suficientemente largas para poder ser reconocidas por el algoritmo a la hora de elaborar el dendrograma (Figura II.6a). De la observación del dendrograma resulta notorio como las enzimas aparecen agrupadas siguiendo las relaciones evolutivas entre las distintas especies representadas. Tanto es así, que las DXS correspondientes a especies de la familia de las solanáceas o aquellas otras pertenecientes a las leguminosas aparecen agrupadas en la misma rama. Por otro lado, las DXS de plantas se encuentran separadas en 2 grupos (I y II), uno de las cuales engloba a la DXS1 y a la DXS2 de *Arabidopsis*. El análisis del alineamiento del que deriva el dendrograma permite establecer el conjunto de residuos que marca la diferencia entre los dos subgrupos de DXS y que, presumiblemente, permitirá asignar una DXS dada a uno o al otro. Las especies *M. truncatula* [309], *L. esculentum* y *S. tuberosum*, poseen representantes en ambas ramas. La búsqueda en las bases de datos confirmó este fenómeno también para *G. max* y *Z. mays*, indicando que la existencia de múltiples isoformas de la DXS sería un fenómeno generalizado entre los genomas vegetales.

Por su parte, la secuencia peptídica teórica correspondiente a la DXS3 aparece bastante alejada del resto de las DXS vegetales, y más aún que aquella de *Chlamydomonas* o *Rhodobacter*, situándose muy cercana a *E. coli*. Este hecho podría verse justificado por la observación, efectuada sobre el alineamiento correspondiente, de las grandes diferencias con el resto de DXS vegetales (Figura II.5). Finalmente, también es señalable la ausencia de un dominio en la DXS3 presente en el resto de formas presentadas en el alineamiento.

En una segunda aproximación filogenética, y con el propósito de acotar el parentesco de la isoforma divergida DXS3, procedimos a elaborar un nuevo árbol que incluía, además de las DXS de plantas presentes en el alineamiento de la Figura II.5, las secuencias de varias transcetolasas y de la subunidad E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa, enzimas todas ellas pertenecientes a la familia de enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina (TPP) [260] (Figura II.6b). Como era de esperar, las enzimas aparecen agrupadas coherentemente de acuerdo con su naturaleza catalítica, además de conservar las relaciones evolutivas correspondientes. Resulta destacable como la DXS3 de *A. thaliana* aparece más cercana al resto de DXS que a aquellas otras enzimas incluidas en el dendrograma.

Figura II.6: Análisis filogenético de las DXS y otras transcetolasas. Los árboles filogenéticos fueron efectuados mediante el programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA), versión 2b2 utilizando el algoritmo de “Neighbor-joining”. La longitud de los brazos refleja el número de sustituciones aminoacídicas entre secuencias, excluyendo aquellas posiciones en las que al menos una de ellas presenta una delección. El algoritmo asume que la frecuencia de aparición de los aminoácidos es la misma para todos ellos. (a), alineamiento de las DXS vegetales completas clonadas hasta el momento y aquellas deducidas a partir de EST que resultaron suficientemente largas para ser consideradas por el algoritmo, entre las que se encuentran *Oryza sativa* (T02208), *Artemisia annua* (AF182286), DXS2 de *Lycopersicon esculentum* (TC85474 y TC85473), DXS1 de *Glycine max* (TC69708 y TC62913), DXS1 de *Solanum tuberosum* (TC16033), DXS2 de *S. tuberosum* (TC17144) *Narcissus pseudonarcissus* (AJ279019), *Morinda citrifolia* (AF443590), *Stevia rebusiana* (CAD22155). Se incluyen también las DXS de *Rhodobacter capsulatus* (A, N° acceso: Z11165 y B, [119]), de *Plasmodium falciparum* (AF111814), *Escherichia coli* y *Chlamydomonas reinhardtii* (T08140). Se han señalado en verde las DXS de *A. thaliana*. (b), árbol filogenético que incluye las DXS de plantas completas clonadas en el momento; varias transcetolasas (TK), señaladas en rojo, entre las que se incluyen las correspondientes a *Homo sapiens* (PH0845), *Xenopus laevis* (AAF76194), *Mus musculus* (BAB30335), *Capsicum annum* (Y15781) y *A. thaliana* (Y15782); y diversas piruvato deshidrogenasas (subunidad E1, PDH) tales las de *M. musculus* (AK011810), *H. sapiens* (P11177), *Zea mays* (AAC72192) y *A. thaliana* (Q38799) resaltadas en azul, todas ellas pertenecientes a la misma familia de enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina.



II.1.4. Identificación del gen *DXR* que codifica para la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (*DXR*) de *A. thaliana*.

La búsqueda de ESTs en las bases de datos disponibles utilizando como "anzuelo" la secuencia peptídica correspondiente a la *DXR* de *E. coli* (*Nº acceso: AB013300*), resultó en la identificación de los clones 120E8T7 y 65F11XP3'. La secuenciación de los mismos reveló que

ambos correspondían a versiones truncadas del ADNc correspondiente al gen *DXR* de *A. thaliana*.

Con el objetivo de obtener un ADNc completo del gen *DXR* de *A. thaliana* se emprendió el análisis de los extremos 5' y 3' del ARNm correspondiente. Utilizando como molde ARN de plántulas de *Arabidopsis* de 12 días crecidas en luz y el oligonucleótido DXR.GSP1 se sintetizó un ADNc específico, a partir del cual se planteó una estrategia de *RACE* 5' análoga a la acometida para la *DXS1*. Dos reacciones de *PCR* anidadas llevadas a cabo sobre este molde y empleando los oligonucleótidos DXR.GSP2 y DXR.GSP3 como cebadores específicos, generaron un patrón de bandas del que aquella de mayor tamaño fue seleccionada, purificada y finalmente clonada en el vector pGEM-T. El ADN resultante se utilizó para transformar *E. coli*, lo que dió como resultado numerosos transformantes, cuatro de cuyos insertos fueron secuenciados. De esta manera, se confirmó como el extremo 5' de todos aquellos insertos coincidía en una adenina situada 89 pb en dirección 5' del codón ATG de inicio de traducción (Figura II.7). No obstante, en este caso, la secuencia que rodea al triplete de iniciación de la traducción no coincidía con las previamente descritas para los ARNm de plantas [181]. Asimismo, se llevó a cabo la determinación del extremo 3' del ARNm *DXR* a través de un experimento de *RACE* 3', con el oligonucleótido DXR.S2 como cebador específico. Los extremos de los 10 clones obtenidos señalaban 5 sitios de poliadenilación distintos, 4 de los cuales se situaban próximos a la secuencia canónica AATAAA identificada como señal de poliadenilación (Figura II.7) [21, 143, 168].

Con la información disponible se diseñaron cebadores que permitieran clonar un ADNc con la secuencia codificante completa del gen *DXR*. De esta manera, los oligonucleótidos DXR-34 y DXR-E2, respectivamente, fueron utilizados en una reacción de *PCR* llevada a cabo en dos etapas consecutivas a partir de una librería de ADNc obtenida a partir de la línea celular T87 [16] (apdo. V.4.5.1). El producto de amplificación finalmente obtenido fue purificado y clonado en el plásmido pBLUESCRIPT-SK⁺. La construcción resultante fue denominada pDXRAt.3 y su identidad confirmada mediante la secuenciación completa del inserto. El ADNc clonado contenía un marco abierto de lectura de 1431 pb (Figura II.7) [48].

Figura II.7: Secuencia nucleotídica y peptídica de la DXR de *A. thaliana*. La secuencia nucleotídica ha sido deducida a partir del ADNc clonado y los extremos resultantes de los experimentos de *RACE*. La nomenclatura es la misma que la empleada en las Figuras II.1 y II.3. Sobre las UTR 5' y 3' aparecen señalados con doble subrayado los oligonucleótidos DXR.34 (5', sentido) y DXR.E2 (3', antisentido) respectivamente, utilizados en el clonaje del ADNc. Con subrayado grueso aparecen los oligonucleótidos específicos antisentido DXR.GSP3, DXR.GSP2 y DXR.GSP1 por 5', y DXR.S2 sentido por 3', respectivamente, utilizados en los experimentos de *RACE*.

II. RESULTADOS

```

1   acaactgtttatctgattcgtcttctctgataatcaagagtagtagtgcggttctctctgqaaaatattcgattttta
76   aaagactctgatgATGACATTAAACTCACTATCTCCAGTGAATCCAAAAGCTATTTCTTTCTTGATACCTCCAG
      M T L N S L S P A E S K A I S F L D T S R .
151  GTTCAATCCAATCCCTAAACTCTCAGGTGGGTTTAGTTTGAGGAGGAGGAATCAAGGGAGAGGTTTTGGAAAAGG
      · F N P I P K L S G G F S L R R R N Q G R G F G K G ·
226  TGTTAAGTGTTCAGTGAAGTGCAGCAGCAACAACCTCCTCCAGCATGGCCTGGGAGAGCTGTCCTGAGGC
      · V K C S V K V Q Q Q Q P P P A W P G R A V P E A ·
301  GCCTCGTCAATCTTTGGGATGGACAAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTTCTATTGGCACTCAGACATT
      · P R Q S W D G P K P I S I V G S T G S I G T Q T L ·
376  GGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTCAGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTGGTTCTGAATGTTACTCTACTTGC
      · D I V A E N P D K F R V V A L A A G S N V T L L A ·
451  TGATCAGGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGAAAACGAGTCACTGATTAATGAGCTTAAAGAGGC
      · D Q V R R F K P A L V A V R N E S L I N E L K E A ·
526  TTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATTATTCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCGACATCTCGA
      · L A D L D Y K L E I I P G E Q G V I E V A R H P E ·
601  AGCTGTAACCGTTGTTACCGAATAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTGCTGCAATTGAAGCAGGAAA
      · A V T V V T G I V G C A G L K P T V A A I E A G K ·
676  GGACATTGCTCTTGCAAACAAGAGACATTAATCGCAGGTGGTCTTTCTGCTTCCGCTTGCCAACAACATAA
      · D I A L A N K E T L I A G G P F V L P L A N K H N ·
751  TGTAAGATTCTTCCGGCAGATTCAGAACATTCTGCCATATTTCAAGTATTCAAGGTTTGCTGAAGCGCTCT
      · V K I L P A D S E H S A I F Q C I Q G L P E G A L ·
826  GCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGAGCTTTTAGGGATTGGCCTGTCGAAAAGCTAAAGGAAGTTAAAGT
      · R K I I L T A S G G A F R D W P V E K L K E V K V ·
901  AGCGGATGCGTTGAAGCATCCAACCTGGAACATGGGAAGAAAATCACTGTGGACTCTGCTACGCTTTTCAACAA
      · A D A L K H P N W N M G K K I T V D S A T L F N K ·
976  GGGTCTTGAGGTCATTGAAGCGCATTATTTGTTGGAGCTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTCATCCGCA
      · G L E V I E A H Y L F G A E Y D D I E I V I H P Q ·
1051 AAGTATCATACTCCATGATTGAAACACAGGATTCTCTGTGCTTGCTCAATTGGGTTGGCCTGATATGCGT
      · S I I H S M I E T Q D S S V L A Q L G W P D M R L ·
1126 ACCGATCTCTACACCATGTCATGGCCGATAGAGTTCCCTTGTCTGAAGTAACTGGCCAAGACTTGACCTTTG
      · P I L Y T M S W P D R V P C S E V T W P R L D L C ·
1201 CAAACTCGGTTTCATTGACTTTCAAGAAACCAGACAATGTGAAATACCCATCCATGGATCTTGCTTATGCTGCTGG
      · K L G S L T F K K P D N V K Y P S M D L A Y A A G ·
1276 ACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTCACGCCGCAATGAGAAAAGCTGTTGAAATGTTCAATGAGAAA
      · R A G G T M T G V L S A A N E K A V E M F I D E K ·
1351 GATAAGCTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATCGAAACGAGTTGGTAAACATCACC
      · I S Y L D I F K V V E L T C D K H R N E L V T S P ·
1426 GTCTCTTGAAGATTGTTCACTATGACTTGTGGGACGTGAATATGCCGCAATGTGCAGCTTTCTTGGTGC
      · S L E E I V H Y D L W A R E Y A A N V Q L S S G A ·
1501 TAGGCCAGTTCATGCATGAagaattggttggtagaagaacataaggaagcttctgaggaatggtgaagaagat
      · R P V H A *
1576 tagtgtagagaatggggtactacttaataagcgtttttggcaaggattatggattgtgtagctaatttatctgtga
1651 tccgaacaagccaaactgataatttgaaccatttttaccaataaaaccgagcttaattgtttcacaatgatatga
1726 tcaattacattcatctaagggttcttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

A continuación, y con el objeto de identificar el número de copias del gen *DXR* presentes en el genoma de *Arabidopsis*, se abordó la misma estrategia de *Southern-blot* referida para las *DXS*. No obstante, y a diferencia de lo observado en el caso del gen *DXS*, el patrón de bandas obtenido en este caso, desarrollando la hibridación bajo condiciones de alta y baja severidad, no reveló ninguna diferencia, y resultaba además congruente con el mapa de restricción de la región de ADN genómico reconocida por la sonda de ADNc utilizada (ver apdo. V.5.2.1). Estos resultados mostrarían que el genoma de *Arabidopsis* contiene una única copia del gen *DXR* (Figura II.8). Además, están de acuerdo con los resultados negativos obtenidos en la búsqueda bioinformática de homólogos para el gen *DXR* sobre la secuencia completa del genoma de *A. thaliana*.

El estudio de la localización del gen *DXR* en el genoma de *Arabidopsis* mostró su

emplazamiento en el cromosoma 5, correspondiendo concretamente a la secuencia nucleotídica del clon genómico MQB2. El alineamiento de la secuencia de ADNc obtenida y la región genómica correspondiente puso de manifiesto una organización estructural del gen *DXR* en 12 exones y 11 intrones, extendiéndose sobre 3,2 kb (Figura II.8c).

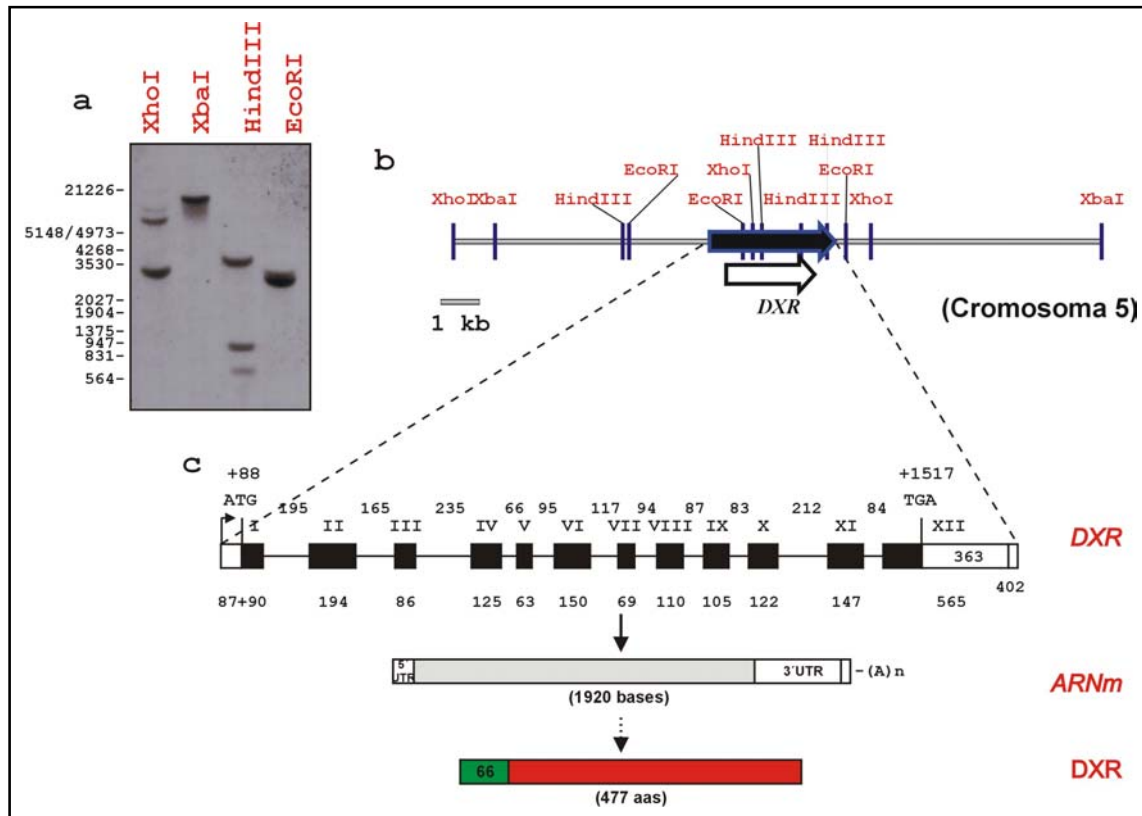


Figura II.8: Análisis mediante Southern-blot de la complejidad genómica del gen *DXR* de *Arabidopsis thaliana*. (a), resultado del experimento de Southern-blot; (b), mapa de restricción a escala de la región genómica donde está localizado el gen *DXR*, marcándose con una flecha blanca, la posición de la sonda utilizada; (c), representación esquemática de la organización en exones e intrones del gen *DXR*, así como la estructura del ARNm correspondiente y del péptido codificado. La nomenclatura es la misma que la utilizada en las Figuras II.2 y II.4.

II.1.5. Análisis de la proteína *DXR*.

El ADNc clonado del gen *DXR* codifica para una proteína de 477 residuos aminoácidos, con un peso molecular estimado de 52 kDa y un punto isoelectrónico teórico de 6,61 (5,66 en la proteína madura).

El alineamiento de las secuencias peptídicas deducidas para homólogos de la *DXR* de varias especies vegetales y con su homólogo procariota en *E. coli*, refleja el alto grado de

conservación existente (Figura II.6). Este hecho es particularmente evidente entre las enzimas de plantas, de tal modo que si entre la enzima de *Arabidopsis* y la de *E. coli* el porcentaje de identidad alcanza el 34,9% (54,3% de similitud), la identidad se eleva hasta valores del 83,1% con su homólogo en *L. esculentum*, o del 83,2% con el correspondiente a *O. sativa*.

El examen del alineamiento permite, además, identificar algunas secuencias conservadas de acuerdo con la actividad enzimática desempeñada por la DXR. Concretamente, y como es de esperar para enzimas que utilizan el NADP(H), aparece conservado el dominio responsable de la unión con aquel cofactor, y que viene caracterizado por el motivo consenso (Ile/Leu)-(Leu/Val)-Gly-X-Thr-Gly-Ser-Ile-Gly situado próximo al extremo N-terminal (posición 85 de la DXR de *A. thaliana*; X representa cualquiera de los residuos hidrofóbicos Ala, Val y Met) [228]. Aún más, el análisis de la comparación entre todas las secuencias revela la existencia de 3 residuos de histidina altamente conservados entre todas las proteínas y que han sido relacionados con la actividad catalítica del enzima [159]. En la DXR de *Arabidopsis* dichos residuos están localizados en las posiciones 232, 278 y 326.

Por otra parte, y a pesar de que el mecanismo de reacción propuesto para la DXR comparta cierta semejanza con el correspondiente a las ceto ácido reductoisomerasas (enzimas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada a partir del piruvato), las secuencias aminoacídicas deducidas para ambos grupos de enzimas no guardan un grado de similitud significativo. En concreto, La acetohidroxi-ácido isomeroreductasa (Nº de acceso X69880, [90]) de *A. thaliana* muestra un reducido porcentaje de identidad (11,9%, correspondiente a un 24% de similitud) con la DXR.

Para caracterizar más en detalle la secuencia correspondiente al extremo N-terminal, se efectuó un alineamiento comparando las regiones correspondientes a otras DXR de plantas conocidas hasta el momento, deducidas a partir de sus ADNc completos clonados. Asimismo, se consideraron aquellos EST cuyas secuencias se hubiesen confirmado por al menos 2 entradas independientes. A primera vista, destaca la existencia de una secuencia N-terminal en el caso de las DXR de plantas que no está presente en la DXR de *E. coli*, y que representa 79 residuos en el caso de la enzima de *A. thaliana*. El análisis de dichas secuencias revela las características propias de un péptido de tránsito a plástidos y que incluyen, tal y como se reflejó en el caso de las DXS1 y DXS2, una alta proporción de residuos de Ser, Thr y Ala (concretamente 16 sobre las 79 totales). De acuerdo con la deducción efectuada por el programa ChloroP V1.1., el sitio de procesamiento para la proteína de *Arabidopsis* se sitúa entre los residuos Lys49 y Cys50 [97]. Resulta destacable como en 11 de los 14 péptidos de tránsito el punto de corte propuesto se disponga hacia el extremo N-terminal del motivo conservado Cis-Ser-X (donde X representa cualquiera de los residuos hidrofóbicos Ala, Val y Met). Un análisis pormenorizado de las secuencias correspondiente a estos supuestos péptidos de tránsito arroja todavía más datos. En efecto, si la región dispuesta hacia el extremo N-terminal del punto de corte está pobremente

conservada y particularmente enriquecida en residuos de Ser, características, por otro lado, propias de los péptidos de tránsito [108], la zona que se extiende hacia el extremo C-terminal, aproximadamente entre las posiciones 50-80, está especialmente conservada y es significativamente rica en residuos de Pro. Concretamente se pueden contabilizar de 6 a 8 residuos que permiten definir el motivo Pro-(Pro/Gln)-Pro-Ala-Trp-Pro-Gly-(Arg/Thr)-Ala en la región más rica en Pro. Este análisis sugiere que las proteínas correspondientes a las formas maduras de las DXR vegetales poseen, hacia la región N-terminal, una extensión rica en Pro que no está presente en las DXR procarióticas.

Finalmente, resaltar que los análisis de los perfiles de hidrofobicidad efectuados sobre la proteína DXR apuntaron a que, al igual que la DXS1, podría tratarse de una proteína soluble. Estos datos, junto con los obtenidos en relación con la flexibilidad estructural, anfipatía, exposición a la superficie e hidrofobicidad, permitieron definir el dominio Glu-Ala-Pro-Arg-Gln-Ser-Trp-Asp-Gly-Pro-Lys dispuesto entre las posiciones 71 y 81 de la proteína DXR de *A. thaliana* como el más antigénico. Consecuentemente, dicho péptido fue sintetizado y utilizado para la obtención de anticuerpos, tal y como se describe en el apartado V.5.3.1.

Figura 9: (a) Alineamiento múltiple de las DXR vegetales publicadas hasta el momento y el homólogo correspondiente de *E. coli*. Se incluyen las secuencias peptídicas de *A. thaliana* (Nº acceso AF148852, [48]), *Oryza sativa* (AF367205), *Lycopersicon esculentum* (LEB8M11, [237]), *Catharanthus roseus* (AAF65154, [303]), *Mentha x piperita* (AF116825, [161]) y *Escherichia coli* (AB013300, [291]). En negro aparecen sombreadas las posiciones conservadas en todas las secuencias, y en gris sólo las que están presentes en 5 de las 6 entradas. Por su parte, el motivo caracterizado como de unión al cofactor NADP(H) aparece sombreado en verde, y en rojo, los residuos de His descritos como implicados en la actividad catalítica DXR [159]. La flecha indica el origen de la proteína madura a partir del sitio de corte deducido por el algoritmo ChloroP v.1.1. Finalmente, se señala también, con una barra negra, la región correspondiente al péptido utilizado para generar los anticuerpos anti-DXR.

(b), Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a los extremos N-terminal de 14 DXR de plantas y la correspondiente al homólogo en *E. coli*. Una barra negra señala la región correspondiente al péptido utilizado para generar los anticuerpos anti-DXR. El fondo gris tras los residuos en blanco refleja las posiciones en las que se han encontrado dos residuos distintos. Los últimos residuos del péptido de tránsito, predichos en cada caso por el programa ChloroP V1.1., aparecen subrayados. El sitio hipotético de procesamiento proteolítico deducido del análisis global de las secuencias alineadas aparece indicado con una punta de flecha. Las secuencias de ADNc y de las ESTs correspondientes son accesibles desde el “GenBank” con los siguientes Nº de acceso: *Artemisia annua* (AF182287), *C. roseus* (AF250235), *Glycine max* (EST 1, BE804032; EST2, BE211397 y EST3, BG839054), *Lycopersicon hirsutum* (EST, AW617386), *Medicago truncatula* (EST 1, BG456710 y EST 2, BG450566), *Mentha x piperita* (AF116825), *Solanum tuberosum* (EST, BE924278), *Zea mays* (AJ297566) y *E. coli* (AB013300).

II. RESULTADOS

a

```

*      20      40      60      80
A.thaliana : MTTNLSLPAESKAI SFLDTSRFNP--IPKLSGGFSLRRRNQGRGFGKGVKCSVKVQQQQQPPAWPGRVVPAPRQS : 76
O.sativa : -MAIKVVSFGLAAV SFLDSNRGGAFN--QLKVDLPFQTRDRRAVSLRRTC SSMQ---QAPPFAWPGRVVPGRRS : 72
L.esculent : -MANNLSLPAEIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---LPPPPAWPGRVVPGRQS : 74
C.roseus : -MANNLSLPPKIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---LPPPPAWPGRVVPGRQS : 73
M.pipperit : -MANNLMAPEIKTISFLDSSKSNYNLNLKPKQGGFAFKRKRDSRCTAAKRVHCSAQ S---QSPPFAWPGRVVPGRMT : 75
E.coli : ----- : -

*      100      120      140      160
A.thaliana : WDCPKPISIVGSGTSGICGTOTLDIVAENPKDFRIVALAAGSNVTLADQVRRKPKALVARNESLINELKEALADLDYKLE : 156
O.sativa : WDCPKPISIVGSGTSGICGTOTLDIVAENPKDFRIVALAAGSNVTLADQVKTFRPKHVARNESLVEELKDALADCDWKPE : 152
L.esculent : WDCPKPISIVGSGTSGICGTOTLDIVAENPKDFRIVALAAGSNVTLADQVKTFRPKLVARNESLVEELKDALADMEDKPE : 154
C.roseus : WDCPKPISIVGSGTSGICGTOTLDIVAENPKDFRIVALAAGSNVTLADQVKTFRPKQLVARNESLVEELKDALADSDVDDKPE : 153
M.pipperit : WDCPKPISIVGSGTSGICGTOTLDIVAENPKDFRIVALAAGSNVTLADQ-KAKRKPQLVSKDESLSLSEKLEALAGFEDMPE : 154
E.coli : ---MKQLTLLGSGTSGICSTLDDVVRHNEPFRFVALVAGKNVIRMVVEQCLEPSPRYAVMDDASAKLLKTMQQQGSRT : 77
      I SSTSGIC

*      180      200      220      240
A.thaliana : IIPGQGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETILAGGPFVLPPLAKKENVKILPADSEHSAIF : 236
O.sativa : IIPGQGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETILAGGPFVLPPLAKKENVKILPADSEHSAIF : 232
L.esculent : IIPGQGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETILAGGPFVLPPLAKKENVKILPADSEHSAIF : 234
C.roseus : IIPGQGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETILAGGPFVLPPLAKKENVKILPADSEHSAIF : 233
M.pipperit : IIPGQGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETILAGGPFVLPPLAKKENVKILPADSEHSAIF : 234
E.coli : VLSGQCAACDMALELDVQVMAALVGAAGLPLTAAIRAGKTIILANKESLVTCLRFLMDAVKQSKAQLLWVDSHNAIF : 157

*      260      280      300      320
A.thaliana : QCIQC-----LPEGALRRIILTASGGAFRDWPEVRLKEVKVADALKHENWVMGKTIIVDSATLFN-KGLEVIIEAH : 305
O.sativa : QCIQC-----LPEGALRRIILTASGGAFRDWPEVRLKEVKVADALKHENWVMGKTIIVDSATLFN-KGLEVIIEAH : 301
L.esculent : QCIQC-----LPEGALRRIILTASGGAFRDWPEVRLKEVKVADALKHENWVMGKTIIVDSATLFN-KGLEVIIEAH : 303
C.roseus : QCIQC-----LPEGALRRIILTASGGAFRDWPEVRLKEVKVADALKHENWVMGKTIIVDSATLFN-KGLEVIIEAH : 302
M.pipperit : QCIQC-----LPEGALRRIILTASGGAFRDWPEVRLKEVKVADALKHENWVMGKTIIVDSATLFN-KGLEVIIEAH : 304
E.coli : QSLPQPIQHNLGYADLEQNGVVSILLGSGGPFRETELRDLATMTPDOACRHEHNSMGRKLSVDSATLMMN-KGLEVIIEAH : 236

*      340      360      380      400
A.thaliana : VLFGEAYDIEIVIHPSIIHSMVETQDSSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRVYVCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 385
O.sativa : VLFGEAYDIEIVIHPSIIHSMVETQDSSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRVYVCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 381
L.esculent : VLFGEAYDIEIVIHPSIIHSMVETQDSSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRVYVCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 383
C.roseus : VLFGEAYDIEIVIHPSIIHSMVETQDSSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRISCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 382
M.pipperit : VLFGEAYDIEIVIHPSIIHSMVETQDSSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRVYVCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 383
E.coli : WLFENASASQMVLIHPSVLIHSMVRYQDGSVLAQLGQWPMRRLPILYTLWSPDRVYVCSVITWPRLDLCKLGSLLFVAPDNV : 313

*      420      440      460      480
A.thaliana : KFPSMDLVAAGRAAGGTMGTGVLSAANEKAVEMFTDEKISVLDIFKRVVELTCDKRNELVTSPSLEIIVHYDLWAREVAAAN : 465
O.sativa : KFPSMDLVAAGRAAGGTMGTGVLSAANEKAVELFTDSKIGVLDIFKRVVELTCDKRNELVTRPSLEIIVHYDLWAREVAAS : 461
L.esculent : KFPSMDLVAAGRAAGGTMGTGVLSAANEKAVELFTDSKIRISVLDIFKRVVELTCDKRNELVTSPSLEIIVHYDLWARDVAAS : 463
C.roseus : KFPSMDLVAAGRAAGGTMGTGVLSAANEKAVELFTDSKISVLDIFKRVVELTCDKRNELVTSPSLEIIVHYDLGARDVAAS : 462
M.pipperit : EIPAMDLVAAGRAAGGTMGTGVLSAANEKAVEMFTDEKISVLDIFKRVVELTCDKRNELVTSPSLEIIVHYDWARDVAART : 463
E.coli : RPECLKLAMEAFEQQAATLTAANAETVAALAAQOITRETDIAALNLSVLEMDMREP--QCVDVLSVDANAREVARK : 391

*
A.thaliana : VQLSSCARPVHA : 477
O.sativa : LQPSLCLSEVPV : 473
L.esculent : LEPSLCLSEPALV : 475
C.roseus : FQNSLCLSEPALV : 474
M.pipperit : VLKSLCLSEPALV : 475
E.coli : EVMRLASZ---- : 399
    
```

b

```

*      20      40      60      80
A.thaliana : MTTNLSLPAESKAI SFLDTSRFNP--PIPKLSGGFSLRRRNQGRGFG-KGVKCSVKVQQQQQPPAWPGRVVPAPRQS : 91
Z.mays : MAIAKASFRGELSAASFLSSRG--PLVQHRVDFTPQRCRAISL---RRTCSM---QAPPFAWPGRVVPGRRS : 86
O.sativa : MLLKVVVSFGLAAV SFLDSNRGGAFNQLVDFLPQTRDRRAVSLRRTC SSMQ---QAPPFAWPGRVVPGRRS : 87
A.annua : -SINLTLSEIRVNSFLDTTKSN--TNLKLQGGVSRVRSKVL---NGLQCSA---AASPPFAWPGRVVPGRRS : 85
M.truncatula1 : -MANNLSLPAEIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---LPPPPAWPGRVVPGRQS : 89
G.max1 : MANNLSSAEVKSIFPAEYFKSN--CLTAKFSGGFAPRERGAASG-GRVYCSV---QATPPFAWPGRVVPGRRS : 89
M.truncatula2 : MANNLPSAQVKPSFESLINPV--ITPTKLGGSFSLRREGDTKVVKRRVYCSA---AHSPPFAWPGRVVPGRRS : 89
G.max3 : -MANNLPSAQVKPLFESLNN-----STKLGGSFSLRREGDSTTV-ERRVYCSA---AAQSPFAWPGRVVPGRRS : 84
M.pipperita : -MANNLMAPEIKTISFLDSSKSNYNLNLKPKQGGFAFKRKRDSRCTAA-KRVHCSAQ S---QSPPFAWPGRVVPGRMT : 90
C.roseus : -MANNLSLPPKIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---LPPPPAWPGRVVPGRQS : 88
S.tuberosum : -MANNLSLPEIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---QPPFAWPGRVVPGRRS : 89
L.hirsutum : -MANNLSLGEIKTISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---QPPFAWPGRVVPGRRS : 89
L.esculentum : -MANNLSSAEKKSISFLDSSKSNYNLNLHLKFTGGLSIRKKECNGAFKRVQCSAQ---QPPFAWPGRVVPGRRS : 89
E.coli : ----- : 12
      MKQLTLLGSGTSG
    
```

II.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DXS1, DXS2 Y DXR.

Con el objeto de estudiar la localización subcelular de las proteínas DXS1, DXS2 Y DXR se plantearon dos estrategias independientes. La primera se basó en la transformación, mediante microbombardeo, de células vegetales con construcciones que expresan la proteína delatora GFP (abreviatura en inglés de proteína fluorescente verde) y en la observación de la fluorescencia por ella emitida. La segunda consistió en la detección directa de la proteína por medio de técnicas de inmunocitoquímica sobre cortes ultrafinos de microscopía electrónica. Ambas aproximaciones se detallan a continuación en los dos epígrafes siguientes, de manera tal que el conjunto de observaciones realizadas permitió ratificar la localización plastídica de las proteínas DXS1, DXS2 y DXR, de modo coherente con la función propuesta para dichas enzimas en la ruta MEP.

II.2.1. Estudio de la distribución subcelular de las proteínas DXS1, DXS2 y DXR.

Con el propósito de estudiar la distribución subcelular de las proteínas DXS1, DXS2 y DXR, se generaron construcciones en las que las secuencias codificantes completas de la DXS1 y la DXR fueron fusionadas traduccionalmente al extremo N-terminal de una versión optimizada de la proteína fluorescente verde (sGFP, [59]). En el caso de la DXS2, la construcción utilizada era la resultante de la fusión traduccional de los 45 primeros residuos (dominio correspondiente al hipotético péptido de tránsito) con la GFP (Figura II.5). En todos los casos, la expresión de la proteína quimérica resultante estuvo dirigida por el promotor CaMV-35S (apdo. V.4.6.1).

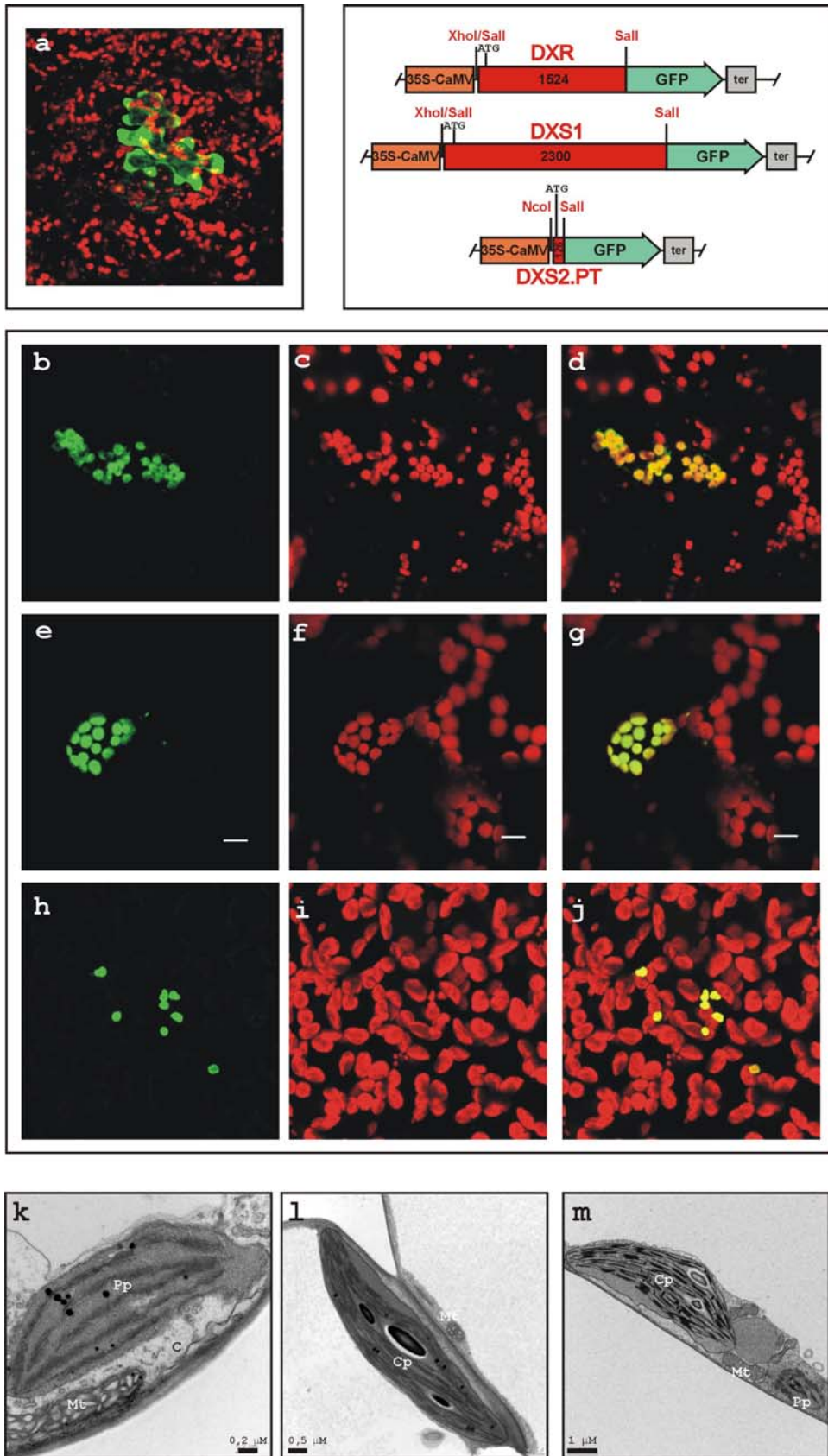
La expresión transitoria de aquellas construcciones en células foliares subepidérmicas se llevó a cabo mediante microbombardeo con un aparato de biolística, tal y como se describe en el apartado V.4.6.2. La muestra fue observada con la ayuda del microscopio láser confocal con el objeto de determinar la localización intracelular de la proteína quimérica expresada. La primera deducción reseñable tras los primeros análisis de microscopía fue la baja eficiencia de transfección obtenida. La optimización del proceso vino de la mano de la elección de hojas particularmente jóvenes, concretamente hojas vegetativas de unos 0,5 cm de diámetro procedentes de plántulas de *Arabidopsis* de 15-20 días. En estas muestras, presumiblemente, el sistema de translocación de proteínas codificadas por el genoma nuclear hacia los distintos orgánulos subcelulares (tales como los plástidos) sería particularmente activo, sistema que, por otro lado, podría verse desbordado como consecuencia de la sobreexpresión de las proteínas quiméricas. Otros cambios que permitieron incrementar la eficacia de transfección pasaron por

optimizar los parámetros asociados específicamente con el proceso de biolística.

La Figura II.10 muestra el patrón de localización encontrado en cada caso. Concretamente, y como era de esperar, el control, efectuado con la proteína GFP, mostraba una distribución citosólica y nuclear. La distribución nuclear de la GFP está justificada por no superar la masa molecular definida por el tamaño de exclusión de los poros presentes en la envuelta nuclear, difundiendo libremente a través de los mismos (Figura II.10a). En los tres casos estudiados, la emisión de la fluorescencia debida a la GFP se correspondía con una localización cloroplástica, lo cual venía corroborado por su colocalización con la autofluorescencia de la clorofila. En efecto, la superposición de las imágenes obtenidas utilizando un filtro específico para la emisión en verde de la GFP, con aquellas otras capaces de absorber selectivamente la autofluorescencia en rojo propia de la clorofila resultaba en una coloración amarilla.

Era apreciable, sin embargo, una diferencia en relación con el tamaño de los plástidos identificados en el caso de la GFP dirigida por el supuesto péptido de tránsito de la DXS2. Aún a pesar de coincidir espacialmente con la clorofila (Figura II.10j), es apreciable cómo, en este caso, el tamaño de los plástidos marcados con GFP era menor (Figura II.10h). Esta particularidad se hace aún más evidente cuando se observan las estructuras análogas en la imagen de autofluorescencia, donde, por otro lado y por regla general, la intensidad de la misma era menor. Por su parte, el análisis de ultraestructura de células del mesófilo foliar reveló que la relación de tamaño entre los cloroplastos maduros y los proplástidos (Figura II.10k, l y m) se ajustaba a la existente entre los plástidos marcados por la proteína DXS2.PT:GFP y los cloroplastos maduros, como se deduce de la observación de las imágenes de microscopía confocal correspondientes (Figura II.10h, i y j).

Figura II.10: Experimentos de localización subcelular de la DXS1, la DXS2 y la DXR fusionadas a la GFP. Hojas jóvenes de *A. thaliana* fueron microbombardeadas con construcciones que codifican para las proteínas DXS1 y DXR o la región que contenía el péptido de tránsito de la DXS2 fusionadas traduccionalmente a la sGFP [59]. Las células que expresaban la proteína quimérica de fusión resultante fueron analizadas mediante microscopía láser confocal. Las imágenes muestran: a, localización de la proteína GFP; b, c y d, experimentos realizados con la proteína DXS1:GFP; e, f y g, DXR:GFP y h, i y j, DXS2.PT:GFP. Por su parte, b, e y h corresponden a la observación de la fluorescencia verde emitida por la GFP en las células transfectadas con las muestras problema; c, f e i, autofluorescencia roja correspondiente a la clorofila de aquellas mismas células; d, g y j imagen resultante de la superposición de las dos imágenes anteriores. Aparecen también representadas a escala las construcciones utilizadas en cada caso, así como los sitios de clonaje correspondientes. Las imágenes k, l y m muestran micrografías electrónicas obtenidas a partir de cortes ultrafinos de las primeras hojas verdaderas de *A. thaliana*, en un estadio temprano de desarrollo. Cp, representa a los cloroplastos maduros; Pp, proplástidos; C, citosol y Mt, mitocondria.

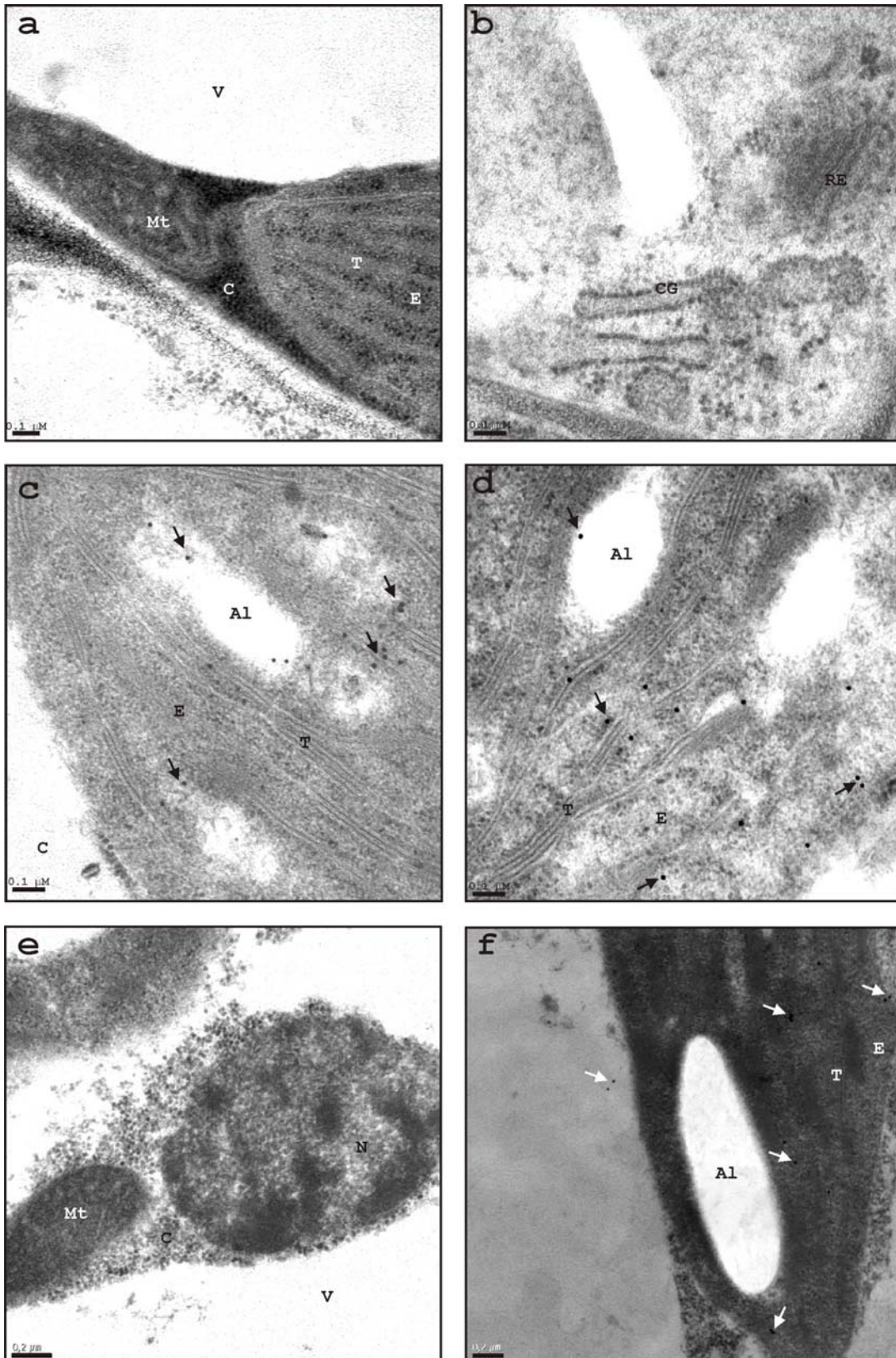


II.2.2. Inmunodetección de las proteínas DXS1 y DXR mediante microscopía electrónica.

Como estrategia alternativa en el estudio de la localización intracelular de la DXS y la DXR, se desarrollaron experimentos de inmunolocalización utilizando los anticuerpos anti-DXR y anti-DXS1 descritos en el apartado V.5.3.1. Con dicho propósito, se obtuvieron cortes ultrafinos a partir de hojas verdaderas emergentes, procedentes de plántulas de 10-12 días, las cuales fueron finalmente incluidos en resina Lowicryl K4M (apdo. V.4.5.2). La elección de dichas muestras vino motivada por ser células con un elevado número de cloroplastos en desarrollo y, consecuentemente, con la maquinaria de translocación de proteínas funcionando activamente. Con el objetivo de determinar cual era la dilución del anticuerpo que ofrecía una relación óptima de marca específica respecto del ruido de fondo, se ensayó un rango de concentraciones de anticuerpo comprendidas entre 1/100 y 1/500 para los experimentos con anti-DXR, y 1/500 a 1/2000 en el caso de los anticuerpos generados contra la DXS1 (apdo. V.4.5.3). Las diluciones seleccionadas fueron de 1/200 para anti-DXR y de 1/500 para anti-DXS1. Como controles negativos a los experimentos de inmunolocalización se realizaron incubaciones con suero preinmune o sin suero.

Las partículas de oro coloidal acopladas al anticuerpo secundario dirigido contra aquellos anticuerpos a estudio se manifiestan, al microscopio electrónico, como estructuras ultradensas de 15 nm de diámetro. La observación por microscopía electrónica de las muestras obtenidas, refleja como dichas partículas son perceptibles fundamentalmente en los cloroplastos, distribuyéndose en la matriz estromática del mismo, tanto para el caso de la DXR (Figura II.11c y d) como de la DXS1 (Figura II.10f). Sin embargo, cierta marca fue observada también al exterior de dicho orgánulo, especialmente en el caso de la DXS1, tal y como muestra la imagen obtenida (Figura II.11f). En cualquier caso, los distintos controles realizados no mostraron señal alguna (Figura II.11a, b y e).

Figura II.11: Experimentos de inmunocitoquímica en el estudio de la localización intracelular de las proteínas DXS1 y DXR. Las flechas indican partículas de oro de 15 nm, confirmando la inmunolocalización de la DXS1 y la DXR en los cloroplastos. Se ha utilizado, en cada caso, a, suero preinmune obtenido a partir del conejo inmunizado contra la DXR a una dilución 1/500; b, hibridación control sin anticuerpo primario ni secundario; c, hibridación control sin anticuerpo primario y con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo; d, suero anti-DXR a una concentración de 1/200; e, hibridación control sin anticuerpo primario y con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón; f, micrografía electrónica resultante de la incubación con anti-DXS1 (1/500), obtenidas a partir de ascitas de ratón inmunizadas con la DXS1 [101]. Para el protocolo de inmunocitoquímica ver apartado V.4.5.3. Las letras sobre las imágenes señalan, respectivamente: Al, gránulos de almidón cloroplastídicos; A, citoplasma; E, estroma; CG, complejo de golgi; Mt, mitocondria; N, nucleo; RE, retículo endoplasmático; T, membranas tilacoidales y V, vacuolas.



II.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *DXS1* Y *DXR* de *Arabidopsis thaliana*.

La utilización de técnicas de *northern-blot* o *western-blot*, así como aquellas derivadas de la utilización del gen delator *GUS* permitieron obtener una idea detallada y precisa del patrón de expresión espacial y temporal de los genes *DXS1* y *DXR*, tal y como se describe a continuación.

II.3.1. Análisis de la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* de *Arabidopsis thaliana*.

II.3.1.1. La expresión de los genes *DXS1* y *DXR* durante etapas tempranas del desarrollo: Estudios de *northern-blot* y *western-blot*.

En primer lugar, se abordó el estudio de la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* durante el desarrollo de plántulas jóvenes. Se siguió para ello una aproximación mediante *western-blot*, por la cual se estudió el patrón de distribución de las proteínas codificadas por los genes *DXS1* y *DXR* sobre muestras obtenidas a partir de extractos de plántulas crecidas bajo un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 horas (condiciones de día largo). Para ello, dichas proteínas fueron detectadas sobre las diferentes muestras analizadas con anticuerpos específicos. En ambos casos, las bandas de proteína detectadas por los respectivos anticuerpos presentaron un tamaño coherente con la masa molecular deducida para las hipotéticas proteínas, una vez sufrido el procesamiento asociado con la translocación a los plástidos. En efecto, la masa molecular aparente de las bandas detectadas en cada caso fue de en torno a 70 kDa en el caso del anticuerpo anti-*DXS1*, y de 46 kDa con el anticuerpo anti-*DXR*. De este modo, se pudo observar cómo los niveles de proteína *DXS1* y *DXR* no variaban durante el desarrollo vegetativo de plántulas en los diferentes estadios analizados, esto es, desde el día 4 al 21 después de la germinación (Figura II.12).

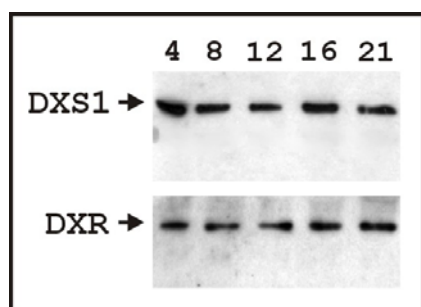


Figura II.12: Estudios de los niveles de la proteína *DXS1* y *DXR* durante el desarrollo de plántulas de *A. thaliana*. *Western-blot* efectuado sobre 30 μg de proteína obtenida a partir de plántulas crecidas bajo un ciclo de 16 horas luz:8 horas oscuridad (fotoperíodo de día largo) utilizando anticuerpos específicos anti-*DXS1* y anti-*DXR*.

La Figura II.13 muestra el análisis por *northern-blot* efectuado mediante sondas específicas para los ADNc de los genes *DXS1* y *DXR* sobre muestras de ARN total obtenidas a partir de plántulas crecidas durante 7 días en oscuridad, o durante 9 días bajo condiciones de fotoperíodo de día largo. Se detectó la presencia de transcritos de 2,65 kb en el caso de la *DXS1* y de 1,8 kb para la *DXR*, de acuerdo con los tamaños esperados según los ADNc correspondientes. En ambos casos los niveles de ARNm eran ostensiblemente menos elevados en las muestras de ARN de oscuridad. Este extremo fue verificado a su vez por los experimentos de *western-blot* (Figura II.13b), los cuales delataron un mayor acúmulo de la proteína DXS1 y DXR en las plántulas crecidas en presencia de luz. Adicionalmente, dichos experimentos revelaron que las diferencias detectadas bajo una u otras condiciones a nivel de proteína eran menores que aquellas encontradas a nivel de los ARNm correspondientes.

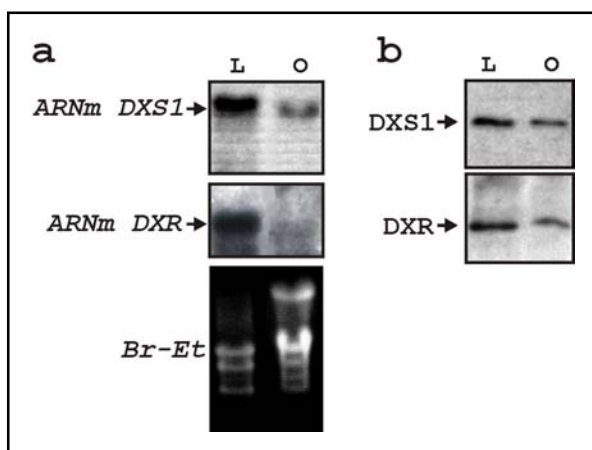


Figura II.13: Análisis de la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* en plántulas crecidas en condiciones de luz y oscuridad. (a), experimentos de *northern-blot* sobre 10 μg de ARN extraído de plántulas crecidas durante 9 días en ciclo de día largo (L, 16 h luz:8 h oscuridad) o durante 7 días en oscuridad (O) utilizando las sondas indicadas en el apartado V.5.2.3; b, experimento análogo realizado mediante *western-blot* sobre 20 μg de proteína.

Seguidamente, y con el objeto de discernir si este comportamiento era debido a cambios en el programa morfogénico particular o si tenía lugar una inducción de la expresión en respuesta a la luz, se midieron los niveles del transcrito correspondiente a la *DXR* sobre muestras crecidas en oscuridad y posteriormente transferidas a luz durante 6 y 24 horas (Figura II.14a). De este modo, se constató un incremento en las cantidades del ARNm *DXR* asociado al proceso de desetiación. Mediante experimentos de *western-blot*, fue estudiado el proceso análogo a nivel de acumulación de la proteína *DXS1* (Figura II.14b), observándose un fenómeno de inducción durante el proceso de desetiación similar al previamente descrito para el ARNm [187].

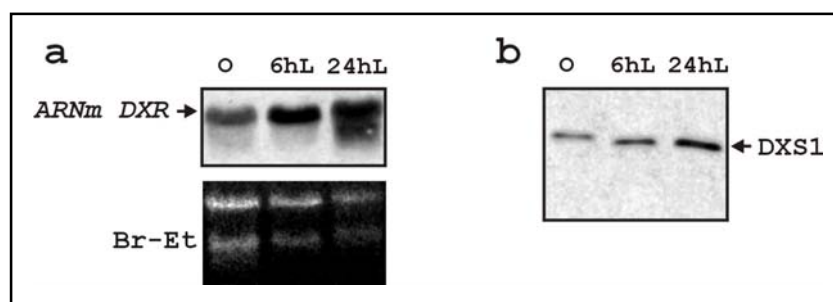


Figura II.14: Acumulación del transcrito *DXR* y la proteína *DXS1* durante el proceso de desetiación. (a), 20 μ g de ARN de plántulas crecidas 7 días en oscuridad (O) y posteriormente expuestas durante 6 (6hL) ó 24 horas (24hL) a la luz fueron utilizados en un experimento de northern-blot con una sonda específica para el ARNm *DXR* (apdo. V.5.2.3); b, experimento análogo de western-blot con 20 μ g de proteína utilizando el anticuerpo específico frente a la *DXS1*.

II.3.1.2. La expresión de los genes *DXS1* y *DXR* en la planta adulta: Estudios de *northern-blot* y *western-blot*.

El análisis de la distribución en diferentes tejidos y órganos de la planta adulta de los transcritos correspondientes a los genes *DXS1* y *DXR* se muestra en la Figura II.15. Se puede observar cómo tanto el mensajero de la *DXS1* (a) como el de la *DXR* (b) se detecta en todos los tejidos analizados, así como en la suspensión celular de la línea T-87 [16]. Particularmente, y en lo que concierne a *DXS1*, los niveles de mensajero eran particularmente elevados en tejidos verdes, tales como las hojas y los tallos, aunque también eran apreciables en inflorescencias, silicuas, y, en bastante menor medida, en raíces (Figura II.15a). Por su parte, la línea celular T-87 mostró también importantes niveles de expresión [16]. Sin embargo, en el caso del gen *DXR* (Figura II.15b), los acúmulos del transcrito correspondiente resultaron más elevados en inflorescencias y hojas, aunque los niveles más destacados de expresión fueron detectados en la suspensión celular de la línea T-87 [16]. También resultaron subrayables los niveles de expresión detectados en las raíces, en este caso de una abundancia relativa mayor que la observada para *DXS1*. Los menores acúmulos del transcrito *DXR* fueron observados en tallos. En general, las variaciones en los niveles del ARNm *DXR* entre los distintos tejidos se revelaron menores que los observados para el mensajero correspondiente al gen *DXS1*. Resulta importante señalar, en este punto, la diferente procedencia de las muestras de raíz utilizadas en cada uno de los casos, y que para el experimento de *northern-blot* efectuado con la sonda específica para la *DXR* procedía de plantas jóvenes crecidas en placa y cuyas raíces estaban, consecuentemente, expuestas a la luz. Finalmente, recalcar la aparición de un mensajero adicional de alrededor de 1,4 kb en inflorescencias y plántulas en proceso de desetiación (Figura II.14a, carril 24hL y Figura II.15), además del esperable de 1,8 kb de acuerdo con el ADNc del gen *DXR* que aparece en todas las muestras analizadas.

La Figura II.15 muestra también los resultados de los análisis de *western-blot* efectuados con muestras procedentes de distintos tejidos y órganos de planta adulta. Una vez más, fue detectada una banda única, de un tamaño en torno a los 70 kDa, correspondiente a la forma madura de la DXS1, en todos los tejidos analizados, tal y como refleja la imagen de la Figura II.15c, y de modo parecido a lo observado anteriormente para el ARNm. Sin embargo, la abundancia relativa en cada una de ellos difería de los observados para el ARNm correspondiente en los experimentos de *northern-blot*. Destacan, en este sentido, los mayores niveles alcanzados en las muestras de frutos e inflorescencias, sobre todo con respecto a los detectados en hojas, particularmente las de la roseta basal. Una mejor correlación fue encontrada en cuanto a la distribución tisular del transcrito de 1,8 kb correspondiente a la DXR y la proteína de 46 kDa detectada por *western-blot* (Figura II. 15d). La proteína DXR se acumula a niveles relativamente elevados en inflorescencias y en frutos. Una vez más, las hojas, particularmente las de la roseta, presentaron acumulos menores de proteína en relación con los observados para el ARNm en los experimentos de *northern-blot*.

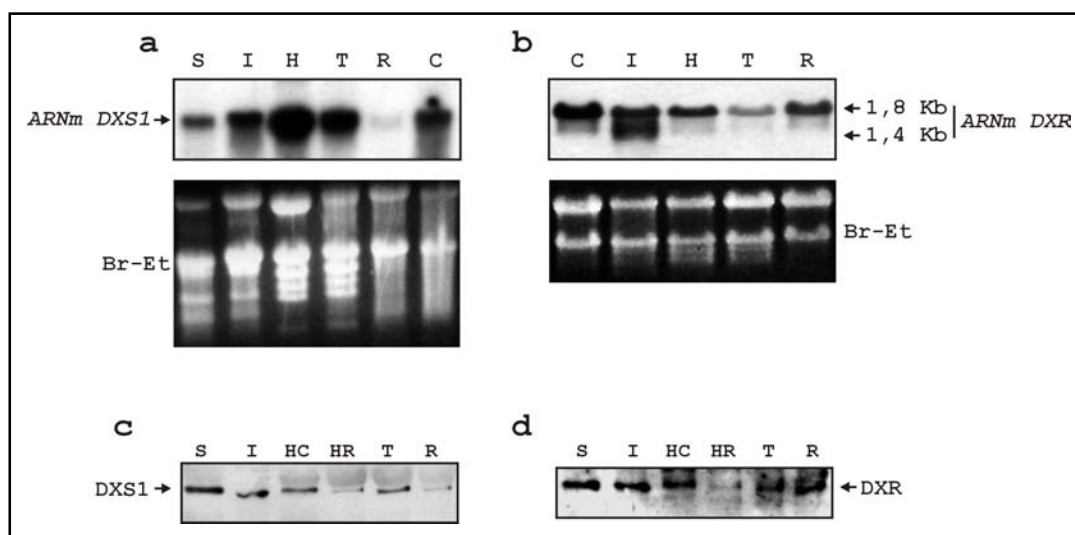


Figura II.15: Estudio del patrón de expresión de los genes DXS1 y la DXR en la planta adulta. Experimentos de *northern-blot* a partir de 20 (a) y 15 (b) μ g de ARN precedente de diversos tejidos de *A. thaliana* (sondas, apdo. V.5.2.3). Las imágenes muestran la película autorradiográfica resultante de una exposición de 6 horas (a) y 48 horas (b) en las que se detectan los transcritos correspondientes a los ARNm de la DXS1 (a) y la DXR (b) respectivamente. Se señala la banda adicional de 1,4 kb detectada con la sonda específica para DXR. Se incluye también el gel correspondiente, teñido con Br-Et previamente al proceso de transferencia. Paneles c y d, análisis por *western-blot* sobre 30 μ g de extracto crudo de proteína de los tejidos indicados, utilizando los anticuerpos policlonales específicos contra la DXS1 y la DXR. El tiempo de exposición fue de aproximadamente 1 minuto. Las abreviaturas corresponden a: S, Silicuas; I, Inflorescencias; H, Hojas; HC, Hojas Caulinares; HR, Hojas de Roseta; T, tallo; R, Raíces y C, Suspensión celular de la línea T87 [16].

II.3.1.3. Análisis del patrón de tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de genes quiméricos *DXS1:GUS* y *DXR:GUS*.

Para analizar detalladamente la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* de forma tejido- u órgano-específico, así como en momentos y condiciones concretas del desarrollo, se optó por la determinación de la actividad histoquímica de plantas transgénicas portadoras de la fusión del promotor correspondiente con el gen delator *GUS*. Con dicho propósito, se planteó el clonaje de la región 5' flanqueante de los genes *DXS1* y *DXR*, siguiendo las estrategias detalladas en el apartado V.4.1.2. De esta manera, unas 2 kb de la región 5' flanqueante del gen *DXS1* que comprenden 1738 pb de la secuencia situada hacia 5' del sitio de inicio de la transcripción definido por el experimento de *RACE* 5', la región transcrita no traducida (5' UTR) en su totalidad, así como los primeros 12 pb de la región codificante, se fusionaron con el gen *GUS*. Por su parte, se recuperó un fragmento de 1,3 kb de la región 5' flanqueante del gen *DXR* que incluye 1,2 kb de la secuencia situada hacia 5' del inicio de transcripción, la UTR 5' completa y las 6 primeras pb de la región codificante, fusionados a su vez con el gen *GUS*. Dichas contrucciones fueron realizadas en el vector binario pBI121, obteniéndose los plásmidos (-1738/+217)*DXS1:GUS* y (-1158/+94)*DXR:GUS*, respectivamente, que fueron utilizados para transformar plantas de *A. thaliana* var. Col. 3 siguiendo el protocolo de infiltración al vacío con *Agrobacterium tumefaciens* (apdo. V.4.1.3).

De cada episodio de transformación fueron recuperados individuos resistentes al antibiótico correspondiente al marcador de selección (kanamicina). El patrón de expresión de los respectivos genes quiméricos fue determinado mediante la detección histoquímica de la actividad *GUS* con el sustrato X-Gluc en individuos de al menos seis líneas diferentes, (apdo. V.4.7.1). De este modo, se confirmó que las diferencias de expresión entre las distintas líneas transformadas con una misma construcción eran meramente cuantitativas, esto es, ligeros matices en cuanto a la intensidad de tinción. Se escogió en cada caso una de ellas que fue considerada como representativa y para la que el carácter resistencia al antibiótico seguía una segregación mendeliana, con el objeto de llevar a homocigosis. Sobre estas líneas genéticamente uniformes se llevaron a cabo los estudios definitivos de tinción histoquímica que se muestran en las Figuras II.16 y 17.

El análisis de la línea 5.8 de las plantas (-1738/+217)*DXS1:GUS* confirmó la distribución generalizada de la tinción *GUS*. Aún más, los bajos tiempos de incubación con el sustrato X-Gluc necesarios para obtener niveles perceptibles de tinción (2-3 horas) revelaron que la región analizada del promotor *DXS1* resultaba en una expresión particularmente fuerte. El análisis detallado de estas plantas durante estadios tempranos del desarrollo vegetativo reveló como la expresión del transgén tenía lugar desde el día 1, esto es, desde los primeros momentos de la germinación (Figura II.16a). A los 6 días de crecimiento la expresión se hacía generalizada en todos los tejidos de la plántula (Figura II.16b). Cabe destacar cómo la actividad *GUS* detectada

en los haces vasculares de los cotiledones era particularmente elevada, observación que podía hacerse extensiva también para las hojas verdaderas, tanto basales (Figura II.16e), como caulinares (Figura II.16g). Posteriormente, y como ilustra el examen sobre plántulas de 15 días (Figura II.16c), la actividad GUS aparecía en las primeras hojas verdaderas, manteniéndose también por toda la raíz.

En lo que respecta a la fase reproductiva, los estudios realizados denotaron una expresión igualmente intensa y generalizada en todos los órganos de la planta adulta. Caben destacar los elevados niveles de expresión detectados en hojas de roseta (Figura II.16e), y hojas caulinares (Figura II.16g), tanto en el limbo como en el pecíolo. Pero no menos importantes resultaron en otros órganos de la planta adulta, como en las inflorescencias (Figura II.16i y j), silicuas (Figura II.16k y l), e incluso raíces (Figura II.16f). Por otra parte, subrayar la elevada expresión en tejidos en intenso crecimiento y diferenciación, tales como los vástagos o los brotes axilares y terminales (Figura II.16g, h e i).

Todos los tejidos de las inflorescencias manifestaron actividad GUS, revelándose particularmente intensa en los haces vasculares de sépalos y pétalos, en los órganos sexuales y en los granos de polen (Figura II.16j), así como durante todos los estadios de desarrollo de las mismas (Figura II.16i). Los pedúnculos florales mostraron una intensidad de tinción proporcional al grado de madurez en el desarrollo de las flores (Figura II.16i). Un análisis más en detalle se obtuvo analizando muestras sometidas a diferentes tiempos de incubación con el sustrato X-Gluc. De esta manera se apreció cómo en flores teñidas durante tiempos cortos la expresión se restringía a la zona cercana a las papilas estigmáticas y la base del ovario, a las anteras y a los sépalos desapareciendo prácticamente de los pétalos (resultados no mostrados) y extendiéndose al resto de tejidos sólo después de incubaciones a tiempos más largos. Del mismo modo, pudo observarse como el perfil de expresión en el gineceo se conservaba aún después de la fecundación. Si a tiempos cortos de incubación la expresión se concentraba en las zonas apical y basal de las silicuas en desarrollo (Figura II.16k), incubaciones a tiempos más largos revelaron como la expresión en frutos jóvenes y maduros se extendía por toda la vaina, aunque particularmente en la zona de abscisión (Figura II.16i y l). Por el contrario, no se detectaba actividad GUS en las semillas (Figura II.16l) circunstancia que podría, no obstante, ser debida a la impenetrabilidad de la cutícula para el sustrato.

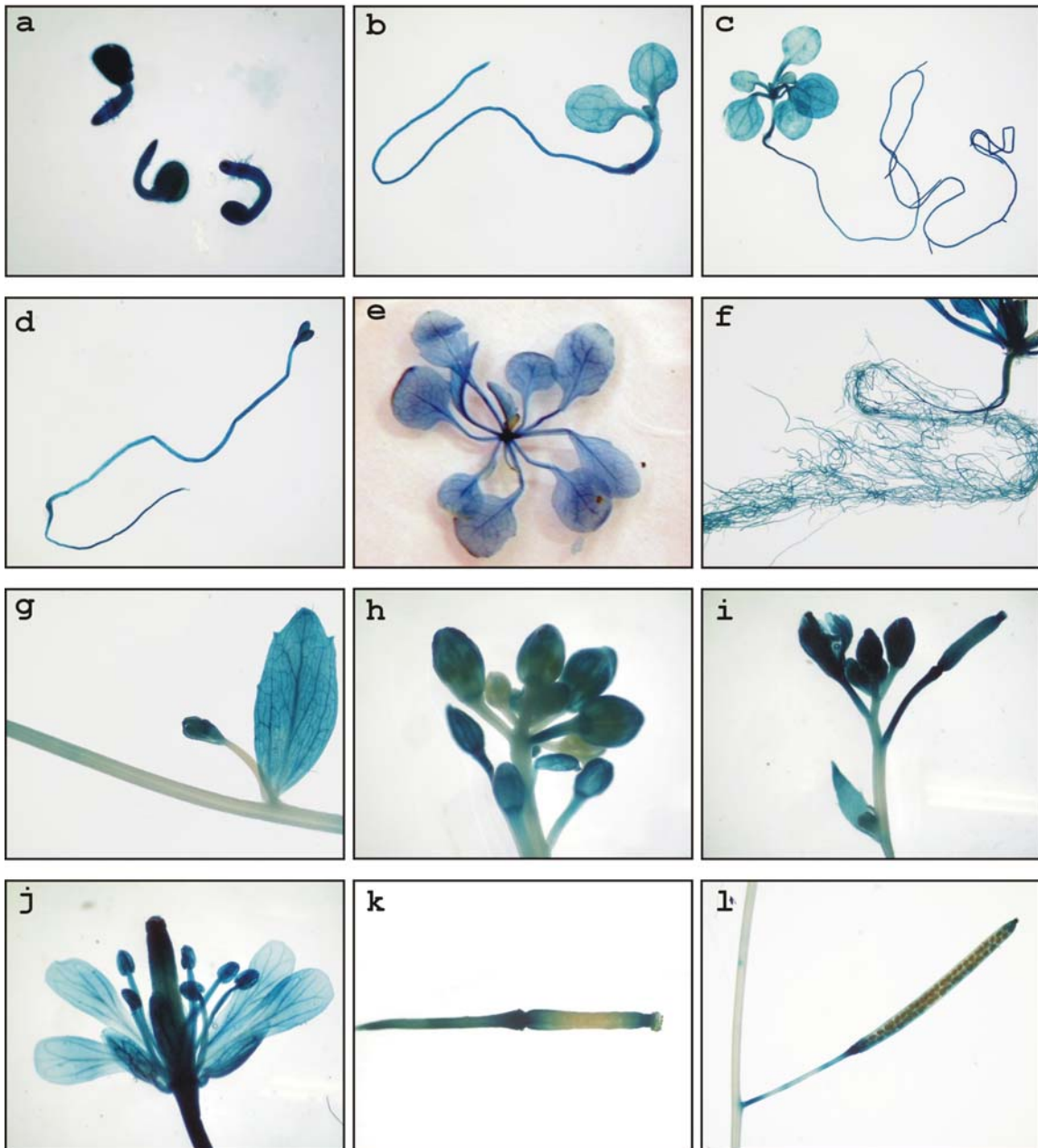
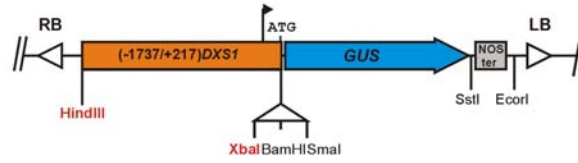
El examen de tinción GUS realizado en las plantas transgénicas portadoras de la construcción (-1158/+94)DXR:GUS mostró un patrón similar al obtenido con el promotor DXS1, aunque revelaba sutiles diferencias, tal y como se muestra en la Figura II.17. Hay que añadir que, a diferencia de lo que anotábamos para la región estudiada del promotor DXS1, en el caso de las plantas (-1158/+94)DXR:GUS fueron necesarios tiempos prolongados de incubación con el sustrato X-Gluc para obtener niveles apreciables de tinción (16-24 horas).

El patrón de distribución de la actividad GUS de las plantas (-1158/+94)*DXR:GUS* durante el desarrollo vegetativo reproducía el observado para la *DXS1*, con la particularidad de que la expresión en raíces decaía hacia el ápice de la misma (Figura II.17b y c). En cualquier caso, los perfiles de expresión dirigidos por uno u otro promotor no mostraron variaciones cualitativas significativas en ninguno de los estadios de desarrollo de la plántula examinados, exámenes que se prolongaron hasta los 21 días.

En cuanto a la expresión del gen *GUS* dirigida por el promotor *DXR* durante la fase reproductiva destacaba la elevada tinción mostrada por las hojas de la roseta basal (Figura II.17e), hojas caulinares (Figura II.17g) y, en menor nivel, inflorescencias (Figura II.17i y j). Esto contrasta con lo observado en los tallos, donde la expresión se ceñía exclusivamente a aquellas zonas próximas a los brotes terminales y, de manera semejante a lo que observamos para *DXS1*, resultaba proporcional al grado de desarrollo de los mismos (Figura II.17i). En este sentido, señalar la aparente ausencia de actividad en los brotes axiales o laterales (Figura II.17g), a diferencia de en las terminales (Figura II.17h). Finalmente, subrayar la escasa aunque significativa actividad GUS mostrada por las raíces de la planta adulta, fundamentalmente en las raíces principales, de forma que dicha actividad se hacía más intensa cuanto más cerca estaba de la parte aérea de la planta (Figura II.17f).

La actividad GUS observada en las inflorescencias de las plantas (-1158/+94)*DXR:GUS* se mostró durante todos los estadios de desarrollo de las mismas (Figura II.17i), en los órganos sexuales y sépalos (Figura II.17j), resultando ausentes en pétalos, salvo en la región próxima al pie de los mismos. El análisis a distintos tiempos de incubación con el sustrato X-Gluc, reveló como la tinción histoquímica se concentraba en los sépalos, las papilas estigmáticas y las anteras, resultando especialmente intensa en los granos de polen (resultados no mostrados). Los frutos, y sus pedúnculos, presentaron también niveles notables de tinción, concentrándose mayoritariamente en la zona apical a medida que avanzaban en el desarrollo (Figura II. 17k y l), a diferencia de lo generalizado de la expresión de la *DXS1* detectada en fruto.

pLATBIPS5.8 (-1738/+217)DXS1:GUS



pLATBIPRIb1.4 (-1158/+94)DXR:GUS

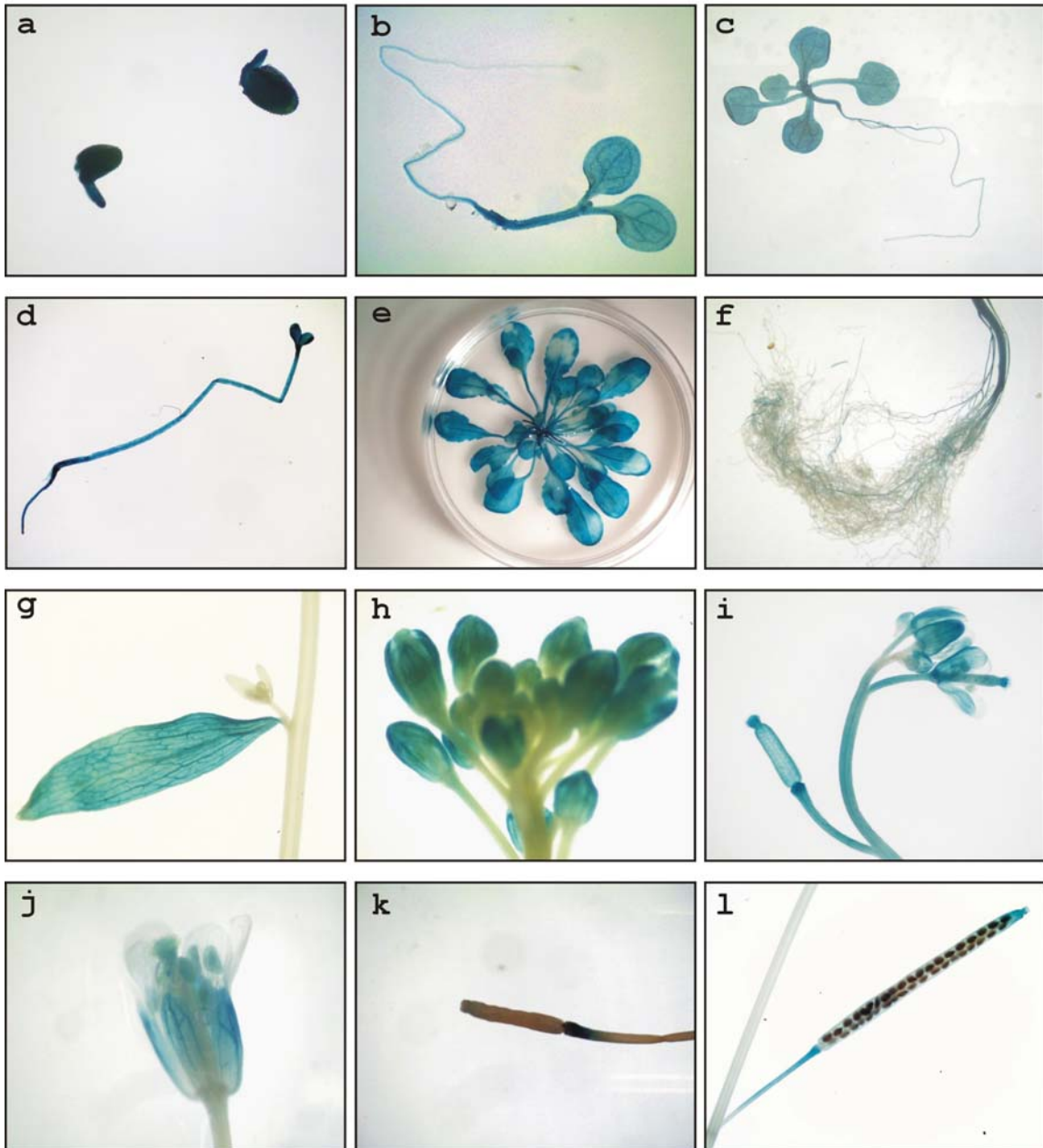
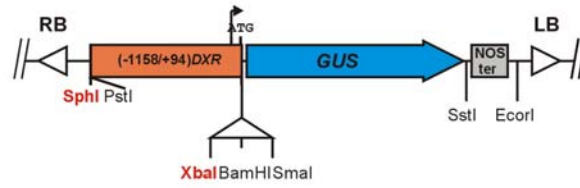


Figura II.16: Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas de *A. thaliana* portadoras de la construcción (-1738/+217)DXS1:GUS. Las imágenes representan, respectivamente: a, semillas en germinación de 1 día; b, plántulas de 6 días; c, plántulas de 15 días; d, plantas de 9 días crecidas en oscuridad; e, roseta basal de 40 días; f, raíz de planta adulta (6 semanas); g, hoja caulinar y brote lateral con primordios; h, brote terminal e inflorescencias jóvenes; i, inflorescencias en distintos momentos de desarrollo; j, flor; k, silicua en desarrollo y l, silicua madura. Las muestras fueron incubadas 16 horas en solución de tinción con el reactivo X-Gluc a excepción de la representada por k, que fue incubada 6 horas.

Figura II.17: Detección de la actividad GUS en plantas de *A. thaliana* portadoras de la construcción (-1158/+94)DXR:GUS. Las imágenes corresponden, en cada caso: a, semillas en germinación de 1 día; b, plántulas de 6 días; c, plántulas de 15 días; d, plantas de 9 días crecidas en oscuridad; e, roseta basal de 2 meses; f, raíz de planta adulta (6 semanas); g, hoja caulinar y brote lateral con primordios foliares; h, brote terminal e inflorescencias jóvenes; i, inflorescencias en distintos momentos de desarrollo; j, flor; k, silicua en desarrollo y l, silicua madura. Las muestras fueron incubadas 16 horas en solución de tinción con el reactivo X-Gluc a excepción de la representada por k, que fue incubada 6 horas.

II.3.1.4. Estudio del efecto de la luz en plantas transgénicas portadoras de las construcciones (-1738/+217)DXS1:GUS y (-1158/+94)DXR:GUS.

Hemos observado los acúmulos diferenciales de mensajero y proteína DXS1 y DXR en plantas crecidas en luz y en oscuridad, así como la inducción de ambos genes durante el proceso de desetiación (Figuras II.13 y II.14). En este sentido, el patrón de tinción histoquímica de la actividad GUS dirigida por los dos promotores estudiados no difería entre aquellas plántulas crecidas en completa oscuridad respecto de las crecidas bajo un ciclo de 16 horas luz:8 horas oscuridad. Efectivamente, se observó como la tinción GUS se distribuía de forma generalizada por todos los tejidos de la planta etiolada, al igual que las plantas crecidas en luz, aunque resultaba moderadamente más abundante en los cotiledones, tanto para los individuos (-1738/+217)DXS1:GUS (Figura II.16d) como para los (-1158/+94)DXR:GUS (Figura II.17d). Asimismo, la expresión de los transgenes durante el proceso de desetiación no mostró ninguna diferencia cualitativa significativa (resultados no mostrados).

Sin embargo, sí se apreciaron diferencias en cuanto a la intensidad de tinción de las plántulas transgénicas. Con el objeto de cuantificar estas diferencias de actividad GUS entre las plántulas crecidas en luz y aquellas otras crecidas en oscuridad se empleó el método fluorométrico descrito en el apartado V.4.7.2 sobre las líneas homocigotas, anteriormente descritas, para los transgenes (-1738/217)DXS1:GUS y (-1158/+94)DXR:GUS. Los resultados muestran como, de modo coherente con lo obtenido en los experimentos de *northern* y *western-blot*, los valores de actividad GUS eran ostensiblemente menores en aquellas plantas crecidas en oscuridad, reduciéndose, hasta un 27 % en el caso de las plantas (-1158/+94)DXR:GUS, respecto de los medidos cuando eran crecidas en luz (Figura II.18). Adicionalmente, estos resultados confirman que las diferencias observadas entre los niveles de expresión de los genes

DXS1 y DXR corresponden, en cada caso, a la actividad transcripcional de la región promotora analizada.

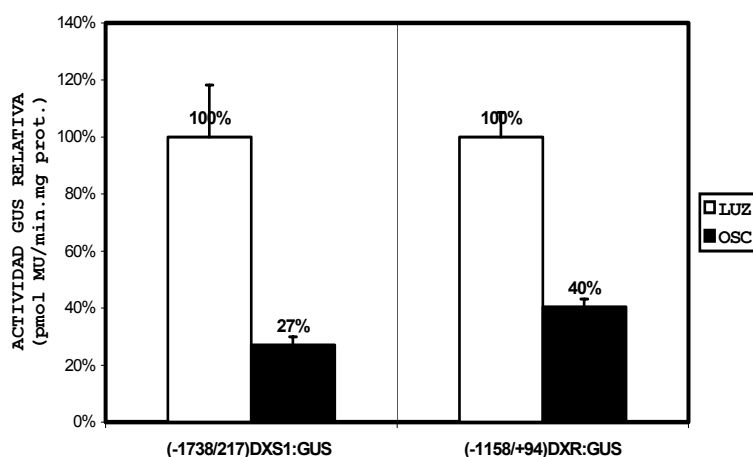


Figura II.18: Actividad GUS relativa de plantas transgénicas portadoras de las construcciones (-1738/+217) DXS1:GUS y (-1158/+94) DXR:GUS crecidas 9 días en completa oscuridad o bajo un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se empleó para ello el método fluorométrico de cuantificación de actividad GUS descrito en el apartado

V.4.7.2. Las columnas representan los promedios de las mediciones de actividad GUS efectuadas sobre 3 réplicas por cada muestra referidas, para mayor claridad, como porcentajes respecto de los valores obtenidos para las plantas crecidas en luz. Las barras representan, en cada caso, las desviaciones estándar. La concentración protéica del extracto se determinó según el método de Bradford, apartado V.4.4 [32].

II.3.2. Análisis del patrón de actividad GUS dirigida por delecciones seriadas de la región -1738/+217 del gen DXS1 y definición de la región mínima del promotor necesaria para su expresión.

Con el objetivo de definir la región mínima del promotor responsable de la expresión del gen *DXS1*, así como identificar posibles elementos reguladores en el mismo, se generaron construcciones en las que cuatro fragmentos de la región promotora de referencia (-1738/+217) del gen *DXS1*, deletados progresivamente por su extremo 5', fueron fusionados al gen *GUS*. Para ello, se llevaron a cabo cuatro reacciones de *PCR* utilizando como molde el ADN purificado de la construcción (-1738/+217)*DXS1:GUS*, según la estrategia descrita en el apartado V.4.1.2. Los fragmentos purificados fueron clonados en el vector pBI121, sustituyendo la región correspondiente al promotor 35S-CaMV. Una vez más, la integridad de los insertos fue verificada mediante análisis del patrón de restricción y la posibilidad de errores en el clonaje desechada mediante secuenciación de la zona de fusión. De esta manera, se obtuvieron las construcciones pLBI1PS11, pLBI1PS8, pLBI1PS6 y pLBIPS4 que contenían en cada caso las regiones del promotor *DXS1* extendiéndose desde la posición -860/+217, -605/+217, -359/+217 y -188/+217 fusionadas traduccionalmente con el gen *GUS* (Figura II.19). Tales construcciones

conservaban, en todos los casos, la región 5' UTR completa así como los primeros 12 nucleótidos de la región codificante del gen *DXS1*.

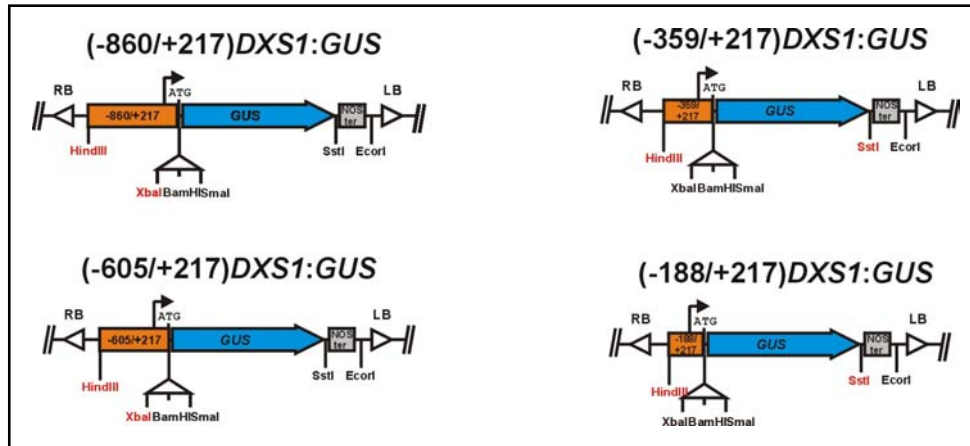


Figura II.19: Representación a escala de las construcciones $(-860/+217)DXS1:GUS$, $(-605/+217)DXS1:GUS$, $(-359/+217)DXS1:GUS$ y $(-188/+217)DXS1:GUS$. Los sitios de restricción utilizados para el clonaje final aparecen señalados en rojo. Las estrategias de clonaje utilizadas en cada caso están detalladas en el apartado V.4.1.2.

Las construcciones obtenidas fueron utilizadas para transformar *Arabidopsis*, siguiendo el método abreviado de infiltración descrito en el apartado V.4.1.3. El análisis de tinción histoquímica de actividad GUS, para cada una de las diferentes líneas transgénicas obtenidas a partir de cada construcción, mostró un patrón que no revelaba diferencias cualitativas mas débiles variaciones relativas a la intensidad de tinción. La Figura II.20 representa el estudio detallado efectuado sobre 10 a 20 de las líneas obtenidas para cada construcción.

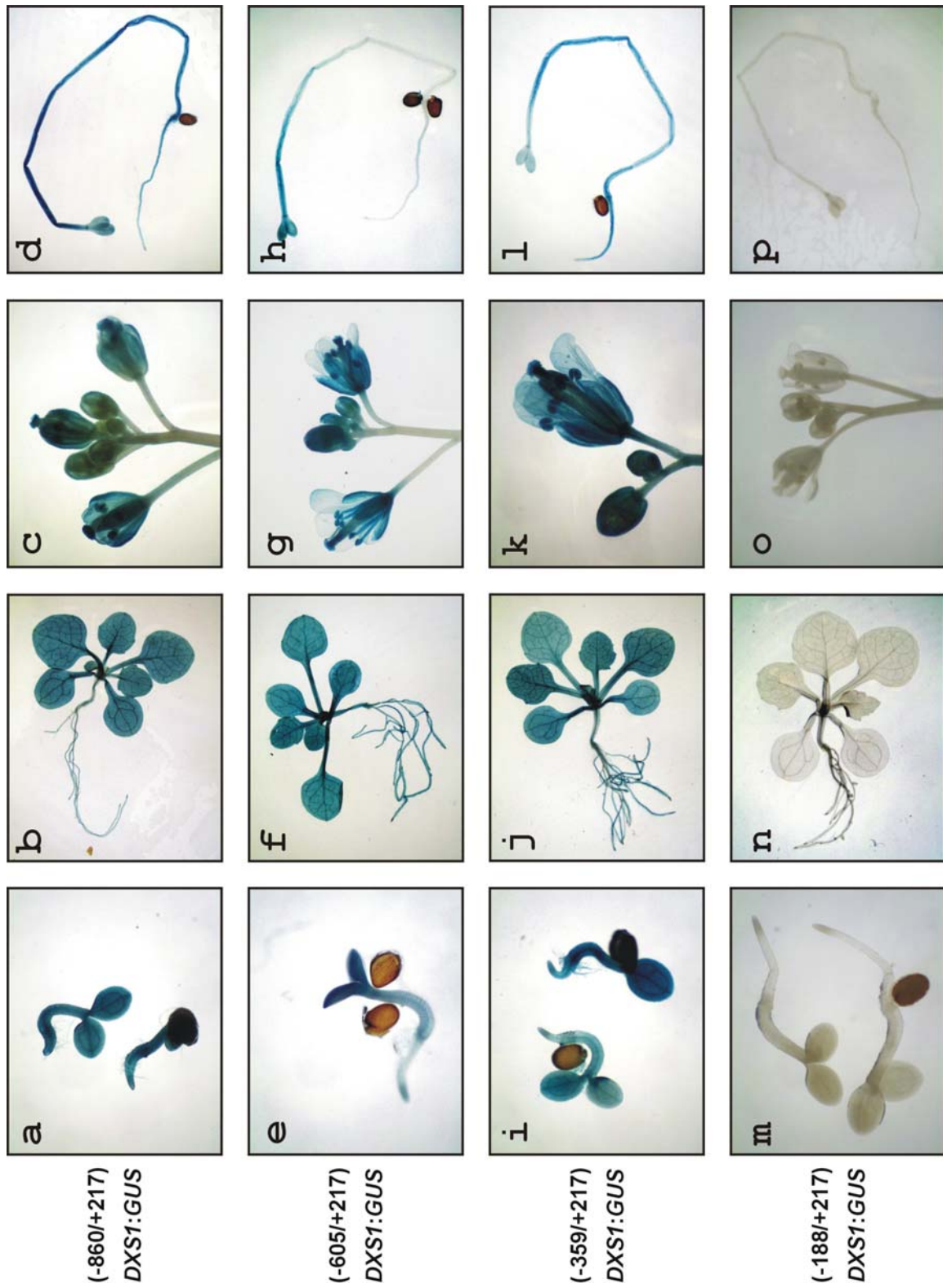
No se apreciaron diferencias cualitativas entre los patrones de expresión del gen quimérico correspondiente al comparar las plantas transformadas con la construcción de referencia $(-1738/+217)DXS1:GUS$, y aquellas portadoras de las tres primeras construcciones analizadas: $(-860/+217)DXS1:GUS$, $(-605/+217)DXS1:GUS$, $(-359/+217)DXS1:GUS$ (Figuras II.16 y II.20). No obstante, y aunque el método de detección no permita realizar determinaciones absolutas de tipo cuantitativo, pudo apreciarse un decaimiento de la expresión entre las plantas portadoras de la construcción $(-860/+217)DXS1:GUS$ y las $(-605/+217)DXS1:GUS$. En efecto, en estas últimas, la intensidad de tinción de las muestras analizadas disminuía manifiestamente, y de modo particular en las plantas etioladas (Figura II.20h) o en germinación (Figura II.20e). El fenómeno inverso tenía lugar entre las muestras procedentes de la línea $(-605/+217)DXS1:GUS$ y las de la línea $(-359/+217)DXS1:GUS$, retornando a intensidades de tinción comparables a los de las plantas $(-860/+217)DXS1:GUS$ y aquellas portadoras del promotor de referencia. Del análisis de todos estos resultados puede

deducirse que las distintas secuencias *cis* implicadas en la regulación transcripcional del promotor *DXS1* aparecen distribuidas en una región muy amplia que, presumiblemente, engloba regiones con capacidad reguladora positiva (incluida entre las posiciones -860/-607), y otras aparentemente represoras de la transcripción (-605/-361)

Sin embargo, lo más destacable de la observación de la Figura II.20 es la total desaparición de actividad GUS detectable en las plantas portadoras de la construcción (-188/+217)*DXS1:GUS* (Figura II.20). En efecto, en estas últimas, no fue detectada actividad GUS en ninguno de los órganos, tejidos y momentos de desarrollo estudiados,. Puede inferirse, por lo tanto, que los elementos mínimos responsables de la actividad del promotor aparecen concentrados en la región situada entre las posiciones -359 a +217. No obstante, y en tanto que desconocemos el umbral de detección de la actividad GUS dirigida por el promotor que nos proporciona esta técnica, no puede descartarse la existencia de otras regiones esenciales para la actividad transcripcional del gen *DXS1* en la zona que se extiende desde la posición -188 a +217, esto es, las englobadas en la construcción (-188/+217)*DXS1:GUS*.

Como consecuencia del conjunto de resultados presentado en los apartados II.3.1.1 y II.3.1.4, se suscitó el análisis del promotor *DXS1* con el objeto de identificar secuencias en *cis* conservadas que hubiesen sido caracterizadas previamente como reguladoras de la expresión génica. En el apartado III.3.3 se detallan y analizan algunos de estos motivos consenso identificados en el promotor *DXS1*, muchos de ellos estrechamente relacionados con la función biológica desempeñada por la *DXS1*.

Figura II.20: Localización histoquímica de la actividad GUS durante las fases vegetativa y reproductiva de plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con los genes quiméricos (-860/+217)*DXS1:GUS*, (-605/+217)*DXS1:GUS*, (-359/+217)*DXS1:GUS* y (-188/+217)*DXS1:GUS*. Las imágenes corresponden a plántulas emergentes de 2 días (a, e, i e m), plántulas de 15 días (b, f, j y n), brotes terminales con inflorescencias maduras (c, g, k y o) y plantas crecidas en oscuridad durante 7 días (d, h, l y p).



II.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA DXS1, DXS2 Y DXR de *Arabidopsis thaliana*.

II.4.1. Complementación funcional de mutantes insercionales de *E. coli*.

II.4.1.1. La expresión de la DXR de *A. thaliana* rescata al mutante de *E. coli* defectivo en el gen *dxr*.

Con la finalidad de demostrar la actividad enzimática de la DXR de *A. thaliana*, el ADNc aislado para el gen *DXR* fue expresado en la cepa mutante de *E. coli* EcAB1-2 en la que el locus correspondiente al gen *dxr* había sido disruptado con un gen marcador de resistencia a la tetraciclina [239]. Esta cepa resulta letal y únicamente es capaz de crecer en medio suplementado con intermediarios de la ruta MEP, tales como el metileritritol (ME), o bien transformándola con un plásmido que codifique para la DXR. De este modo, y como era previsible, la transformación de la cepa EcAB1-2 con una construcción que contenía el gen codificante para la DXR de *E. coli* clonado en el vector pTAC (pTAC-Ec.DXR; Besumbes, O. y cols., resultados no publicados), permitía revertir dicho mutante (Figura II.21).

Asimismo, el mutante EcAB1-2 pudo ser rescatado mediante la transformación con los plásmidos pBAD-At.DXR-L y pBAD-At.DXR-C en presencia de arabinosa. Estas construcciones están basadas en pBADM1 [45], una versión modificada del vector pBAD-GFPuv cuyo promotor presenta la particularidad de poder ser inducido con arabinosa y reprimido con glucosa (Figura II.21, ver apdo. V.5.1.1 para la estrategia de clonaje). El plásmido pBAD-At.DXR-C contenía la forma delecionada en todo el extremo N-terminal específico de la proteína DXR de *A. thaliana* (residuos aminoacídicos 81-477, At.DXR-C) mientras que el plásmido pBAD-At.DXR-L codificaba para una versión truncada de la DXR de *A. thaliana* defectiva en el hipotético péptido de tránsito de dicha proteína y los primeros 7 residuos de la proteína madura (residuos aminoacídicos 57-477, At.DXR-L) (Figura II 9a), en ambos casos bajo el control del promotor pBAD. El resultado obtenido permite concluir que ambas formas ensayadas de la DXR eran funcionales. Sin embargo, el crecimiento observado con la forma larga (At.DXR-L) era ostensiblemente más rápido que el resultante de la transformación con At.DXR-C, como se dedujo del análisis del tamaño de las colonias obtenidas.

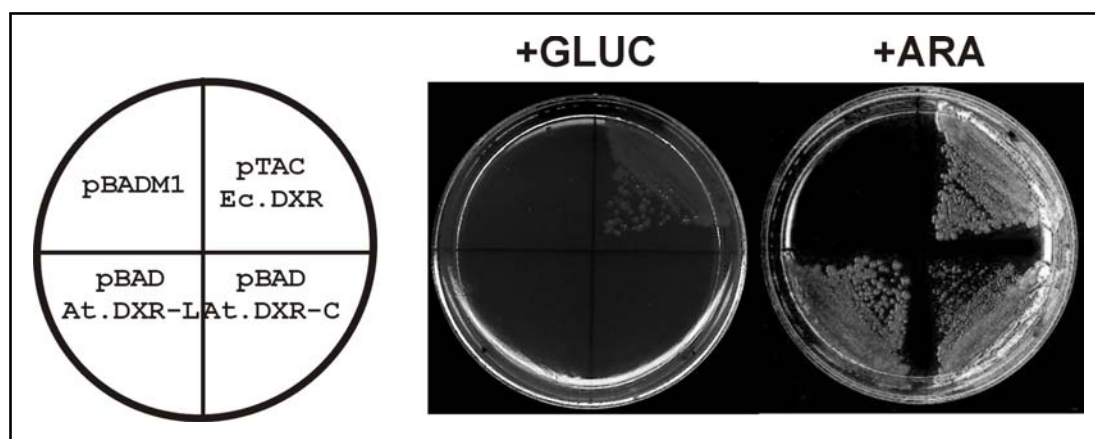


Figura II.21: Experimentos de complementación funcional de mutantes *dxr* de *E. coli* con la DXR de *A. thaliana*. Se utilizó el mutante *EcAB1-2* (*dxr::TET*) para transformar con las construcciones *pBADM1*, como control negativo, los derivados del mismo que codifican para la forma larga (*pBAD-At.DXR-L*) y corta (*pBAD-At.DXR-C*) de la DXR de *A. thaliana* o un plásmido de expresión que codifica para la DXR de *E. coli* (*pTAC-Ec.DXR*) como control positivo. Las transformantes resultantes fueron plaqueadas en medio LB suplementado con 6 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina para seleccionar por el marcador de disrupción presente en el mutante, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina para seleccionar por el plásmido correspondiente, 100 μM de IPTG para inducir la expresión de *Ec.DXR* y 0,02% de glucosa (+GLUC) o arabinosa (+ARA) en cada caso. Las imágenes fueron tomadas después de incubar a 37 °C durante 17 horas.

II.4.1.2. La expresión de la DXS1 de *A. thaliana* rescata al mutante de *E. coli* defectivo en el gen *dxs*, no así la DXS2.

Para esclarecer la actividad enzimática de la DXS1 y la DXS2 de *A. thaliana* se utilizó la cepa *EcAB4-2* de *E. coli*, en la que el gen *dxs* endógeno está disruptado mediante una inserción en el locus correspondiente con el gen marcador de resistencia al cloranfenicol [45]. La presencia del operón sintético MVA+ en el cromosoma bacteriano de dicha cepa [45], facultaba para la síntesis de IPP y DMAPP a partir de MVA suplementado exógenamente (apdo. I.2.3.6). De este modo, el mutante podía ser rescatado adicionando MVA al medio de cultivo o alternativamente mediante la transformación con un plásmido que expresase una forma activa de la DXS.

La transformación de la cepa *EcAB4-2* con la construcción *pTAC-At.DXS1* permitió revertir la auxotrofia del mutante para el mevalonato (Figura II.22b). El vector *pTAC-At.DXS1* contiene la secuencia codificante de la DXS1 de *Arabidopsis* clonado en el vector *pTACTAC*, que permite la expresión de la proteína cuando es puesto en presencia del inductor isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG). En este sentido, es interesante anotar como el crecimiento de la cepa *EcAB4-2* transformada con *pTAC-At.DXS1* era tanto mejor cuanto menor era la concentración de IPTG suplementado al medio de cultivo, y que incluso tenía lugar en ausencia del inductor. Éste

fenómeno fue puesto de manifiesto en experimentos preliminares que permitieron optimizar la técnica, de manera que los resultados mostrados en la Figura II.22b fueron desarrollados en ausencia del inductor, obteniéndose un crecimiento óptimo bajo tales condiciones. La toxicidad de la DXS1 de Arabidopsis cuando es sobreexpresada en *E. coli* podría explicar esta coyuntura, bastando los niveles basales de expresión de la DXS1 bajo el control del promotor pTAC para la reversión del mutante. En cualquier caso, la aproximación seguida permitió verificar como la proteína DXS1 de Arabidopsis era funcional cuando se expresaba en *E. coli*, ratificando su actividad enzimática.

No obstante, los diversos intentos efectuados para revertir la auxotrofia para el MVA del mutante EcAB4-2 con la DXS2 de Arabidopsis no dieron resultado, como muestra la Figura II.22b. Con dicho objetivo, se habían generado las construcciones pLBAD-At.DXS2, que codificaba para la proteína completa, pLBAD-At.DXS2-C, que codificaba para la proteína truncada en el extremo N-terminal a partir del residuo 33 (lugar de procesamiento predicho por el algoritmo CHLORO-P v1.1), y pLBAD-At.DXS2-CC, defectiva en los 44 aminoácidos del extremo N-terminal extra respecto del homólogo procariota, en todos los casos clonados bajo la dirección del promotor pBAD (Figura II. 22a; estrategia de clonaje, ver apdo. V.5.1.1; secuencia peptídica DXS2, ver Figura II.5). La transformación de la cepa EcAB4-2 con las 3 construcciones presentadas no condujo, en ninguno de los casos, al rescate del mutante. La separación electroforética en geles *SDS-PAGE* de extractos crudos de la proteína procedente de aquellas cepas crecidas en presencia del inductor permitió en todos los casos la sobreexpresión, en mayor o menor grado, de las proteínas recombinantes en forma soluble (resultados no mostrados).

El análisis del alineamiento múltiple entre las secuencias peptídicas de DXS de distintos orígenes había revelado la ausencia de una región de 33 aminoácidos en la DXS2 de *A. thaliana*. Dicho dominio, presente en el resto de proteínas DXS descritas hasta el momento (Figura II.5), se extendía concretamente entre los aminoácidos que ocupan las posiciones 277 y 310 de la secuencia correspondiente a la DXS1 de *A. thaliana*. La búsqueda en la base de datos "Blocks" (<http://www.blocks.fhcrc.org/>), de dominios conservados previamente caracterizados en otras enzimas, no desveló ninguna homología significativa, con lo que, aún siendo una región particularmente conservada, no aparecía asociada a ninguna función previamente descrita. A pesar de ello, se planteó la inserción del dominio extra correspondiente de la DXS1 de Arabidopsis en el lugar correspondiente de la DXS2, siguiendo una estrategia de mutagénesis dirigida sobre la construcción pLBAD-At.DXS2-CC basada en la utilización de la Pfu ADN polimerasa y la endonucleasa de restricción DpnI (ver apdo. V.5.1.1). La reacción de *PCR* correspondiente logró amplificar el vector completo utilizado como molde, introduciendo el dominio deseado en el inserto, como así fue comprobado mediante la secuenciación completa del mismo. La imagen b de la Figura II.22 muestra como la transformación de la cepa EcAB4-2 con la construcción resultante, bautizada pLBAD-At.DXS2-CCdom, no logró complementar al

mutante.

En resumen, ninguna de las variantes de la DXS2 de *A. thaliana* ensayadas para transformar el mutante de *E. coli* defectivo en *dxs* lograron rescatarlo, lo cual significaba la inactividad de dicha enzima, al menos cuando es expresada en un sistema bacteriano. Queda abierta, por tanto, la dilucidación del papel bioquímico desempeñado por esta proteína

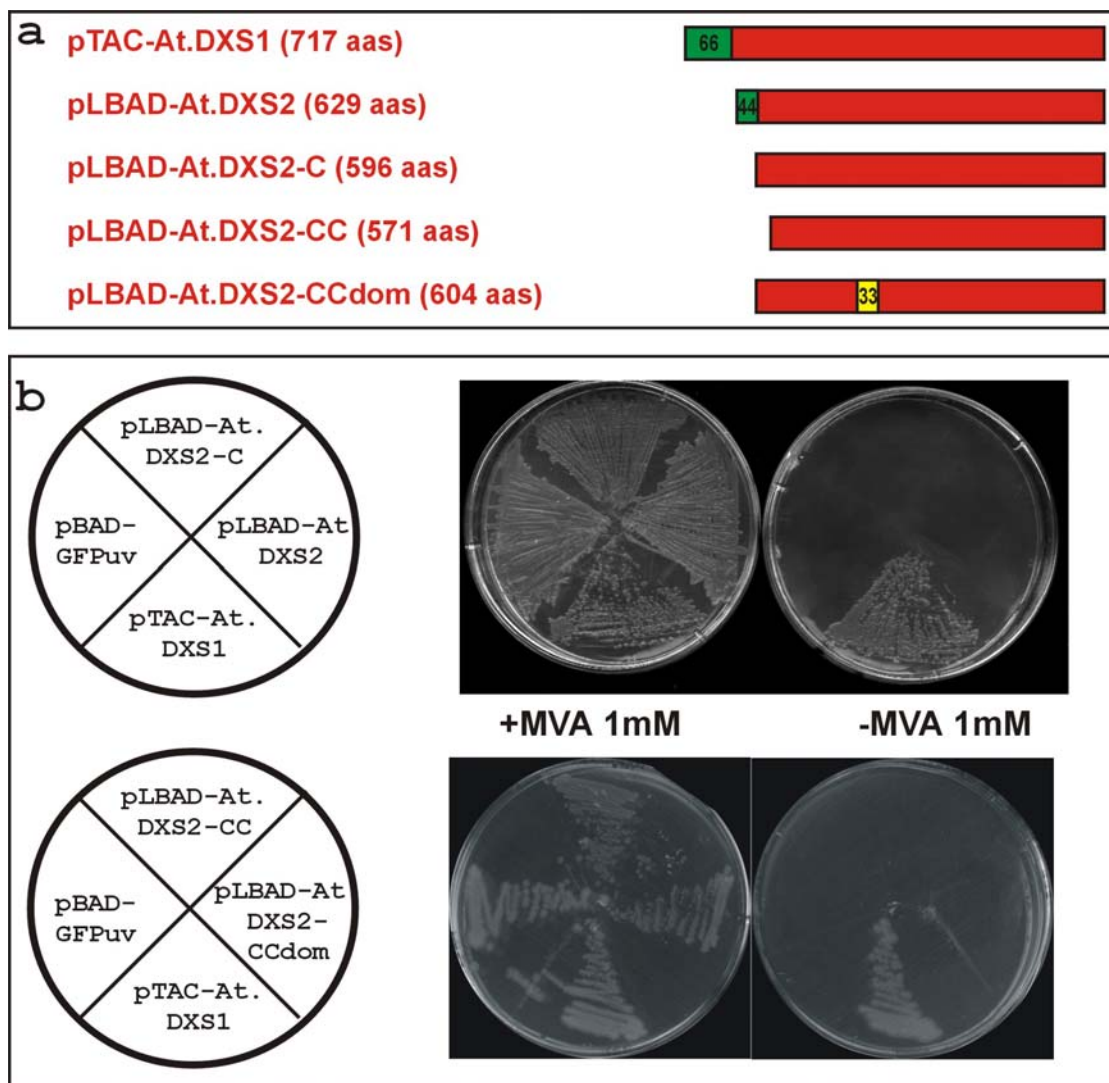


Figura II.22: Ensayos de complementación del mutante *EcAB4-2* de *E. coli* con la DXS1 o la DXS2 de *A. thaliana*. (a), representación esquemática de las secuencias peptídicas expresadas en cada caso, y en las que las cajas rojas representan la proteína madura, las cajas verde los péptidos de tránsito a cloroplastos deducidos por el programa Chloro-P v.1.1, y la caja amarilla el dominio extra de la DXS1 integrada en la posición correspondiente de la DXS2. (b), La cepa mutante de *E. coli EcAB4-2* (*dxs::CAT; MVA⁺*) [45], fue transformada con el vector *pBAD-GFPuv* como control negativo; *pTAC-At.DXS1*, que contiene la secuencia codificante completa de la DXS1 de *A. thaliana*; *pLBAD-At.DXS2*, que codifica para la proteína DXS2

completa; *pLBAD-At.DXS2-C*, que codifica para la región de la proteína DXS2 comprendida entre los aas 33 y 629; *pLBAD-At.DXS2-CC*, comprendida entre los aas 44 y 629 y *pLBAD-At.DXS2-CCdom*, comprendida entre los aas 44 y 629 con el dominio adicional de 33 aas (procedente de la DXS1) integrado entre las posiciones 255 y 256. Las transformantes fueron crecidas hasta 24 horas a 37°C en 2xTY adicionado con 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina, 17 µg/ml de cloranfenicol, arabinosa al 0,2%.

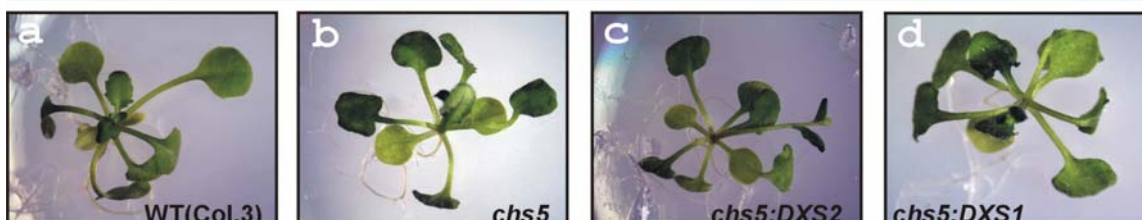
II.4.2. La sobreexpresión del gen *DXS2* no revierte el fenotipo del mutante *chs5* (*DXS1*) de *A. thaliana*.

Los resultados anteriores han mostrado la imposibilidad de rescatar un mutante de *E. coli* defectivo en *dxs* mediante la expresión de la DXS2 de *A. thaliana*. Dado que estos ensayos se han llevado a cabo en un sistema heterólogo de expresión, podían argüirse problemas de plegamiento u estabilidad que limitasen la funcionalidad de la DXS2. Se hacía necesario llevar a cabo el experimento análogo utilizando algún mutante de *Arabidopsis* afectado en la DXS. En este contexto, se planteó abordar la reversión del mutante *chs5*. El mutante *chs5* de *A. thaliana* fue caracterizado en el año 2000 como portador de una sustitución aminoacídica puntual en la posición 627 (Asp627Asn) de la DXS1 [11]. Este mutante desarrolla hojas cloróticas cuando es crecido a temperaturas inferiores a 16 °C, fenocopiando lo observado para el mutante *cla1* del gen *DXS1* [187]. El fenotipo observado resulta de una reducción en las cantidades de pigmentos fotosintéticos sintetizados, aunque menos drástica que la descrita para el mutante *cla1* [101, 187].

En estos experimentos de complementación se transformó un individuo del mutante *chs5* con la construcción resultante de la fusión del promotor 35S-CaMV con el ADNc completo del gen *DXS2*. Asimismo, otra planta *chs5* se transformó con la construcción 35S:*DXS1* (para una descripción de ambas estrategias de clonaje, ver apdo. V.4.1.2). Resultados publicados previamente habían descrito el rescate del mutante *cla1* con la DXS1 de *A. thaliana* [187]. La transformación del mutante con cada una de las construcciones a examen, utilizando el método simplificado de infiltración de *Arabidopsis*, permitió obtener numerosas líneas transgénicas. Dichas líneas positivas se germinaron a temperaturas restrictivas (15-16 °C) o permisivas (22-24 °C) en las que el fenotipo característico del mutante *chs5* no se manifestaba. La imagen g de la Figura II.23 muestra como la sobreexpresión de la DXS2 en el mutante *chs5* no modificaba substancialmente el fenotipo albino característico desarrollado a temperaturas restrictivas. Sin embargo, a temperatura permisivas (Figura II.23c) crecía correctamente y de forma similar al control con individuos de genotipo silvestre (Columbia 3) (Figura II.23a) o del propio *chs5* (Figura II.23b). La imagen muestra una de las líneas representativas analizadas, aunque el mismo comportamiento se repetía con hasta 6 de las líneas *chs5*(35S:*DXS2*) que fueron estudiadas. Por su parte, la presencia de la construcción 35S:*DXS1* en el fondo genético *chs5* revertía nítidamente el aspecto clorótico de las mismas, recobrando las hojas verdaderas la pigmentación propia de los individuos silvestres o de los mutantes crecidos por encima de 22 °C

(Figura II.23h). El mismo efecto era conseguido cuando las plantas *chs5* eran crecidas a 15-16°C en medio suplementado con una concentración 1 mM de DX (Figura II.23e).

22-24 °C



15-16 °C

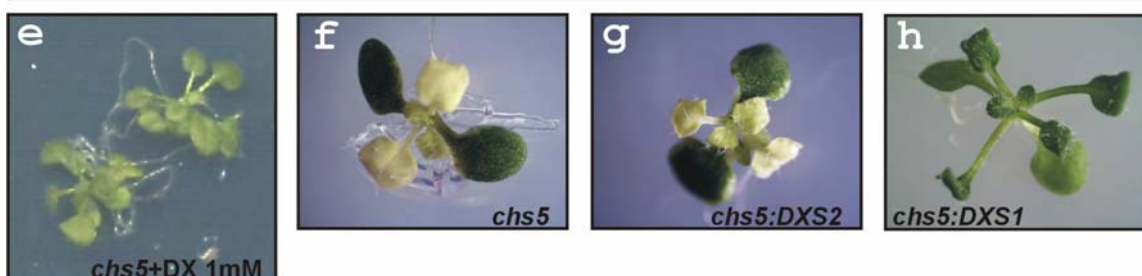


Figura II.23: Ensayos de complementación del mutante *chs5* de *A. thaliana* [11]. Plantas de las líneas silvestres Col.3 (a), *chs5* (b, e y f), *chs5(35S:DXS2-A)* (c y g) y *chs5(35S:DXS1-F)* (d y h) fueron crecidas a temperaturas de 22-24°C (a-d) y 15-16°C (e-h) en medio de germinación sin suplemento adicional (a-d, f-h) o suplementado con 1mM de DX (e).

II.4.3. Utilización de mutantes e inhibidores en el estudio de la función de la DXS1 y la DXR de *A. thaliana*.

II.4.3.1. La expresión del gen *DXR* es inducida en respuesta al tratamiento con los inhibidores fosmidomicina y mevinolina.

En una primera aproximación al estudio del posible papel regulador de la DXS1 y la DXR en el control de la síntesis de isoprenoides en *A. thaliana*, fueron analizados los cambios en la expresión de los genes correspondientes en respuesta al tratamiento con diversos inhibidores de las dos vías de síntesis de IPP que coexisten en las células vegetales, la ruta MEP y la ruta del MVA. Los tratamientos fueron aplicados a plántulas crecidas durante 7-9 días en medio líquido y bajo luz continua. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron cada uno de los inhibidores y se recogieron muestras a diferentes tiempos, procesándose con el objeto de obtener ARN y proteínas. A partir de ellos se realizaron los experimentos de *northern-blot* y *western-blot* que se detallan a continuación.

Los resultados de los experimentos realizados con fosmidomicina (Fm), inhibidor específico de la DXR, se muestran en la Figura II.24. Resulta notorio el enérgico incremento en los niveles de proteína DXR en respuesta a la presencia de fosmidomicina 100 μ M, incremento que tenía lugar desde, al menos, una hora después del tratamiento (Figura II.24b). Por el contrario, los valores de proteína DXS1 no se veían modificados sustancialmente (Figura II.24b). La disminución progresiva en los niveles de proteína, especialmente pronunciada para la DXS1, pudo venir justificada por un efecto citotóxico general del inhibidor.

Cuando se analizaron los niveles respectivos de ARNm en las mismas muestras, se observó similar comportamiento en cuanto a la inducción del transcrito *DXR*. La Figura II.24a muestra como, efectivamente, el perfil de respuesta era similar al encontrado para la proteína, aunque menos acusado. Estos resultados sugieren que la respuesta del gen *DXR* frente a la fosmidomicina es de naturaleza transcripcional. Sin embargo, los cambios encontrados a nivel de mensajero resultaban menos acusados que los verificados para la proteína, apuntando hacia la existencia de mecanismos adicionales de control postranscripcional. Por su parte, los niveles de mensajero *DXS1* permanecieron inalterados (Figura II.24a).

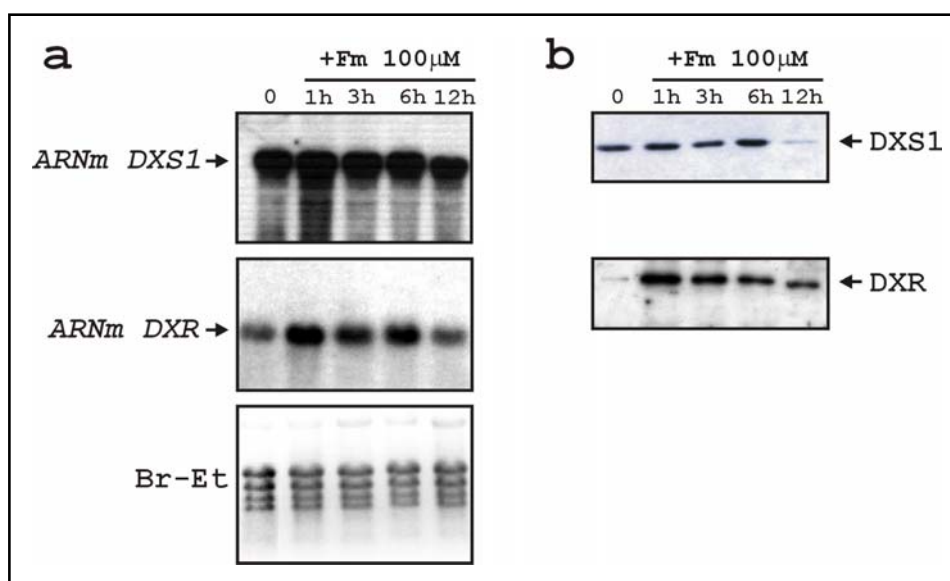


Figura II.24: Estudio de la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* en respuesta a fosmidomicina. (a), experimento de northern-blot sobre 10 μ g de ARN obtenido a partir de cultivos en medio líquido de *A. thaliana* crecidos durante 8 días bajo luz continua, y posteriormente suplementadas durante los tiempos indicados con fosmidomicina 100 μ M (descripción de las sondas utilizadas, apdo. V.5.2.3). (b), Análisis análogo por western-blot con 20 μ g de proteína por muestra.

La adición de mevinolina (inhibidor específico de la HMGR y, por lo tanto, de la ruta citosólica del MVA de síntesis de IPP) al medio de cultivo a una concentración 2,5 μ M, también determinó una inducción en los niveles de proteína DXR, aunque en este caso más lenta y

moderada (Figura II.25b). Una vez más, este efecto era manifestado exclusivamente por la proteína DXR, alcanzándose el pico en el acúmulo de proteína únicamente transcurridas 6 horas después el tratamiento. Por el contrario, no fueron observadas diferencias significativas de los valores de mensajero *DXS1* y *DXR* en los experimentos análogos de *northern-blot* (Figura II.25a).

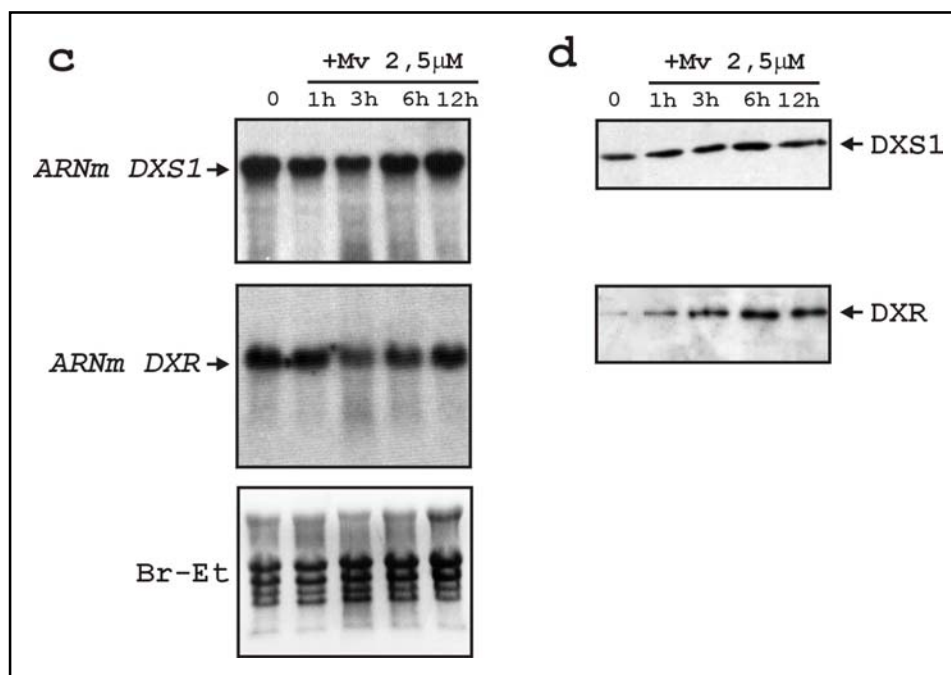


Figura II.25: Estudio de la respuesta de los genes *DXS1* y *DXR* a la presencia de mevinolina. (a), experimento de *northern-blot* sobre 20 μg de ARN obtenido a partir de cultivos en medio líquido de *A. thaliana* crecidos durante 8 días bajo luz continua, y posteriormente suplementados durante los tiempos indicados con mevinolina 2,5 μM (sondas utilizadas, apdo. V.5.2.3). (b), experimento análogo de *western-blot* con 20 μg de proteína en cada caso.

Por su parte, tratamientos con Fm y Mv análogos a los anteriormente descritos fueron también realizados sobre plántulas transgénicas de las líneas (-1738/+217)*DXS1:GUS* y (-1158/+94)*DXR:GUS*, sin que se observasen cambios cualitativos apreciables en el patrón de expresión *GUS* con respecto a las mismas plantas sin tratar (resultados no mostrados).

Habida cuenta de la respuesta protagonizada por la DXR a la presencia de los inhibidores fosmidomicina y mevinolina, nos propusimos profundizar en la posible capacidad de respuesta de la DXR frente a cambios en las concentraciones de productos isoprenoides finales sintetizados a través de la vía MEP y la vía del MVA. Para ello fueron planteados experimentos utilizando los inhibidores norflurazón (Nf) [23, 109, 274, 317] y ácido zaragóxico (ZA) [4, 27] respectivamente. Se trata aquél de un herbicida que ejerce un efecto específico sobre la

actividad fitoeno desaturasa (PDS), provocando la aparición de un fenotipo albino, consecuencia directa de un bloqueo total en la biosíntesis de carotenoides. Por su parte, el ácido zaragózico es un inhibidor que actúa bloqueando específicamente la reacción catalizada por la escualeno sintasa (SQS), primer paso exclusivo de la ruta que dirige el IPP citosólico hacia la síntesis de esteroides. La aproximación metodológica era similar a la planteada en los experimentos con Fm y Mv. El resultado se muestra en la Figura II.26a, y permite constatar como no existen cambios aparentes en cuanto a las cantidades de proteína DXR en respuesta a ninguno de los dos inhibidores.

En la misma línea, se estudiaron posibles cambios en la expresión del gen *DXR* en respuesta al ácido abscísico (ABA). El ABA es una fitohormona sintetizada como producto de degradación de los carotenoides, es decir derivada de IPP plastídico, y que actúa a su vez como un regulador del crecimiento implicado particularmente en procesos fisiológicos desencadenados frente a situaciones variadas de estrés que pueda sufrir la planta. No resultaron apreciables cambios significativos en los niveles del transcrito correspondiente al gen *DXR* cuando fue observado después de un tratamiento de 3 horas con ABA (Figura II.26b).

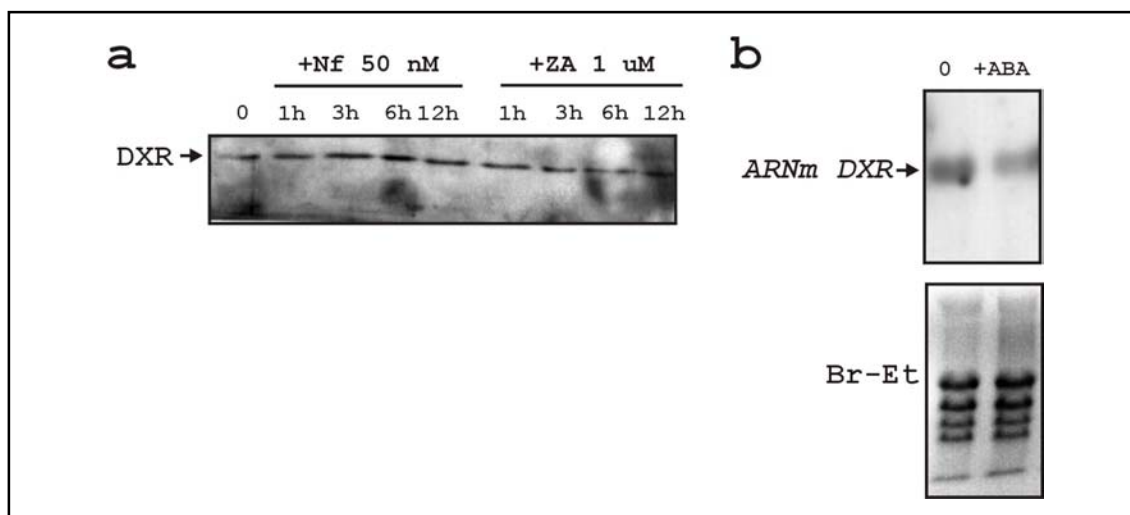


Figura II.26: Estudio de la respuesta del gen *DXR* a la presencia de norflurazón, ácido zaragózico y ácido abscísico (ABA). (a), experimento de western-blot con el anticuerpo específico frente a la DXR y 10 μ g de proteína extraídos a partir de plántulas crecidas 8 días en medio líquido bajo luz continua y sometidas posteriormente a un tratamiento con concentraciones de 50 nM de Nf y 1 μ M de ZA. (b), Detección mediante northern-blot del transcrito correspondiente a la DXR sobre muestras crecidas durante 3 horas con una concentración de ácido abscísico (ABA) de 10 μ M, junto al control correspondiente a tiempo 0.

II.4.3.2. Herramientas para el estudio de la función de las proteínas DXS1 y DXR en el desarrollo de los plástidos.

Una de las aproximaciones que se plantearon con el objetivo de definir el papel biológico de los genes *DXS1* y *DXR* fue la de estudiar el fenotipo de las plantas tratadas con fosmidomicina, en tanto que inhibidor específico de la DXR capaz de bloquear la ruta de síntesis de isoprenoides plastídicos, así como el del mutante *chs5*, previamente caracterizado como afectado en el paso catalizado por la DXS (apdo. II.4.2; [11]), o la línea 35S:*DXR*-b1.A, en la que el gen *DXR* endógeno se encuentra silenciado, y que examinaremos en detalle más adelante (apdo. II.4.4.3). El análisis del fenotipo originado por el tratamiento con norflurazón sirvió como control para verificar la especificidad de las alteraciones observadas, particularmente aquellas encontradas a nivel de ultraestructura.

Estudio del fenotipo resultante del tratamiento con fosmidomicina y norflurazón.

Los experimentos realizados germinando *Arabidopsis* en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores fosmidomicina y norflurazón permitieron delimitar las concentraciones mínimas susceptibles de bloquear por completo el crecimiento de las plántulas. Y es que, si bien la germinación no aparecía interrumpida como consecuencia de ninguno de los dos tratamientos, el desarrollo de hojas verdaderas aparecía restringido por encima de 50 μ M de fosmidomicina y de concentraciones de 10 a 25 nM de norflurazón. En cualquier caso, el bloqueo en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos provocado por ambos inhibidores, concretamente de los carotenoides en el caso del norflurazón, provocaba la aparición de un fenotipo albino tanto más acusado cuánto mayores eran las concentraciones del inhibidor. No obstante la naturaleza del fenotipo observado era distinta en uno en otro caso. El albinismo inducido por el norflurazón es originado por la degradación fotooxidativa de la clorofila consecuencia de la ausencia de pigmentos carotenoides. Por su parte, el fenotipo clorótico, característico del tratamiento con fosmidomicina es originado por un bloqueo global de la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos, compuestos de naturaleza isoprenoide producidos en los plástidos.

Las imágenes a, b y c de la Figura II.27 muestran los cloroplastos de una célula de plántula no sometida a ningún tratamiento, con los grana y acúmulos de almidón característicos, propios de una hoja vegetativa emergente. Concretamente, la imagen c permite estimar el número de cloroplastos que pueden encontrarse en un corte de célula foliar subepidérmica típica, presumiblemente del mesófilo. Por su parte, el estudio por microscopía electrónica de cortes ultrafinos obtenidos a partir de las primeras hojas verdaderas de plantas crecidas a concentraciones subletales de los inhibidores fosmidomicina y norflurazón permitió observar defectos a nivel ultraestructural, así como una reducción en el número de plástidos por célula que en algunos casos extremos pueden llegar a desaparecer por completo, al menos en algunas células, (Figura II.27f). El tamaño de los plástidos observados (o más correctamente

pseudocloroplastos) en las plantas tratadas era sensiblemente menor al de los cloroplastos silvestres, aunque en cualquier caso mayor que el de los proplástidos (3-5 μm versus 0,5-1 μm). También desaparecía la forma característica de los mismos, tornándose deformados y con un perfil irregular. Sin embargo, aunque ambos inhibidores afectasen el desarrollo de los cloroplastos, las alteraciones producidas en cada caso no resultaban idénticas, como se observa en las imágenes d, e y f que refleja las muestras crecidas con fosmidomicina, o g, h e i para el norflurazón. La ausencia generalizada de membranas tilacoidales correctamente organizadas era una característica compartida en ambos casos, si bien, ciertas estructuras de membrana eran aún apreciables en algunos pseudocloroplastos, sobre todo en aquellos procedentes de plantas tratadas con Fm 25 μM . Por su parte, los plástidos de las plantas crecidas a concentraciones de Nf de 10 nM, aparecen generalmente como estructuras vacuoladas, destacando además la presencia de numerosas vesículas esféricas agrupadas y fuertemente electrodensas, similares a los plastoglobuli, aunque más heterogéneos en cuanto al tamaño, estructuras estas últimas detectadas también en plástidos tratados con fosmidomicina aunque únicamente en aquellos particularmente afectados. Dichas estructuras han sido descritas en distintos mutantes alterados en el desarrollo de los cloroplastos, tales el mutante *immutans* [8, 47, 144, 316, 317] afectado en una oxidasa terminal de naturaleza plastídica cuya actividad está asociada a la de la fitoeno desaturasa [47], o "yellow variegated" [57, 58], bloqueado en una proteasa dependiente de ATP implicada en mecanismos plastídicos de degradación proteolítica. Se trata en ambos casos de mutantes de *A. thaliana* de naturaleza variegada, en los que aparecen cuerpos esféricos intraplastídicos que han sido caracterizados como acúmulos de quinonas, carotenoides, tocoferoles u otros isoprenoides plastídicos, así como intermediarios en la síntesis de todos ellos.

Por su lado, es interesante señalar como, y en las plantas sometidas a ambos tratamientos, coexisten células adyacentes con plástidos en variados estadios de desarrollo, que muestran una graduación en cuanto a lo rudimentario de las estructuras lamelares y en cuanto al número y tamaño de las vacuolas.

Finalmente, destacar como las alteraciones citológicas observadas en ambas muestras aparecen limitadas a la estructura de los cloroplastos. La micrografía i de la Figura II.27 muestra, por ejemplo, una mitocondria morfológicamente madura con un desarrollo correcto de las membranas internas procedente de una planta crecida en presencia de norflurazón 10 nM.

El análisis ultraestructural del mutante *chs5* reveló malformaciones plastídicas similares a las observadas con el tratamiento con fosmidomicina.

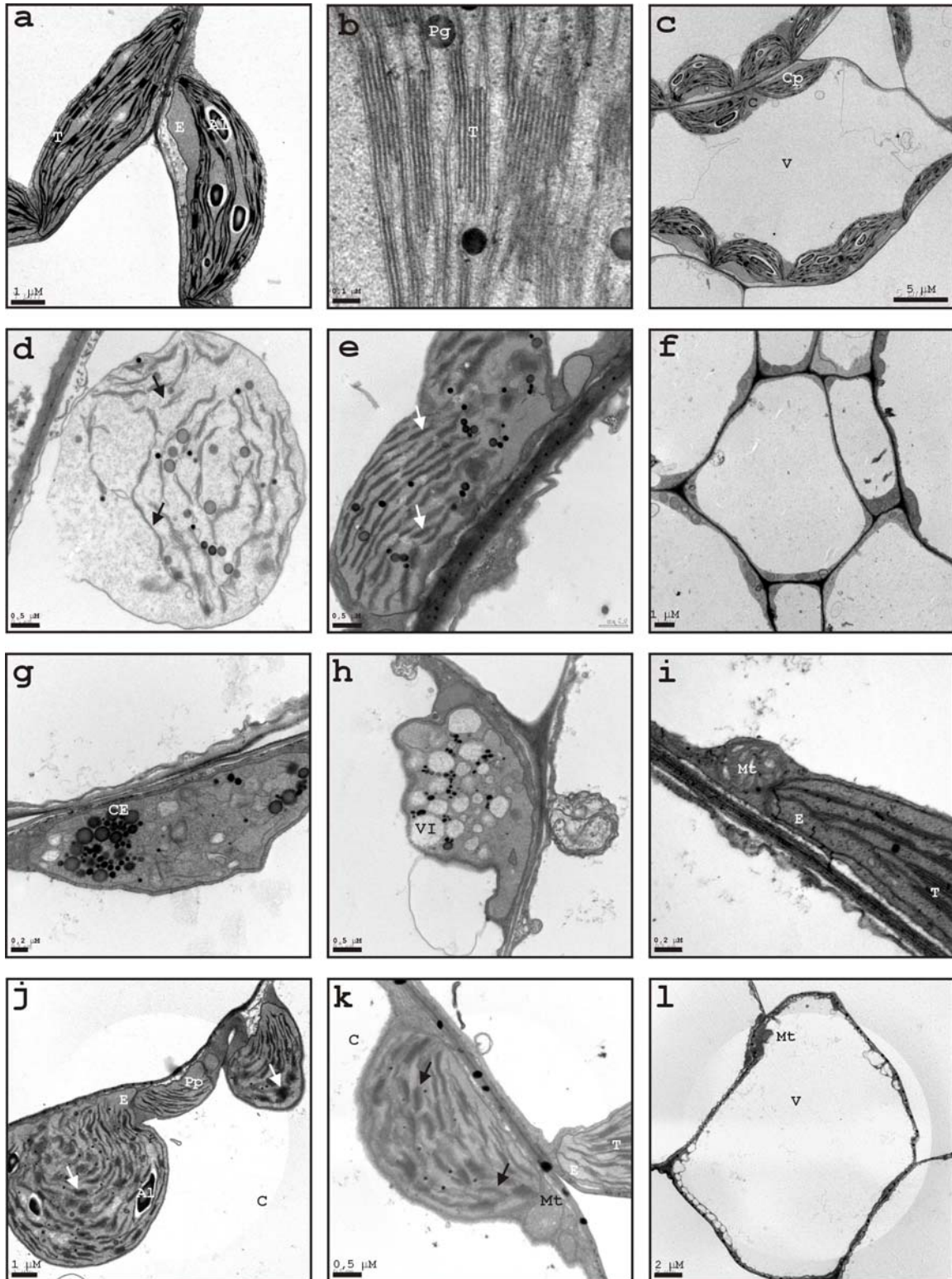
Atendiendo al fenotipo albino característico manifestado por el mutante *chs5* (Figura II.23f), resultaban esperables los desarreglos ultraestructurales en los cloroplastos, del modo como ilustran las micrografías electrónicas de la Figura II.27j, k y l. Tales alteraciones morfológicas parecen corresponderse con las observadas para las plantas silvestres tratadas con fosmidomicina. En efecto, el aspecto deformado de los cloroplastos abortados en el desarrollo

propios del fenotipo anteriormente observado con el inhibidor de la DXR resultaba también notable en este mutante. Aún más, una cierta heterogeneidad en el aspecto de los plástidos estudiados así como de las estructuras de membrana generadas parece también observarse en el caso del mutante *chs5*, a pesar de tratarse de muestras homogéneas en cuanto a lo pronunciado del fenotipo (Figura II. 27j y k). De la misma manera, era patente una reducción en el número de orgánulos plásticos en el mutante crecido a 16 °C (Figura II.27l). Sin embargo, en este caso, no fueron observados los cuerpos esféricos característicos de los plástidos más severamente afectados por cualquiera de los dos inhibidores empleados (Figura II.27e, g y h), estructuras que también estaban ausentes del mutante *cla1* [187]. Finalmente, y del modo como ocurría en las células de plantas tras el tratamiento con los inhibidores, ningún otro orgánulo, aparte de los cloroplastos, aparece alterado en el mutante *chs5*, como muestran las mitocondrias morfológicamente maduras de las imágenes k y l de la Figura II.27.

A la luz de todos estos resultados puede inferirse que el bloqueo en la síntesis de isoprenoides plásticos (originado por el inhibidor fosmidomicina o en el mutante *chs5* crecido a temperaturas restrictivas), o más concretamente de carotenoides (derivados del tratamiento con norflurazón) provoca alteraciones graves en el desarrollo de los cloroplastos que serían, presumiblemente, responsables de la letalidad de los individuos correspondientes. A estos resultados se unirán los obtenidos tras el examen microscópico de la línea 35S:DXR-b1.A y que serán expuestos en el apartado II.4.4.3.

Figura II.27: Análisis ultraestructural de células de plántulas de *A. thaliana* tratadas con fosmidomicina o norflurazón, no tratadas y procedentes del mutante *chs5* [11]. Las micrografías electrónicas se obtuvieron a partir de cortes ultrafinos (apdo. V.4.5.1) de las primeras hojas vegetativas de plántulas crecidas durante 10-12 días y corresponden a las siguientes muestras: (a, b, c) plantas de *A. thaliana* ecotipo Col. 3 crecidas sin tratamiento; plantas crecidas en presencia de fosmidomicina 25 μ M (d, e y f) o norflurazón 10 nM (g, h e i) y, finalmente, aquellas pertenecientes al mutante termosensible *chs5* crecidas a temperaturas restrictivas (15-16 °C) (j, k y l). Las abreviaturas sobre las imágenes señalan respectivamente: Al, gránulos de almidón cloroplastídicos; C, citoplasma; CE, cuerpos esféricos; E, estroma; Mt, mitocondria; Pg, plastoglobuli; T, membranas tilacoidales; V, vacuola y VI, vacuolas intraplásticas. Las flechas indican membranas tilacoidales presuntamente abortadas durante el desarrollo.

II. RESULTADOS



II.4.4. Estudio de la función de los genes *DXS1* y *DXR* mediante aproximaciones de genética reversa.

Una estrategia comúnmente utilizada para el estudio de la función biológica de un gen es la basada en la genética reversa, aproximación que permite modificar los niveles de expresión de un gen a través de la generación de plantas transgénicas que expresan el ADNc correspondiente a dicho gen en dirección sentido o antisentido. El estudio del fenotipo resultante permite profundizar en la función desempeñada en la planta por la proteína codificada por el gen correspondiente.

II.4.4.1. La sobreexpresión de la *DXR* conduce a un significativo incremento en los niveles de clorofilas y carotenoides.

Con el propósito de abordar el estudio del fenotipo resultante de la sobreexpresión del gen *DXR*, fue generada una construcción basada en el sistema de vectores binarios pBI121 en la que la secuencia codificante completa del gen *DXR* fue puesta bajo el control del promotor 35S-CaMV. Dicho promotor ha sido ampliamente caracterizado por desencadenar una expresión fuerte y constitutiva en diversos sistemas vegetales, incluido *A. thaliana*. Una vez más, se confirmó la integridad de la construcción mediante estudio del patrón de restricción y se revisó, mediante secuenciación, la región de clonaje (apdo. V.4.1.2).

Dicha construcción, denominada pLBI1DXR10 (Figura II.28a), fue la utilizada para la transformación de plantas adultas de *A. thaliana* var. Col. 3. Al final del proceso se recuperaron 5 líneas positivas seleccionadas por su resistencia a la kanamicina, cuyo marcador aparece acompañando al transgén en el ADN-T. Los estudios de segregación revelaron que el carácter resistencia al antibiótico seguía una herencia mendeliana en 3 de estas líneas, en las que aparecía una relación de 1:3 descendientes $Km^S:Km^R$, indicativo de la presencia de una única copia del transgén (Tabla II.1). Estas 3 líneas, que fueron designadas 35S:*DXR*-1, 35S:*DXR*-2 y 35S:*DXR*-b1, derivaban de episodios independientes de transformación. A partir de ellas se acometió la obtención de segregantes homocigóticos para el carácter resistencia al antibiótico (generación T3), resultando en las líneas 35S:*DXR*-1.C, 35S:*DXR*-2.B y 35S:*DXR*-b1.A. Sobre estos ejemplares se realizaron los estudios que se detallan a continuación.

	35S: <i>DXR</i> -1	35S: <i>DXR</i> -2	35S: <i>DXR</i> -B1A
Relación $Km^R:Km^S$	65:25	61:21	40:15

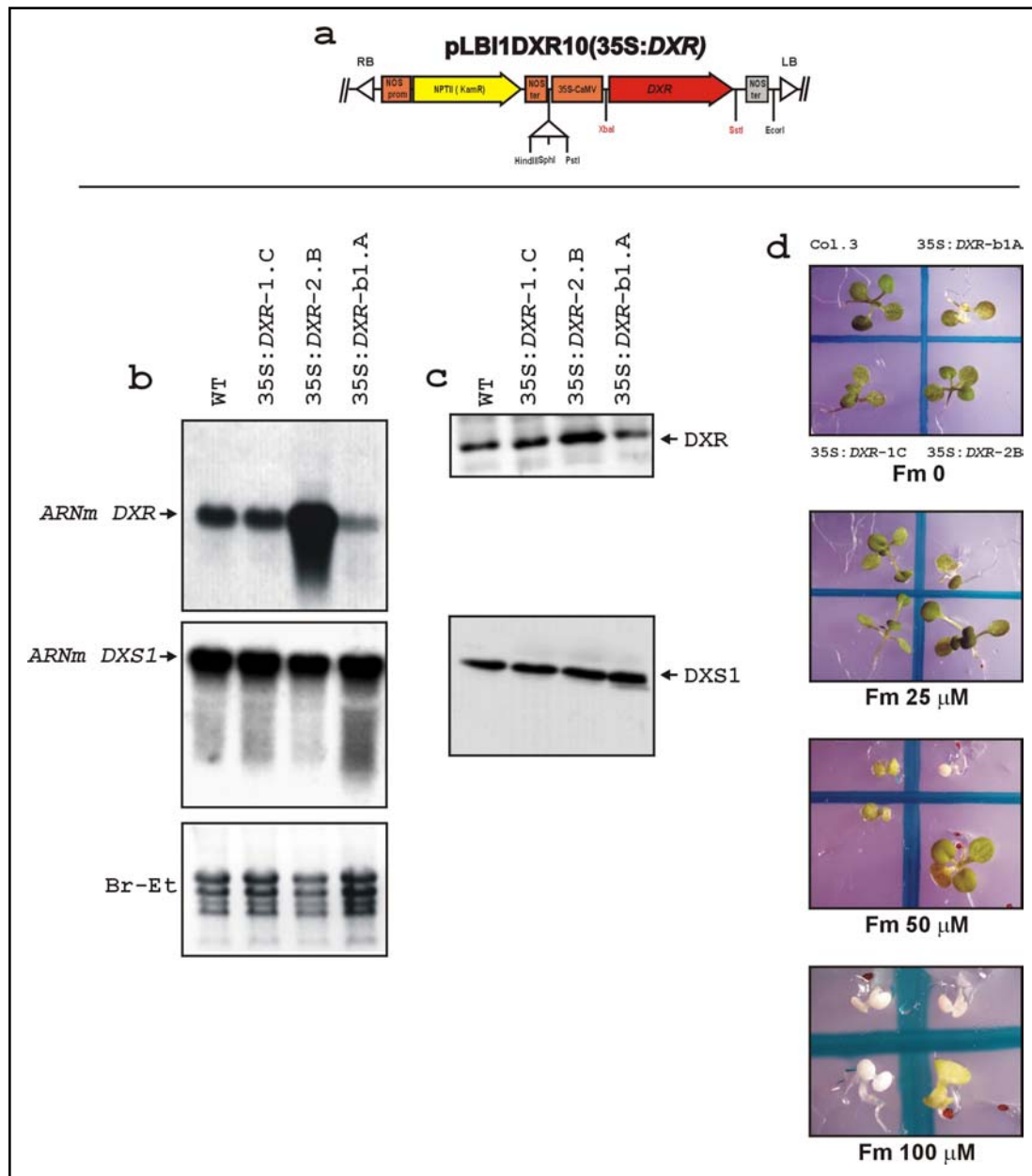
Tabla V.1: Análisis de la segregación T2 de las líneas 35S:*DXR* mediante el recuento de la relación entre el número de individuos resistentes a kanamicina (Km^R) o sensibles a kanamicina (Km^S).

Los análisis de *northern-blot* sobre muestras obtenidas a partir de hojas de plántulas de 12 días de cada una de las 3 líneas transgénicas estudiadas y la variedad silvestre Columbia 3,

revelaron niveles incrementados del mensajero únicamente para la línea 2.B (Figura II.28b). Por su parte, los niveles de transcrito observados para la línea 1.C resultaban similares a los del control. Finalmente, la línea 35S:DXR-b1.A presentaba niveles reducidos de ARNm, apuntando hacia un fenómeno de cosupresión. Subsiguientemente, fueron analizados en las mismas 3 líneas los niveles de proteína DXR mediante *western-blot*, confirmándose las variaciones respecto al control según el patrón observado para los niveles de ARNm respectivos (Figura II.28c). De igual modo fueron analizados los niveles de transcrito y proteína DXS1 en las mismas líneas transgénicas 35S:DXR, no observándose ningún cambio significativo respecto de lo verificado por el control (Figura II.28b y c). Por lo tanto, la presencia del transgén 35S:DXR no era responsable de cambios concomitantes en la expresión del gen responsable de la actividad enzimática DXS.

Por otra parte, y a pesar de que hasta el momento no se ha puesto a punto ningún método fiable para detectar la actividad enzimática DXR en extractos de *Arabidopsis*, obtuvimos una estimación indirecta de dicha actividad catalítica gracias a los estudios de la resistencia mostrada por cada una de las líneas 35S:DXR al inhibidor fosmidomicina (Figura II.28d). La línea 35S:DXR-2.B, esto es, aquella que mostraba niveles acrecentados de mensajero y proteína DXR manifestaba una mayor resistencia desde una concentración 25 μM de Fm, concentración a la que se aprecia ya un cierto retraso en el crecimiento de las demás líneas. La diferencia en cuanto a las resistencias mostradas por las distintas líneas se hacía más evidente a partir de concentraciones de 50 μM . A 100 μM del inhibidor la despigmentación resultaba patente en todas las líneas excepto en la 35S:DXR-2.B, algunos de cuyos individuos conservaban cierta coloración verde incluso a una concentración 200 μM de Fm (resultados no mostrados). Coherentemente, la línea 35S:DXR-b1.A, supuestamente cosuprimida, resultaba más sensible a la Fm. Una estimación cuantitativa de este fenómeno aparece reflejado en la gráfica de la Figura II.36 (apdo. II.4.5.1).

Figura II.28: Caracterización molecular de las plantas transgénicas 35S:DXR. (a), representación esquemática a escala de la región de ADN-T del vector pLBIDXR10, mostrando los sitios de clonaje utilizados. (b), experimentos de *northern-blot* con 20 μg de ARN procedentes de las primeras hojas verdaderas de plántulas de las líneas 35S:DXR-1.C, 2.B y b1.A y de un control de genotipo silvestre (Col. 3). La membrana resultante fue hibridada con sondas obtenidas a partir del ADNc de los genes DXS1 y DXR (apdo. V.5.2.3); c, análisis por *western-blot* con 20 μg de proteína detectados con los anticuerpos ANTI-DXS1 y ANTI-DXR; d, fotografías de plántulas de cada una de las líneas transgénicas analizadas crecidas durante 10 días (Fm 0) ó 14 días (imágenes restantes), a las concentraciones indicadas del inhibidor fosmidomicina.



El fenotipo de aquellas líneas que mostraban variaciones significativas de mensajero, proteína y resistencia a la fosmidomicina, esto es, las líneas 35S:DXR-2.B y 35S:DXR-b1.A, no manifestaba ningún cambio morfológico relevante, como se dedujo de la observación de las plántulas en diferentes momentos de desarrollo así como de los tejidos y órganos de la planta adulta. Sin embargo, un examen más minucioso permitió observar una intensificación del color verde en las primeras hojas verdaderas de la línea 35S:DXR-2.B. Por su parte, la línea cosuprimida 35S:DXR-b1.A presentaba un fenotipo albino particular que se manifestaba de forma variegada, alternando sectores verdes y blancos distribuidos de modo aparentemente estocástico a partir del primer par de hojas verdaderas. El fenotipo de estas plantas será descrito con más detenimiento en los 2 epígrafes siguientes.

II. RESULTADOS

Las observaciones en cuanto a las diferencias en la pigmentación verde entre las diferentes líneas fueron corroboradas mediante la cuantificación de pigmentos fotosintéticos. En efecto, la gráfica de la Figura II.29 refleja como la línea 35S:DXR-2.B presenta un incremento significativo en las cantidades de clorofilas y carotenoides totales, alcanzando en el caso particular de la clorofila A un 142,6 % de los valores obtenidos para la planta control. Coherentemente, dichos valores aparecen disminuidos en las muestras procedentes de la línea 35S:DXR-b1.A, reduciéndose los valores de clorofila A en aquellos sectores particularmente afectados hasta un 30 % de los medidos en la planta silvestre. De esta forma, los cambios en el contenido en pigmentos parecían correlacionar con los niveles de expresión detectados en este caso. Finalmente, en ninguno de los casos parecían observarse cambios en las ratios clorofila a/b o clorofilas/carotenoides respecto de las medidas para la variedad silvestre Col. 3 de *Arabidopsis*, ratios que, por otro lado, reflejan el estado fisiológico de la planta (datos no mostrados).

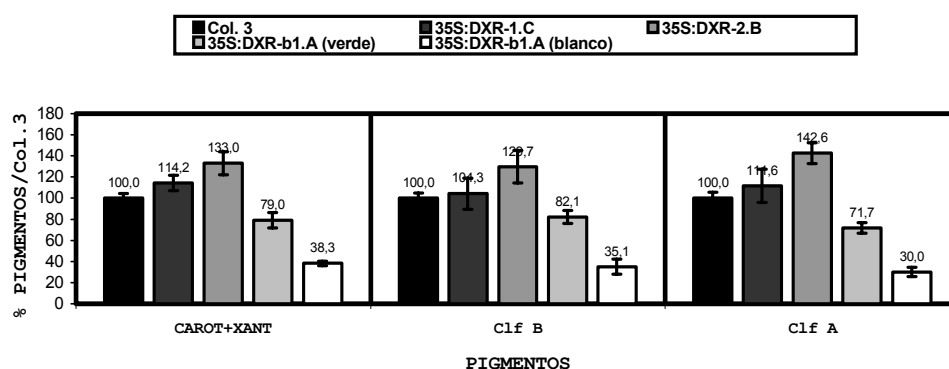


Figura II.29: Análisis cuantitativo de clorofilas y carotenoides de plantas 35S:DXR (parte aérea). Cuantificación realizada sobre muestras de hojas procedentes de las líneas 35S:DXR-1.C, 35S:DXR-2.B, 35S:DXR-b1.A y Col. 3 de *A. thaliana*, midiendo 3-4 réplicas para cada una de ellas según una adaptación del método de Lichtenthaler [170] (apdo. V.4.8). Las muestras correspondientes a la línea 35S:DXR-b1.A fueron clasificadas en dos grupos en función de la severidad del fenotipo que presentaban (blanco y verde). Las columnas representan las cantidades de pigmento así estimadas, que, para mayor claridad en la exposición de los datos, han sido representadas como valores porcentuales relativos a los obtenidos para la variedad Col. 3 silvestre. Las barras representan, en cada caso, las desviaciones estándar. CAROT+XANT, carotenoides y xantofilas; Clf B, clorofila B y Clf A, clorofila A.

Otro aspecto del fenotipo de las líneas 35S:DXR estudiado fue el referido al desarrollo de las radículas, habida cuenta de la notoria expresión alcanzada en dichos tejidos por el gen *DXR*. Con el objeto de facilitar la observación y medición de las mismas, las plántulas de cada una de

las líneas fueron crecidas durante 2 semanas en placas dispuestas perpendicularmente al suelo. No pudo apreciarse ninguna alteración en el patrón de desarrollo morfogénético en ninguno de los casos durante el tiempo en que se efectuó el seguimiento. Aún más, tampoco fueron apreciadas variaciones significativas en cuanto a la longitud alcanzada por las raíces de las diferentes líneas, tal y como refleja la gráfica de la Figura II.30.

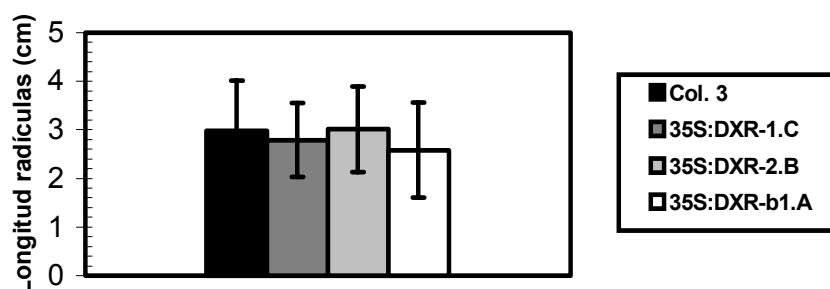


Figura II.30: Estudio de la longitud de las radículas de las plantas 35S:DXR. Medición efectuada sobre 15-25 raíces de plántulas de 11 días de cada una de las líneas crecidas bajo condiciones de fotoperiodo de día largo. Las columnas representan las medias correspondientes a cada una de las mediciones, y las barras, las desviaciones estándar correspondientes.

II.4.4.2. La línea 35S:DXR-b1.A manifiesta un fenotipo variegado.

Como acabamos de ver, la línea 35S:DXR-b1.A presenta unos niveles reducidos del mensajero y proteína DXR, así como de resistencia a la fosmidomicina (Figura II.28 y 35), muy probablemente debidos a un fenómeno de cosupresión. A través de este fenómeno, y por medio de un mecanismo poco conocido, la planta reprime los niveles de expresión del gen endógeno, homólogo al introducido mediante la transgénesis [83, 236, 302]. Por todo esto, y de acuerdo con el papel que la enzima DXR tiene en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, resultaba esperable la aparición de un fenotipo albino en la línea 35S:DXR-b1.A, ya desde las primeras hojas verdaderas, como confirmaron los análisis de pigmentos. Curiosamente, este fenotipo seguía una distribución irregular de unos individuos a otros, afectándolos con variada intensidad, y resultando letal en aquellos casos extremos. Aún más, dicha variabilidad se manifestaba dentro de un mismo tejido u órgano, como reflejan las imágenes de la Figura II.31, en las que se aprecian sectores verdes, blancos y un conjunto de matices intermedios siguiendo una distribución aparentemente estocástica. A pesar de ello, no eran apreciables alteraciones morfológicas reseñables en aquellos órganos afectados, al margen de una reducción en el tamaño de los mismos. Las inflorescencias mostradas en las imágenes b y c de la Figura II.31 resultaban biológicamente funcionales, esto es, fértiles, pudiendo generar silicuas (Figura II.31e)

con semillas totalmente viables, aunque producidas en menor número. El estudio mediante lupa de fluorescencia de sectores blancos y verdes de las hojas del mutante, utilizando un filtro capaz de absorber específicamente a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia del espectro de la clorofila, reveló una reducción en la intensidad de la fluorescencia emitida en relación con la imagen correspondiente de una hoja de la planta silvestre, reducción que además correlacionaba con aquellos sectores más severamente albinos (Figura II.31a). Sin embargo, aún en las zonas de la hoja aparentemente blancas, seguía apareciendo cierta emisión propia de la clorofila, indicativa de la presencia de cloroplastos pigmentados.

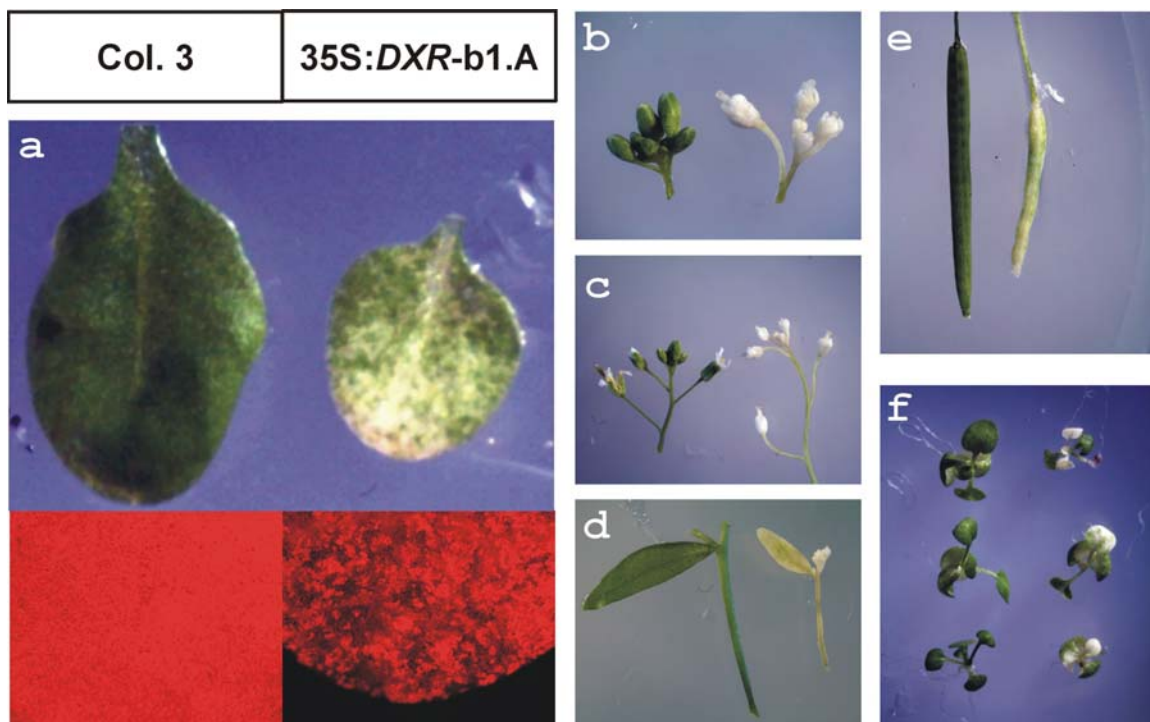


Figura II.31: Observación del fenotipo variegado característico de la línea 35S:DXR-b1.A. (a), imágenes obtenidas mediante lupa confocal provista de un filtro específico para la clorofila a partir de hojas jóvenes y aumentadas 40 veces; b, brotes terminales con primordios florales; c, brotes terminales con inflorescencias maduras; d, hojas caulinares; e, silicuas y f, plántulas de 14 días. En cada caso, las imágenes de la izquierda corresponden a individuos de la línea silvestre Columbia 3 de *A. thaliana*, mientras que a la derecha aparecen las muestras procedentes de la línea 35S:DXR-b1.A.

II.4.4.3. La línea 35S:DXR-b1.A posee alteraciones en los plástidos análogas a las del mutante *chs5* y a las provocadas por el tratamiento con fosmidomicina o norflurazón.

El exámen al microscopio óptico de secciones transversales de hojas de *A. thaliana* var. Col. 3 (Figura II.32c) y de la línea 35S:DXR-b1.A (Figura II.32d), en este caso procedentes de sectores particularmente afectados, denotaron una reducción en el número de cloroplastos, los

cuales además presentaban niveles reducidos de tinción con azul de metileno, reflejo de la deficiencias en las estructuras internas de membranas. Pero lo más destacado de esta observación era la alteración en el perfil histológico de la hoja de *Arabidopsis*. La reducción en los niveles de DXR correlacionan con una desorganización en la morfología típica de las células epidérmicas y del mesófilo, tanto las que conforman el parénquima en empalizada como el esponjoso.

Para obtener más información acerca de las alteraciones citológicas de las hojas de la línea 35S:DXR-b1.A se llevaron a cabo observaciones por microscopía confocal y electrónica. Para ello, se seleccionaron hojas vegetativas emergentes provenientes de plántulas de 12 días agrupadas en 3 tipos en función de la severidad del fenotipo que presentaban, junto a otras muestras obtenidas a partir de la línea silvestre de referencia.

La observación en un microscopio confocal, provisto de filtros que detectaban específicamente la autofluorescencia emitida por la clorofila, de las hojas 35S:DXR-b1.A denotaba alteraciones en la forma y tamaño de los cloroplastos y una autofluorescencia reducida, corroborando lo ya apuntado tras la observación con la lupa de fluorescencia. Además, estas particularidades eran tanto más evidentes cuanto mayor era el grado de albinismo presentado (Figura II.32f-h). A pesar de ello, aún en las zonas completamente blancas, aparecía señal roja correspondiente a la autofluorescencia de la clorofila, indicativa de la presencia de plástidos con cierto grado de pigmentación. A continuación, todas estas observaciones fueron detalladas gracias a los estudios de microscopía electrónica (Figura II.32j-l). En efecto, el análisis de la ultraestructura reveló la aparición de cloroplastos que, si bien presentaban un tamaño no muy inferior al de los correspondientes al control, estaban desposeídos de granas correctamente formados. Otro fenómeno destacable era la aparición de heteroplastidia (Figura II.32k), esto es, células en las que coexisten plástidos con sus estructuras membranas internas en diversos estadios del desarrollo, en un rango que incluía desde aquellos con un grado de desarrollo análogo al de las plantas silvestres hasta otros con alteraciones similares a las observadas tras el tratamiento con fosmidomicina o norflurazón y aquellas propias del mutante *chs5* (Figura II.28j y k). A medida que se acentuaba el fenotipo, aumentaba la desestructuración de los cuerpos lamelares, abortándose la formación de los grana en un estadio anterior. Era destacable, asimismo, la aparición de vacuolas intraplastídicas y cuerpos esféricos similares a los encontrados en aquellas muestras tratadas con norflurazón. En cualquier caso, no fueron observadas alteraciones en orgánulos distintos de los descritos, tales como las mitocondrias.

II. RESULTADOS

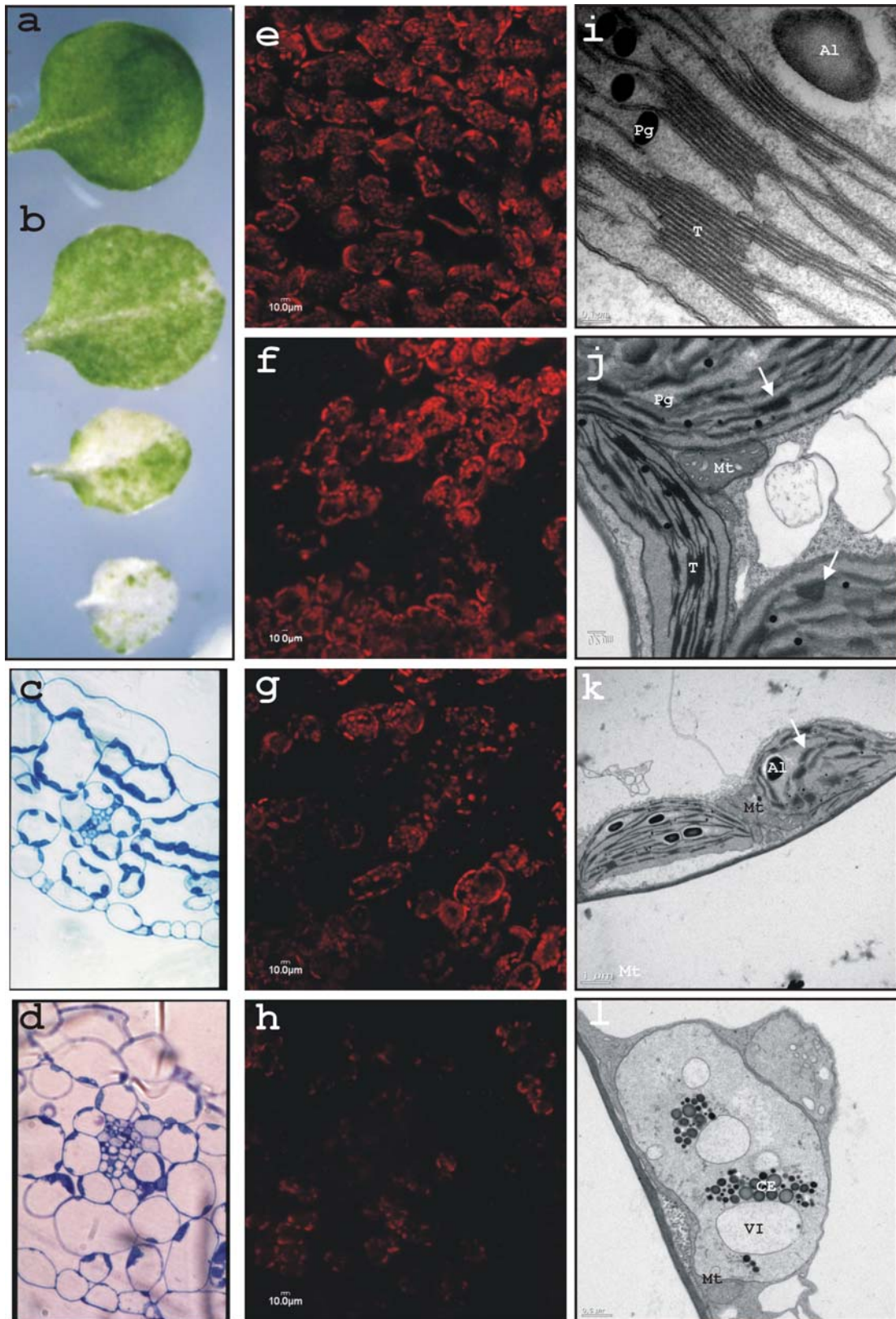


Figura II.32: Estudios de microscopía óptica, láser confocal y electrónica de plantas 35S:DXR-b1.A. La imagen a corresponde a una hoja procedente de la variedad Columbia 3 de *A. thaliana* y b, a 3 hojas representativas de los fenotipos encontrados en la línea 35S:DXR-b1.A, con intensidad creciente en la severidad del fenotipo variegado de arriba a abajo; (c) Exámen al microscopio óptico de cortes transversales procedentes de hojas Col. 3 teñidos con azul de metileno y 35S:DXR-b1.A (d) (magnificación 60x); observación por microscopía confocal (e, f, g y h) y electrónica (i, j, k y l) de la citología de células foliares de plantas silvestres de *A. thaliana* var. Col.3 (c y g) y provenientes de la línea 35S:DXR-b1.A (d, e, f, h, i y j), clasificadas en 3 grupos en función de la severidad del fenotipo observado (d→f; y →j). Las flechas en las micrografías electrónicas indican grana abortados en diversos estadios del desarrollo. La notación es la siguiente: Al, gránulos de almidón; T, tilacoides; Pg, platoglobuli; Mt, mitocondria; CE, cuerpos esféricos y VI, vesículas intraplastídicas.

II.4.4.4. Expresión de la DXS1 bajo el control del promotor inducible pTA7002.

La utilización de sistemas de expresión inducible incrementa las posibilidades derivadas de las técnicas de transgénesis en plantas, posibilitando, por ejemplo, la obtención de mutantes condicionales. La generación de plantas transgénicas que permiten la expresión modulada del transgén permite el estudio del fenotipo originado aún cuando la expresión estable de dicho gen resulte en un efecto letal para la planta. Finalmente, constituye una herramienta útil para regular la expresión del transgén de modo espacio-temporal o incluso dosis-dependiente respecto del inductor.

En este ámbito, se generaron plantas que contenían la construcción resultante de la fusión traduccional del promotor inducible del vector pTA7002 [10] con el marco abierto de lectura completo para la *DXS1* (ver apdo. V.4.1.2). La transformación de plantas de *Arabidopsis* con aquella construcción, designada pLTAS1, permitió rescatar 5 líneas en las que el carácter resistencia a higromicina (marcador de selección que aparecía acompañando al transgén en la región de ADN-T) seguía una segregación mendeliana (Tabla II.2). Dichas líneas fueron seleccionadas para llevar a homocigosis, momento en el que se observó como dos de ellas presentaban problemas desde la germinación mientras que las restantes no sufrían ninguna alteración fenotípica apreciable como resultado del tratamiento con el inductor. Sobre estas tres líneas, designadas TA:DXS1-6.1.3, TA:DXS1-b.1.1 y TA:DXS1-4t.3.1 fueron realizados los estudios que se detallan a continuación.

	TA:dxs1-6.1.	TA:dxs1-b.1.	TA:dxs1-4t.3.
Relación Hg ^R :Hg ^S	43:18	27:8	36:18

Tabla II.2: Análisis de la segregación T2 de las líneas TA:DXS1 mediante recuento de la relación resistentes a higromicina (Hg^R) frente a sensibles al antibiótico (Hg^S).

La Figura II.33 muestra el resultado obtenido en el análisis de *northern-blot* efectuado a

II. RESULTADOS

partir de ARN de la parte aérea de plántulas de 12 días de las 3 líneas homocigotas seleccionadas crecidas en presencia de 30 μM del inductor dexametasona. Plantas transgénicas transformadas con el vector vacío pTA7002 fueron utilizadas como control. En este análisis resultó destacable los acrecentados niveles de expresión del mensajero *DXS1* en respuesta a la presencia de dexametasona para las tres líneas TA:*DXS1*, en especial para la línea TA:*DXS1*-4t.3.1. Asimismo, se remarcó la ausencia de cambios en los niveles de ARNm entre las plantas control crecidas con y sin el glucocorticoide sintético utilizado como inductor, confirmando la ausencia de efectos pleiotrópicos debidos a la presencia del inductor o del factor de transcripción quimérico responsable de la inducción. A pesar de ello, los análisis cuantitativos de los carotenoides y las clorofilas (A+B) no reflejaron cambios significativos entre las distintas líneas inducidas, ni con respecto al control sin tratar (Figura II.33b). Por otro lado, la ausencia de cambios significativos para los niveles de proteína *DXS1* entre las distintas muestras analizadas resultó lo más destacado de la aproximación de *western-blot* mostrada en la Figura II.33a.

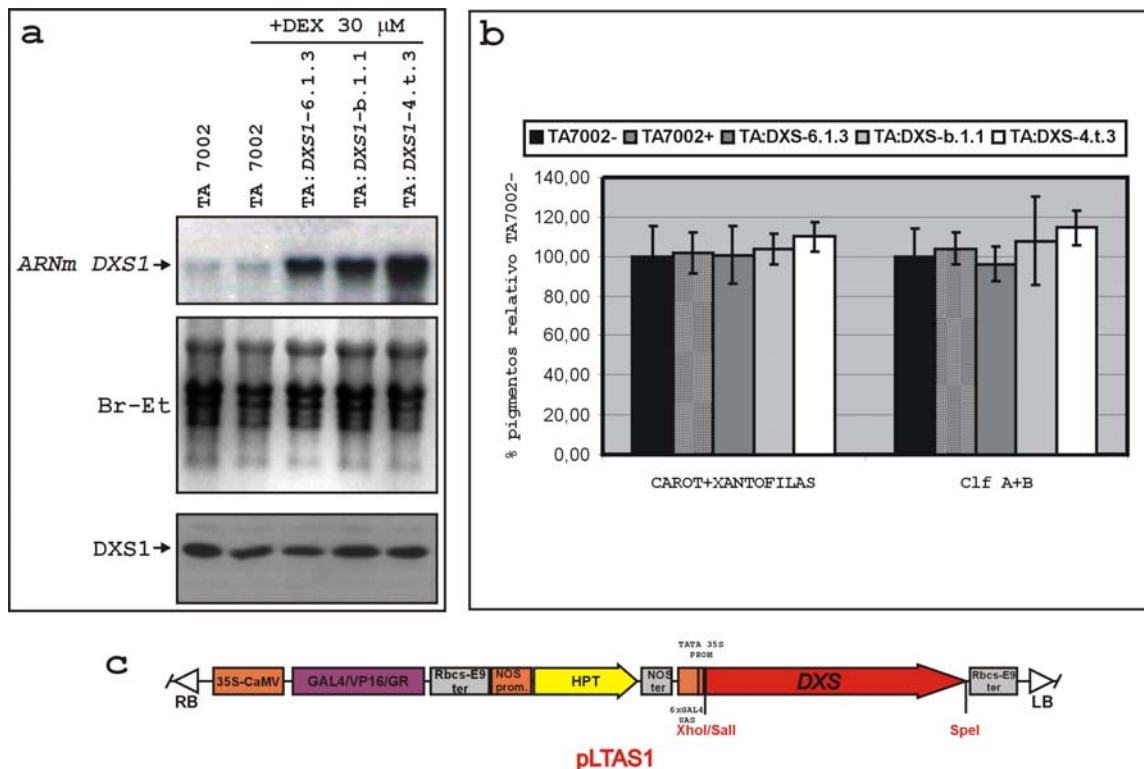


Figura II.33: Análisis de las líneas TA:DXS1. (a), caracterización molecular, mediante aproximaciones de northern y western-blot. Se utilizaron, en cada caso, 20 μg de ARN total o proteína extraídas de la parte aérea de plántulas de cada una de las líneas TA:DXS1 crecidas durante 12 días bajo ciclo 16 horas luz:8 horas oscuridad en presencia de una concentración final de 30 μM de dexametasona (DEX) y, como control, plantas transgénicas portadoras del vector vacío pTA7002 crecidas con o sin inductor. (b), cuantificación de carotenoides y clorofilas. Las columnas representan la media de 2 muestras independientes expresadas en % respecto de los valores obtenidos por la línea TA7002 crecida en ausencia de tratamiento. Las barras

corresponden a las desviaciones estándar. CAROT+XANT, carotenoides y xantofilas; Clf A+B, clorofilas A y B. (c), representación esquemática a escala de la región de ADN de transferencia integrada en las plantas de la línea TA:DXSI. Se indican, asimismo, los sitios de restricción utilizados en el clonaje.

II.4.5. Aproximaciones al estudio del intercambio de intermediarios entre las rutas del MEP y del MVA de síntesis de IPP.

La posible interacción entre las dos vías de síntesis de IPP que coexisten en la célula vegetal constituye una de las cuestiones más intrigantes en relación con el estudio de la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas. Con el objeto de abundar en dicha cuestión, se han planteado una serie de abordajes experimentales sobre la base de las herramientas generadas en este trabajo, que pasaremos a analizar a continuación.

II.4.5.1. El fenotipo originado por el tratamiento con mevinolina puede ser revertido por la adición exógena de desoxixilulosa.

Como se ha referido abundantemente en otros puntos de esta memoria, la mevinolina es un potente inhibidor de la ruta del MVA de síntesis de isoprenoides, bloqueando específicamente la enzima HMGR. El fenotipo originado por la mevinolina es manifiesto desde concentraciones de 2,5 μM y pasa por el malogramiento o aborto del meristemo primario (cono vegetativo) responsable de la formación de las primeras hojas vegetativas, una parálisis casi total en el desarrollo de la radícula, así como una acumulación de antocianinas que le confieren un característico color rojo. De este modo, la presencia de mevinolina en el medio de germinación origina un bloqueo en el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana*.

En este contexto, se planteó la posibilidad de revertir el bloqueo causado por la mevinolina con mevalonato (MVA), producto específico de la reacción catalizada por la HMGR, o bien con metabolitos de la recientemente descubierta ruta del MEP de síntesis de IPP, como la desoxixilulosa (DX).

De acuerdo con lo esperado, el MVA, adicionado al medio de crecimiento a una concentración de 1mM revierte el bloqueo originado por mevinolina (Figura II.34c). Sin embargo, resultaba inédita la capacidad de la DX, identificada como primer intermediario de la ruta plastídica del MEP de síntesis de IPP, de rescatar el efecto de la mevinolina cuando era añadido a concentraciones de 1mM, aún no siendo tan efectiva como el MVA, sobre todo en lo referido a las radículas (Figura II.34d). Era reseñable también el efecto letal sobre las plantas de la DX adicionada a concentraciones finales de 5 mM, letalidad que pasaba por la aparición de un fenotipo similar al mostrado cuando eran crecidas a una concentración de Fm superior a 50 μM (datos no mostrados).

Cuando fueron extraídas las proteínas procedentes de dichas muestras e identificadas

sobre ellas las proteínas DXS1 y DXR mediante *western-blot*, se observó como la mevinolina determinaba una disminución en los niveles de proteína respecto del control, probablemente como consecuencia del bloqueo metabólico global generado por el inhibidor. Asimismo, la adición de los intermediarios DX o MVA junto a la mevinolina originaba una acumulación de las proteínas DXS1 y DXR que alcanzaban los valores obtenidos por el control, y que incluso los superaban en el caso de la proteína DXR, particularmente en lo concerniente al tratamiento con MVA (Figura II.34e).

Sin embargo, no se destacó ninguna característica fenotípica diferencial entre las plantas crecidas en presencia de los intermediarios DX o MVA a una concentración de 1mM o en ausencia de los mismos (resultados no mostrados). La Figura II.34f refleja como, en las muestras extraídas de plántulas crecidas durante 21 días en presencia de MVA o DX suplementada al medio de cultivo a una concentración de 1mM, no fue detectable ningún cambio significativo en los niveles de proteína DXS1 o DXR en relación con las detectadas en plantas crecidas en ausencia de intermediarios. Por lo tanto, quedaban descartados eventuales efectos de regulación "feed-back" de los intermediarios DX y MVA en la DXS1 y DXR, las 2 primeras enzimas implicadas en la síntesis vía MEP de IPP.

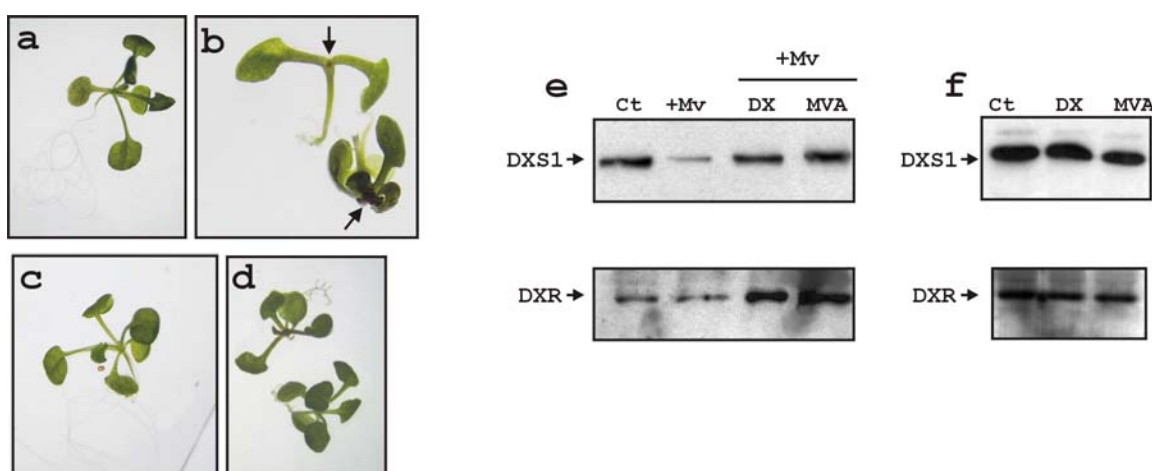


Figura II.34: Experimentos de reversión de la mevinolina (Mv). (a), plántulas de *A. thaliana* var. Col. 3 crecidas durante 21 días bajo fotoperiodo de día largo (16 h luz:8 h oscuridad) en ausencia de suplementos en el medio; b, en presencia de 2,5 μM de mevinolina (Mv); c, de 2,5 μM de Mv suplementada con mevalonato 1mM (MVA) y d, 2,5 μM de Mv suplementada con desoxixilulosa (DX) 1 mM. Las flechas señalan las aberraciones que ocurren en los meristemos foliares como consecuencia del tratamiento con mevinolina. (e), western-blot sobre proteínas extraídas de las muestras a, b c y d, con los anticuerpos anti-DXS1 y anti-DXR. (f), western-blot efectuado a partir de proteínas de plantas crecidas 21 días con 1 mM DX y 1 mM MVA, o en ausencia de intermediarios.

Desde otro abordaje experimental, nos planteamos examinar si la sobreexpresión de la DXR de *A. thaliana* incrementaba la resistencia frente al inhibidor mevinolina. Para ello, se utilizaron las plantas transgénicas 35S:DXR (apdo. II.4.4.1) y, con el objeto de obtener una apreciación cuantitativa del proceso, ante la variabilidad de respuesta observada, se cuantificó el porcentaje de individuos de las líneas 1.C y 2.B que eran capaces de desarrollar hojas verdaderas frente a concentraciones crecientes de mevinolina. Se empleó como control una planta transgénica de *A. thaliana* que sobreexpresaba el dominio catalítico de la HMGR1 bajo el control del promotor 35S-CaMV (línea 35S:HMGR1-24.3, [112]). Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Figura II.35 y, como era esperable, la línea 35S:HMGR1-24.3 mostró un elevado porcentaje de individuos resistentes a concentraciones de hasta 5 mM de mevinolina. Sin embargo, ninguna de las dos líneas 35S:DXR examinadas (1.C y 2.B) presentaron niveles aumentados de resistencia con respecto al control Columbia 3 de cara al bloqueo originado por la mevinolina.

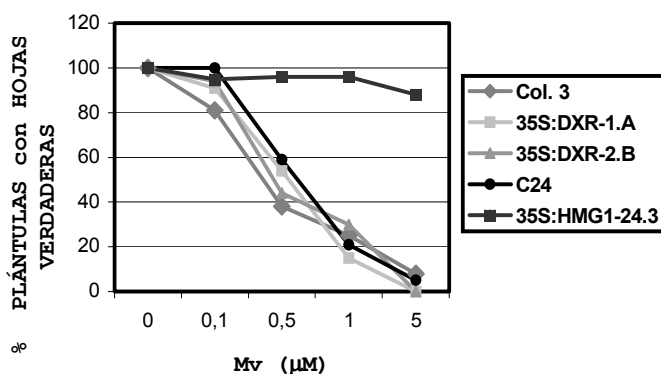


Figura II.35: Análisis cuantitativo de la resistencia a mevinolina de plantas transgénicas 35S:DXR y 35S:HMGR1. La gráfica representa el porcentaje de plántulas (sobre un recuento de aproximadamente 100 en cada caso) de cada una de las líneas capaces de desarrollar hojas verdaderas a las concentraciones indicadas de mevinolina (Mv). Se utilizaron como control las variedades silvestres Col. 3 y C-24 de *A. thaliana*, sobre las que se generaron, respectivamente, las plantas transgénicas de las líneas 35S:DXR y 35S:HMGR1-24.3 [112].

II.4.5.2. La sobreexpresión de la HMGR1 de *A. thaliana* resulta en un ligero incremento en la resistencia frente a la fosmidomicina.

Una serie de experimentos análogos a los descritos con la mevinolina fueron, asimismo, planteados con la fosmidomicina, el inhibidor de la DXR. En este caso, ninguno de los intermediarios analizados, desoxixilulosa (DX), metileritritol (ME) y mevalonato (MVA) a 1 y 5 mM, fueron capaces de revertir el fenotipo originado por el inhibidor de la DXR (resultados no mostrados).

Seguidamente, fue analizada la resistencia de líneas transgénicas de sobreexpresión de

la HMGR1 y DXR a la presencia de fosmidomicina. Para ello, fue elegido el criterio de contabilizar el número de individuos que eran capaces de desarrollar hojas verdes tras 14 días creciendo a distintas concentraciones de la droga. Como ya habíamos apuntado en el apartado II.4.4.1 (Figura II.28), las plantas de la línea 35S:DXR-2.B, que mostraba niveles incrementados de ARNm y proteína DXR, presentan una resistencia aumentada a la fosmidomicina respecto de las plantas control del mismo fondo genético (Col. 3). Por su parte, la línea 35S:DXR-1.C, que mostraba unos niveles de ARNm y proteína DXR similares a los del control, presentó un ligero incremento en la resistencia frente a bajas concentraciones de fosmidomicina, especialmente perceptible a Fm 25 μ M. Finalmente, la línea 35S:DXR-b1.A, cosuprimida para la expresión de la DXR, era la que presentaba menor resistencia a la fosmidomicina, sensiblemente por debajo de las plantas Col. 3 control (Figura II.36).

En la gráfica de la Figura II.36 aparecen reflejados también los niveles de resistencia verificados por la línea 24.3 que sobreexpresa del dominio catalítico de la HMGR1 respecto de los obtenidos por los individuos de su fondo genético C-24 [112]. Se pudo constatar, de este modo, como aumentos en la actividad HMG-CoA reductasa correlacionaban con ligeros incrementos en la resistencia a la fosmidomicina. Este extremo resultaba especialmente notorio en el rango de concentraciones de 50 a 75 μ M del inhibidor Fm. Nótese, por último, la resistencia de las plantas silvestres de la variedad C-24, considerablemente incrementada respecto de las de Col. 3.

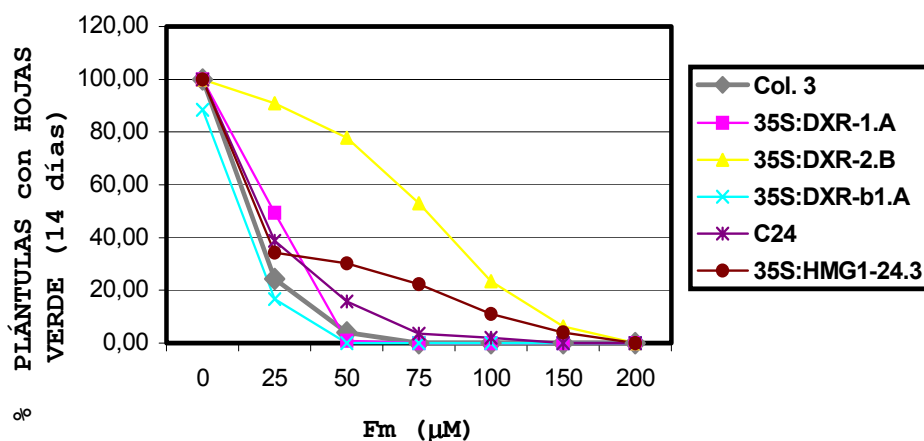


Figura II.36: Análisis cuantitativo de la resistencia frente a la fosmidomicina de plantas transgénicas 35S:DXR y 35S:HMG1. La gráfica representa el porcentaje de individuos (sobre un recuento de aproximadamente 100 en cada caso en 2 réplicas independientes) de cada una de las líneas capaces de desarrollar hojas verdes, después de crecer durante 14 días a las concentraciones de fosmidomicina indicadas (Fm). Se utilizaron como control las variedades silvestres Col. 3 y C-24, sobre las que se generaron, respectivamente, las plantas transgénicas de las líneas 35S:DXR y 35S:HMG1-24.3 [112].

II.4.5.3. El fenotipo albino de las plantas 35S:DXR-b1.A no puede ser revertido por la adición exógena de metileritritol.

Se ha descrito que el mutante de *E. coli* defectivo para la DXR es revertido con el metileritritol (ME), forma defosforilada del producto de la reacción catalizado por la DXR [239]. Presumiblemente, dicho metabolito sería fosforilado e incorporado eficientemente a la ruta MEP de síntesis de IPP [55]. En base a estos antecedentes, se planteó la posibilidad de revertir el fenotipo observado para el mutante 35S:DXR-b1.A con ME, así como con el producto de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa, el mevalonato (MVA).

Para ello, fueron crecidas plántulas de *Arabidopsis* provenientes de la línea 35S:DXR-b1.A, cosuprimida en la DXR y de la variedad silvestre Col. 3, como control, en medio suplementado con concentraciones de 1 mM de ME y de MVA. Después de 10 días de crecimiento bajo condiciones de luz continua no se observaron diferencias apreciables en ninguna de las 2 líneas analizadas bajo los distintos tratamientos. Para descartar la aparición de algún cambio cuantitativo en la despigmentación característica de la línea 35S:DXR-b1.A en respuesta a la presencia de ninguno de los dos intermediarios, fueron medidos los pigmentos en cada uno de los casos. El resultado se muestra en la gráfica de la Figura II.37, y permite concluir como, ninguno de los tratamientos llevados a cabo desemboca en reversión del fenotipo, aún cuando el mevalonato produzca un limitado aumento en los valores de pigmentos de la línea 35S:DXR-b1.A.

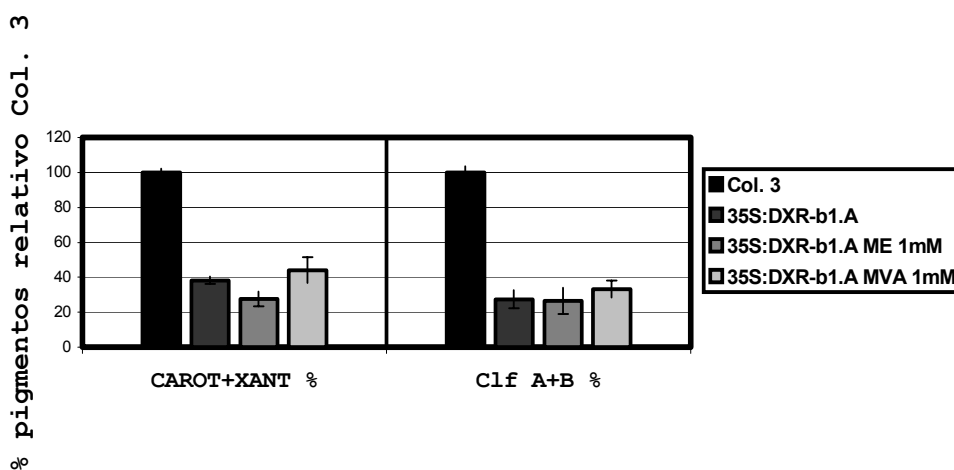


Figura II.37: Análisis cuantitativo de clorofilas y carotenoides de plantas 35S:DXR-b1.A (parte aérea) crecidas en presencia de ME y MVA o en ausencia de tratamiento. Cuantificación realizada sobre muestras de hojas procedentes de las líneas 35S:DXR-b1.A y Col. 3, midiendo 3 réplicas para cada una de ellas según una adaptación del método de Lichtenthaler [170] (apdo. V.4.8). Las plantas fueron crecidas durante 10 días a luz continua en medios sin suplementar o suplementados con metileritritol y mevalonato a las concentraciones indicadas. CAROT+XANT, carotenoides y xantofilas; Clf A+B, clorofilas A y B.

II.4.5.4. El mutante termosensible *chs5* pudo ser rescatado con la DX, no así con el ME ni con el MVA.

Para terminar con estos experimentos relativos a la interacción entre las dos vías de síntesis de IPP, se utilizó el mutante *chs5*, abundantemente referido a lo largo de esta memoria, y bloqueado en el paso catalizado por la DXS1. Coherentemente con ello, y como ya había sido descrito [11], la DX, a una concentración de 1mM rescataba el fenotipo característico del *chs5* (Figura II.23). Las mismas concentraciones de MVA o de ME, sin embargo, fueron incapaces de producir ningún cambio en el mutante *chs5* crecido por debajo de 16 °C (resultados no mostrados).

III. DISCUSIÓN

III.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES *DXS* y *DXR* EN *Arabidopsis thaliana*.

III.1.1. El gen *DXS1* posee dos secuencias altamente homólogas en el genoma de *A. thaliana*.

La búsqueda en bases de datos permitió identificar una EST que contenía la secuencia codificante completa del gen *DXS1* de *A. thaliana*. Las aproximaciones de *Southern-blot* efectuadas utilizando una sonda derivada del ADNc correspondiente al gen *DXS1*, confirmaron la existencia de, al menos, 2 secuencias adicionales con homología al gen *DXS1* en el genoma de *A. thaliana* (Figura II.2), designadas *DXS2* y *DXS3*. Las búsquedas en las bases de datos correspondientes desvelaron, coherentemente, la presencia de 3 *EST* para el gen *DXS2* y de 1 para el gen *DXS3*, confirmando que se trataría de genes funcionales, a pesar de lo que previamente había sido sugerido [187, 309]. Adicionalmente, y gracias a una estrategia de *RT-PCR*, pudo ser clonado un ADNc que contiene la secuencia codificante completa del gen *DXS2* (apdo. II.1.2). La mayor divergencia encontrada entre la secuencia nucleotídica de los ADNc correspondientes a los genes *DXS1* y *DXS2* con el gen *DXS3*, divergencia ratificada en posteriores estudios comparativos a nivel de la secuencia peptídica, desaconsejaron considerar a la *DXS3* para futuros análisis, al no existir indicios de que codificase para una *DXS* funcional.

Hasta el momento, no son conocidas las regiones genómicas en la que mapean ninguno de los genes *DXS* vegetales caracterizados, excepción hecha de las correspondientes a *A. thaliana* y descritas en este trabajo. La comparación de estos patrones de organización genómica con aquellos correspondientes a genes *DXS* de otras especies contribuiría, indudablemente, al estudio de las relaciones evolutivas entre ellos. Por su parte, la comparación entre las regiones de ADN genómico de las isoformas 1 y 2 reveló una gran similitud en cuanto a las secuencias respectivas, tanto entre aquellas codificantes como entre las que no lo eran, así como en lo relativo a la organización de las mismas, evidenciando que derivarían de un episodio de duplicación génica evolutivamente reciente (apdo. II.1.2).

Los fenómenos de duplicación génica (junto con la poliploidía) han moldeado los genomas de *Arabidopsis* y otras angiospermas durante la evolución de los mismos. En efecto, la mayoría de los 25.000 genes que, se estima, posee *Arabidopsis*, se encuentran en alrededor de 100 bloques duplicados, el 17% de los cuales aparecen dispuestos en tándem [197]. De hecho, este proceso de duplicación (o multiplicidad) génica que estamos observando ha sido ya abundantemente descrito para genes codificantes para muy diversas proteínas. Más concretamente, y como ya fue apuntado en la Introducción (apdo. I.4.1), se conocen numerosos casos de enzimas relacionados con la síntesis de isoprenoides en plantas codificados por más de

un gen, algunos de los cuales serían, a su vez, traducidos en 2 isoformas distintas. Ejemplos ampliamente caracterizados vienen dados por los genes *AAT*, *HMG*, *IDI*, *FPS* o *SQS* de *A. thaliana* [4, 42, 43, 73, 75, 83, 98]. Precisamente, en fecha muy reciente, ha sido publicada una revisión de las familias génicas que codifican para las enzimas implicadas específicamente en la biosíntesis de isoprenoides en *A. thaliana* [163], donde se presentan casos extremos como el representado por la familia génica de la GGPS, que contaría con 12 miembros, 5 de ellos caracterizados [215].

Además, estos fenómenos de duplicación son extensibles a otras muchas especies vegetales, constituyéndose en un carácter distintivo de las plantas. Con respecto a muchos de los homólogos de DXS vegetales caracterizados hasta el momento, existen evidencias crecientes de que estarían codificados por más de un gen. En efecto, tres isoformas de la DXS de *Medicago truncatula* han sido recientemente clonadas, habiéndose confirmado hasta el momento la función de dos de ellas. En otras especies se han descrito ESTs adicionales significativamente homólogos a los ADNc previamente caracterizados para el gen *DXS*. Este es el caso de *Lycopersicon esculentum* [178] o *Catharanthus roseus* [50, 303]. Adicionalmente, la búsqueda en las bases de datos desvela la existencia de familias de ESTs correspondientes a *DXS* en distintos sistemas vegetales, tales como *Solanum tuberosum*, *Zea mays* o *Glycine max*. Estas evidencias permiten constatar lo generalizado del fenómeno en el reino vegetal, fenómeno por el cual en la mayoría de las especies de plantas la DXS está codificada por pequeñas familias multigénicas.

Esta multiplicidad de isoformas, característica de las plantas, estaría íntimamente asociada con la fabulosa variedad funcional y estructural de los isoprenoides de origen vegetal. La diversidad de formas isoenzimáticas y de patrones de expresión espacio-temporal o localizaciones subcelulares asociados, contribuiría a la producción de estos compuestos, derivados en cualquier caso del precursor común IPP.

II.1.2. El análisis de la secuencia peptídica de DXS1 y DXS2 resulta coherente con la función bioquímica propuesta como desoxixilulosa sintasa.

Los estudios comparativos de las hipotéticas secuencias peptídicas de diversas DXS vegetales pusieron de manifiesto una serie de rasgos estructurales y motivos de secuencia comunes. En primer lugar, el alineamiento múltiple de la secuencia de las proteínas DXS1, DXS2 y DXS3 de *Arabidopsis thaliana*, junto con todas las otras formas vegetales descritas hasta la fecha (apdo. II.1.3), pone en evidencia la existencia de una secuencia cercana al extremo N-terminal adicional respecto de las secuencias peptídicas correspondientes de sus homólogos procariotas. Dicha extensión presenta las características estructurales y de composición de aminoácidos propias de los péptidos de tránsito a cloroplastos, de modo coherente con la función propuesta para estas enzimas como responsables de la primera etapa en la síntesis de IPP a través de la recientemente descubierta ruta del MEP. Por otra parte, resulta notable comprobar

como la DXS2 y DXS3 son las únicas representantes que están desposeídas de algunos dominios comunes a las restantes proteínas DXS.

Más aún, el alineamiento múltiple desvela la presencia de múltiples dominios conservados asociados con la actividad enzimática DXS. Entre estos destacan los motivos caracterizados como de unión al cofactor característico de la reacción enzimática, el pirofosfato de tiamina (TPP) [122, 260], requerimiento compartido, por otro lado, por todas las enzimas transcetolasas. El dominio alrededor de la His114 de la DXS1 [226], asociado específicamente con la transferencia de protón llevada a cabo por las enzimas DXS, aparece también especialmente conservado. Sin embargo, estas características comunes están ausentes en la DXS3, cuya secuencia será, como también revela el alineamiento, la que con mayor frecuencia rompa el consenso. Este extremo fue corroborado, de modo más gráfico, gracias al estudio filogenético efectuado, que aparece reflejado en el dendrograma de la Figura II.6, y que destaca como la DXS3 aparece alejada del resto de DXS vegetales incluidas, incluso más que aquella forma correspondiente a la clorofita *Chlamydomonas*. En cualquier caso, la DXS3 aparece más relacionada con las DXS que con las otras enzimas representadas, subunidades E1 de la piruvato deshidrogenasa o transcetolasas pertenecientes todas ellas a la misma familia de enzimas dependientes de TPP. Se verifica de este modo como la DXS3 constituye una forma fuertemente divergida de las restantes DXS vegetales revelándose, por lo tanto, muy alejada filogenéticamente.

Los árboles filogenéticos ponen de manifiesto otro interesante fenómeno: todas las DXS representadas aparecen englobadas en 2 subgrupos distintos (I y II), nítidamente separados entre sí, cada uno de los cuales deriva de una rama independiente.

En el primero (I) de estos subgrupos aparece un conjunto de DXS, algunos de las cuales han sido caracterizadas en cierta medida, y que comparten todas ellas un patrón de expresión espacio-temporal aparentemente constitutivo. Entre ellas destacan la DXS1 de *L. esculentum*, cuyo transcrito ha sido detectado en hojas, inflorescencias, tallos y frutos en diferentes estadios de desarrollo [178] o raíces [178, 309]; la isoforma correspondiente de *M. truncatula*, también caracterizada en numerosos tejidos [309]; o la CapTKT2 (DXS2) de *Capsicum annuum* [30]. El exhaustivo estudio de la expresión del gen *DXS1* de *A. thaliana* presentado en esta memoria, y que será discutido en detalle mas adelante, comparte esta característica, común en cuanto a lo generalizado de su expresión, con los homólogos de aquellos otros sistemas vegetales [48].

Por su parte, en el segundo subgrupo (II), estarían incluidos aquellas enzimas previamente asociadas con funciones específicas. Entre ellas destaca la DXS de *Mentha x piperita*, cuyo pico de expresión máxima coincide con el estadio de desarrollo de la hoja en el que tiene lugar la síntesis de monoterpenos (y sesquiterpenos), que se corresponde con el breve pero intenso periodo de actividad secretora de los aceites esenciales característicos de esta

especie [165]. Los transcritos *DXS* de cultivos celulares de *C. roseus* se acumulan coordinadamente con la producción de alcaloides indol terpénicos [50, 303]. En las raíces colonizadas por micorrizas arbusculares de *M. truncatula* tiene lugar una inducción de la expresión de la isoforma 2 de la *DXS* relacionado con la producción de apocarotenoides (derivados xantofílicos que se acumulan durante la interacción planta-hongo simbiote) [308, 309]. Esta característica es asimismo compartida por la denominada isoforma 2 de la *DXS* en *Z. mays* y en *L. esculentum*, cuya expresión, en ambos casos, se ve incrementada como consecuencia de la infección por hongos micorrízicos del género *Glomus* [309]. Finalmente, se han observado niveles de expresión del gen *DXS* particularmente elevados en flores de caléndula (*Tagetes erecta*) de la variedad "Dark Orange Lady" además, del orden de 3 a 4 veces superiores a los encontrados en las hojas [198]. Esta particularidad es exclusiva de la *DXS* de esta "cultivar", que coincide con aquella que presenta una mayor concentración del carotenoide luteína en sus pétalos. Por el contrario, la síntesis de carotenoides que desarrollan funciones fotosintéticas en las hojas no muestra cambios significativos entre las diferentes variedades analizadas, lo que sugeriría la existencia de una segunda isoforma de la *DXS* dedicada a la síntesis de IPP destinado a tales productos isoprenoides [198].

Walter y cols. han llamado la atención sobre este fenómeno, atribuyéndolo a una especialización evolutiva de las *DXS* en función del tipo plastídico en el que hayan de desarrollar su actividad [309]. Según este modelo, las *DXS* entroncadas con la *DXS1* de *A. thaliana* aparecerían asociados a cloroplastos maduros de células foliares con funciones fotosintéticas o en transición hacia los cromoplastos propios de los frutos, procesos ambos en los que tiene lugar una intensa acumulación de clorofilas y/o carotenoides. En cualquier caso, esta separación no sería estricta, en tanto que la *DXS1* de *A. thaliana* [48] o el mensajero correspondiente en *L. esculentum* [178, 309], son detectados también en tejidos y órganos desprovistos de plástidos relacionados con dichas funciones, tales como las raíces. Por otro lado, las *DXS* emparentadas con la isoforma 2 de *Medicago truncatula* estarían relacionadas con la síntesis de isoprenoides específicos radicadas en tipos plastídicos particulares, tales como los cromoplastos propios de las raíces que son micorrizadas, rebautizados como gerontoplastos [309]; los leucoplastos, implicados en la síntesis de aceites esenciales presentes en las células glandulares de los tricomas foliares de *Mentha x piperita* [165, 299]; o los cromoplastos, responsables de la pigmentación de los pétalos en *T. erecta* [198].

Este sugerente modelo postula una separación de tareas entre aquellas *DXS* implicadas en la producción de isoprenoides esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta (tales como los pigmentos fotosintéticos) y aquellas otras isoformas asociadas a la biosíntesis de metabolitos secundarios, relacionados con la interacción planta-entorno. De hecho, esta división del trabajo entre genes relacionados con la biosíntesis de isoprenoides había sido anteriormente referida para las terpeno sintasas vegetales en base a estudios evolutivos sobre la organización genómica de los mismos [298]. En este contexto, resultan tremendamente interesantes los

trabajos desarrollados en torno a la bacteria purpúrea no sulfúrea *R. capsulatus* [119]. Se trata de una especie aneróbica facultativa con capacidad fotosintética, en las cuales han sido identificados dos genes *DXS*, uno de los cuales estaría ubicado precisamente en la región del ADN genómico (*cluster*) asociado con el resto de genes relacionados con funciones fotosintéticas, y el otro, en un *cluster* distinto. Además, cuando son expresadas en *E. coli*, las propiedades bioquímicas de ambas enzimas resultan similares, aunque con diferencias en cuanto a sus eficiencias catalíticas. Esta redundancia ha sido también encontrada para el gen de la IPP isomerasa en *R. Capsulatus* (gen *idi*) [118]. Estos antecedentes sugieren un origen evolutivo independiente de los dos subgrupos de enzimas *DXS* caracterizadas hasta el momento, y como esta especialización habría de producirse muy temprano en la evolución.

¿Qué papel jugaría la *DXS2* de *A. thaliana* en todo este esquema?. El estudio filogenético que presentamos muestra a la *DXS2* íntimamente asociada con la *DXS1*, ocupando un lugar central entre las *DXS* del grupo I (apdo. II.1.3). Las brassicáceas (crucíferas), familia taxonómica a la que pertenece *A. thaliana*, constituyen uno de los pocos grupos botánicos cuyas raíces no son susceptibles de ser colonizadas por hongos formadores de micorrizas. Además, *A. thaliana* no destaca como especie productora de aceites esenciales, pigmentos u otro tipo de productos secundarios de origen isoprenoide. De confirmarse la función de la *DXS2*, y de acuerdo con su ubicación filogenética, resultaría justificada la imbricación de la *DXS2* en la rama de las enzimas *DXS* relacionadas con los metabolitos primarios. A favor de esta hipótesis se mostrarían también los resultados preliminares relativos al perfil de expresión del gen *DXS2*. En efecto, aproximaciones de *northern-blot*, RT-PCR semicuantitativa y determinación de la actividad *GUS* mediante tinción histoquímica en plantas transgénicas portadoras de la región 5' flanqueante del gen *DXS2* fusionado con el gen delator *GUS* revelarían la expresión generalizada del gen *DXS2* en todos los tejidos de la planta, si bien manifestándose de forma particularmente intensa en frutos en desarrollo (resultados no mostrados).

Finalmente, tampoco puede descartarse la existencia de nuevas isoformas, fuertemente divergidas del resto, con funciones específicas asociadas a la producción de isoprenoides aún no caracterizados.

III.1.3. Las particularidades de la secuencia peptídica de la *DXS3* apuntan a que esta proteína no tendría actividad desoxixilulosa sintasa.

El descubrimiento y caracterización de nuevos genes responsables de codificar para *DXS* en múltiples sistemas vegetales permitirá en el futuro corroborar el paradigma presentado en el epígrafe anterior, en tanto que las nuevas isoformas que vayan apareciendo puedan ser asignadas a uno u otro subgrupo en relación con su función. Curiosamente, la *DXS3*, como hemos mencionado, no aparece emparentada con ninguna de las dos familias definidas hasta el momento. A pesar de las fuertes dudas que plantea su inclusión en esta nueva familia de

transcetolasas, derivadas fundamentalmente de la discrepancia mostrada por su secuencia peptídica en aquellos motivos especialmente conservados con las restantes DXS, son necesarios nuevos estudios que confirmen o refuten definitivamente su función. No obstante, no puede descartarse que dichas discrepancias estén en el origen de una función asociada a tipos plastídicos específicos presentes en *A. thaliana*, constituyéndose en el representante de una hipotética tercera familia de DXS. En esta línea, es interesante recalcar como la secuencia de proteína propuesta para la DXS de *P. falciparum* es la única que rompe, junto con la DXS3 de *Arabidopsis*, el consenso en torno a la secuencia Asp-Arg-Ala-Gly del motivo transcetolasa dispuesta en la posición 498 de la DXS1 (correspondiente a la posición 478 de la DXS3), y que constituye una de las diferencias esenciales de las DXS para con el resto de enzimas dependientes de TPP. La función de la DXS de *P. falciparum* está asociada con la síntesis de isoprenoides que tiene lugar en los apicoplastos, orgánulos de origen plastídico específicos de dicho organismo, esenciales, aunque de función desconocida [142].

III.1.4. Caracterización funcional de la DXS1 y DXS2.

La complementación funcional de mutantes procariotas ha permitido confirmar la funcionalidad bioquímica de la DXS1 *in vivo* (apdo. II.4.1.2). En efecto, la expresión del ADNc que codifica para la enzima DXS1 de *A. thaliana* en una cepa de *E. coli* defectiva en el gen *dxs* permitió revertir la letalidad provocada por dicha mutación, verificándose de esta manera su actividad catalítica.

Por el contrario, no pudo llegarse a la misma conclusión cuando la DXS2 fue expresada en el mutante correspondiente de *E. coli*, (apdo. II.4.1.2). En un primer momento, se especuló con que un problema de inestabilidad, insolubilidad o plegamiento incorrecto de la proteína derivado de la presencia de la extensión N-terminal extra de la DXS2 vegetal sería el responsable de la dificultad para complementar funcionalmente al mutante bacteriano. Sin embargo, la eliminación del péptido de tránsito (forma At.DXS2-C) o de la extensión N-terminal completa de la DXS2 respecto del homólogo procariota (forma At.DXS2-CC) tampoco consigue revertir el déficit en la actividad DXS. Aún más, la ausencia en la DXS2 del dominio dispuesto entre los residuos aminoacídicos 277 y 310 de la secuencia de la DXS1 no es la responsable de su inactividad en *E. coli*, puesto que la inclusión mediante mutagénesis dirigida de dicho dominio en la posición correspondiente de la DXS2 tampoco permite la complementación del mutante.

No obstante, también parecía razonable pensar que la inactividad de la DXS2 en *E. coli* fuese debida a la utilización de un sistema heterólogo. Por esta razón, se acometió la transformación del mutante *chs5* (DXS1) de *A. thaliana* [11] con la construcción 35S:DXS2. La sobreexpresión de la DXS2 de *A. thaliana* en el mutante *chs5* no logró tampoco una recuperación significativa del fenotipo característico del mismo que pudo, sin embargo, ser totalmente rescatado en aquellas otras líneas transgénicas portadoras de la construcción

35S:DXS1 o mediante la adición exógena de 1-desoxi-D-xilulosa (DX), el producto defosforilado de la reacción catalizada por la DXS, al medio de crecimiento (apdo. II.4.2).

Todos estos resultados conforman un cuerpo creciente de evidencias que refutarían el papel bioquímico que se le había asignado al producto del gen *DXS2*, deducido en base al análisis de la secuencia de la proteína hipotéticamente codificada. A pesar de ello, el alto grado de homología y de parentesco evolutivo con su "homólogo" *DXS1* hace pensar que la función bioquímica de la *DXS2* no deba estar muy alejada de la de las restantes *DXS*. Las diferencias en cuanto a las actividades enzimáticas desempeñadas por la *DXS2* y las *DXS* podrían derivar, exclusivamente, de la especificidad del sustrato, cuyos dominios específicos de unión no han sido aún caracterizados en las proteínas de esta familia. De este modo, la *DXS2* conservaría los mecanismos esenciales de la catálisis de las *DXS*, coherentemente con el alto grado de conservación mostrado por la secuencia peptídica correspondiente con respecto a dichas enzimas.

No obstante, tampoco puede descartarse que determinadas peculiaridades inherentes a la propia proteína *DXS2* y/o a la actividad catalítica desempeñada por ella sean la causa de la imposibilidad de rescatar el mutante *chs5*. Algunas de estas singularidades podrían derivar de la propia localización proplastídica que hemos observado. Es bien conocida la importancia de los mecanismos de degradación proteolítica en el proceso de diferenciación de los proplastidos hacia cloroplastos, particularmente en el modelaje de complejos multiprotéicos integrales a las membranas tilacoidales [57, 292]. Mecanismos de regulación postraduccional como los descritos podrían impedir la existencia de niveles suficientes de proteína *DXS2* en el cloroplasto maduro como para revertir el déficit en la actividad *DXS* propia del mutante *chs5*.

Resulta importante recordar la dualidad de la función que está llamada a desarrollar el producto de la reacción catalizada por la *DXS*. En efecto, la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) constituye el primer intermediario específico en la síntesis, vía MEP, de IPP plastídico, pero también de los cofactores tiamina y piridoxol [131, 145]. Por consiguiente, el estudio de la función biológica de las enzimas pertenecientes a este grupo no puede obviar este aspecto. En este sentido, no resulta descabellado suponer que la isoforma *DXS2* sintetizara precursor DXP destinado preferentemente hacia la producción de aquellos cofactores. Esto explicaría por qué los mutantes *chs5* y *cla1-1* crecen sin suplemento exógeno de vitaminas, cuando es conocido que mutantes de tabaco deficientes en tiamina no trascienden más allá del estadio de plántula [193]. Sin embargo, esto último podría interpretarse también por la actuación de enzimas, distintas de la *DXS*, pero con actividades catalíticas similares, que revirtiesen, al menos parcialmente, el déficit en DXP. En todo caso, a pesar de que este modelo de especialización funcional de diferentes *DXS* implicados en la síntesis de distintos productos específicos generados a partir del mismo intermediario DXP resulte extremadamente sugerente, su confirmación precisa de la dilucidación definitiva de la función bioquímica de la *DXS2*. En este

sentido, la expresión y purificación de la proteína en sistemas apropiados así como la determinación de la actividad enzimática mediante los ensayos correspondientes [224] contribuirán, indudablemente, al esclarecimiento de este aspecto.

III.1.5. La DXR de *A. thaliana*, enzima que cataliza la primera etapa exclusiva de la ruta del MEP, está codificada por un único gen.

Los clones de ADNc correspondientes al gen *DXR* en plantas disponibles en el momento de desarrollar esta tesis, resultaban incompletos en su extremo 5' [161, 266]. La determinación, mediante técnicas de *RACE*, de los extremos 5' y 3' correspondientes permitió el clonaje de un ADNc que contenía el marco abierto de lectura completo de la *DXR* de *A. thaliana* (apdo. II.1.4). Los experimentos de *Southern-blot* con una sonda correspondiente al ADNc clonado de la *DXR*, revelaron la existencia de una sola copia del gen en el genoma de *A. thaliana* (apdo. II.1.4). Este resultado apareció posteriormente validado por la ausencia de secuencias con homologías significativas en las bases de datos correspondientes, en las búsquedas efectuadas una vez concluida la secuenciación del genoma de *A. thaliana*. Esta particularidad constituye una diferencia fundamental con lo descrito para la *DXS*. No obstante, 2 EST diferentes para la *DXR* han sido identificados en *M. truncatula*, y hasta 3 en *G. max*, sugiriendo su implicación en aspectos concretos de la biosíntesis de isoprenoides propios de dichas especies de leguminosas.

La secuencia peptídica codificada por este ADNc del gen *DXR* presenta altamente conservados los dominios caracterizados hasta el momento como necesarios para la función bioquímica a desempeñar (apdo. II.1.5). Coherentemente con ello, la expresión de la *DXR* de *A. thaliana* en una cepa de *E. coli* defectiva en el gen *dxr*, permite rescatar el fenotipo letal del mutante, ratificándose su actividad como responsable de la segunda etapa de la ruta del MEP (apdo. II.4.1.1). Es interesante incidir en la peculiar actividad enzimática desempeñada por la *DXR*, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa. Esta enzima es capaz de catalizar la conversión de la *DXP* en *MEP*, primer intermediario específico de la ruta que conduce hasta la síntesis de *IPP* en plástidos, y todo ello a través de un reordenamiento molecular seguido de una reducción. Ambos procesos, que transcurren secuencialmente en una sola etapa, conducen hasta la formación del esqueleto ramificado característico del *IPP*. A pesar de las analogías de dicha reacción con aquella desarrollada por las ceto-ácido reductoisomerasas [90], que conducen a la formación de 2,3-dihidroxiisovalerato a partir de 2-acetolactato en el contexto de la biosíntesis de aminoácidos ramificados tales como la valina, la leucina o la isoleucina, algunas diferencias señalan a las *DXR* como una nueva familia de enzimas. Entre estas destacan la ausencia de dominios significativos conservados entre ambos grupos de enzimas, excepción hecha de aquellas propias de la unión al cofactor *NADP(H)*, así como la preferencia de las *DXR* por el Mn^{2+} como catión divalente respecto del Mg^{2+} , asociado específicamente con la actividad de las ceto-ácido reductoisomerasas [291].

La proteína DXR de *Arabidopsis* presenta un extremo N-terminal de 80 aminoácidos, característica inherente a todas las DXR eucariotas, adicional respecto a sus homólogos bacterianos. El análisis comparativo de esta región de la proteína entre todas las secuencias de la DXR vegetales conocidas hasta el momento, revela que está compuesta por dos dominios estructuralmente diferentes, a saber, un extremo N-terminal con las características propias de un péptido de tránsito a plástidos y, a continuación, un segundo dominio particularmente rico en residuos de prolina (apdo. II.1.5). Un sitio potencial de procesamiento de proteínas plastídicas, definido por el motivo consenso Cys-Ser-(Ala/Met/Val) [97], separaría ambos dominios. Aunque este punto de corte no sea compartido por todas las secuencias presentadas en el alineamiento, la coincidencia en torno a aquel motivo en 11 de las 14 secuencias presentadas, de acuerdo con las predicciones efectuadas con el algoritmo ChloroP V1.1, sugiere que, efectivamente, todas las DXR de plantas serían procesadas proteolíticamente en dicho punto previamente al ingreso en los plástidos. La región situada hacia el extremo N-terminal, aparece pobremente conservada, aún cuando, en todos los casos, posea los residuos aminoacídicos más habituales en los péptidos de tránsito. Por su parte, la región rica en Pro presenta el dominio consenso Pro-(Pro/Gln)-Pro-Ala-Trp-Pro-Gly-(Arg/Thr)-Ala conservado en todas las secuencias analizadas, por lo que puede constituirse en atributo característico (o diagnóstico) de las DXR vegetales. La presencia de este dominio en la proteína madura viene confirmada por su detección mediante inmunocitoquímica y *western-blot* a través de anticuerpos policlonales dirigidos específicamente contra péptidos correspondientes a dicha región de la proteína.

Las secuencias ricas en residuos de prolina han sido frecuentemente relacionados con dominios implicados en la interacción proteína-proteína [147]. La región rica en Pro de las DXR de plantas podría ser necesaria para la oligomerización de estas proteínas. Sin embargo, la proteína correspondiente en *E. coli* ha sido purificada como un homo-tetrámero, -hexámero y -octámero a pesar de la ausencia de dicho dominio [291]. Es destacable el hecho de que la expresión de la proteína DXR de *A. thaliana* desprovista de dicho dominio (At.DXR-C) en el mutante de *E. coli* defectivo en *dxr* resulte en colonias de menor tamaño que las originadas de transformar dicha cepa con otra forma más larga que lo incluye (At.DXR-L) (apdo. II.4.1.1). De este modo, la capacidad disminuida de la forma truncada de la DXR para revertir al mutante de *E. coli* avalaría la importancia de dicha región en la funcionalidad de la enzima en plantas. Resulta sugerente especular con la posibilidad de la implicación de dicho dominio en la interacción con otras proteínas, bien directamente involucradas en las distintas etapas de la ruta MEP de síntesis de IPP, o bien con aquellas otras que desempeñen funciones reguladoras.

III.2. LAS PROTEÍNAS DXS1, DXS2 Y DXR SE ENCUENTRAN UBICADAS EN LOS PLÁSTIDOS.

Desde el descubrimiento en los años 50 de la ruta del mevalonato en levaduras y

animales [52, 114, 279], se había asumido que el acetil-CoA era el precursor exclusivo en la síntesis de IPP en todos los organismos, síntesis que transcurriría en cualquier célula asociada al retículo endoplasmático (RE)/citosol. La incongruencia con aquel modelo de los resultados de marcaje obtenidos en el estudio de la biosíntesis de determinados isoprenoides específicos de bacterias y plantas propició, recientemente, la identificación de una ruta alternativa de síntesis de IPP independiente del mevalonato localizada en los plástidos, la ruta del MEP (apdo. I.2.3) [94, 171, 173, 238, 247]. Los resultados presentados en este trabajo confirman la localización plastídica de las enzimas DXS y DXR, coherentemente con la localización de la ruta del MEP en dichos organelos.

En efecto, las proteínas DXS1 y DXR fueron inmunodetectadas mediante anticuerpos policlonales específicos sobre cortes ultrafinos de microscopía electrónica. La marca fue observada distribuyéndose en la matriz estromática de cloroplastos maduros de hojas vegetativas de plántulas de *Arabidopsis* (apdo. II.2.2). Cierta señal residual fue identificada, asimismo, en el citoplasma, particularmente en el caso de la DXS1, señalando, presumiblemente, formas no procesadas de la proteína en tránsito hacia los cloroplastos.

Adicionalmente, fueron utilizadas construcciones resultantes de la fusión de los péptidos de tránsito de las proteínas DXS1, DXS2 y DXR con la proteína marcadora GFP dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S-CaMV). Con estas construcciones fueron transformadas por microbombardeo células del mesófilo de hojas jóvenes de *A. thaliana*, permitiendo la expresión transitoria de las proteínas quiméricas resultantes. La observación mediante microscopía confocal permitió detectar la fluorescencia propia de la GFP específicamente en cloroplastos, como revelaba la colocalización con la clorofila propia de dichos orgánulos (apdo. II.2.1). Estos resultados confirmaron lo observado mediante los ensayos de inmunolocalización para la DXS1 y la DXR. También delataron una particularidad propia a la DXS2. Así, la relación de tamaño existente entre los cloroplastos marcados con DXS2:PT:GFP y el resto, dentro de una misma célula, apunta a una localización en proplástidos. Los proplástidos constituyen formas plastídicas indiferenciadas propias de células meristemáticas en división, a partir de los cuales se generan los restantes tipos plastídicos, asegurando la continuidad de los mismos de generación en generación. Las observaciones por microscopía electrónica permitieron reconocer proplástidos en las células del mesófilo (apdo. II.2.1), de modo coherente con la potencialidad meristemática que estas células conservan aún en los tejidos adultos [229]. En todo caso, y aún cuando sean necesarias nuevas aproximaciones para confirmarlo, estos resultados parecen sugerir la relación de la función desempeñada por la enzima DXS2 con la síntesis de metabolitos asociados específicamente a estadios tempranos de desarrollo de los cloroplastos, metabolitos de los cuales se conocen numerosos ejemplos, entre ellos algunos de naturaleza isoprenoide. Efectivamente, resulta extremadamente interesante comprobar cómo la síntesis de giberelinas está íntimamente asociada a tejidos meristemáticos en proceso de división activa, como revela el perfil de distribución de la expresión del gen para la ent-kaureno

sintasa (KS) de *A. thaliana*, primera enzima específica que conduce a la síntesis de estas fitohormonas a partir del GGPP [273, 287]. Además, en trigo y guisante, la actividad enzimática correspondiente ha sido detectada mayoritariamente en aquellos orgánulos [1].

Los plástidos presentan una enorme plasticidad estructural y metabólica, adaptando su morfología y composición a la función del tejido o contexto fisiológico particulares en el que se encuentren. Los diferentes tipos plastídicos serán, de este modo, interconvertibles. Parece lógico pensar que la síntesis de isoprenoides plastídicos deba adaptarse a esta circunstancia y tenga lugar de un modo igualmente dinámico y adaptable. La confirmación de la función bioquímica de otras isoformas de la DXS en la síntesis de IPP resultaría coherente con la implicación de las mismas en la síntesis de isoprenoides específicos correspondientes a hipotéticos tipos plastídicos específicos como, por otro lado, parecen sugerir los resultados de filogenia molecular discutidos en los epígrafes III.1.2 y III.1.3.

No obstante, la observación de la DXS2.PT:GFP en proplástidos también podría interpretarse por la mayor eficacia de la maquinaria de translocación de proteínas en los mismos. Se conoce cómo la capacidad de importe de proteínas citosólicas por parte de los proplástidos decae hasta 20 veces en el transcurso de su diferenciación hacia cloroplastos o etioplastos [80]. Presumiblemente, el promotor 35S-CaMV conduciría a la sobreexpresión de la DXS2 por encima de los niveles endógenos, de modo que es razonable pensar que un sistema como el de los proplástidos podría asumir la entrada de un exceso de proteína DXS2 mejor que los propios cloroplastos maduros. En cualquier caso, habría de tratarse de una singularidad propia de la DXS2, pues los experimentos análogos con la DXS1 y la DXR fusionados a GFP, no reprodujeron el supuesto perfil de distribución observado en los proplástidos.

III.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *DXS1* Y *DXR* de *Arabidopsis thaliana*.

III.3.1. Los genes *DXS1* y *DXR* de *A. thaliana* se expresan de manera generalizada.

Uno de los aspectos fundamentales desarrollados en la presente memoria se centra en el análisis minucioso de los patrones de expresión de los genes *DXS1* y *DXR*, realizado en base a los estudios de la distribución de los transcritos y proteínas correspondientes a partir de aproximaciones de *northern-blot* y *western-blot* respectivamente, así como a partir del examen detallado de los perfiles de tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de las regiones 5' flanqueantes correspondientes a cada gen fusionados con el gen delator *GUS*.

Los transcritos identificados mediante los experimentos de *northern-blot* resultaron, en

cada caso, coherentes con los tamaños deducidos a partir de los ADNc clonados. En efecto, para *DXS1*, un ARNm único de 2,6 kb fue detectado en todas las muestras analizadas (Figuras II.13, II.14, II.15, II.24, II.25, II.26 y II.28). Sin embargo, en adición al transcrito de 1,8 kb correspondiente al ADNc clonado del gen *DXR*, otro ARNm de aproximadamente 1,4 kb fue detectado (Figuras II.14 y II.15). Además, a diferencia del mensajero de 1,8 kb que fue detectado en todos los tejidos analizados, la forma corta de 1,4 kb lo fue exclusivamente en la muestra correspondiente a las inflorescencias y a plantas etioladas y posteriormente expuestas a luz 24 horas. Aunque sean necesarios nuevos análisis para confirmar la funcionalidad de una supuesta segunda isoforma de la DXR generada a partir del ARNm corto, se conocen precedentes de formas isoenzimáticas de expresión tejido-específico derivadas, por ejemplo, de la utilización de promotores alternativos para un mismo gen. Entre ellos destacan los genes *HMG1L* y *C* o *FPS1L* y *C* (donde L y C reflejarían formas largas y cortas respectivamente de los productos génicos correspondientes) (apdo. I.4.1) [75, 180]. En algunos casos, estas isoformas seguían también patrones de localización subcelular diferentes. No obstante, habida cuenta de que la longitud estimada para el transcrito corto (1,4 kb) es menor que el de la propia secuencia codificante para la DXR, también parecería plausible pensar que dicho transcrito resultase en una forma de ARN antisentido tejido específico, con funciones moduladoras de la expresión del gen *DXR*. Algunos precedentes a esta hipótesis se encuadran en los trabajos en torno a la identificación de un ARN antisentido con la secuencia nucleotídica complementaria a la del gen *AAT1* de *A. thaliana* [4].

Los resultados de *northern-blot* mostraron una coincidencia en los patrones cualitativos de expresión de los genes *DXS1* y *DXR*. Efectivamente, en todas las muestras analizadas fue posible detectar los mensajeros correspondientes a ambos genes (apdos. II.3.1.1 y II.3.1.2). Sin embargo, se verificaron diferencias cuantitativas entre los diferentes tejidos y órganos en cuanto a los niveles de ARNm correspondientes a uno y otro gen. La expresión del gen *DXS1* se concentra en las hojas, tallos e inflorescencias, mientras que la expresión del gen *DXR* es especialmente abundante en inflorescencias y hojas, y en raíces presenta niveles relativos de mensajero mayores que en el caso de *DXS1*. En ambos casos los transcritos se acumularon a niveles destacados en las muestras obtenidas a partir de la suspensión celular de la línea T-87 [16].

El perfil de distribución de actividad GUS de las plantas transgénicas portadoras de la región -1738/+217 del gen *DXS1* fusionadas con el gen delator *GUS* resultó consistente con la distribución del transcrito de 2,6 kb detectado mediante las aproximaciones de *northern-blot* (apdo. II.3.1.3). Este extremo nos permite afirmar que la región del gen *DXS1* utilizada para efectuar la construcción quimérica descrita anteriormente contiene todos los elementos en *cis* necesarios para la regulación espacial y temporal de su expresión. Otro tanto puede afirmarse de la región 1158/+94 de la *DXR* que puede, a su vez, ser considerada promotor completo del gen (apdo. II.3.1.3).

El análisis de tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de las construcciones (-1738/+217)*DXS1:GUS* y (-1158/+94)*DXR:GUS* permitió, en cada caso, confirmar lo observado mediante *northern-blot*. Sin embargo, un examen más detallado, como se irá discutiendo, desveló sutiles diferencias entre los patrones de expresión de uno y otro gen (Figuras II.16 y II.17). Dichas diferencias podrían derivar, en cierta medida, del papel adicional del producto de la actividad *DXS1*, que además de ser el primer intermediario en la vía MEP, es también el sustrato para la síntesis de la tiamina y el piridoxol, cofactores comunes a todos los tejidos vegetales. Presumiblemente, el patrón de expresión del gen *DXR*, en tanto que responsable de la primera etapa exclusiva en la síntesis plastídica de IPP, habría de ceñirse de modo más fiel a los órganos y tejidos de la planta en los que tiene lugar síntesis de isoprenoides.

Las distintas aproximaciones abordadas han mostrado elevados niveles de expresión de los genes *DXS1* y *DXR* en cualquier tipo de hojas, procediesen de la roseta basal o del tallo (hojas caulinares), y en todos los estadios de desarrollo. El análisis de las plantas *DXS1:GUS* y *DXR:GUS* puso de manifiesto cómo la expresión de ambos genes ocurría de modo generalizado en todas las partes y tejidos de las hojas, y de modo especialmente intenso en el tejido vascular. Esto último, previsiblemente, sería debido a la mayor permeabilidad de estas células al X-Gluc (sustrato de GUS). La función fotosintética de algunos de los isoprenoides más importantes sintetizados en los plástidos (carotenoides y cadena fitol de la clorofila) explicaría la intensa y generalizada expresión de los genes *DXS1* y *DXR* en las hojas. También hay que considerar la emisión de terpenos volátiles que tiene lugar en las hojas en el contexto de los sutiles mecanismos de defensa desencadenados frente a los herbívoros [301]. Por otra parte, los experimentos de tinción histoquímica a diferentes tiempos de incubación con X-Gluc no arrojaron diferencias perceptibles en la expresión de ninguno de los dos genes asociadas al proceso morfogénico de las hojas. De hecho, esta particularidad es compartida por el gen *DXS1* del tomate [178], y resulta coherente con el hecho de que el desarrollo de las hojas no coincida con picos de acumulación de ningún isoprenoide específico.

La falta de coincidencia en las hojas de los patrones de expresión de los genes involucrados en la vía MEP y del MVA de síntesis de IPP apuntarían a que en este órgano no habría de verificarse la interacción o comunicación entre ambas vías, aspecto que se irá discutiendo posteriormente en esta discusión. En general, se ha descrito una baja o nula expresión de los genes de la vía del MVA de síntesis de IPP en hoja madura. Esto ha sido observado para los genes *AAT2* [4], *HMS* (Díez-Juez, E. y Boronat, A.; resultados no publicados), *MVK* [176], *HMG* (Marín, C. y Boronat, A.; resultados no publicados), *FPS1* y *FPS2* [73, 75, 76] o *SQS* [83]. En todos estos casos, la expresión aparece restringida a hojas en crecimiento de plantas jóvenes de la roseta o a los propios primordios foliares, por lo que se ha asociado a los requerimientos en esteroides que son precisados para la biogénesis de los componentes estructurales de las membranas propias de los tejidos en diferenciación o elongación, así como, aunque de forma cuantitativamente menor, con la síntesis de

brasinosteroides. Cabe destacar que, entre los distintos procesos directamente regulados por estas fitohormonas se encuentran, precisamente, la diferenciación y la elongación celulares [67].

De un modo más general, las observaciones realizadas tampoco parecen apoyar la idea de una variación en los niveles de expresión del gen *DXS1* o *DXR* a lo largo de las etapas tempranas del desarrollo de las plantas (apdos. II.3.1.1 y II.3.1.3). La expresión de uno y otro gen se mostraba intensa y constitutiva en todos los estadios de desarrollo analizados, manifestándose en la radícula emergente desde el mismo momento de la germinación. Sin embargo, otros procesos particulares de desarrollo de la planta, entre los que se incluyen aquellos relacionados con la morfogénesis de las inflorescencias, sí parecen cursar con una modulación concomitante en la expresión de uno y otro gen. De esta manera, la variación en los niveles de mensajero *DXR* podría estar relacionada con algún aspecto concreto del desarrollo morfogénico de la flor. No hay que olvidar la pérdida de clorofila y rediferenciación hacia leucoplastos que sucede en los cloroplastos presentes en la lámina de los pétalos durante su formación, en un proceso en el que únicamente se conservan los cloroplastos del pie [223]. Precisamente es a esa zona a la que se circunscribe la expresión del gen *DXR* en las flores maduras, como reveló la tinción histoquímica de las plantas transgénicas (-1158/+94)*DXR*:GUS (Figura II.17).

Concretamente, las inflorescencias constituyen uno de los órganos donde, tal y como se desprende de la observación detallada de los patrones de expresión GUS dirigidos por los promotores estudiados, se apreciaron pequeñas aunque significativas diferencias en cuanto al patrón de expresión de uno y otro gen. Ésta se reveló ampliamente generalizada en el caso del gen *DXS1*, pero débil en los pétalos para la *DXR*. Hemos examinado también el elevado nivel de tinción detectado en el gineceo y el androceo de plantas transgénicas *DXS1*:GUS y *DXR*:GUS, tejidos en los que tiene lugar la síntesis de pigmentos (Figura III.1) y otros isoprenoides. En este sentido, ha sido recientemente caracterizado un conjunto de terpenos volátiles implicados, presumiblemente, en la atracción de insectos en los poco frecuentes, pero significativos, episodios de fecundación cruzada que ocurren en *Arabidopsis*, así como en la protección de los órganos reproductivos frente al daño oxidativo o en la defensa frente a patógenos varios [56, 296]. Esto explicaría la expresión en el androceo y el gineceo de los genes *DXR* y *DXS1*, particularmente intensa para este último a pesar de lo que había sido previamente referido [101], y que seguiría un patrón de distribución espacial semejante al de las terpeno sintasas responsables de la síntesis de aquellos terpenos específicos de flores de *Arabidopsis* [56, 296]. Estas observaciones podrían también hacerse extensibles a los granos de polen, donde no puede olvidarse el papel estructural atribuido a los carotenoides [35]. Otro ejemplo provendría de la identificación de proteínas relacionadas con el desarrollo del tubo polínico que son geranilgeraniladas, como la *Rop1*, que pertenece a la subfamilia de las GTPasas tipo Rho [322]. Asimismo, han sido caracterizadas otras proteínas íntimamente asociadas al desarrollo de las flores y que son modificadas por grupos prenilo, particularmente en *Arabidopsis*, como

APETALA1 [325], pero también en otros sistemas, como la proteína LIM1 de las lilas, *Syringa vulgaris* [241]. Sin embargo la implicación del FPP o el GGPP de origen plastídico en la prenilación de proteínas no ha sido aún confirmada.

Por otro lado, resulta interesante señalar cómo las inflorescencias constituyen uno de los órganos en los que se concentra la expresión de los genes de la ruta del MVA caracterizados hasta el momento [4, 73, 75, 76, 83, 176]. Todos estos datos resultarían congruentes con una contribución de ambas vías a la síntesis de isoprenoides especializados propios de los órganos reproductivos de *Arabidopsis*. Esta interacción podría estar implicada, por ejemplo, en la síntesis del dolicol responsable de la glicosilación de las glicoproteínas que median la interacción polen-papilas estigmáticas [293]. También podría extenderse a la cubierta del grano de polen, particularmente rico en esteres de esteroides y en otros triterpenoides de origen citosólico [221, 222]. La formación del tubo polínico viene acompañada además por una intensa producción de brassinosteroides, fitohormonas generadas a partir de los esteroides [67].

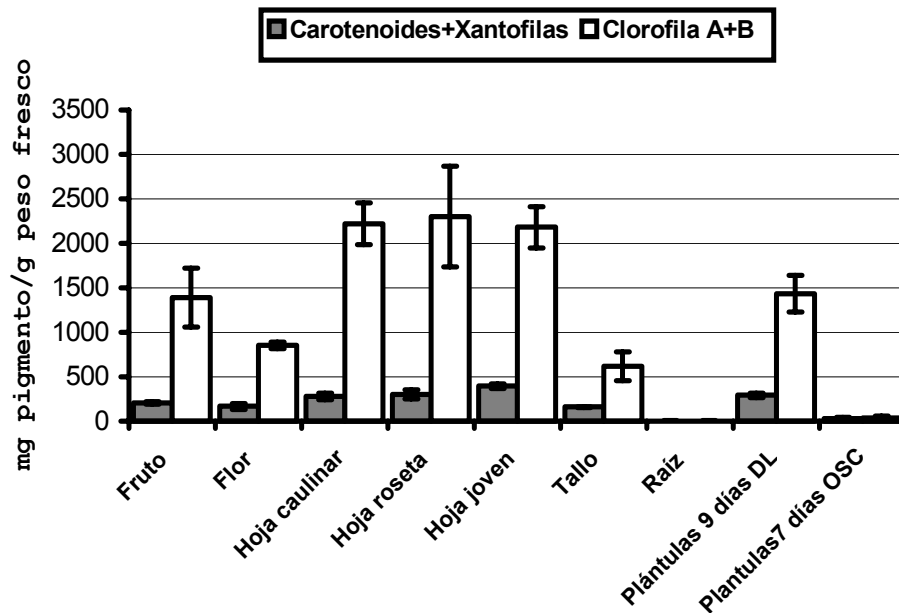
En lo que concierne a la expresión del gen *DXR* en la zona de abscisión de flores y frutos, es destacable como esta se iniciaría con posterioridad al proceso de antesis, manteniéndose durante toda la maduración del fruto y prolongándose hasta la dehiscencia del mismo. Por el contrario, la expresión de *DXS1* en dicha zona aparece más tempranamente durante el desarrollo de la flor, aunque permanece también en los estadios ulteriores de desarrollo/maduración de la inflorescencia y el fruto. El ácido abscísico (ABA) (fitohormona derivada de la metabolización de compuestos carotenoides) fue originalmente relacionada con el proceso de abscisión del fruto, y su producción podría justificar la expresión de los genes *DXS1* y *DXR* localizada en la zona en que tiene lugar dicho proceso [284]. Una vez más, esta particularidad es compartida por otras enzimas asociadas a la ruta del mevalonato, particularmente la isoforma 2 de la FPS [76]. No puede descartarse, como ya ha sido apuntado, la entrada de IPP citosólico en los plástidos para incorporarse a los carotenoides y, consecuentemente, al ABA [195]. Los autores basaron esta afirmación, mayoritariamente, en experimentos desarrollados sobre extractos de aguacate en los que comprobaron la capacidad del MVA marcado de incorporarse al ABA sintetizado *de novo*. No obstante, algunos autores descartan en la actualidad la implicación del ABA en el proceso de abscisión [104, 229].

La expresión de los genes *DXS1* y *DXR* descubierta en las raíces de plantas jóvenes y adultas parece apuntar hacia la producción de isoprenoides de naturaleza plastídica diferentes de aquellos producidos en el contexto de la interacción con micorrizas y relacionados con otros procesos no fotosintéticos que tengan lugar en los mismos. Por ejemplo, se conoce que la síntesis de ABA está localizada también en este órgano [104]. También aquí se aprecian diferencias entre el patrón de expresión observado, más restringida a las zonas cercanas a la parte aérea de las raíces para *DXR*, y más generalizado en el caso de *DXS1*. En este contexto, caben destacar los reducidos niveles de tinción GUS encontrados en las raíces de las plantas (-

1158/+94)DXR:GUS respecto de los niveles de transcrito detectados mediante *northern-blot* (Figuras II.15 y II.17). Dicha contradicción podría explicarse, al menos parcialmente, por el diferente origen de las muestras utilizadas, y que en el caso del experimento de *northern-blot* efectuado con la sonda específica para la DXR procedían de plantas jóvenes crecidas en placas de germinación y, por tanto, con las raíces expuestas a la luz, factor ambiental que, como veremos mas adelante, tiene un claro efecto positivo sobre la expresión de los genes DXS1 y DXR. Por su parte, la distribución de la expresión detectada para algunos genes de la vía del MVA en las regiones meristemáticas o en división/elongación celular intensa cerca del ápice de las raíces [83, 176] o, particularmente, en las zonas de emergencia de las raíces secundarias [76], no parece coincidir, en lo esencial, con lo referido para los genes DXS1 o DXR, apuntando a que la vía MEP no jugaría un papel relevante en estos tejidos concretos.

En general, se encontró una buena correlación entre los patrones de distribución de los mensajeros DXS1 y DXR y el de las proteínas correspondientes. Los tamaños de las proteínas detectadas, se ajustaban, en todos los casos, a los esperados para las formas procesadas de las proteínas DXS1 y DXR. Sin embargo, las variaciones en los niveles de proteína detectados mediante *western-blot* en las plantas crecidas en presencia o en ausencia de luz resultaron relativamente menos acusadas que las variaciones detectadas para los transcritos correspondientes o que los valores de actividad GUS para las plantas transgénicas DXS1:GUS y DXR:GUS (apdos. II.3.1.1 y II.3.1.3). Asimismo, aunque las proteínas fueran detectadas, al igual que los ARNm, en todos los tejidos y órganos analizados de la planta adulta, los niveles encontrados de unas y otros mostraban variaciones cuantitativas. Este hecho reflejaría posibles mecanismos de regulación postranscripcional que modularían, en cada caso, los niveles de traducción de los mensajeros, así como la estabilidad de estos o la de las proteínas correspondientes. Una explicación parcial a esta observación podría derivar también de la sobrerrepresentación de la RUBISCO en los tejidos fotosintéticamente activos sobre el resto de proteínas, que estuviese alterando las concentraciones relativas reales de las proteínas a estudio. Esto explicaría por que los niveles de proteína (tanto DXS1 como DXR) encontrados en las hojas fuesen menores que los detectados en, por ejemplo, las raíces, a la inversa de lo que ocurría con los transcritos. Por otra parte, también eran notorias las discrepancias entre los valores de proteína encontrados respecto al contenido en pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas) acumulados para cada muestra particular (Figura III.1), sobre todo si partimos de la premisa de que el flujo metabólico dirigido por las dos primeras enzimas de síntesis plastídica de IPP está dirigido, principalmente, hacia la síntesis de aquellos productos isoprenoides.

Figura III.1: Análisis cuantitativo de clorofilas y carotenoides extraídos de distintos tejidos de *A. thaliana*. Cuantificación realizada sobre muestras procedentes de la variedad Col. 3 de *A. thaliana*, midiendo dos réplicas para cada una de ellas según una adaptación del método de Lichtenthaler [170] (apdo. V.4.8). Las columnas representan las cantidades de pigmento así estimadas, mientras que las barras indican, en cada caso, las desviaciones estándar. DL, Día Largo y OSC, oscuridad.



Tampoco puede ser descartada la implicación de familias de productos tan heterogéneas como los carotenos en funciones distintas de las atribuidas hasta el momento. De hecho, es conocida la desproporción entre las concentraciones de estos compuestos en determinados tejidos de *Arabidopsis* y los valores de expresión alcanzados por algunos de los genes más directamente implicados en su biosíntesis, como el que codifica para la actividad fitoeno sintasa (*PSY*). La actividad transcripcional dirigida por el promotor *PSY* duplica en flores y frutos los valores alcanzados en las hojas, y alcanza valores altamente significativos en otros tejidos, como las raíces, prácticamente desprovistos de carotenos [314]. El patrón de expresión del gen *PSY* coincide, en lo esencial, con el de *DXS1* y *DXR*.

Todos estos resultados reafirman la participación de los intermediarios producidos por la *DXS1* y la *DXR* en la síntesis de isoprenoides específicos distintos de los pigmentos isoprenoides de carácter fotosintético. Conviene señalar que, aunque *A. thaliana* no destaque precisamente como especie productora de metabolitos secundarios de naturaleza isoprenoide, tales como las fitoalexinas, aceites esenciales, sustancias alelopáticas o en general productos que median la interacción planta-entorno, todos ellos ampliamente caracterizados en otras especies, los resultados aquí presentados y otros relativos a la reciente identificación de una amplia variedad de compuestos isoprenoides en *A. thaliana*, algunos específicos de las inflorescencias [56, 296] o las hojas [301], aconsejan a una revalorización de esta especie como productora de derivados de IPP plastídico no conocidos hasta el momento.

III.3.2. El papel de la luz en la expresión de los genes *DXS1* y *DXR*.

La importancia de la luz para las plantas no se limita a ser su fuente primera de energía. La luz se erige, independientemente o de modo integrado con el agua y la gravedad, en el más importante y complejo factor/señal ambiental responsable de inducir y controlar numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, tales como aquellos relativos a los ritmos circadianos, a los patrones de desarrollo propios de los meristemas foliares, a la germinación o la iniciación de la floración, amén de la fotosíntesis o la biogénesis de los cloroplastos [210]. Muchos de estos procesos, enmarcados en el llamado programa de desarrollo fotomorfogénico, van aparejados con la síntesis de muy diversos isoprenoides plastídicos, algunos esenciales como las clorofilas y los carotenoides. Este aspecto nos llevó a estudiar la posible influencia de la luz en la expresión de los genes *DXS1* y *DXR*.

Los mayores niveles de mensajero y proteína *DXS1* y *DXR* detectados entre las plántulas crecidas en día largo (16 horas luz:8 horas oscuridad) en relación a aquellas otras crecidas en oscuridad apuntaban hacia un papel relevante de la luz sobre la expresión de ambos genes (apdo. II.3.1.1). Estos resultados fueron estimados cuantitativamente al medir la actividad GUS de plantas (-1738/+217)*DXS1:GUS* y (-1158/+94)*DXR:GUS* crecidas bajo unas y otras condiciones (apdo. II.3.1.4). Sin embargo, dichas diferencias podían estar implícitas en el propio proceso morfogenético que dirige el programa de desarrollo específico en luz o en oscuridad. En este sentido, la constatación de que durante el proceso de desetiación tenía lugar un incremento paralelo en los niveles de transcrito *DXR* y proteína *DXS1* confirmaría la capacidad de respuesta de ambos genes a la luz (Figura II.14). Esta capacidad estaría acorde con el papel desempeñado por las enzimas codificadas por uno y otro gen en relación con la síntesis masiva de pigmentos fotosintéticos que tiene lugar en el contexto de la biogénesis de los cloroplastos que acompaña a la desetiación.

No obstante, tampoco parece aventurado considerar que el estudio detallado de los numerosos procesos regulados por la luz conduzca, por mor de su variedad, a la identificación de otros compuestos isoprenoides específicos distintos de los pigmentos fotosintéticos, estrechamente relacionados con el desarrollo fotomorfogénico.

Otro interesante aspecto deriva de los niveles de tinción GUS observados durante el desarrollo escotomorfogénico (en oscuridad) de aquellas plantas portadoras de la región 5' flanqueante de los genes *DXS1* y *DXR* fusionados con el gen *GUS* (Figura II.16 y II.17). La notoria expresión alcanzada por los genes *DXS1* y *DXR* en oscuridad, ratificados por los niveles de proteína detectados mediante *western-blot*, no debe tampoco ser desestimada (Figura II.13). Este fenómeno resulta, cuanto menos, sorprendente, máxime cuando se constata que los únicos isoprenoides de los que se conoce su síntesis en *Arabidopsis* bajo estas condiciones han sido caracterizados como derivados de IPP de origen citosólico [67]. En efecto, los brasinosteroides,

reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza esteroídica [28, 206], han sido ampliamente caracterizadas como involucradas en los cambios morfológicos que se producen en las plantas cuando crecen privadas de luz [206], y que explicarían la represión por la luz de los genes *HMG* [98, 167, 180] o *SQS* [83], responsables de la biosíntesis de los precursores de estas fitohormonas.

III.3.3. El análisis del promotor *DXS1* revela la presencia de numerosas secuencias con homología a elementos en *cis* de unión a factores de transcripción relacionados con el papel biológico del la *DXS1*.

La disminución de los niveles de actividad GUS, claramente perceptible entre las plantas transgénicas portadoras de la región (-860/+217) en relación con las (-605/+217)*DXS1*:GUS, así como su recuperación en aquellas otras (-359/+217)*DXS1*:GUS, refleja, presumiblemente, la presencia de una combinación de elementos en *cis* con funciones activadoras y represoras de la transcripción en el promotor *DXS1* (apdo. II.3.2). Si bien esta afirmación procede de la observación de un elevado número de muestras de diferentes tejidos procedentes de las distintas líneas transgénicas analizadas, la identificación y confirmación de los hipotéticos elementos de control positivo y negativo presentes en las regiones -860/-607 ó -605/-361 respectivamente, precisaría de análisis ulteriores. En todo caso, estas discontinuidades en la actividad transcripcional dirigida por un promotor son comunes a genes que precisan de una fina regulación. Un ejemplo a propósito viene constituido por el gen *SQS1* [83].

El análisis de las plantas transgénicas portadoras de delecciones seriadas del promotor *DXS1* fusionado con el gen *GUS* permitió, además, definir su región promotora mínima. En efecto, la región comprendida entre las posiciones -359 a +217 del promotor *DXS1* parece contener todos los elementos mínimos necesarios para dirigir la expresión, tanto cualitativa como cuantitativamente, del gen *DXS1*. Esta afirmación resulta de la observación de que, al eliminar la región -359/-188, la actividad GUS detectable mediante tinción histoquímica desaparece por completo en todas las condiciones, tejidos y momentos del desarrollo analizados. La búsqueda en diversas bases de datos de motivos consenso presentes en dicha región del promotor resultó en una serie de entradas relacionadas, algunas de ellas estrechamente, con la función biológica del producto del gen *DXS1* (Tabla III.1). Para ello, se procedió a la búsqueda en la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) [130], PlantCare (*Plant cis-acting regulatory DNA Elements*, <http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>) [250] y TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), aquellas dos específicas de promotores de plantas. La búsqueda se restringió a los elementos presentes en la región -359/-188, caracterizada por contener los elementos mínimos del promotor *DXS1*, que presentaban una homología significativa con la secuencia consenso correspondiente y que habían sido previamente caracterizados como responsables de modular la expresión de otros genes en

Arabidopsis. Asimismo, únicamente se contemplaron aquellos motivos relacionados directamente con la función del producto codificado por el gen *DXS1*. La Tabla III.1 enumera todos ellos, señalando aquellos comunes a los promotores de los otros dos genes estudiados en esta memoria, *DXS2* y *DXR*.

NOMBRE:	SECUENCIA CONSENSO:	REFERENCIA:	PROMOTOR DXS2:	PROMOTOR DXR:
Cajas I	GATAA	[294]	SÍ	SÍ
Sitios GT-1	GRWAAW	[12, 294]	SÍ	SÍ
Motivo ATC	-	[12]	NO	SÍ
Motivos TGACG	TGACG	[294]	SÍ	NO
CiadianLeLHC	CAANNNNATC	[220]	SÍ	NO
Sitios "Evening"	AAAAATATCT	[121]	NO	NO
"Root Motif"	ATATT	[96]	SÍ	SÍ
MYB.Ph3	1:WWAAAACSGTTAY.	[38, 127, 276]	SÍ	SÍ
AGAMOUS	2:AGTTAGTTA NTTWCCWAAWNNGGNAAN	[135, 229]	SÍ	SÍ
ABRE	YACGTGGC	[17, 104, 149]	NO	NO
Sitios P	CCWACCNN	[115]	SÍ	SÍ
Motivo ATCTA	ATCTA	[314]	SÍ	SÍ

Tabla III.1: Relación de motivos conservados en la región -359/-188 del gen DXS1 identificados mediante las bases de datos PLACE, Plant CARE y TFSEARCH. Se han considerado aquellos sitios que se ajustan significativamente al consenso y que habían sido caracterizados previamente en genes de A. thaliana involucrados en procesos relacionadas con la función desempeñada por el gen DXS1. En la parte superior de la tabla aparecen aquellos relacionados con la respuesta a la luz o a oscilaciones circadianas y en la inferior, los asociados con otras funciones. Se ha considerado significativa una homología por encima del 85% (o del 75% para las búsquedas en el TFSEARCH). Se indica también la presencia o no de todos aquellos motivos en la región (-1158/+94) del gen DXR y (-1184/+76) del gen DXS2 (en este caso considerando como posición +1 la del extremo 5' conocido). Claves: R, A+G; Y, C+T; S, G+C; W, A+T; N, A+C+G+T

La Figura III.2, por su parte, muestra la representación esquemática de todos estos motivos identificados sobre el promotor del gen *DXS1*, ampliando la región -359/-188, correspondiente a la región mínima del promotor. Para mayor claridad en la exposición, se han señalado por separado aquellos motivos relacionados con la inducción por luz o regulación por ritmos circadianos y los restantes motivos identificados. La figura permite destacar los numerosos elementos en *cis* presentes en dicha región del promotor, particularmente de aquellos relacionados con la respuesta a luz.

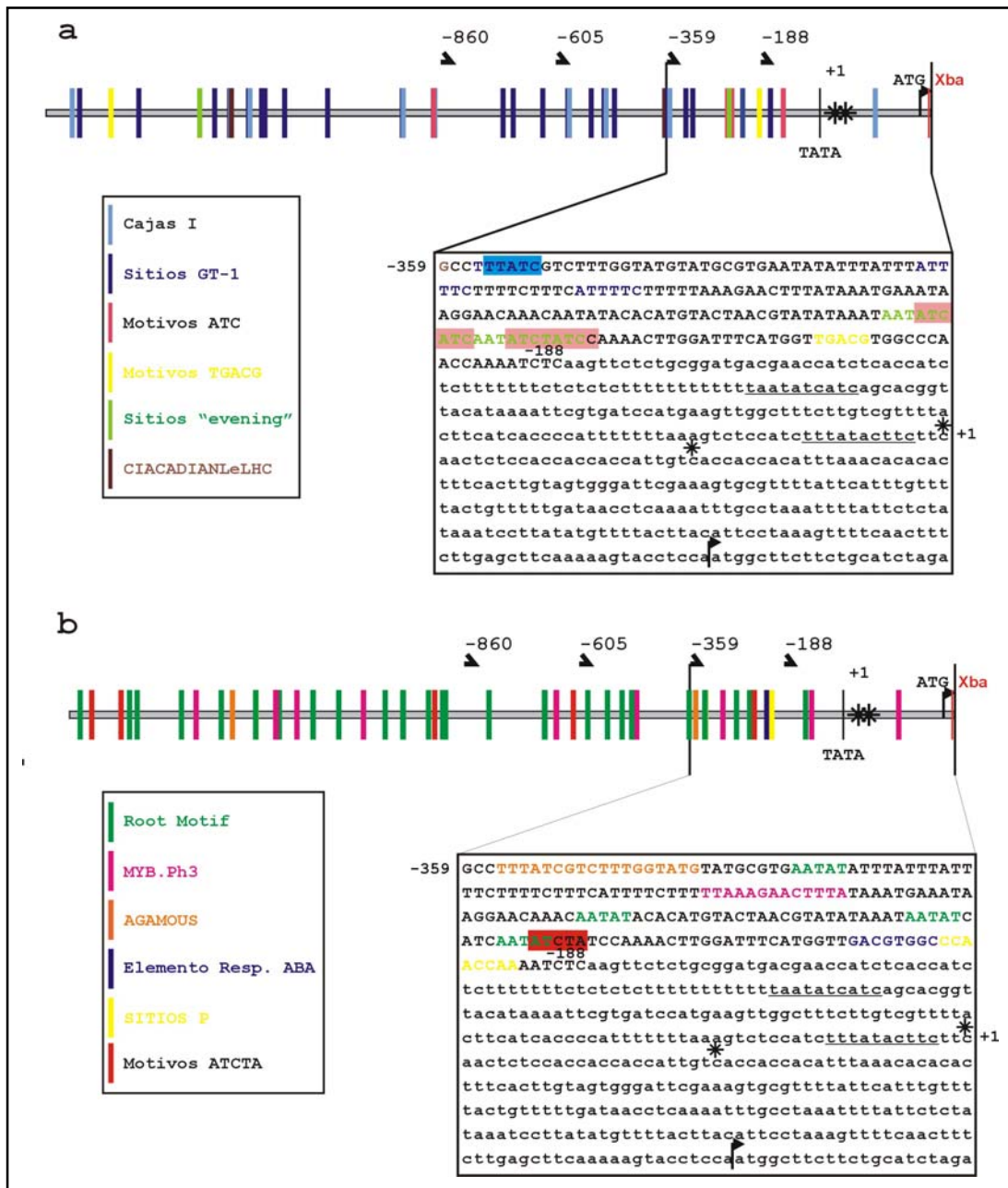


Figura III.2: Análisis "in silico" del promotor del gen *DXS1*. La barra representa el promotor considerado como de referencia (-1738/+217). Sobre ella se han representado todos los motivos de la Tabla III.1, identificados en la región -359/-188 del gen *DXS1*. Un código de color señala cada uno de los motivos encontrados, distinguiendo entre aquellos relacionados con la respuesta a luz o a oscilaciones circadianas de la expresión (a) y los asociados a otras funciones (b). La región (-359/-188)*DXS1* aparece en mayúscula, señalando la posición de los motivos encontrados sobre la secuencia correspondiente. Los asteriscos aluden a los dos principales inicios de transcripción encontrados mediante los experimentos de RACE 5', marcándose la posición considerada como +1. Por su parte, las hipotéticas cajas CAAT y TATA, aparecen subrayadas. Finalmente, la flecha indica el codón de inicio de la traducción.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los aspectos más destacados en la regulación de la expresión del gen *DXS1* (y *DXR*) se refiere a su inducibilidad por la luz (apdo. III.3.2). Las plantas, por su carácter fotosintético, se han hecho extremadamente sensibles a la luz que reciben, pudiendo monitorizar cambios en la cantidad (intensidad), calidad (longitud de onda) o duración de la misma. Estos cambios, como ya apuntamos, inducen una serie de respuestas, mediadas por la expresión de un amplio conjunto de genes plastídicos y nucleares, que conforman lo que se ha dado en llamar desarrollo fotomorfogénico. Además, todos estos procesos dependientes de la luz son controlados por la acción combinada de diversos sistemas fotoreceptores, que comprenden fundamentalmente el fitocromo y el criptocromo [63, 310]. Los mecanismos de transducción de señal de estos sistemas son, por el momento, poco conocidos, pero concluyen, en cualquier caso, con una fina regulación de la expresión de determinados genes [63, 310]. Los esfuerzos realizados en este campo han permitido identificar, en los últimos años, un gran número de elementos en *cis* y factores de transcripción que se unen a los mismos en promotores de genes cuya expresión es reactiva a la luz [12, 294]. De esta manera, la capacidad de un promotor para ser regulado por la luz resultará de la combinación específica de varios elementos actuantes en *cis* [294]. De esta manera, y de modo coherente con el comportamiento observado, numerosos de estos elementos responsables de la transcripción regulada por luz han sido encontrados en la región (-359/-188) del promotor del gen *DXS1*.

Entre ellos hemos señalado los sitios GT-1, que aparecen dispuestos en tándem en numerosos promotores regulados por luz [12, 294], aunque también han sido relacionados con la inhibición de la expresión en raíces [304, 332]; las cajas I [294]; los motivos TGACG, originalmente caracterizados en promotores implicados en la respuesta a auxinas y a ácido salicílico, aunque frecuentes también en promotores sensibles a luz y finalmente los motivos ATC [12]. Parece razonable pensar que, dado el papel de la actividad enzimática *DXS1*, estos u otros elementos aún no identificados, jueguen un papel determinante en su respuesta frente a la luz durante, por ejemplo, el desarrollo fotomorfogénico o el proceso de desetiación, que conduzcan de manera eficaz, y de forma coordinada con otros genes, a la síntesis de los pigmentos isoprenoides y demás elementos que conforman el aparato fotosintético. Por todo esto, no resulta extraño que los motivos señalados, excepción hecha de los TGACG, hayan sido encontrados también en el promotor del gen *DXR* (Tabla III.1). La confirmación de la funcionalidad de estos elementos en cuanto a su capacidad de respuesta a la luz deviene uno de los aspectos prioritarios para investigar en el futuro, en el ámbito de la comprensión global de la regulación mediada por la luz de los genes implicados en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos.

Otro aspecto a considerar en el estudio de los procesos biosintéticos dependientes de la luz relacionados con la actividad del gen *DXS1*, es el carácter dual de la propia luz, que la hace responsable, además de su ya conocida función, de la capacidad para infligir efectos deletéreos sobre el aparato fotosintético emergente [211]. Por ello es esperable que la biosíntesis de

carotenoides y/o clorofilas así como otros compuestos de origen isoprenoide con propiedades fotoprotectoras esté exquisitamente coordinada tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

A estas cuestiones podría responder la presencia del motivo ATCTA. Se trata de un motivo descubierto muy recientemente durante la caracterización del promotor *PSY* de *Arabidopsis*, y que se ha revelado como imprescindible para su actividad transcripcional [314]. Este motivo ha sido encontrado en numerosos promotores de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y tocoferol (entre ellos *DXS1* y *DXR*), y parece ser común a muchos genes relacionados con el desarrollo del aparato fotosintético, lo cual podría indicar un papel global de dicho motivo en la co-regulación de todos estos genes. El motivo ATCTA presenta cierta similitud con un elemento en *cis* caracterizado en varios genes *cab* (que codifica para las proteínas ligantes de clorofila a/b), que sería reconocido por una proteína denominada CCA1. Este factor de transcripción, relacionado con los factores MYB, está implicado en la regulación mediada por fitocromo de dichos genes [310].

Siguiendo con la enumeración de los motivos hallados en el promotor *DXS1*, encontramos los sitios P. Se trata de motivos originalmente identificados en promotores de genes responsables de la pigmentación de los frutos y flores del maíz, particularmente aquellos que codifican para enzimas biosintéticas de compuestos de naturaleza flavonoide. Dichos elementos serían reconocidos por el producto del gen P [115]. Este gen es un miembro específico de la familia génica *MYB*, ampliamente caracterizada en numerosas especies, y que en plantas ha sido frecuentemente relacionado, actuando de modo concertado con proteínas bHLH (*basic helix-loop-helix*), con la activación coordinada de genes responsables de la biosíntesis de productos de naturaleza flavonoide, amén de otras funciones [276]. De hecho, los motivos reconocidos específicamente por el factor MYB.Ph3 han sido identificados también en la región -359/-188 del promotor *DXS1*, flanqueado por otras 4 de estas secuencias consenso, de modo similar a lo encontrado, por ejemplo, en el gen responsable de la actividad chalcona sintasa, considerada una de las etapas limitantes de la síntesis de flavonoides [38, 127, 276]. Algunos de estos compuestos, como las flavonas, los flavonoles y las antocianinas, desarrollan funciones similares a las de algunos pigmentos isoprenoides de naturaleza plastídica, como los carotenoides o los tocoferoles [38, 127]. En efecto, gracias a que poseen un máximo de absorbancia en el espectro de la luz ultravioleta, resultan extremadamente importantes en órganos como las hojas como protectores frente a los efectos dañinos de las radiaciones UV sobre las células del mesófilo. Aún más, algunos de estos compuestos son responsables, también junto a los carotenoides, de la coloración final de algunos órganos florales donde funcionan, adicionalmente, como atrayentes para la polinización [38, 127].

A la luz de la presencia de los elementos P y MYB.Ph3 en el promotor *DXS1* podría especularse con que los factores de transcripción acoplados a dichos elementos estarían orquestando la expresión de toda una batería de genes implicados en la biosíntesis de

compuestos de variado origen pero que desempeñan funciones comunes. Se conocen precedentes de fenómenos de este tipo. Sin ir más lejos, es bien conocido cómo los múltiples mecanismos que ayudan a prevenir y/o reparar el daño oxidativo resultante de la generación de moléculas reactivas durante la fotosíntesis actúan concertadamente [24, 211].

Asimismo, es interesante comprobar cómo 23 de los genes codificantes para enzimas de la ruta biosintética de los fenilpropanoides (familia de metabolitos que incluye a los flavonoles y a las antocianinas), siguen una regulación circadiana de la transcripción (con un pico 4 horas "bsd", abreviatura en inglés de "antes del amanecer subjetivo") extremo que ha podido ser puesto de manifiesto mediante el uso de "microarrays" de ADN [121]. En dicho trabajo se ha reseñado un elemento conservado en los promotores de muchos de estos genes que siguen una oscilación cíclica en su expresión, entre los que se incluyen también factores de transcripción de la familia MYB [121], alguno de los cuales (PAP1) ha sido responsabilizado genéricamente de la inducción de varias enzimas de la ruta de los fenilpropanoides [192]. Este elemento, denominado elemento "evening" resultaría esencial para controlar el ritmo circadiano, y está presente también en la región (-359/-188) del promotor del gen *DXS1*, gen para el que ha sido confirmada la oscilación circadiana de su expresión [121]. La fase descrita por el pico de expresión del gen *DXS1* (4 horas "asd", después del amanecer subjetivo) coincide con la encontrada para una nutrida representación de genes íntimamente asociados con la fotosíntesis, entre ellos los genes *lhca* y *B* [121, 192]. Las proteínas LHC forman parte de los complejos colectores de luz presentes en los fotosistemas [38, 127]. En este sentido, se ha encontrado otro motivo (CircadianLeLHC), previamente caracterizado en las regiones 5' flanqueantes de varios de los genes *LHC* del tomate como necesaria para su expresión circadiana [220]. Los resultados preliminares que apuntarían hacia una oscilación periódica de la biosíntesis de carotenoides (Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A.; resultados no publicados) sumado al conjunto de evidencias presentadas confiere mayor peso a la hipótesis que sostendría que los diversos elementos que conforman el aparato fotosintético seguirían una expresión, armonizada por el llamado "reloj biológico", dependiente del reconocimiento de estos motivos consenso en las regiones promotoras de los genes involucrados en su formación.

El gen homeótico *AGAMOUS* está enormemente estudiado por el importante papel desempeñado en el desarrollo floral. Su mutación provoca la transición de estambres en pétalos y la desaparición de los carpelos que son sustituidos por series sucesivas de sépalos y pétalos [229]. El producto codificado por este gen aparece regulando la expresión de numerosos genes en las flores, uniéndose a una secuencia consenso presente en las regiones 5' flanqueantes correspondientes y altamente conservada con otros factores de transcripción descritos en otros sistemas biológicos, como los humanos o las levaduras [135]. La secuencia consenso de unión a *AGAMOUS* se encuentra también en el gen *DXS1*, para el que hemos verificado elevados niveles de expresión en inflorescencias (Figuras II.15 y II.16). Podría argüirse que alguno de los productos sintetizados a partir de la ruta MEP estaría implicado en la correcta morfogénesis

floral, particularmente algún regulador del crecimiento de naturaleza isoprenoide, justificando así la eventual respuesta del gen *DXS1* frente a AGAMOUS. En este sentido, es bastante conocido el papel del ácido abscísico (ABA) en diversos aspectos del desarrollo floral, particularmente en el retraso de la floración. El efecto sería antagónico respecto del desempeñado por las giberelinas y condicionado por la duración del fotoperíodo y los ritmos circadianos [104]. De hecho, tanto el ABA como las giberelinas son sintetizados a partir del GGPP plastídico [104, 124, 195]. Por otra parte, se conocen varias proteínas en las plantas que están unidas covalentemente a grupos prenilo, propiedad que les resulta esencial para el desempeño de su función y que en ocasiones está relacionada con el desarrollo de las inflorescencias. Es el caso del factor de transcripción APETALA1 [241, 325]. Otras funciones relacionadas con el papel de los isoprenoides en las inflorescencias aparecen detalladas en el apartado III.3.1.

Otro de los elementos presentes en el promotor *DXS1* es el motivo ABRE (*ABA Responsive Element*). Este motivo está ampliamente caracterizado como determinante de la capacidad de un gen para responder al ABA [17, 104, 149, 275]. Se conocen varias proteínas de unión a estos elementos que tienen en común el poseer en su estructura el dominio básico de cremallera de leucina (bZIP).

Una de las funciones esenciales del ABA durante el crecimiento vegetativo de la planta es la de optimizar el desarrollo en respuesta a los procesos de estrés abiótico, manteniendo la homeostasis. Particularmente, la respuesta al estrés hídrico constituye, de entre aquellas dependientes del ABA, uno de los mecanismos adaptativos más importantes para las plantas. Esta fitohormona actuaría, a través de la regulación de la transcripción de una batería de genes, promoviendo el conjunto de respuestas fisiológicas ejecutadas para hacer frente a todas aquellas condiciones adversas de crecimiento como la sequía, la congelación o la salinidad, que cursan con la deshidratación de la planta [17]. Así, podría sospecharse también la implicación de algunos isoprenoides plastídicos en los procesos que propician la aclimatación de la planta a tales contingencias. Se conoce, por ejemplo, que el crecimiento de *Arabidopsis* a bajas temperaturas provoca, en un primer momento, la inhibición en la expresión de genes relacionados con la actividad fotosintética, capacidad que es recuperada cuando se consigue la tolerancia al estrés [282, 283, 297]. El contenido en clorofilas sigue un perfil similar, recuperándose tras 2-3 semanas creciendo a 4°C [252]. De hecho, un simple pulso de frío de unas horas es responsable de un aumento en la relación carotenoides/clorofilas, condiciones bajo las cuales ha sido descrita una inducción en la expresión de los genes codificantes para la enzima IPP isomerasa (*IDI*) [208]. Todos estos fenómenos deben precisar, presumiblemente, de la fina regulación de los genes involucrados en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, lo cual resultaría coherente con la función de la *DXS1*. Tampoco puede olvidarse que el ABA es sintetizado a partir de los carotenoides mediante rotura oxidativa de las xantófila violaxantina, por lo que su relación con los productos sintetizados a partir de la *DXS1* es directa [104]. Otras respuestas encuadradas en la aclimatación de la planta al frío pasan por cambios en la

composición de los lípidos de membrana, particularmente de esteroides, conducentes a una mayor estabilidad de la misma. Aún cuando estos productos sean sintetizados a partir del MVA, podría asumirse que estas particulares condiciones fisiológicas de crecimiento estuviesen entre aquellas que facultan para el intercambio de IPP, u otros intermediarios comunes a la ruta del MEP y del MVA, entre los 2 compartimentos subcelulares donde transcurren (plástidos y citosol), en la línea de algunos de los resultados discutidos posteriormente en este trabajo (apdo. III.5).

Para terminar con esta descripción de los elementos *cis* encontrados en el promotor *DXS1*, nos referiremos al llamado "*root motif*". Se trata de un motivo primeramente descrito como específico de la expresión en raíces de *Nicotiana tabacum* y *Triticum aestivum* [96], y que podría estar relacionado con la insólita expresión del gen *DXS1* en este órgano. El pequeño tamaño de la secuencia nucleotídica consenso correspondiente a este motivo (ATATT), así como la abundancia en el genoma de *Arabidopsis* de bases A y T, obligan a ser cautelosos a la hora de atribuir papel alguno a este motivo en el control de la expresión de *DXS1*.

De hecho, otro aspecto destacable de la región -359/-188 del promotor *DXS1* es la enorme abundancia de secuencias ricas en A y T. Existen algunos modelos sobre el papel de estas secuencias en la regulación de la expresión génica. A este respecto, se han encontrado proteínas que se unen específicamente a secuencias ricas en AT de numerosos genes regulados por la luz [294]. En *Pisum sativum* ha sido descrita la capacidad de la proteína PLATZ1 de unirse específicamente a regiones ricas en A+T presentes en los promotores de varios genes, modulando su expresión. PLATZ1 pertenece a una familia de proteínas ligantes de zinc exclusivas de plantas, de la que han sido identificados homólogos en *A. thaliana* [205]. Aún más, los altos niveles de expresión hallados en numerosos genes codificantes para ARNt de plantas han sido condicionados a la presencia en las regiones 5' flanqueantes de dominios ricos en A+T [62].

Por otra parte, las regiones ricas en A+T han sido relacionadas frecuentemente con las llamadas regiones de anclaje a la matriz nuclear (MARs). Las MARs aparecen flanqueando los genes y modulando su expresión al favorecer la accesibilidad de proteínas reguladoras. Otras de sus funciones están relacionadas con la organización del ADN en cromatina, e incluyen la definición de dominios independientes en la regulación transcripcional, así como la formación del origen de replicación del ADN o la organización cromosómica durante la mitosis y la meiosis [133].

En resumen, este prolijo análisis del promotor *DXS1* ha puesto de manifiesto la enorme riqueza de elementos en *cis* presentes, en consonancia con el papel clave demostrado por esta región en la expresión del gen. A pesar de que las aproximaciones presentadas en este trabajo no permiten afirmar taxativamente su implicación en la modulación de la actividad del gen *DXS1*, definen una línea de investigación a desarrollar en el futuro que permita la caracterización

de estos y otros elementos, en el sentido de relacionarlos con las funciones desempeñadas por los numerosos isoprenoides sintetizados a través de la vía MEP. Un aspecto interesante de este estudio pasaría por la búsqueda de motivos comunes a los promotores de los diferentes genes implicados en esta ruta. De hecho, muchos de los que han sido descritos en este apartado son comunes a los promotores *DXS1* y *DXR* (Tabla III.1), en menor medida que con el del gen *DXS2*. Resulta interesante comprobar la ausencia de determinados motivos que puedan estar en el origen de las particularidades en el patrón de expresión entre los genes *DXS1* y *DXR*. Particularmente, es interesante constatar la ausencia del sitio "evening" del promotor *DXR*, para el cual no ha sido detectada una oscilación circadiana de su expresión, como pone de manifiesto el análisis de los "microarrays" de la Stanford Microarray Database (<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/>). Tampoco está presente en el promotor *DXR* el elemento ABRE, coherentemente con la ausencia de respuesta encontrada para gen *DXR* a la fitohormona ABA (apdo. II.4.3.1). Estas y otras diferencias podrían resultar determinantes para las singularidades en cuanto a los roles limitantes que, verosímilmente, desempeñarán estos genes en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides plásticos, tal y como se desprende de los resultados presentados en este y otros trabajos y que serán discutidos en el apartado III.4.2.

III.3.4. La expresión del gen *DXR* responde al bloqueo de la ruta MEP y del MVA.

La utilización de inhibidores que bloquean pasos específicos en la síntesis de IPP ha puesto de relieve el fino control metabólico que parece recaer sobre la *DXR*. En efecto, los tratamientos con los inhibidores fosmidomicina y mevinolina fueron capaces de desencadenar una respuesta específica en forma de acúmulo de la proteína *DXR* (apdo. II.4.3.1). Más aún, esta activación ha sido verificada también en los niveles de ARNm frente al bloqueo provocado por la propia fosmidomicina, sugiriendo un mecanismo de regulación transcripcional. Tal respuesta podría basarse en un mecanismo de regulación "feed-back" dependiente del reconocimiento de cambios en la concentración de algún intermediario de la vía o de algún producto final, cambios que se constituirían en una señal desencadenada en respuesta a la alteración del flujo metabólico. En este sentido, la ausencia de cambios en los niveles de proteína *DXR* en respuesta a la inhibición por norflurazón de la síntesis de carotenoides estaría indicando que esta señal podría corresponder a un intermediario entre las reacciones catalizadas por la *DXR* y la geranilgeranilPP sintasa (GGPS), más que los propios productos finales. De hecho, tampoco se apreció cambio significativo alguno en la expresión del gen *DXR* en respuesta al tratamiento con ABA, uno de los productos finales derivados de la ruta MEP (apdo. II.4.3.1). En esta dirección convergerían los resultados que muestran como la presencia del inhibidor norflurazón no comporta cambios en la expresión de los genes *PSY* y *PDS* [314, 317], a pesar de estar bloqueando el paso catalizado por el producto de este último. A todo esto se une la falta de reacción mostrada por el gen *PDS* a las variaciones en el contenido en carotenoides, verificada a

partir de muestras del mutante variegado *inmutans* procedentes de sectores de hojas con diverso grado de despigmentación, esto es, con concentraciones variables de carotenoides [317]. Otros sistemas, como *C. annuum* [274], han confirmado la misma falta de reactividad de la *PDS* o la ζ -caroteno desaturasa (*ZDS*) al norflurazón. El comportamiento mostrado por el gen *DXR* resultaría coherente con un papel regulador de la enzima en la ruta del MEP, en tanto que catalizadora de la primera etapa específica de la misma, aspecto sobre el que incidiremos extensamente en el apartado II.4.2. Finalmente, hay que señalar cómo la existencia de procesos de naturaleza parecida se manifiestan también en los frutos del tomate inoculados con fosmidomicina, aunque en este sistema la capacidad de respuesta se extendía también al gen *DXS* y se confirmaba en ambos casos su naturaleza transcripcional [237].

Por su parte, el origen de la respuesta mostrada frente al tratamiento con mevinolina habría que buscarlo en el contexto de la comunicación intracelular que, previsiblemente, ha de verificarse entre las dos rutas de síntesis de IPP (apdo. III.5).

III.4. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA DXS1 Y LA DXR.

III.4.1. Las dos primeras etapas de la ruta del MEP resultan esenciales para el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

III.4.1.1. Mutantes e inhibidores en el estudio de la función biológica de la DXS1 y la DXR.

Hasta el momento han sido caracterizados dos mutantes de *A. thaliana* afectados en el paso catalizado por la DXS1. Se trata de los mutantes *cla1* y *chs5* [11, 187], abundantemente referidos en esta memoria. Ambos mutantes manifiestan un fenotipo albino, constitutivo en el caso del *cla1*, dependiente de la temperatura para el *chs5*. El fenotipo de estos mutantes deriva del bloqueo en la primera etapa de la ruta del MEP de síntesis de IPP, lo cual provoca una drástica reducción en las cantidades de compuestos de origen isoprenoide, particularmente pigmentos fotosintéticos. En ambos casos, el fenotipo resultante puede ser revertido mediante la adición exógena de DX al medio de crecimiento (apdo. II.4.2; [11, 101, 146]).

Un fenotipo similar al descrito para los dos mutantes fue observado tras el tratamiento de plantas de *A. thaliana* de genotipo silvestre con el inhibidor fosmidomicina. En este caso, la etapa afectada es la catalizada por la DXR [142, 157, 172, 175, 202, 329], segunda etapa de la ruta del MEP, por lo cual, el origen del fenotipo habría que buscarlo también fundamentalmente en la reducción de los niveles de carotenoides y clorofilas. Del mismo modo que en los mutantes *cla1* y *chs5*, la presencia del inhibidor no afectaba a la germinación ni al correcto desarrollo de la raíz o los cotiledones, lo que indica que los isoprenoides plastídicos, o al menos la actividad DXR, no resultan esenciales en dichos procesos u órganos. A pesar de ello, cabe señalar que la presencia del producto de la reacción catalizada por la DXR en su forma defosforilada, el

metileritritol (ME), es incapaz de revertir la inhibición por fosmidomicina (apdo. II.4.5.2). Tampoco la presencia de dicho intermediario logró rescatar la línea transgénica 35S:DXR-b1.A (apdo. II.4.5.3), silenciada en el gen DXR endógeno y cuyo característico fenotipo variegado estudiaremos en detalle más adelante, ni el mutante *chs5* (apdo. II.4.5.4). Estos resultados apoyarían la imposibilidad mostrada por el ME, contrastada en otros sistemas vegetales, de incorporarse eficientemente a la síntesis de IPP, o al menos de ser fosforilado a MEP [102, 254].

Por su parte, el fenotipo observado en el caso de las plantas crecidas en medio conteniendo norflurazón ha sido abundantemente estudiado [23, 274, 316, 317]. En nuestro caso, se ha verificado un efecto letal de este inhibidor específico de la fitoeno desaturasa a concentraciones por encima de 25 nM (apdo. 4.3.2). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con los mutantes *chs5* y *cla1* o en el tratamiento con fosmidomicina, en el caso del norflurazón, el fenotipo deriva de un proceso de fotooxidación provocado por la ausencia de carotenoides que protejan al aparato fotosintético de la formación de moléculas reactivas de oxígeno [317].

III.4.1.2. Las actividades DXS1 y DXR resultan necesarias para el correcto desarrollo de los cloroplastos.

El desarrollo de los cloroplastos constituye un proceso extraordinariamente complejo que implica una fina regulación de la biosíntesis de los diversos componentes del aparato fotosintético y de los ciclos reductores del carbono. Dicho proceso depende de la expresión coordinada de genes, tanto nucleares como plastídicos, en respuesta a señales ambientales (particularmente la luz). Esta coordinación parecería estar mediada, a su vez, por la actividad de un conjunto de factores plastídicos, que dirigen la expresión de genes nucleares relacionados con el desarrollo de los cloroplastos en función del estado funcional y de desarrollo del mismo [235]. Es la denominada hipótesis de la señal plastídica.

Los resultados presentados en esta memoria permiten afirmar que la función biológica desempeñada por los productos de los genes *DXS1* y *DXR* es necesaria para el normal desarrollo de los cloroplastos y que, consecuentemente, resultan esenciales para el desarrollo de la planta. A esta conclusión se llega después de observar cómo el bloqueo en cualquiera de las 2 etapas enzimáticas, bien de modo inducido por medio de inhibidores (fosmidomicina) (apdo. II.4.3.2), bien de modo constitutivo utilizando mutantes (*chs5* y 35S:DXR-b1.A) (apdos. II.4.3.2 y II.4.4.3), resulta en la formación de cloroplastos con severas deficiencias en sus estructuras internas de membrana, que no consiguen diferenciarse hasta tilacoides maduros. Este bloqueo en la biogénesis de los cloroplastos debe interferir con la producción de la hipotética señal plastídica que dirige la expresión de los genes relacionados con dicho proceso. Futuros estudios sobre cambios en la expresión de toda esta familia de genes involucrados en la formación de los cloroplastos, tanto en los mutantes estudiados como en aquellas plantas tratadas con inhibidores de la ruta del MEP contribuirán, indudablemente, a la identificación de los componentes de la

señal plastídica.

Se conocen numerosos mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en el desarrollo de los cloroplastos y que presentan fenotipo albino. Algunos de ellos, como el *abc1* [272] o *gun* [289], están caracterizados por su implicación en la coordinación de los genomas plastídico y nuclear durante el desarrollo de los cloroplastos; otros, entre los que se incluyen los mutantes *cue* [179], forman parte de los complejos antena fotosintéticos, o están afectados en los procesos de importe de proteínas a plástidos, como los mutantes *toc* [139]; finalmente, destacan algunos involucrados en diversos aspectos de la fisiología plastídica, tales los mutantes *pac* [233], *alb3* [288], *cla1* [187] o *chs5* [11]. La importancia para la planta del normal desarrollo de los cloroplastos en respuesta a la presencia de la luz viene dada por la identificación en el genoma de *Arabidopsis thaliana* de, hasta la fecha, 100 genes específicamente asociados con la percepción y transducción de la señal luminosa, así como de 139 genes relacionados potencialmente con el proceso fotosintético, entre los que se incluyen 47 directamente implicados en la biosíntesis de clorofilas y carotenoides [136]. Los genes *DXS1* y *DXR* se suman así a esta larga lista de genes esenciales para el normal desarrollo de los cloroplastos, entre otros procesos fotomorfogénicos.

No se dispone de información sobre el papel de los genes *DXS1* y *DXR* en el desarrollo de otros tipos plastídicos, aunque resultados obtenidos por otros autores han apuntado hacia el requerimiento de la *DXS1* en el normal desarrollo de los etioplastos, pero no de los amiloplastos [101]. En cualquier caso, los análisis microscópicos han confirmado que las alteraciones ultraestructurales se centran en los plástidos, pues otros orgánulos, por ejemplo, las mitocondrias, no se ven afectados (apdos. II.4.3.2 y II.4.4.3).

III.4.1.3. La línea 35S:DXR-b1.A presenta un característico fenotipo variegado.

Hemos caracterizado el fenotipo variegado de la línea 35S:DXR-b1.A. Los niveles reducidos de expresión del gen *DXR* en esta línea, verificados para el ARNm, proteína e, indirectamente, para la actividad enzimática correspondiente conducen al desarrollo de un fenotipo variegado que afecta de modo variable de unos individuos a otros. Dicho fenotipo está caracterizado por la presencia de órganos y tejidos con diversos grados de despigmentación. (apdos. II.4.4.1 y II.4.4.2). ¿Cómo conciliar la expresión constitutiva del transgén dirigido por el promotor 35S con la aparición de un fenotipo variegado derivado de niveles variados de expresión del gen *DXR* de unas células a otras?

La variegación tiene su origen en muy diversos mecanismos, algunos hereditarios y otros que no lo son. Entre aquellos, se incluyen los debidos a mutaciones en genes nucleares u organelares, a alteraciones en los ribosomas organelares, a la aparición de quimeras o procesos dependientes de la inserción de elementos transponibles [236]. Un último mecanismo de variegación causado por genes nucleares es el constituido por el silenciamiento génico

dependiente de homología. Dentro de este tipo se engloban los llamados procesos de Silenciamiento Génico Post-Transcripcional (SGPT) que estarían, presumiblemente, en el origen del fenómeno de cosupresión observado en las plantas de la línea 35S:DXR-b1.A. La propia naturaleza del fenómeno de cosupresión permitiría explicar la aparición del fenotipo variegado.

A pesar de que los mecanismos que rigen el SGPT son, todavía, poco conocidos, parece que estarían mediados por moléculas bicatenarias de ARN que provocan la degradación secuencia-específica del ARN diana, sin afectar necesariamente a su transcripción. La iniciación del proceso ocurriría espontáneamente y de forma estocástica y altamente localizada. A continuación tendría lugar la propagación sistémica del fenómeno de SGPT, por el que es transmitido a otras partes de la planta, presumiblemente a través de una señal molecular de ARN. Finalmente, modificaciones tales como la metilación del ADN, acetilación de las histonas o remodelación de la cromatina podrían ser responsables de la perdurabilidad del fenómeno de SGPT durante el desarrollo de nuevos tejidos, a partir del tipo celular originalmente silenciado [68, 302].

Podemos extrapolar este modelo para entender el fondo biológico de la variegación en la línea 35S:DXR-b1.A. El hecho de que únicamente esta línea, de entre las distintas analizadas, desarrolle este fenotipo podría derivar de la eficiencia del SGPT, que depende de que el ARNm diana particular (en este caso aquel producido por el transgén) se exprese por encima de un umbral determinado [68, 302]. Además, se ha postulado que la capacidad de una línea transgénica de producir la señal propagadora de la variegación dependería del sitio de inserción del transgén y de la estructura correspondiente del locus ocupado. En base a esto, puede argüirse que el proceso de SGPT, iniciado en una célula determinada en respuesta a niveles exacerbados de expresión del transgén, reduce los niveles de proteína DXR por debajo del umbral necesario para sintetizar convenientemente los pigmentos fotosintéticos, de naturaleza isoprenoide. Dicho déficit biosintético estaría en el origen de los defectos ultraestructurales verificados en los cloroplastos de las plantas 35S:DXR-b1.A y de la despigmentación típica de los tejidos verdes de las plantas de esa línea (apdos. II.4.4.2 y II.4.4.3). Otros elementos, tales como las variaciones en la traducción del mensajero *DXR* entre unos y otros tejidos, las sutiles diferencias en la cantidad de luz percibida por unos y otros sectores de la planta, o las desigualdades en el reparto de plástidos entre las células hijas durante el proceso de división celular, podrían acentuar aún más las diferencias entre las dosis de proteína DXR presentes en las células vecinas pertenecientes a sectores de tejido variegados. Esto permitiría explicar las enormes variaciones encontradas en la morfología plastídica entre células cercanas (heteroplastidia), fenómeno que, por otro lado, también se manifiesta en cierta medida en las plantas crecidas en presencia de los inhibidores fosmidomicina o norflurazón, o del mutante *chs5*, aún cuando no desarrollen el fenotipo variegado característico de la línea 35S:DXR-b1.A.

Como ha sido ya apuntado en el epígrafe anterior, existe un conjunto de evidencias que

sostienen la idea de que la transcripción de algunos genes nucleares, particularmente aquellos relacionados con la fisiología y el proceso biogenético plastídico, está controlado por el estadio de desarrollo del plástido [235]. En las plantas dicotiledóneas, el proceso de desarrollo de los cloroplastos está íntimamente coordinado con el de las hojas. Por ello, los estadios iniciales de diferenciación de proplástidos a cloroplastos coinciden con la formación de las células del mesófilo a partir de células meristemáticas indiferenciadas [229]. En este contexto, las alteraciones en el desarrollo de las células del mesófilo observados por microscopía óptica en las hojas procedentes de la línea 35S:DXR-b1.A podrían explicarse por el propio desarrollo de la hipótesis de la señal plastídica (Figura II.32). En efecto, dicha hipótesis se completa planteando que el estado metabólico o de desarrollo de los plástidos juega un papel central en la regulación de la diferenciación celular y de la morfogénesis foliar [235]. Según este modelo, las alteraciones histológicas de las hojas 35S:DXR-b1.A podrían derivar de la incompleta diferenciación plastídica.

A pesar de ello, el mecanismo molecular mediante el cual es testado el estado funcional del plástido no está aún completamente dilucidado. En este sentido, los mutantes variegados presentan importantes ventajas respecto de los albinos recesivos en el estudio de la cooperación entre los genomas plastídico y nuclear en el desarrollo de cloroplastos y hojas, debido a que el linaje celular de los cloroplastos defectuosos puede seguirse dentro de los sectores afectados [236]. Entre los pocos mutantes de naturaleza variegada caracterizados en *Arabidopsis* destacan *var*, responsable de codificar para una metaloproteasa necesaria para el correcto procesamiento de proteínas plastídicas [57, 58, 292]; *cue1*, cuya mutación está localizada en un transportador fosfoenolpiruvato/fosfato plastídico [179, 285]; *pac*, alterado en una proteína presuntamente implicada en el proceso de maduración del ARNm [233] o *inmutans*, bloqueado en una oxidasa alternativa asociada a la actividad de la fitoeno desaturasa [8, 47, 144, 316, 317]. De esta forma, podemos añadir 35S:DXR-b1.A a esta relación de mutantes que desarrollan un fenotipo variegado similar, y que están bloqueados en la comunicación plástido-núcleo. Los mutantes 35S:DXR-b1.A e *inmutans* comparten muchos rasgos fenotípicos, como las alteraciones plastídicas e histológicas, lo cual resulta lógico en tanto que ambos se ven afectados en la biosíntesis de carotenoides, productos, además, explícitamente identificados entre aquellos que conforman la mencionada señal plastídica [235].

III.4.2. Regulación del flujo metabólico de la ruta del MEP: El papel de la DXS1 y la DXR.

A pesar de los sustanciales avances efectuados en los últimos años en cuanto a la elucidación de la ruta del MEP en bacterias y en plantas, se dispone de poca información acerca del posible papel regulador de las distintas enzimas en el flujo de intermediarios que conducen hacia la síntesis de los isoprenoides plastídicos finales. Una de las más eficaces aproximaciones experimentales para su estudio es la llamada genética inversa, que permite provocar

alteraciones del flujo metabólico en puntos concretos de la misma. Del análisis de los cambios originados en los productos finales (y genéricamente de las alteraciones fenotípicas derivadas) se puede obtener información acerca del papel de tales etapas en la regulación de la ruta bioquímica en cuestión.

En este sentido, los experimentos llevados a cabo con las líneas transgénicas 35S:DXR permiten concluir que la enzima DXR juega un papel clave en el control de la ruta del MEP de síntesis de IPP, al menos en *A. thaliana*. Esta conclusión deriva de la observación de que cambios en la expresión de la DXR, conseguidos en líneas transgénicas portadoras del ADNc correspondiente dirigido por el promotor 35S, provocan modificaciones significativas en la cantidad de carotenoides y clorofilas (apdo. II.4.4.1). Asimismo, dichos cambios son proporcionales a los niveles de actividad enzimática resultante, que fueron deducidos en base a la resistencia al inhibidor fosmidomicina (apdos. II.4.4.1 y II.4.5.2). Sin embargo, lo moderado de los incrementos en tales pigmentos observados en aquellas líneas que presentan valores incrementados de resistencia a la fosmidomicina, sugiere la presencia de puntos limitantes adicionales, reflejo de la enorme complejidad de las rutas biosintéticas que divergen del IPP plastídico. Por otro lado, la rápida respuesta observada para el gen DXR al tratamiento con fosmidomicina, verificada ya a nivel del ARNm y acentuada para los valores de la proteína correspondiente, resulta congruente con este papel regulador propuesto para la DXR (apdo. II.4.3.1).

A la luz de observaciones efectuadas en el grupo de la Dra. Patricia León a partir de aproximaciones análogas a las descritas para la DXR, también había sido mostrado un papel clave para la enzima DXS en la regulación de la síntesis de isoprenoides plastídicos en *Arabidopsis* [100]. Los autores analizaron variaciones en los valores de carotenoides y clorofilas entre diferentes líneas 35S:DXS1 y 35S:anti-DXS1 de *A. thaliana*, encontrando que resultaban proporcionales a los valores de expresión del gen DXS1 y del orden de los cuantificados en esta memoria para las plantas 35S:DXR (apdo. II.4.4.1). Dicho grupo constató también modificaciones similares en el contenido de otros isoprenoides de naturaleza plastídica, tales como los tocoferoles, el ácido abscísico o las giberelinas, productos estos que son requeridos por la planta en menores cantidades. En este último caso, sin embargo, los autores verificaron también variaciones en la expresión del gen GA4, que codifica para la GA 3 β -hidroxilasa [124], inversamente proporcionales a las del gen DXS1 en cada una de las líneas analizadas, en un proceso que pretendería amortiguar los cambios en el contenido de giberelinas finales. Este resultado apoya la idea de la existencia de etapas reguladoras adicionales a las específicas de la ruta MEP, al menos para alguna de las numerosas familias de isoprenoides sintetizados en las plantas a partir de esta ruta.

Por nuestra parte, la sobreexpresión de la DXS1 utilizando el sistema inducible pTA7002, no consiguió provocar cambios aparentes en las concentraciones de clorofilas y carotenoides

para ninguna de las líneas estudiadas (apdo. II.4.4.4). Los resultados de *western-blot* obtenidos sugieren un fino mecanismo de regulación postranscripcional, dependiente de los valores de sobreexpresión alcanzados por el transgén en respuesta al inductor, que revierta las cantidades de proteína a niveles cercanos a los obtenidos en ausencia de la dexametasona. Este sería el origen de por qué los elevados niveles de transcrito *DXS1* detectados en las líneas TA:*DXS1* en presencia del inductor (respecto de las verificadas por las plantas transgénicas control portadoras del vector sin inserto) no trascendían en cambios en los valores de pigmentos fotosintéticos. Adicionalmente, la existencia de dichos mecanismos de regulación postranscripcional permitirían explicar lo moderado de los cambios encontrados por Estévez y col. [100] para la proteína *DXS1* en relación con los mayores niveles alcanzados por el ARNm correspondiente en las plantas transformadas con la construcción 35S:*DXS1*.

Otros sistemas biológicos han aportado evidencias en la línea de un papel compartido de la *DXS* y la *DXR* en la regulación del flujo metabólico de IPP hacia la biosíntesis de isoprenoides plastídicos específicos. Tal es el caso de *Mentha x piperita*, donde se ha constatado cómo la sobreexpresión de la *DXR* conducía a aumentos sensibles en los monoterpenos que componen los aceites esenciales sintetizados por esta especie [185], y cómo dicho proceso correlacionaba con un aumento en los valores de ARNm para la *DXS* [165]. Resultados similares han sido obtenidos en muy distintas especies vegetales. En algunos cereales se ha observado cómo la producción de apocarotenoides específicos que tiene lugar en las raíces micorrizadas cursaba paralelamente a la inducción de los genes *DXS* y *DXR* [308, 309]. El mismo fenómeno se repite en células en suspensión de *C. roseus*, cuyos genes *DXS* y *DXR* ven estimulada su expresión en aquellas condiciones de cultivo que propician la producción de alcaloides indol-terpénicos [50, 303], productos específicos de esta especie. Otros resultados parecen apoyar el papel compartido de las dos primeras etapas en la regulación de la síntesis de IPP vía MEP también en eubacterias. Así, la sobreexpresión de la *DXS* en una cepa de *E. coli* genéticamente modificada para la biosíntesis de licopeno conducía a la acumulación de dicho carotenoide y paralelamente de ubiquinona-8 [120]. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por diferentes autores, añadiéndoles la posibilidad de incrementar la producción de licopeno al sobreexpresar simultáneamente la *DXS* y la *DXR* [22, 148]. Sin embargo, la sobreexpresión en *E. coli* de la *DXR* de la cianobacteria *Synechococcus leopoliensis* no permitió detectar variaciones sustanciales en los niveles de DMAPP, otro de los productos finales, junto con el IPP, de la ruta MEP [196].

Sin embargo, otros autores han demostrado cómo el peso de la regulación de la biosíntesis de determinados isoprenoides parece recaer fundamentalmente sobre la *DXS*. En efecto, Lois y cols. [178] evidenciaron que en el transcurso de la maduración organoléptica del fruto de tomate tenía lugar una inducción de la expresión del gen *DXS* que se correlacionaba estrictamente con la acumulación de carotenoides que tiene lugar durante este proceso, según un perfil similar al del transcrito *PSY1* (fitoeno sintasa), hasta ese momento, única etapa

limitante conocida. El hecho de que las mismas aproximaciones no apuntasen cambios similares en la expresión del gen *DXR* [237], animó a los autores a atribuir, en este proceso, un papel limitante para la *DXS*, actuando de manera coordinada a la *PSY1*, en un modelo de control de la biosíntesis de carotenoides durante la maduración del fruto de tomate que excluiría a la *DXR*.

Todos estos elementos en su conjunto permiten proponer que, en *Arabidopsis*, las dos primeras etapas desarrollarían un papel clave en la modulación de la síntesis de IPP vía MEP y, en consecuencia, en el control del flujo metabólico que conduce hacia la síntesis de isoprenoides plastídicos. Aunque por el momento no puedan realizarse generalizaciones, resulta atractiva la hipótesis que sugiere un papel regulador global para la *DXS*, mientras que la *DXR* se reservaría para una función de control específica en determinados órganos, procesos o especies, de acuerdo con el patrón de distribución más restringida de esta última. Futuras investigaciones contribuirán a dilucidar el papel de las restantes enzimas implicadas en la ruta MEP [238].

III.5. NUEVAS EVIDENCIAS ACERCA DE LA INTERACCIÓN BIOQUÍMICA ENTRE LAS RUTAS DEL MVA Y DEL MEP EN PLANTAS.

Numerosos resultados presentados en los últimos años, y basados fundamentalmente en el seguimiento de la incorporación del marcaje radioactivo sobre distintos productos isoprenoides, así como en la utilización de la mevinolina, y ampliamente analizados en el apartado I.3.2, contradecían el esquema teórico propuesto que contemplaba la estricta segregación de las dos vías de síntesis de IPP que coexisten dentro de la célula vegetal. Los resultados presentados en este trabajo añaden interesantes evidencias en favor de una comunicación entre las dos rutas biosintéticas de IPP, la ruta del MEP y la del MVA que, aún manteniéndose ubicadas en sus respectivos subcompartimentos celulares, apuntan hacia la cooperación entre ambas, presumiblemente a nivel del intercambio de intermediarios comunes. Para ello, nos hemos servido de diversas herramientas bioquímicas (inhibidores específicos e intermediarios) y genéticas (mutantes de la vía MEP).

III.5.1. La desoxixilulosa es capaz de revertir la inhibición del crecimiento provocada por la mevinolina.

Este sencillo enunciado lleva a plantearnos interesantes cuestiones. Una vez confirmada, efectivamente, la eficacia de la desoxixilulosa para rescatar el fenotipo originado por la mevinolina (apdo. II.4.5.1), fenómeno que apuntaría inequívocamente a una interacción de la ruta plastídica de síntesis de IPP (vía MEP) con su análoga citosólica (vía MVA), ¿En qué términos ha de producirse esta?

El planteamiento más sencillo pasa por asumir la entrada de la DX en la célula, su

fosforilación por una xilulosa kinasa, para la cual ha sido caracterizada la actividad responsable en *E. coli* [323], y de la que se conoce la existencia de un homólogo en *Arabidopsis* (At5g49650), y, finalmente, la incorporación directa del intermediario en la ruta del MEP de síntesis de IPP. El aumento del flujo metabólico en esta ruta permitiría superar, mediante el transporte hacia el citosol de algún intermediario común a las dos vías, el bloqueo de la ruta del mevalonato producido por la mevinolina. Sin embargo, algunas evidencias complican este modelo. En *Arabidopsis*, la incorporación efectiva de la DX únicamente ha sido conseguida bajo circunstancias de bloqueo de una u otra ruta de síntesis de IPP, bien en el mutante *cla1* [187], bien en plantas tratadas con mevinolina [146]. Por otra parte, a pesar de que un efecto análogo de activación de la ruta del MEP sea conseguido en las plantas 35S:DXR-2.B a través de la sobreexpresión del gen *DXR*, ésta no resultó en una resistencia incrementada al inhibidor mevinolina (Figura II.35). Finalmente, ha sido constatada la imposibilidad de la DX suministrada exógenamente de incorporarse directamente a isoprenoides plastídicos en el sistema de fruto de tomate (Rodríguez-Concepción, M., Rohmer, M y Boronat, A.; resultados no publicados), tratamiento que, sin embargo, incidía positivamente en la acumulación de carotenoides durante la maduración del mismo [178]

De todo esto parece inferirse, que el papel de la DX en la reversión del efecto causado por el tratamiento con mevinolina es esencialmente más sutil de lo que parece a primera vista. La DX parece comportarse, bajo determinadas circunstancias, como una señal que provocaría una respuesta de activación en algunas de las enzimas involucradas en la ruta plastídica de síntesis de IPP, posibilitando la reversión del bloqueo provocado por la mevinolina. Otras evidencias indirectas apoyarían este fenómeno. Por un lado, la toxicidad de la DX había sido ya señalada desde concentraciones de 1,5 mM [101] y ha sido aquí confirmada como absolutamente letal para valores de 5 mM (resultados no mostrados). La naturaleza química de la DX no parece poder justificar, por sí sola, este efecto letal sobre la planta que, paradójicamente, mimetiza el originado por la fosmidomicina. Se podría inferir por lo tanto, que el papel desempeñado por la DX vaya más allá de la de mero precursor en la síntesis de IPP. De hecho, es bien conocido el papel de determinados azúcares, tales la 3-O-metilglucosa o la 6-desoxiglucosa, como señalizadores en la regulación de diversos aspectos del desarrollo y crecimiento vegetales. Por otra parte, esta reconsideración de la DX como señal química permitiría explicar la fina regulación postranscripcional postulada para la DXS (apdo. II.4.4.4), en tanto que dependiente del producto, así como lo limitado de los niveles de sobreexpresión descritos para los transcritos y la proteína del gen *DXS1* en las plantas 35S:DXS1 [100].

La capacidad de la DX de provocar esta respuesta sería estrictamente dependiente del carácter limitante del flujo metabólico que conduce hacia la síntesis de IPP, en este caso debido a la mevinolina y, por lo tanto, del derivado del MVA. Ambas circunstancias convergerían en una estimulación de la síntesis plastídica de IPP que permitiese revertir el fenotipo de inhibición por la mevinolina. Numerosos resultados estarían en sintonía con estos postulados. El incremento en

los niveles de proteína DXR descrito para aquellas muestras germinadas y crecidas en medio suplementado con mevinolina ocurre exclusivamente en presencia de DX o, en su caso, MVA (Figura II.34). Este efecto sería asimismo verificado por la DXS1, pero en este caso los niveles de proteína alcanzarán estrictamente los niveles basales. También hemos constatado cómo la sola presencia de los intermediarios no justifica, por sí sola, la respuesta en cuanto a los niveles de proteína DXS1 o DXR (apdo. II.4.5.1). La ya discutida rápida respuesta de la DXR al bloqueo en la síntesis de IPP, por un lado cara al bloqueo por fosmidomicina, que podría deberse al aumento originado en la concentración del sustrato DXP y, por otro, a la presencia de mevinolina, resultarían también congruentes con esta hipótesis (apdo. II.4.3.1). Finalmente, hay que anotar, en apoyo de este modelo, que ha sido recientemente publicado cómo determinadas circunstancias, similares a las que venimos describiendo, han permitido la incorporación eficiente de DX en el campesterol, isoprenoide de origen citosólico [146]. Para ello, los autores suministraron el intermediario marcado en concentraciones crecientes al mutante *cla1*, bloqueado en la DXS1 [187].

En resumen, dos circunstancias parecen estar actuando sinérgicamente para propiciar esta translocación de intermediarios en la dirección plástido-citosol. En primer lugar, el carácter limitante de alguna de las dos vías de síntesis de IPP; por otro, la variación en la concentración intracelular de algún intermediario, particularmente DX. El proceso vendría mediado por una activación del equipo enzimático de la ruta del MEP (singularmente la DXR), dependiente de la señal DX, acompañado por la translocación a través de la envuelta plastídica de intermediarios comunes en la síntesis de isoprenoides, presumiblemente el IPP, dada la mayor facilidad para su transporte que vendría impuesta por su tamaño y su resistencia frente a las fosfatasas plastídicas [31]. Este último aspecto resulta, por el momento, el menos conocido, pues los intentos efectuados para identificar transportadores de grupos prenilo ubicados en la envuelta plastídica no han dado aún resultados definitivos, deviniendo, en el contexto de la comprensión del papel que la interacción de las dos rutas de síntesis de IPP tendría en la regulación global de la biosíntesis de isoprenoides, otro de los temas prioritarios de estudio.

Algunos procesos similares a los que estamos analizando han sido descritos también en otras especies. La administración directa del inhibidor fosmidomicina a frutos de tomate en estadio de verde maduro provoca rápidas acumulaciones de los genes *DXR* y *DXS* [237]. En este caso, sin embargo, los autores han observado cómo la respuesta transcripcional dependiente de la presencia de DX únicamente se verificaba en el caso del gen *DXS* [178, 237].

No obstante, trabajos de marcaje llevados a cabo en sistemas distintos a *Arabidopsis* obligan a ser cautelosos en cuanto al posible papel de señal molecular de la DX, pues su incorporación directa en la ruta del MEP ha sido descrita en diversos sistemas vegetales, independientemente del carácter limitante de la síntesis de IPP. Tal es el caso de isoprenoides propios de las flores de *Maricaria recutita* (manzanilla) [2], de cultivos celulares de *C. roseus*

[13, 14] y *Ginkgo biloba* [264] o del ME en hojas de *Liriodendron tulipifera* [254]. Si bien, en la mayoría de los casos, esta incorporación de la DX tenía lugar a ratios por debajo del 2%. Por otro lado, el análisis de los isoprenoides examinados en estos ejemplos presentaron marcaje mixto, esto es, derivado de la incorporación de unidades prenilo procedentes de la vía del MEP y del MVA de síntesis de IPP.

III.5.2. Transporte de intermediarios de la síntesis de isoprenoides desde el citosol a los plástidos.

Diversos trabajos han sido abordados en esta tesis con el objeto de descifrar el transporte de intermediarios de la ruta del MVA producidos en el citosol/RE hacia los plástidos.

Es bien conocido como el MVA suministrado exógenamente a la célula vegetal es capaz de incorporarse eficientemente al flujo metabólico global de síntesis citosólica de IPP [114]. En base a esto, el MVA fue utilizado con la intención de revertir mutantes bloqueados en la ruta del MEP. El MVA no consiguió revertir el fenotipo variegado del mutante 35S:DXR-b1.A, aún cuando se verifique un ligero aumento en los niveles de clorofilas y carotenoides (apdo. II.4.5.3). Algo parecido indicó la imposibilidad de rescatar al mutante *chs5* con MVA (apdo. II.4.5.4, resultados no mostrados). Finalmente, en la misma dirección incidiría lo moderado de la resistencia a la fosmidomicina observada en las plantas 35S:HMG1-24.3, que sobreexpresan el dominio catalítico del gen *HMG1*, respecto de su control correspondiente (Figura II.36).

El análisis de todas estas evidencias no permite concluir que el proceso de translocación de intermediarios bioquímicos de la síntesis de IPP sea posible también en la dirección citosol-plástido. La ruta del MEP resultará imprescindible aún cuando el flujo metabólico de la ruta del MVA sea elevado. Sin embargo, diversos trabajos recientemente presentados abogan por qué dicho intercambio se verifique realmente, aunque con una eficiencia sensiblemente menor de la estimada en sentido inverso. En esa dirección apuntarían los ensayos desarrollados en el grupo del Dr. Kamiya, relativos a los intentos de reversión del fenotipo del mutante *cla1* mediante la adición al medio de concentraciones crecientes de MVA [146]. Sus resultados permiten cuantificar la contribución de la ruta del MVA a la síntesis de giberelinas (GAs), cuyo primer intermediario exclusivo en *Arabidopsis*, el ent-kaureno, es sintetizado en los plástidos a partir del GGPP [214, 287]. La marca del ¹³C-MVA suministrado a plantas crecidas a concentraciones letales de mevastatina, un inhibidor análogo a la mevinolina, es recuperado hasta un 8% en el ent-kaureno. Otros autores han observado incluso una significativa regeneración en las estructuras tilacoidales de los plástidos del mutante *cla1* suplementado con MVA, lo que indicaría una síntesis de clorofilas y carotenoides dependiente de productos derivados de dicho intermediario, al menos en estas circunstancias de bloqueo de la ruta MEP [207].

La aparente contradicción entre estos dos conjuntos de evidencias experimentales habría

que buscarla en una modulación espacio-temporal de la comunicación entre las dos vías de síntesis de IPP. El siguiente apartado pretende aportar algo de luz sobre esta cuestión.

III.5.3. Hacia un cambio de paradigma en la comprensión de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.

Una vez señalada la posibilidad de la interacción bioquímica entre las dos rutas que convergen, en la célula vegetal, hacia la síntesis de IPP, restaría por determinar cuales serían las coyunturas fisiológicas o de crecimiento, distintas por tanto de las observadas, que autorizarían a este intercambio. Podría sospecharse que esta colaboración se vea potenciada en momentos en los que existe una demanda especialmente intensa de isoprenoides. Se conocen algunos modelos, abundantemente estudiados, que postulan un fenómeno de colaboración similar al que estamos analizando dependiente del momento de desarrollo. El más interesante es el protagonizado por las células glandulares de *M. piperita* responsables de la síntesis de aceites esenciales. Estos productos están compuestos de monoterpenos, de naturaleza plastídica, pero también incluyen restos de sesquiterpenos, sintetizados en el citoplasma a partir de FPP sintasas citoplasmáticas que utilizan exclusivamente el IPP sintetizado vía MEP [191]. Experimentos de marcaje han confirmado este extremo [95], que obliga al IPP plastídico a ser movilizado hacia el citosol para servir como sustrato en la síntesis de sesquiterpenos. En estos sistemas, la ruta citosólica de síntesis de IPP parecería estar temporalmente bloqueada en el paso catalizado por la HMG-CoA reductasa, mimetizando el efecto de la mevinolina [191]. Estas células serían capaces de sintetizar y utilizar el IPP citosólico únicamente en momentos tempranos del desarrollo, canalizándolo hacia la síntesis de esteroides requeridos en la biogénesis de membrana durante el crecimiento celular. Este sistema precisará, necesariamente, de un fino mecanismo de regulación que module el funcionamiento de una u otra vía en función del estadio de desarrollo y, en última instancia, de los requerimientos de los isoprenoides sintetizados en una u otra ubicación.

Algunas evidencias apuntarían también hacia una modulación espacial de la interacción entre las dos rutas. Así lo sugiere, por ejemplo, la coincidencia en los patrones de expresión de genes de la ruta MEP y del MVA en determinados tejidos y órganos. Particularmente en inflorescencias, cuyo desarrollo pasa por la producción de muy diversos productos de naturaleza isoprenoide, de origen tanto plastídico como citosólico (apdo. III.3.1). El intercambio entre las dos vías podría justificar por qué el bloqueo en la actividad DXR propio de la línea 35S:DXR-b1.A, cosuprimida en el gen correspondiente, no conduce a alteraciones morfológicas significativas en el desarrollo de las inflorescencias. Este dato podría estar insinuando la posibilidad de que intermediarios procedentes de la ruta del MVA suplan a la ruta del MEP en la síntesis de isoprenoides plastídicos propios de las flores. De todos modos, tampoco puede descartarse que estos isoprenoides específicos de flores no resulten esenciales para el normal desarrollo de las mismas. Si esto fuese cierto, podría inferirse que la observación efectuada

sobre los primordios florales del mutante *cla1* (afectado en la DXS1) incapaces de desarrollarse en inflorescencias maduras [187], vendría justificada por el bloqueo originado en las síntesis de los cofactores tiamina y piridoxol derivados del producto del gen *cla1* (*DXS1*), más que por el carácter esencial de los hipotéticos productos isoprenoides sintetizados de modo específico en dichos órganos. De hecho, algunos de ellos, recientemente caracterizados, actuarían como atrayentes de insectos para la polinización en los infrecuentes episodios de fecundación cruzada existentes en poblaciones de *Arabidopsis* [56]. Otras evidencias presentes en la bibliografía incluyen la observación de la reducida capacidad de la DX para revertir el fenotipo originado por la mevinolina a nivel de las raíces respecto de la parte aérea de la planta (apdo. II.4.5.1), órganos donde, por otro lado, no hay solapamiento entre los patrones de expresión de los genes de una y otra vía; o la recuperación preferente de las estructuras de membrana en aquellos plástidos situados cercanos a las nervaduras de los cotiledones de las plantas *cla1* tratadas con MVA [207].

En cualquier caso, podemos desechar el modelo que, hasta hace pocos años, contemplaba la biosíntesis de isoprenoides en las células vegetales como ocurriendo de manera estrictamente compartimentalizada entre los diversos orgánulos subcelulares involucrados. Los resultados aquí presentados, y otros igualmente recientes, invitan a reformular dicho modelo, apostando por otro que contemplaría la interacción de ambas rutas biosintéticas de IPP en la biosíntesis de determinados isoprenoides. La implicación relativa de cada una estaría modulada según el momento de desarrollo, tejido u órgano, coyuntura fisiológica o ritmo metabólico particular de cada ruta bioquímica que estuviese atravesando la planta. La utilización de las herramientas genéticas y bioquímicas presentadas en esta memoria, en combinación con la búsqueda de mutantes afectados en el previsible intercambio a través de la envuelta plastídica de intermediarios propios de la síntesis de IPP, serán de enorme utilidad en el futuro para desentrañar el peso de la interacción entre ambas rutas en la regulación global de la biosíntesis de isoprenoides dentro de la célula vegetal.

IV. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

I.-Se han clonado los ADNc correspondientes a los genes *DXS1*, *DXS2* y *DXR* de *Arabidopsis thaliana*. La determinación de los extremos 5' y 3' mediante experimentos de RACE ha mostrado la existencia de cierta heterogeneidad en la longitud de la región 5'UTR y en el sitio de poliadenilación.

II.-Los análisis de *Southern-blot* efectuados, conjuntamente con el examen de las bases de datos y los análisis filogenéticos han permitido determinar la existencia de tres secuencias genómicas en *Arabidopsis thaliana* (*DXS1*, *DXS2* y *DXS3*) correspondientes a la familia de las proteínas DXS de plantas y bacterias. Las proteínas DXS constituyen, a su vez, un grupo dentro de la superfamilia de enzimas que utilizan TPP como cofactor. En la familia de las DXS pueden distinguirse dos subgrupos (I y II) nítidamente separados a nivel filogenético. Las proteínas *DXS1* y *DXS2* pertenecen al subgrupo I, mientras que la *DXS3* está filogenéticamente muy alejada y no puede incluirse en ninguno de los dos subgrupos. Por su parte, no se han detectado secuencias nucleotídicas adicionales en *Arabidopsis thaliana* con similitud a la del gen *DXR* identificado. El análisis del alineamiento efectuado con varias *DXR* vegetales han revelado la presencia de un dominio rico en Pro altamente conservado entre todas ellas.

III.-Los ensayos de complementación funcional de mutantes de *Escherichia coli* defectivos en los genes *dxs* y *dxr* han permitido concluir que las proteínas codificadas por los genes *DXS1* y *DXR* tienen actividad 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, respectivamente. Por el contrario, la expresión del ADNc correspondiente al gen *DXS2* no ha permitido complementar al mutante de *Escherichia coli* disruptado en el gen *dxs*, ni al mutante *chs5* de *Arabidopsis thaliana*, defectivo en el gen *DXS1*. La dilucidación de la actividad enzimática de la proteína codificada por el gen *DXS2* requiere, por lo tanto, de análisis ulteriores.

IV.-Las proteínas *DXS1*, *DXS2* y *DXR* poseen una extensión N-terminal adicional respecto de sus homólogas procariontas, extensiones que presentan las características propias de los péptidos de tránsito a plástidos. Consecuentemente, la expresión de formas quiméricas de estas proteínas fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP) en hojas jóvenes de *Arabidopsis thaliana* ha permitido confirmar su transporte a cloroplastos, en el caso de *DXS1* y *DXR*, y a proplástidos, en el caso de la *DXS2*. Asimismo, la presencia de las proteínas *DXS1* y *DXR* en cloroplastos ha sido corroborada mediante técnicas inmunocitoquímicas.

V.-Un análisis detallado de los patrones de expresión de los genes *DXS1* y *DXR* ha sido obtenido mediante experimentos de *northern-blot* y *western-blot* así como de tinción histoquímica y cuantificación de la actividad GUS de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* portadoras de las construcciones (-1738/+217)*DXS1:GUS* y (-1158/+94)*DXR:GUS*. Dichos análisis han permitido constatar como tanto el gen *DXS1* como el gen *DXR* manifiestan expresión generalizada en los distintos tejidos y estadios de desarrollo de la planta. Sin embargo, el patrón

de expresión espacio-temporal del gen *DXR* resulta más restringido, no detectándose en brotes laterales o haciéndolo a muy bajos niveles en determinados tejidos florales, tales como los pétalos. Otro aspecto destacable de la expresión de ambos genes consiste en su inducción en respuesta a la luz. El patrón de expresión observado resulta coherente con la implicación de los genes *DXS1* y *DXR* en la síntesis, vía MEP, de los isoprenoides plastídicos.

VI.-El análisis del patrón de tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de delecciones seriadas de la región 5'-flanqueante del gen *DXS1* fusionadas con el gen delator *GUS* han permitido establecer que la región comprendida entre los nucleótidos -359 y +217 engloba todos los elementos en *cis* necesarios para la correcta expresión espacial y temporal del gen. La región -359/-188 contiene elementos imprescindibles para la expresión del gen *DXS1*, algunos de ellos previamente descritos en otros genes por su implicación en la regulación por luz u otros aspectos relacionados con la función biológica del gen *DXS1*. Entre estos últimos destaca el motivo ATCTA, conservado en los promotores de numerosos genes implicados en la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos, de naturaleza isoprenoide.

VII.-Se ha observado una inducción de la expresión del gen *DXR* en respuesta al bloqueo de la síntesis de isoprenoides provocada por fosmidomicina y mevinolina, inhibidores específicos de la vía del MEP y del MVA respectivamente. Dicha respuesta se ha verificado en forma de acúmulo del ARNm *DXR* en el caso de la fosmidomicina. Estos resultados resultan coherentes con un papel regulador de la *DXR* en la síntesis de IPP.

VIII.-Las plantas transgénicas portadoras de la construcción 35S:*DXR*, diseñadas para la sobreexpresión constitutiva de *DXR*, presentaron niveles modificados de ARNm, proteína y actividad enzimática. Una de las líneas obtenidas presenta niveles disminuidos de ARNm y proteína debido a un proceso de cosupresión. En todos los casos, las variaciones en los niveles de ARNm y proteína correlacionan con cambios en los contenidos en clorofilas y carotenoides, lo cual afianza el papel regulador de la *DXR* en la ruta del MEP en *Arabidopsis thaliana*.

VIII.-Las plantas transgénicas TA:*DXS1*, diseñadas para la sobreexpresión inducible de la *DXS1*, responden a la presencia del inductor dexametasona, mostrando mayores niveles de ARNm *DXS1*. Los niveles de proteína *DXS1*, no obstante, permanecen inalterados en dichas plantas, así como las concentraciones de clorofilas y carotenoides. Estos resultados sugieren una regulación postranscripcional del gen *DXS1* dependiente del producto de la reacción catalizada por la *DXS1*, o de alguna molécula señal derivada del mismo.

IX.-Las proteínas *DXS1* y *DXR* resultan esenciales para el correcto desarrollo de los cloroplastos y, en congruencia con la hipótesis de la señal plastídica, de las hojas. El uso de mutantes e inhibidores de las etapas catalizadas por sendas enzimas así lo corroboran.

X.-Algunos resultados presentados en esta memoria apuntan a la interacción de la ruta

IV. CONCLUSIONES

del MEP con la ruta del MVA. Entre ellos destacan la reversión con la desoxixilulosa del fenotipo causado por la mevinolina. Dicha reversión correlaciona con la inducción de la expresión de genes de la ruta del MEP, particularmente *DXR*, inducción que se verificaría únicamente en condiciones de bloqueo de la ruta del MVA.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Las técnicas básicas de manipulación y análisis de ADN, ARN y proteínas se realizaron, en lo esencial, siguiendo los manuales *Molecular Cloning: A laboratory Manual* [255] y *Current Protocols in Molecular Biology* [15]. A continuación, se describen aquellas técnicas implementadas en el laboratorio o que resultan de especial interés.

V.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

V.1.1. Material vegetal.

- *Arabidopsis thaliana* (Heyn) variedad Columbia-3. Se trata de la variedad utilizada en el programa de secuenciación del genoma de *Arabidopsis*. Concretamente sobre esta línea número 3, se obtuvieron los datos de mapeo génico por RFLP (siglas en inglés de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) en el laboratorio del Dr. Elliot Meyerowitz.
- *Arabidopsis thaliana* (Heyn) variedad C-24.
- Mutante *chs5* de *Arabidopsis thaliana* [11] (*Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University*. Número de stock: CS 8004).
- Línea celular T87 de *A. thaliana* [16]. Obtenida a partir de callos derivados de la variedad Columbia.

V.1.2. Cepas bacterianas.

- *Escherichia coli* **XL1 blue** (*endA1, hsdR17* (r^m^+), *supE44, thi-1, recA1, gyrA996, relA1, lac*⁻ (F^+ *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15, Tn10 Tet^r)).
- *Escherichia coli* **DH5 α** (*supE44, Δ lac, U169, (Φ 80, lacZ Δ M15), hsd R17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1*).
- *Escherichia coli* **EcAB4-2** (*EcAB1-1:operón MVA*⁺) [45].
- *Escherichia coli* **EcAB1-1** (*MC1655:DXS::tet*) [55].
- *Escherichia coli* **EcAB1-2** (*MC4100:DXR::tet*) [239].
- *Agrobacterium tumefaciens* **C58C1** (Rif^r-pGV2260) [300].

V.1.3. Vectores Plasmídicos.

- pBLUESCRIPT-SK⁺ (*Stratagene*).
- pGEM-T (*Promega*).
- pBI221 (*Clontech*).
- pBI121 (*Clontech*).
- pTA7002 [10].

- pCAMBIA1303.
- pGFP-MRC [240].
- pBAD-GFPuv (*Clontech*).

La mayoría de las construcciones fueron originalmente generadas en los vectores pBLUESCRIPT-SK^{+/+} y pGEM-T (*Promega*). Éste último se utilizó específicamente para el clonaje de productos resultantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, apdo. V.5.4). Los vectores de las series BI, TA y CAMBIA se emplearon para la generación de plantas transgénicas mediante transformación de *A. thaliana*. Por su parte, el vector pGFP-MRC fue utilizado en los estudios de localización subcelular de proteínas. Finalmente, el vector de expresión inducible pBAD-GFPuv fue adaptado convenientemente para los ensayos de complementación funcional de mutantes de *Escherichia coli*. Estos plásmidos fueron propagados en las cepas DH-5 α y XL1-Blue de *E. coli*. Además las construcciones generadas a partir de los vectores pBI121, pCAMBIA1303 y pTA7002, fueron amplificadas en la cepa C58C1Rif^R-pGV2260 de *A. tumefaciens*.

V.2. MEDIOS DE CULTIVO.

V.2.1. Medios de cultivo de plantas:

El medio de germinación se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 120 °C antes de ser plaqueado en placas de cultivo / germinación (placas de Petri un poco más altas adecuadas para el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis*). Para el crecimiento en matraces Erlenmeyer de semillas en medio semilíquido se usó el porcentaje de agar indicado por **. Éste medio de crecimiento fue el utilizado para crecer plantas en condiciones estériles. Antibióticos, inhibidores, intermediarios metabólicos y demás productos se adicionaron una vez esterilizado el medio en el autoclave y después de haberse atemperado hasta aproximadamente 50 °C.

MEDIO de GERMINACIÓN:

Murashige&Skoog*	4,4 g
MES	0,5 g
Agua miliQ c.s.p.	1 l
Agar	8 g(0,8 g)**
Ajustar el pH a 5.7 con KOH 1 N.	

MEDIO MINERAL:

KNO ₃	5 mM
KH ₂ SO ₄ (pH=5,5)	2,5 mM
MgSO ₄	2 mM
Ca (NO ₃) ₂	2 mM
EDTA-Fe	50 mM
Micronutrientes	0,1 %

MICRONUTRIENTES:

H ₃ BO ₃	70 mM
MnCl ₂	14 mM
CuSO ₄	0,5 mM
ZnSO ₄	1 mM
NaMoO ₄	0,2 mM
NaCl	10 mM
CoCl ₂	10,01 mM

*El medio MS (Murashige&Skoog) utilizado no contenía ni sacarosa, ni agar, ni kinetina, ni ácido indolacético (*ICN Biomedicals*). El agua miliQ es el agua bidestilada-desionizada.

V.2.1.1. Suplementos al medio de cultivo:

Diferentes intermediarios e inhibidores fueron adicionados al medio de germinación en cultivos estériles. Se enumeran los distintos productos que fueron utilizados, los proveedores, la preparación de las soluciones madre o, en su caso, los procedimientos de síntesis:

-**Dexametasona** (9 α -fluoro-16 α -metilprednisolona F): Se trata de un glucocorticoide sintético que fue suministrado por *Sigma* y preparado en etanol a las concentraciones de 30 mM y 100 μ M.

-**Fosmidomicina** (ácido 3-(N-formil-N-hidroxiamino)propilfosfónico) [157]: *Molecular Probes, Eugene*. Se prepara una solución madre a 100 mM en Tris-HCl 10 mM a pH=8,5, que posteriormente se esteriliza mediante filtros de 0,2 μ m de diametro de poro.

-**Norflurazón** [274] (3(2H)-piridazinona, 4-cloro-5-(metilamino)-2-[3-(trifluorometil)fenil]: Este inhibidor fue enviado por el Dr. Harker de la *University of London*. La solución madre se obtiene resuspendiendo en DMSO hasta 100 mM final.

-**Mevalonato**: Este intermediario se prepara a partir de Mevanolactona (*Sigma*) mediante un proceso de hidrólisis alcalina. Para ello se incuba 1 vol de mevanolactona 1 M con 1,05 vol de KOH 1 M a 37°C durante 30 min. El pH de la preparación resultante será de aproximadamente 7,5.

-**Mevinolina** [20]: Este compuesto, aislado originalmente del hongo *Aspergillus terreus*, se prepara en una solución al 6,5 mM. Con tal fin, se disuelven 25 mg en 0,760 ml de etanol absoluto calentando hasta 50-55°C. Se le añade a continuación 0,25 ml de NaOH 0,6 N y se completa con 7,6 ml de H₂O. Tras media hora de incubación a T³A, se ajusta el pH de la solución resultante a 7,8 con HCl 2 N. Finalmente se lleva hasta 9,509 ml con H₂O y se hacen alícuotas de 1 ml, que se conservan a -20°C.

-**Ácido zaragóxico** [27]: Este producto, también de origen fúngico, fue suministrado por *Merck* y preparado en H₂O a 2,5 mM.

-**Ácido abscísico**: La fitohormona ABA, provista por *Sigma*, se prepara a una concentración final de 10 mM en NaOH 1N.

-**2-C-Metil-D-eritritol**: Este intermediario metabólico fue sintetizado y cedido amablemente por el grupo del Dr. Rohmer de la *Université Louis Pasteur, Strasbourg* [55].

-**1-desoxi-D-xilulosa**: Este sustrato se preparó en el laboratorio mediante la técnica enzimática que se detalla a continuación [177]:

Materiales:

- pTAC-ORF2 [177].

- IPTG (isopropil β -D-tiogalactósido).
- Centrífuga *Beckman J2-21* y rotores JA-10.
- Tampones A y B.
- Sonicador *Branson Sonifier 250*.
- Liofilizador-Evaporador-trampa de vacío (*B. Braun Christ-Loc I*).
- Placas TLC (Silica GEL 60, *Merck* y 60-200 UV₂₅₄ 20x20 cm, *Panreac*), cubetas y eluyentes para la separación cromatográfica.
- Solución de revelado.
- Metanol.
- Rotavapor.
- Trampa de vacío.
- Inhibidores de proteasas.

Método:

Preparación del extracto proteico:

1.- Crecer toda una noche un precultivo, obtenido a partir de una colonia aislada de pTAC-ORF2, en 3 ml de 2xTY+Amp a 37°C. La cepa pTAC-ORF2 contiene el marco abierto de lectura completo del gen *dxs* de *E. coli* clonado en el vector de expresión inducible pTACTAC [177].

2.-Inocular 2 Erlenmeyer con 500 ml de 2xTY con una dilución 1/500 del preinóculo anterior e incubar 4 horas a 37°C o hasta que el cultivo alcance una $DO_{600nm}=0,6-0,7$.

3.-Inducir durante 2 horas mas la expresión de la proteína, adicionando al cultivo con hasta 1 mM final de IPTG.

4.-Centrifugar durante 10 min a 4°C y 7500 rpm en un rotor JA-10 preatemperado.

5.-Resuspender el sedimento anterior en 1/10 del volumen de cultivo bacteriano original de solución A.

6.-Centrifugar como en el paso 4.

7.-Resuspender en la solución B según una relación 5 ml/gr de sedimento bacteriano.

8.-Incubar 30 min a 4°C.

9.-Sonicación: se aplican 5 pulsos de 1 min a 30W con 1 min 30 seg de intervalo entre ellos.

10.-Centrifugar durante 30 min a 4°C y 7500 rpm en un rotor JA-10 preatemperado.

11.-Resuspender el precipitado obtenido en una solución de sulfato de protamina al 1 % según una

relación 1:7 e incubar 15 min a T^ªA. De esta manera el ADN es eliminado.

12.-El sobrenadante, obtenido tras una última centrifugación de 20 min a 4°C y 7500 rpm en un rotor JA-10 preatemperado, se usa como extracto proteico. La concentración de proteína se determinó mediante la técnica de Bradford (apdo. V.4.4.).

Reacción preparativa de desoxixilulosa:

1.-Preparar la siguiente mezcla de reacción:

REACCIÓN ENZIMÁTICA DXS:

Extracto proteico.....	5 mg
D-Gliceraldehído.....	150 mM
Piruvato.....	150 mM
MgCl ₂	2,5 mM
EDTA pH=8.....	1 mM
Pirofosfato de tiamina.....	1 mM
PMSF.....	0,2 mM
Tris-Cl 1M pH=8.0.....	80 mM
H ₂ O miliQ c.s.p.....	10 ml

2.-Incubar 4 horas a 37 °C.

3.-Desproteización: Inactivar proteína incubando 10 min a 80°C.

4.-Centrifugar 30 min a 4°C y 10000 rpm. Recuperar el sobrenadante y repetir con él los pasos 3 y 4.

5.-Congelar la muestra en N₂ líquido sumergiéndola lentamente y congelando gradualmente de fuera hacia dentro.

6.-Liofilizar: Este paso puede llevar hasta 1 día. Es importante evitar en lo posible la aparición de espuma sobre la muestra liofilizada, indicativa de la presencia de proteínas desnaturalizadas altamente tensioactivas.

Separación cromatográfica de los productos de reacción:

1.-Resolver en una placa de TLC pequeña una alícuota de la muestra resuspendida en metanol. Desarrollar la cromatografía durante 1 hora-1 hora y media utilizando cloroformo:metanol (8:2, v:v) como eluyente.

2.-Revelar rociando la placa con solución de revelado. Los componentes de esta solución son extremadamente tóxicos por lo que se debe evitar la exposición a la misma (guantes, mascarilla y campana de extracción).

3.-Incubar unos minutos a 80°C en la estufa hasta que la resolución del revelado sea óptima. De esta manera se detectó la aparición de desoxixilulosa a una R_f 0,37.

TLC preparativa:

1.-Purificación de la mezcla de reacción: Se somete para ello a 3 extracciones sucesivas en 25 ml de cloroformo:metanol (8:2/v:v) incubando de 10-30 min a 37°C y con agitación. Entre paso y paso se filtra con el sistema Erlenmeyer Kitasato-trampa de vacío, y se evapora de 15 a 20 min con ayuda del rotavapor a 70°C y bajo agitación.

2.-Resuspender la muestra así purificada en el mínimo volumen de elución necesario para cargar en la placa de TLC preparativa. En un extremo se deja un carril donde se carga separadamente una alícuota de aquella que servirá como control.

3.-Una vez resuelta la cromatografía en el eluyente indicado (aproximadamente de 1 hora a 1 hora y media hasta alcanzar 10-12 cm desde el punto de aplicación) se revela el sector correspondiente al control, procurando siempre no contaminar la región de la placa donde ha migrado la cromatografía preparativa, protegiéndola por ejemplo con papel de aluminio. Se puede así identificar la región donde migra el producto de interés, que será marcado con un lápiz.

4.-Con la ayuda de una espátula se rasca la zona marcada, recuperando en un tubo el polvo de sílica-gel que contiene la desoxixilulosa.

5.-Purificación final: Se procede como en el paso 1, añadiendo el volumen deseado de la solución de elución al polvo de sílice y aplicando todo el conjunto sobre el filtro del Erlenmeyer Kitasato.

6.-Una vez purificado el producto de esta manera se pesa y resuspende en agua a una concentración de trabajo de 0,5M.

Tampón A:

Tris-Cl pH=7,5.....	40 mM
MgCl ₂	1 mM
β-Mercaptoetanol.....	5 mM
EDTA.....	1 mM

SOLUCIÓN de REVELADO:

Etanol.....	46,4 ml
Ác. sulfúrico.....	1,8 ml
p-anisaldehído.....	1,2 ml
Ác. acético glacial.....	0,6 ml

Preparar esta mezcla bajo la campana de extracción.

Tampón B:

PEFABLOC.....	1 mM
Lisozima.....	1 mg/ ml
Leupeptina.....	2 µg/ ml
Pepstatina.....	2 µg/ ml
Quimioestatina.....	2 µg/ ml

Adicionar estos compuestos al tampón A.

V.2.2. Medios de cultivo de bacterias.

Los medios de cultivo bacteriano se prepararon en agua destilada y fueron autoclavados durante 20 minutos a 120°C. Los antibióticos o intermediarios requeridos en cada ocasión se añadían después de atemperar el medio a 50°C. Estos mismos fueron los medios utilizados para cultivo sólido en placa de Petri, añadiéndoles en tal caso agar al 1,5 %.

Se utilizó generalmente medio LB para crecimiento de *E. coli*. El medio 2xTY, más rico, se empleó para aquellos casos en los que se requería un crecimiento rápido o la estirpe bacteriana fuera de crecimiento particularmente lento o dificultoso. El medio YEB se reservó para el crecimiento de *A. tumefaciens*.

MEDIO LB (1 litro):

NaCl.....0,5 %
 Bactotriptona.....1 %
 Extracto de levadura.....0,5 %
 Bactotriptona.....1,6 %

MEDIO 2xTY (1 litro):

Extracto de levadura.....1 %
 NaCl.....1 %
 KNO₃.....5 mM

MEDIO YEB (1 litro):

Extracto de levadura.....0,1 %
 Extracto de buey.....0,5 %
 Peptona.....0,5 %
 Sacarosa.....0,5 %
 MgSO₄·7H₂O.....0,05 %
 Equilibrar a pH=7 con NaOH

Como regla general, y para alcanzar la fase de desarrollo estacionario, se siguieron las condiciones de cultivo indicadas en la Tabla V.1:

	MEDIO SÓLIDO	MEDIO LÍQUIDO
<i>Escherichia coli</i>	37°C noche	37°C noche con agitación 220-260 rpm
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28°C 2-3 días	28°C 2-3 días con agitación suave 120-160 rpm

Tabla V.1: Condiciones generales de cultivo de las diferentes especies bacterianas empleadas en este trabajo.

V.3. CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se cultivaron en cámaras especiales de cultivo a una temperatura de 22-24°C siguiendo esencialmente dos programas de desarrollo. En un caso fueron mantenidas bajo un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad (condiciones de día corto) en los que la planta permanece en fase vegetativa más tiempo y retrasa su floración, incrementándose la biomasa vegetal correspondiente a las hojas de la roseta basal. En otras ocasiones fueron cultivadas bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (condiciones de día largo). En dichas condiciones se acelera la entrada de la planta en fase reproductiva. Una combinación de aquellas dos fases permite el desarrollo óptimo y completo de las plantas, lo cual requiere el constante seguimiento de los individuos.

Excepcionalmente, las plantas fueron crecidas bajo condiciones de luz continua, o bien en oscuridad,

protegidas de la luz con papel de aluminio. Finalmente, algunos experimentos requirieron del crecimiento a 15-16 °C.

El material vegetal utilizado fue cultivado, bien en condiciones estériles, bien en macetas con una mezcla de tierra, tal y como se detalla a continuación.

V.3.1. Cultivo estéril de *Arabidopsis thaliana*.

V.3.1.1. Cultivo estéril en medio sólido:

Para la regeneración de plantas transgénicas y la selección de semillas resistentes al marcador correspondiente, el material vegetal fue cultivado en condiciones estériles en medio sólido de germinación. Este medio fue también el utilizado cuando quisieron crecerse con el objeto de recuperar el tejido de plantas crecidas bajo distintas condiciones (longitudes de fotoperíodo, T^a, distintos tratamientos, etcétera).

Para cultivar las plantas en condiciones estériles, deben extremarse las precauciones al manipular las semillas, trabajando siempre cerca de la llama del mechero de alcohol y en una cabina de flujo laminar. La omisión de sacarosa en el medio de germinación reduce considerablemente la aparición de contaminantes, aunque el crecimiento se vea sensiblemente retardado. Excepcionalmente las placas pueden exponerse bajo la luz ultravioleta toda una noche antes de sembrar, siempre y cuando el medio no incluya ningún producto fotolábil. Por otro lado, es conveniente secar las placas para reducir la condensación de agua en el interior de la parte superior de la tapa de la misma, dejándolas abiertas cerca de la llama unos minutos. Asimismo, conviene sellar las placas, una vez sembradas las semillas, mediante esparadrapo transpirable (*Leukopor*),.

Para esterilizar las semillas de *A. thaliana* se siguió el método detallado a continuación:

1.-Se sumergen las semillas (50-100 mg en tubos de microcentrifuga) en solución de esterilización durante 8 min agitando 2 ó 3 veces como mínimo.

2.-Lavar a continuación durante 2 pasos de 1-2 min con etanol absoluto, agitando 1-2 veces.

3.-Finalmente, dejar secar con la campana encendida entre 4 horas y una noche, según la cantidad de etanol que hubiese permanecido en el tubo.

Se siembra entonces directamente sobre el medio. Como paso previo a la puesta en germinación se guardan las placas de 2 a 4 días a 4°C protegidas de la luz. El objetivo de este proceso (llamado de estratificación) es el de sincronizar la germinación de las semillas sembradas.

SOLUCIÓN de ESTERILIZACIÓN:

Bayrol GmbH.....1.5 g (desinfectante universal de uso común)

Agua miliQ c.s.p.....40 ml

Diluir al 10 % en etanol 95 %

V.3.1.2. Cultivo estéril en medio líquido:

Se recurrió al cultivo estéril en medio líquido cuando quiso obtenerse tejido procedente de los

ensayos con inhibidores, pues facilita la resuspensión rápida de cualquier producto adicionado al medio en cualquier momento de su desarrollo

Para ello, se siembran semillas estériles de *Arabidopsis* en matraces Erlenmeyer que contienen medio líquido de crecimiento (alrededor de 20-30 semillas en 10-50 ml de medio para un matraz de 100-250 ml de volumen). Tras el paso de estratificación correspondiente, los matraces se disponen en un agitador a 130 rpm en una cámara con luz continua y temperatura de 22-24°C.

Una vez transcurrido el tiempo necesario, y aplicados los tratamientos correspondientes, las plantas se extrajeron del medio líquido y se limpiaron con agua destilada para eliminar el exceso de sales.

V.3.2. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en tierra.

Se hicieron crecer en condiciones no estériles aquellas plantas destinadas a completar su ciclo biológico y producir semillas, con el objetivo de estudiar la segregación así como para obtener tejidos para análisis ulteriores, como *northern-blot*, *western-blot*, determinación de actividad GUS o cuantificación de pigmentos. El cultivo en macetas se llevó a cabo en un sustrato sólido consistente en una mezcla de perlita:vermiculita:turba siguiendo las proporciones 1:1:1. Para amortiguar la naturaleza ácida de la turba 2 g de una mezcla de carbonato potásico:carbonato cálcico:carbonato magnésico (según una relación 7:4,5:2) se añadieron a cada litro del sustrato. Las macetas se regaron periódicamente (dos veces por semana) intercalando agua destilada con el medio mineral indicado en el apartado V.2.2.

Las semillas pueden sembrarse directamente sobre el soporte sólido, pero cuando fue necesario seleccionar la resistencia al marcador (en este caso antibióticos como la kanamicina o la higromicina), las semillas eran crecidas previamente en placas tal y como se ha indicado en el apartado V.3.1.1. Una vez seleccionados los individuos resistentes se pueden trasplantar a tierra, pero nunca debe hacerse antes de unos 15 días de crecimiento, momento en que las raíces han alcanzado un nivel de desarrollo que permite superar el estrés resultante del cambio de ambiente que podría matar a unas plántulas demasiado jóvenes.

Para traspasar plantas de *Arabidopsis* de un medio estéril a tierra se han de extremar las precauciones en la manipulación. La tierra debe ser abundantemente irrigada, y las macetas recubiertas con una película de plástico (*Saran Wrap* o similar). El objetivo es que las plantas se habitúen gradualmente a las nuevas condiciones, fundamentalmente de humedad del aire en el paso de la atmósfera cerrada de la placa a la atmósfera del invernadero. De este modo, y para favorecer paulatinamente el intercambio de aire, se practican unos orificios en el plástico, retirándose éste finalmente una vez los individuos han enraizado convenientemente.

V.3.3. Mantenimiento de la suspensión celular de la línea T87.

El mantenimiento de la suspensión celular de la línea T87 de *A. thaliana* [16] se realiza traspasando una alícuota de 5-10 ml de un cultivo en fase estacionaria temprana (7días) a 120 ml de medio de células suplementado con ácido α -naftalenacético (ANA) hasta una concentración final de 1 μ M. Esta operación se

realiza en todo caso manteniendo las condiciones de esterilidad anteriormente descritas. Las condiciones de crecimiento fueron asimismo de 22-24°C, bajo agitación (130 rpm) y en condiciones de luz continua.

MEDIO de CRECIMIENTO de CÉLULAS:

Murashige&Skoog.....4,4 g
 MES.....0,5 g
 Sacarosa.....10 g
 Agua miliQ c.s.p.....1 L
 Ajustar el pH a 5.7 con KOH 1 N

HORMONA ANA 5 mM:

Ácido α -naftalenacético (ANA) ...9.3 mg
 DMSO (Dimetilsulfoxido).....10 ml
 (Conservar alicuotado a -20°C)

V.4. BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE *Arabidopsis thaliana*: TÉCNICAS ESPECÍFICAS.

V.4.1. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

La generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se realizó mediante infección con la estirpe C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando la técnica de infiltración al vacío basada en la metodología descrita por Bechtold y cols. [26]. Más recientemente, se ha seguido una versión simplificada basada en la llamada técnica de “floral dip” [66].

V.4.1.1. Descripción de los vectores utilizados para generar las plantas transgénicas.

Tres tipos de vectores fueron utilizados para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. En primer lugar se utilizó el vector pBI121 suministrado por *Clontech*. En la imagen correspondiente (Figura V.1a) se observan los elementos que componen la región de ADN-T que se pretende integrar en el genoma. En ella se encuentra el marcador de selección *nptII*, puesto bajo el control del promotor nos y que codifica para la neomicina fosfatasa. Esta enzima confiere resistencia frente a antibióticos de naturaleza aminoglucosídica (como la kanamicina) inactivándolos mediante la fosforilación de los mismos. Contiene, por otro lado, el gen *uidA* (*GUS*) de *Escherichia coli*, que codifica la enzima β -glucuronidasa (*GUS*) dirigido por la región promotora de la fracción 35S del ARN ribosomal del virus del mosaico de la coliflor (35S-CaMV). La enzima *GUS* es ampliamente utilizada como marcador de los patrones de expresión génica al ser muy estable en sistemas vegetales y debido a que la actividad correspondiente está ausente en plantas, anulando cualquier posible interferencia. Su uso se basa en su capacidad para hidrolizar β -glucurónidos en ácidos glucurónicos de intensa coloración. Muchos de estos sustratos están disponibles comercialmente como sustratos espectrofotométricos, fluorométricos e histoquímicos. Por su lado, el promotor 35S-CaMV permite la expresión fuerte y constitutiva de cualquier ADNc clonado en el vector pBI121. El estudio de las alteraciones fenotípicas provocadas por la alteración en los niveles de expresión del transgén en las plantas transformadas con estas construcciones proporciona valiosa información acerca de la función desarrollada por el producto del gen a estudio.

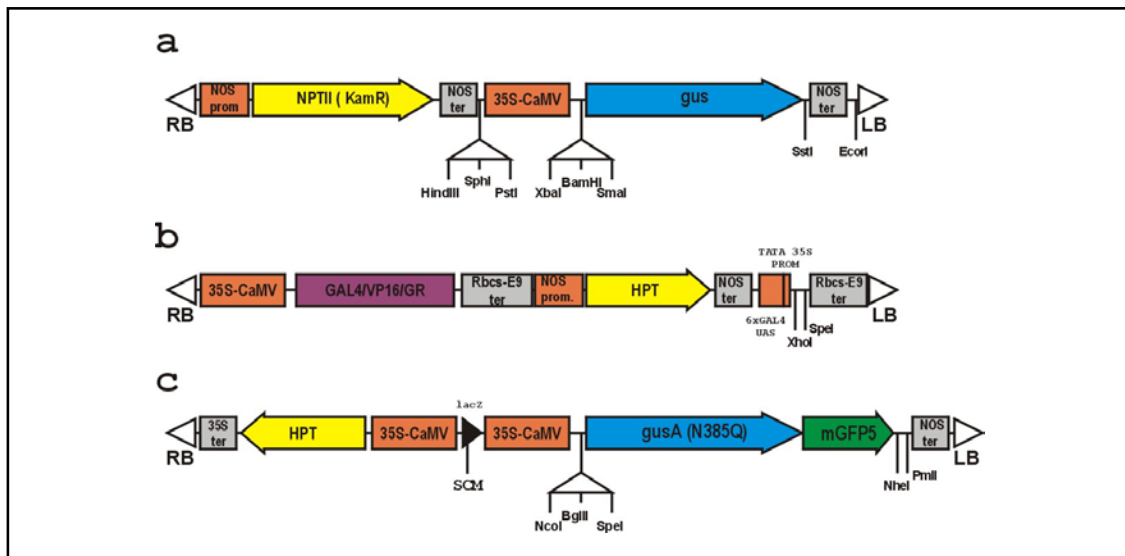
Los vectores de la serie pCAMBIA1303 (Figura V.1b), presentan importantes ventajas respecto del

pBI121 como sistema binario para la transformación de *A. thaliana*. Entre ellas destacan la mayor eficiencia de amplificación en sistemas bacterianos, al ser un vector que permite mantenerse en mayor número de copias en la célula; la presencia de una región de policlonaje con mayor número de sitios de restricción únicos, confiriéndole mayor versatilidad a la hora de diseñar un clonaje; el presentar marcadores de resistencia distintos para plantas y bacterias (concretamente *nptII* para estas y *hpt* para aquellas), evitando fenómenos cruzados de contaminación; y finalmente, el poseer 2 genes delatores bajo el control del promotor 35S: el codificante para la GFP y el gen *GUS*, éste último truncado por un intrón que evita la expresión del gen en sistemas bacterianos [213]. En cualquier caso, las aplicaciones de este vector son análogas a las descritas para el pBI121. Por su parte, la presencia del gen *hpt* dirigido por el promotor *NOS*, confiere resistencia frente al antibiótico higromicina, permitiendo la selección de los eventuales transformantes.

Finalmente, se ha utilizado el vector pTA7002 [10]. Se trata de un vector que permite la inducción transcripcional mediada por glucocorticoides, gracias al sistema GVG. Tanto los elementos en *cis* como en *trans* necesarios para la inducción están incluidos en la región de ADN-T del plásmido (Figura V.1c). El elemento en *trans*, GVG, comprende el dominio de unión a ADN de GAL4 de levadura, el dominio de transactivación vírico VP16 y finalmente el dominio de unión a hormona específico del receptor de glucocorticoides humano GR, puesto bajo el control del promotor 35S. El promotor incluye los elementos en *cis* y se compone de 6 copias del sitio de unión (UAS) de la proteína GAL 4 y la región mínima (caja TATA) del promotor 35S. La presencia en el medio de crecimiento del glucocorticoide sintético dexametasona provoca la inducción de la expresión del gen puesto bajo el control de la región promotora descrita. El sistema permite modular temporal y espacialmente la expresión de los genes estudiados. Asimismo, este vector contiene el marcador HPT.

Todos estos vectores contienen orígenes de replicación para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, permitiendo la propagación de las construcciones en las cepas XL1-blue o DH5 α de *E. coli* previamente a su introducción en *A. tumefaciens*.

Figura V.1: Representación esquemática a escala de las regiones de ADN-T de los tres vectores utilizados para generar plantas transgénicas de *A. thaliana*: a, corresponde a pBI 121; b, pCAMBIA 1303 y c, pTA 7002. SCM: Sitio de Clonaje Múltiple. LB y RB: "Left" y "Right Border".



V.4.1.2. Construcciones utilizadas para la generación de transgénicas:

Tres tipos de construcciones fueron generadas para transformar *A. thaliana*. Las estrategias desarrolladas para la obtención de las mismas se detallan en este apartado. Algunos detalles adicionales relativos al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a técnicas puntuales de ADN recombinante llevadas a cabo durante la generación de estas construcciones pueden obtenerse consultando los apartados V.5.4 y V.5.1 respectivamente. Las zonas de fusión de todos los insertos clonados con sus vectores respectivos fueron confirmadas por secuenciación con el objeto de descartar posibles anomalías.

Construcciones promotor:*GUS*:

Para el clonaje de la región promotora del gen *DXS1*, fue recuperado un inserto de 2033 pb resultante de la digestión con BglII del clon genómico p1C10AP64. Este inserto fue posteriormente clonado direccionalmente en el sitio BamHI del vector pBLUESCRIPT-SK⁻, gracias a la compatibilidad de los extremos protuberantes generados por ambas enzimas. Mediante una estrategia de mutagénesis dirigida [156] basada en la utilización del oligonucleótido DXS1.PROMbaseXbaI, se introdujo un sitio de restricción XbaI ceñido 12 pb corriente abajo del ATG. La construcción resultante fue comprobada por secuenciación, tras lo cual fue digerida con las enzimas HindIII y XbaI y el fragmento obtenido clonado directamente en los sitios equivalentes del vector pBI121, sustituyendo la región correspondiente al promotor 35S-CaMV. El gen quimérico *DXS1:GUS* de la construcción resultante, designada pLBI1PS1.2, contiene 1738 pb de la secuencia corriente arriba del inicio de transcripción del gen *DXS1*, la región transcrita no traducida entera, y los primeros 12 pb de la región codificante fusionado en modo traduccional con el gen *GUS*. Para mayor claridad en la exposición de los resultados, esta construcción fue denominada (-1738/+217)*DXS1:GUS* (Figura II.16).

Por otra parte, fueron generadas construcciones en las que se fusionaron 4 fragmentos del promotor *DXS1*, delecionados progresivamente en su extremo 5', con el gen *GUS* del vector pBI121. Para ello, se

llevaron a cabo 4 reacciones de *PCR* usando como molde ADN purificado de la construcción pLBI1PS1.2 que contenía la región -1738/+217 del gen *DXS1*. Como cebadores, en dirección sentido se emplearon los oligonucleótidos DXS1.PROM11, DXS1.PROM8, DXS1.PROM6 y DXS1.PROM4 respectivamente y en dirección antisentido, DXS1.PROMbase**XbaI**. Este último introducía, además, un sitio XbaI para facilitar los clonajes subsiguientes. Los 4 productos resultantes de la amplificación fueron subclonados en pGEM-T. Una vez secuenciados los insertos y confirmada la orientación e identidad de los mismos, se recuperaron los fragmentos resultantes de la digestión con PstI y XbaI para ser clonados en los sitios correspondientes del vector pBI221, sustituyéndolo por la región correspondiente al promotor 35S-CaMV. Se obtuvieron así las construcciones pLBI2PS11, pLBI2PS8, pLBIPS6 y pLBIPS4 derivadas de cada uno de los fragmentos del promotor recuperados, y que contenían, respectivamente, las regiones 5' flanqueantes al gen *DXS1* extendiéndose desde la posición -860/+217, -605/+217, -359/+217 y -188/+217 fusionadas traduccionalmente al gen *GUS*. Finalmente, el casete correspondiente a la digestión con las restrictasas HindIII y XbaI para aquellas dos construcciones, y HindIII y SstI en el caso de estas dos últimas, fue sustituido por las correspondientes regiones en el vector de destino pBI21. Estas construcciones fueron designadas según la notación (-860/+217)*DXS:GUS*, (-605/+217)*DXS1:GUS*, (-358/+217)*DXS1:GUS*, (-188/+217)*DXS1:GUS* (Figura II.19).

En lo que concierne al promotor del gen *DXS2*, se planteó una estrategia de *PCR* basada en la enzima Pfu ADN polimerasa utilizando ADN genómico de *A. thaliana* var. Col3 como molde. La amplificación con los oligonucleótidos DXS2.PROM5A y DXS2.PROM3**XbaI** (éste último introducía un sitio XbaI), permitió obtener un producto de 1,6 kb que contenía la región flanqueante del gen *DXS2*. Dicho fragmento fue clonado en el vector pBLUESCRIPT-SK⁻ gracias a los extremos romos dejados por la digestión con SmaI. La digestión de dicha construcción, denominada pLBSpromS2.6, con la endonucleasa XbaI resultó en un inserto de 1260 pb, que fue clonado en el vector pCAMBIA1303, digerido a su vez con XbaI y SpeI. De esta manera se consiguieron integrar 1184 nucleótidos corriente arriba del extremo conocido del ADNc *DXS2*, 43 nucleótidos de la *UTR* 5', más 33 nucleótidos de la secuencia codificante del gen *DXS2* en fase traduccional con una versión modificada del gen marcador *GUS* [213], y el codificante para la GFP, como así fue confirmado mediante la posterior restricción analítica y secuenciación.

Finalmente, en el caso del promotor del gen *DXR*, se siguió una estrategia de *PCR* basada en la enzima Pfu ADN polimerasa utilizando ADN genómico de *A. thaliana* var. Col. 3 como molde, y los oligonucleótidos DXR.PROM1 y DXR.PROMbase**XbaI** (que introducía un sitio XbaI en el extremo 3') como cebadores. Se recuperó así un producto de amplificación de 1,3 kb, que fue clonado en el vector pGEM-T y secuenciado, confirmándose que contenía la región 5' flanqueante al gen *DXR*. El inserto fue recuperado mediante las restrictasas XbaI y SphI y transferido al vector pBI221, en el que previamente se había liberado el fragmento correspondiente al promotor 35S-CaMV. El transgén incluía 1,2 kb de la región 5' flanqueante, la región transcrita no traducida, y las 6 primeras pares de bases fusionados con el gen *GUS*. Se obtuvo así el plásmido pLBI2PRI1.2, sobre el que fue secuenciada particularmente la zona de fusión traduccional, en previsión de posibles errores generados por la *PCR* o en el clonaje. Finalmente, el gen quimérico completo

DXR:GUS fue recuperado como un fragmento EcoRI-HindIII, y clonado en los sitios correspondientes del vector pBI121, obteniéndose (-1158/+94)*DXR:GUS* (Figura II.17).

Construcciones 35S:DXR, 35S:DXS1 y 35S:DXS2:

La construcción 35S:*DXS1* se generó a partir de una reacción de *PCR* en la que los oligonucleótidos *DXS1.BamHI* y *DXS1.SstI* fueron utilizados para amplificar el marco de lectura abierto completo de la *DXS1* de *Arabidopsis* sobre el clon H2A12, que fue utilizado como molde al contener el ADNc completo del gen *DXS1*. Tras un paso por pGEM-T, se rescató el fragmento derivado de la digestión con BamHI y SstI, introducidos en la *PCR* original, lo que facilitó el clonaje definitivo en la región correspondiente del vector pBI121, en sustitución del gen *GUS* y bajo la dirección del promotor 35S. Sobre la construcción resultante fue secuenciado minuciosamente el punto de fusión, descartando posibles errores derivados del proceso de clonaje, y para verificar la corrección de la fase de lectura entre el promotor 35S-CaMV y el ADNc de *DXS1*.

Por otra parte, se creó la construcción 35S:*DXS2*. Para ello, el ADNc completo del gen *DXS2* fue liberado del vector pLBSDXS2.2 (apdo. V.5.4.2) por los sitios de restricción BamHI (5') y HincII (3'), y clonado directamente en el vector pCAMBIA-1303 digerido con las endonucleasas BglII y Eco72I, gracias a la compatibilidad entre los extremos creados. El análisis del patrón de restricción y de las entradas de secuencia correspondientes certificaron, también en esta ocasión, la integridad del inserto y de la zona de clonaje.

Finalmente, para la construcción 35S:*DXR*, se efectuó una reacción de *PCR* en el que los oligonucleótidos *DXR.XbaI* y *DXR.SstI* amplificaban la región correspondiente al marco de lectura abierto completo de la *DXR* de *Arabidopsis* sobre el molde pDXRA1.3, en el que dicho ADNc estaba clonado (apdo. V.5.4.1). Mediante esta *PCR* fueron introducidos los sitios de restricción XbaI y SstI. Tras un paso por pGEM-T, se rescató el fragmento derivado de la digestión con XbaI y SstI, clonándolo en la región correspondiente del vector pBI121, sobre el que el inserto fue secuenciado por completo en previsión de posibles errores, sancionando la corrección de la fase de lectura entre el promotor 35SCaMV y el ADNc de la *DXR* (Figura II.28).

Construcción TA:DXS1:

Gracias a los sitios de restricción Sall y SpeI, que aparecen flanqueando al inserto en el vector H2A12, fue recuperado un fragmento que contenía el ADNc completo del gen *DXS1*. En el proceso se arrastraron 20 pb por el extremo 5' y 22 por el 3' de las respectivas regiones flanqueantes al inserto. La ligación del fragmento obtenido con el vector pTA7002 digerido con las enzimas XhoI y SpeI permitió el clonaje, gracias a la compatibilidad entre los extremos protuberantes dejados por Sall y XhoI (Figura II.33).

V.4.1.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Para la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* se siguió el método de infiltración al vacío. Esta técnica se basa en la inmersión de las plantas en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* portadora

de la construcción de interés, con la intención de infectar las células germinales a partir de las que se generen posteriormente semillas portadoras del transgén. Para facilitar la invasión bacteriana, el proceso de inmersión se lleva a cabo en el interior de una cámara en donde se realiza el vacío. La adición de un agente tensioactivo a la solución bacteriana aumenta la superficie de contacto entre dicha solución y la superficie vegetal.

El estadio de desarrollo de las plantas a infiltrar resulta crucial para el rendimiento del proceso de transformación. Es necesario que las plantas hayan desarrollado la suficiente biomasa como para resistir las lesiones provocadas durante el proceso de infiltración. Además, debe elegirse un momento del desarrollo de la planta en el que abunden los botones florales, pues así aumentará considerablemente el rendimiento de transformación.

Materiales:

- Semillas de *A. thaliana* Col. 3.
- *A. tumefaciens* C58C1-pGV 2260 portador del plásmido que desea expresarse ectópicamente en Arabidopsis.
- Medio de cultivo YEB.
- Centrífuga *Beckman* J2-21 y rotor JA-10.
- Rifampicina 34-50 mg/ml (solución metanólica), kanamicina 100 mg/ml, ampicilina 100mg/ml e higromicina (50mg/ml).
- Medio Murashige&Skoog.
- Sales Gamborg B5 (sin hormonas, sacarosa ni agar, *ICN Biomedicals*).
- Sacarosa.
- MES.
- 6-benzilaminopurina.
- Tensioactivo Silwet L-77 (*Osi Specialities*).
- Desecador conectado a una bomba de vacío.
- Nitrógeno líquido.
- Cámara de germinación y crecimiento.

Método:

1.-Sembrar, en condiciones estériles, semillas de *A. thaliana* en placas con medio de germinación. Después de estratificar y de aproximadamente 2 semanas de desarrollo a día largo se trasplantan de 6-8 plántulas a macetas. De este modo, se eligen individuos que han germinado sincronizadamente. Se necesitan un mínimo de 2-3 macetas con 6-8 individuos cada una por cada construcción que deseamos infiltrar.

2.-Mantener entonces las plantas bajo condiciones de día corto hasta que empiecen a aparecer los

primeros tallos (aproximadamente 6-8 semanas). De este modo, se potencia el desarrollo de las hojas de la roseta basal, retrasándose el momento de aparición de los tallos reproductivos y adquiriendo una biomasa vegetal que permita a las plantas soportar el estrés sufrido en el proceso de infiltración al vacío.

3.-En el momento de la aparición de los primeros botones florales en el tallo principal, las macetas son trasladadas a una cámara de crecimiento con condiciones de fotoperíodo de día largo. A medida que van apareciendo los primeros tallos, se podan desde la base, operación que se repite de 3-4 veces en cada planta con una finalidad doble: Por un lado, estimular la formación de múltiples tallos laterales aumentando el número de inflorescencias susceptibles de ser posteriormente infectadas por *Agrobacterium* y, por consiguiente las probabilidades de obtención de semillas transformadas; por otro, sincronizar la aparición de los tallos entre los diferentes individuos.

4.-En el momento en que las plantas han desarrollado un número suficientemente elevado de inflorescencias y después de eliminar las silicuas en formación que hayan podido originarse, las plantas están en el momento óptimo para ser infiltradas. En este punto han podido pasar 2-3 semanas desde que fueron trasladadas a día largo.

Crecimiento del *Agrobacterium*:

1.-Sembrar una estría a la escocesa en una placa de medio YEB/Agar (kanamicina 30 µg/ml-rifampicina 100 µg/ml) a partir de un cultivo glicerinado congelado a -80°C de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* portadora de la construcción de interés. Incubar la placa a 28°C protegida de la luz con papel de aluminio (pues la rifampicina es fotosensible) hasta obtener colonias individuales.

2.-Inocular a partir de una colonia individual de aquella placa un cultivo de 10 ml de medio YEB (kanamicina 30 µg/ml-rifampicina 100 µg/ml). Crecer el cultivo en oscuridad durante 24 h a 28°C y con agitación suave (150 rpm). Recuperar 4,5 ml de un cultivo de cada construcción para preparar ADN plasmídico sobre los cuales recomprobar la construcción (apdo. V.4.2.1.).

3.-Inocular una dilución 1/500-1/750 del cultivo anterior en un matraz Erlenmeyer de 2 l conteniendo 750 ml de medio YEB (kanamicina 30 µg/ml-rifampicina 100 µg/ml). Se utilizaron 2 matraces por cada construcción que se deseó infiltrar. Crecer los cultivos durante unas 24 h con agitación suave de 150 rpm y a una Tª de 28°C.

4.-Una vez que los cultivos han alcanzado una DO_{600nm} de ~1 (el crecimiento del *Agrobacterium* es lento por lo que se requieren aproximadamente 15-20 h), sedimentar las células a 4000 rpm durante 15 min a 4°C con el rotor JA-10 pretemperado.

5.-Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en medio de infiltración. Se considera que una DO_{600 nm} de 2,4 es la óptima para la infiltración. Para estar en torno a esa cifra se resuspenden las células, provenientes de los dos cultivos de 750 ml, en 650 ml de medio de infiltración. Para resuspender las células se evitó utilizar la pipeta o el vórtex, que podían provocar la ruptura mecánica de las células bacterianas. Finalmente, la suspensión celular se somete a agitación suave (100 rpm) durante alrededor de 30 min.

Infiltración al vacío:

1.-Verter los 650 ml de la suspensión celular en un único recipiente de vidrio *Pyrex*. Este debe tener un diámetro similar al de la maceta a infiltrar y un fondo de aproximadamente 5-6 cm. Añadir entonces la 6-benzilaminopurina (0,044 μ M) y el tensioactivo *Silwett L-77* (36 μ l/l). La citoquinina 6-benzilaminopurina promueve la regeneración celular después del proceso de transformación.

2.-Preparar las macetas que se vayan a infiltrar retirando las hojas muertas y presionando la tierra fuertemente. Fijar la tierra disponiendo cuidadosamente dos espátulas atravesadas en perpendicular bajo las hojas de la roseta y cubriéndolas con trozos de corcho, para evitar en lo posible la caída de tierra al medio de infiltración.

3.-Montar el sistema de infiltración al vacío: desecador conectado a una bomba de vacío y una trampa fría alimentada con nitrógeno líquido conectada entre bomba y desecador. El objeto de la trampa fría es evitar que vapores procedentes del desecador lleguen a la bomba y puedan acabar deteriorándola.

4.-Colocar en el interior del desecador el recipiente de vidrio con el volumen indicado de resuspensión celular. Enrollar suavemente la parte aérea de las plantas de una maceta a modo de un moño e invertirlas, colocándolas de forma que la planta quede sumergida en lo posible dentro de la solución.

5.-Cerrar el desecador, conectarlo a la bomba y aplicar el vacío durante 21 min, interrumpiéndolo unos segundos cada período de 7 min. La brusca desgasificación de la resuspensión celular que tiene lugar durante los primeros segundos de haber aplicado el vacío provoca un burbujeo y su derramamiento al desecador. Por ello es conveniente interrumpir el proceso pasados 1-2 min para recuperar, con la ayuda de una jeringa de 50 ml, el líquido desbordado y devolverlo al recipiente.

6.-Tras la infiltración, lavar copiosamente las plantas con agua destilada para eliminar el exceso de *A. tumefaciens* así como la gran cantidad de sacarosa presente en la solución de infiltración, que podría favorecer la contaminación del tejido vegetal. Se coloca a continuación las plantas en la cámara de 22°C y ciclo de día largo. La planta adquiere un aspecto pálido resultado de la aplicación del vacío y durante los primeros días será especialmente sensible a cambios en las condiciones de crecimiento.

7.-Antes de repetir el proceso de infiltración con una nueva maceta, renovar parte del volumen de resuspensión celular con células frescas. Repetir los pasos 4-6 para el resto de macetas a infiltrar. Cada vez que se cambia de construcción conviene lavar profusamente todo el material que haya estado en contacto con la resuspensión celular, para evitar posibles episodios cruzados de transformación.

8.-Las plantas infiltradas constituirán la generación T_0 . Después de aproximadamente 2-3 semanas, cuando las silicuas empiecen la dehiscencia, se dispuso un sistema de recogida de semillas consistente en una "arabase" y un "aratubo". Este sistema evita los fenómenos de fecundación cruzada, aislando reproductivamente unos individuos de otros. Al cabo de aproximadamente 1 mes, y una vez que las silicuas que las contienen están completamente secas, se recogieron las semillas producidas (generación T_1) y se

seleccionaron las transformadas mediante comprobación de su resistencia al marcador correspondiente (apdo. V.3.1.1.).

SOLUCIÓN de INFILTRACIÓN:

Murashige&Skoog.....2.2 g
Gamborg B5.....5.7 g
Sacarosa.....50 g
Ajustar el pH a 5,7 con KOH 1 N.

STOCK de BENZILAMINOPURINA:

Benzilaminopurina.....2 mg
DMSO.....1 ml

Esta solución se prepara inmediatamente antes de utilizar y no hace falta autoclavarla.

Método simplificado de infiltración “floral dip”:

El método de “floral dip” simplificó extremadamente la obtención de líneas transgénicas [66], eliminando la necesidad de infiltrar al vacío las plantas de *Arabidopsis*. El estado de desarrollo de los individuos a transformar es aquí crítico, eliminándose en lo posible, y hasta al menos 1 día antes de la infiltración, las silicuas que puedan aparecer.

1.-Crecer un cultivo de *Agrobacterium* a partir de una colonia aislada, como se refiere en los pasos 1 y 2 del apartado correspondiente al crecimiento del *Agrobacterium*.

2.- Inocular una dilución 1/500-1/750 del cultivo anterior en un matraz Erlenmeyer de 2 l conteniendo 500 ml de medio YEB (kanamicina 30 µg/ml-rifampicina 100 µg/ml). Crecer los cultivos entre 16 y 24 h con agitación suave de 150 rpm y a una Tª de 28°C.

3.-Repetir el paso 4 del protocolo original de crecimiento del *Agrobacterium*.

4.-Resuspender cuidadosamente el sedimentado de células obtenido en 300 ml de una solución de sacarosa al 5 % preparada en agua destilada.

5.-Proceder con la infiltración de las plantas seleccionadas para transformar: Para ello, sumergir durante 10 seg la planta en la resuspensión celular (como en el paso 4 de la infiltración al vacío) a la que se habrá adicionado 90 µl del agente surfactante *Silwett L-77*. Las plantas se tumban entonces sobre papel de filtro en una bandeja hasta que se recuperan, 2-3 días después, momento en que se dejan completando su ciclo de desarrollo hasta la aparición de semillas.

Selección de las transformantes:

Del total de semillas obtenidas en la generación T₁, solamente unas pocas habrán incorporado efectivamente el transgén. Para seleccionarlas, se utilizó un marcador de selección que aparece acompañando al transgén en la región de ADN-T incorporado al genoma vegetal.

1.-Esterilizar las semillas de la generación T₁ según describe en el apartado V.3.1.1.

2.-Sembrar en placas que contengan medio de germinación suplementado en cada caso con:

-Kanamicina 50 µg/ml.

-Higromicina 25-50 µg/ml.

3.-Al cabo de alrededor de 15-20 días, se debe observar la selección de algunas plantas resistentes que serán capaces de desarrollar hojas verdaderas. Frecuentemente aparece contaminación con *A. tumefaciens*, derivado del proceso de infiltración y muy resistente al proceso de esterilización de las semillas. En estos casos, es recomendable adicionar al medio de cultivo hasta 500 µg/ml del antibiótico vancomicina, que resulta inocuo para *Arabidopsis*.

4.-Transferir los individuos resistentes a tierra para que completen su ciclo biológico, autofecundándose y produciendo semillas. Se obtuvo así la generación T₂, sobre la que puede analizarse el número de copias que efectivamente se ha incorporado al genoma. Para ello se estudió el comportamiento de la segregación del carácter resistencia al marcador sembrando de nuevo en placas suplementada con el antibiótico. De esta manera, las segregantes que se rijan por la proporción mendeliana 1:3 (sensibles:resistentes) presentarán al marcador ocupando un único *locus* en el genoma de *Arabidopsis* [26].

5.-De 5-10 individuos con las características descritas anteriormente se trasladaron nuevamente a tierra y se completó el ciclo biológico. Para seleccionar las líneas uniformes genéticamente en cuanto al carácter resistencia al marcador, se debe confirmar que todas las semillas descendientes, generación T₃, sean resistentes al antibiótico. Algunas de estas líneas se llevaron así a homocigosis. El objetivo es poder prescindir del antibiótico en los estudios ulteriores, que podría alterar el normal desarrollo de la planta.

V.4.2. Técnicas específicas de *Agrobacterium tumefaciens*.

V.4.2.1. Transformación de *A. tumefaciens*.

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* se realizó siguiendo el método descrito en [9]. Se trata de una modificación del protocolo clásico de transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico. Para ello, se utilizó ADN plasmídico previamente propagado en *E. coli*. Es crucial mantener las células, durante todo el tiempo que dure el proceso, por debajo de 4 °C.

Materiales:

- Centrífuga *Beckman* J2-21 y rotor JA-10.
- *A. tumefaciens* C58C1Rif^R-pGV2260.
- ADN de la construcción a transformar.
- Medio YEB.
- Rifampicina 34 mg/ml en metanol, Kanamicina 100 mg/ml y Ampicilina 100 mg/ml en solución acuosa.
- NaCl 0,15 M y CaCl₂ 20 mM.
- N₂ líquido.

Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

Método:

1.-Inocular un precultivo de 10 ml de medio estéril YEB-rifampicina 150 µg/ml a partir de una colonia aislada de *A. tumefaciens* e incubar en agitación a 150-160 rpm a 28°C durante aproximadamente 24 h.

2.-Inocular 50 ml de YEB-rifampicina 150 µg/ml con una dilución 1/1000 del precultivo anterior. Incubar en agitación a 150-160 rpm y 28°C hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,5. Normalmente, y si el precultivo original no está excesivamente saturado, el cultivo tarda unas 18-20 h en alcanzar la DO deseada.

3.-Centrifugar las células durante 5 min a 5000 rpm y 4 °C con un rotor JA-10 preatemperado. A partir de este paso las células se mantienen en hielo, extremando el cuidado al manipularlas para evitar lisarlas mecánicamente.

4.-Resuspender suavemente el sedimento en 10 ml de solución de NaCl 0,15 M previamente atemperada a 4°C.

5.-Recentrifugar como en el paso 3 y resuspender el sedimento resultante en 1 ml de solución de CaCl₂ 20 mM previamente enfriada en hielo.

6.-Distribuir las células en alícuotas de 200 µl. Congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a –80°C.

Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*:**Método:**

1.-Descongelar en hielo una alícuota de células competentes de *Agrobacterium* preparadas como se ha descrito anteriormente.

2.-Añadir de 1-3 µg de ADN, mezclar e incubar en hielo durante 30 min.

3.-Congelar la mezcla en nitrógeno líquido durante 1 min. A continuación se somete a choque térmico en un baño a 37°C hasta que la muestra está completamente descongelada.

4.-Añadir 1 ml de medio YEB e incubar durante 2-4 h a 28°C con agitación suave (120 rpm).

5.-Extender con ayuda de un asa de siembra 200 µl del cultivo en una placa de Petri con medio YEB sólido suplementado con rifampicina (150 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml).

6.-Incubar la placa a 28°C durante 2-3 días protegida de la luz.

Preparación de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*

Los métodos convencionales utilizados para obtener ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* son difícilmente extrapolables al caso de cultivos de *A. tumefaciens*, obteniéndose un muy bajo rendimiento de ADN y de baja pureza. Esto dificulta la consecución con éxito de los métodos habituales para el análisis de las colonias obtenidas.

El rendimiento en la obtención de ADN plasmídico mediante cualquiera de los protocolos clásicos descritos para *E. coli* puede aumentarse considerablemente si, previamente a la etapa de lisis de las bacterias, se incuban las células con 20 μ l de lisozima 30 mg/ml durante 30 min a 37°C, con el objeto de facilitar la rotura de la pared bacteriana.

Una vez obtenido el ADN plasmídico, puede confirmarse su identidad mediante restricción o amplificación por *PCR*. Otro método posible es la retransformación de *E. coli* con el ADN plasmídico obtenido y la posterior comprobación de las colonias transformantes resultantes.

Finalmente, una vez comprobada la presencia del vector, se inocular de nuevo en medio YEB con alguna de las colonias que han resultado ser positivas y, una vez crecido dicho inóculo, se almacena una alícuota a -80°C, en presencia de un 50 % (v/v) de glicerol.

V.4.3. Obtención de ácidos nucleicos a partir de tejidos de *Arabidopsis thaliana*.

V.4.3.1. Obtención de ADN genómico nuclear.

El ADN genómico obtenido mediante el procedimiento que se describe a continuación, fue utilizado para la amplificación por *PCR* de los promotores de los genes *DXS2* y *DXR* (apdo. V.4.1.2). Asimismo, los estudios de *Southern-blot* se llevaron a cabo a partir de ADN obtenido de la misma manera (apdo. V.5.2.3).

Materiales:

- Mortero, mazo y espátula.
- Nitrógeno líquido.
- Tampón de extracción.
- Isopropanol.
- Tubos de vidrio *Corex*.
- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).
- NaCl 5 M.
- Solución CTAB/NaCl
- Etanol 70 %.
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v:v).
- Centrífuga *Beckman J2-21* y rotor *JA-20*.
- Tampón TE a pH=7,5.
- Espectrofotómetro (modelo *Shimadzu UV-160A*).

- N-lauril sarcosina 10 %.

1.-Triturar la muestra en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino (se utilizaron hojas de planta adulta, tejido del que se puede disponer en cantidad y que es fácil de homogeneizar). Evitar en todo momento que la muestra se descongele.

2.-Añadir 5 ml de tampón de extracción por gramo de tejido machacado y continuar triturando para resuspender, en lo posible, la muestra.

3.-Traspasar el triturado anterior a un tubo de vidrio *Corex*. Medir el volumen y adicionar hasta 1 % (v:v) del detergente n-lauril-sarcosina al 10 %. Homogeneizar la muestra incubando 2 h a 55°C con agitación suave y constante en un agitador orbital.

4.-Centrifugar 10 min a 6000 rpm y 4°C en un rotor JA-20 pretemperado.

5.-Recuperar el sobrenadante y adicionar 0,6 volúmenes de isopropanol. Incubar 30 min-2h a -20 °C para conseguir la precipitación de los ácidos nucleicos.

6.-Centrifugar 15 min a 8000 rpm y 4°C en rotor JA-20 pretemperado.

7.-Se formará un precipitado blanquecino de ADN. Lavar con etanol al 70 %. Secar y resuspender en el volumen deseado de tampón TE pH=7,5.

El ADN obtenido de esta manera está contaminado con abundantes polisacáridos. Para eliminarlos, se utilizó el detergente no iónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Este detergente tiene la propiedad de interactuar con el ADN y los polisacáridos asociados y evitar que precipiten conjuntamente. Para ello debe trabajarse a una concentración de sales igual o mayor a 0,5M.

8.-Adicionar 160 µl de NaCl 5M/ ml de muestra.

9.-Añadir 1/10 del volumen final resultante del paso anterior con solución de CTAB/NaCl previamente atemperada a 65 °C, e incubar a continuación 20 min a 65 °C.

10.-Seguidamente, añadir hasta 1 vol de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v:v). Resuspender suavemente y centrifugar 10 min a 6000 rpm (rotor JA-20), esta vez a temperatura ambiente.

11.-Recuperar la fase acuosa y repetir la extracción con fase orgánica del paso anterior 2 a 3 veces más.

12.-Recuperar la fase acuosa una vez más y adicionar 1 vol de cloroformo. Recentrifugar 10 min a 6000 rpm (rotor JA-20) a temperatura ambiente.

13.-Precipitar el ADN de la fase acuosa resultante de la última centrifugación con hasta 0,6 volúmenes de isopropanol. Centrifugar 15 min más a 8000 rpm (rotor JA-20) a temperatura ambiente.

14.-Lavar el precipitado de ADN obtenido con etanol al 70 %. Finalmente secar la muestra y resuspenderla en el volumen deseado de tampón TE pH=7,5.

15.-Se puede estimar la concentración de ADN obtenido, así como su pureza, midiendo la muestra resultante en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La absorbancia a 260 nm permite cuantificar la presencia de ácidos nucleicos en una muestra relativamente pura. Usando cubetas de 1 cm de camino óptico, valores de absorbancia de 1 corresponderán a concentraciones de 50 µg/µl para ADN de doble cadena y de 40 µg/µl para ARN. Las proteínas absorben a 280 nm, de manera que la *ratio* DO_{260}/DO_{280} proporciona una estimación del grado de pureza de la preparación. Así, relaciones de 1,6-1,8 para el ADN y de 1,7-1,9 para ARN indican un grado de pureza satisfactorio. Finalmente, los valores de absorbancia a 230 nm permiten estimar la presencia de contaminantes de naturaleza fenólica.

TAMPÓN de EXTRACCIÓN:

Tris-HCl pH=8.....100 mM
EDTA pH=8.....100 mM
NaCl.....250 mM
Proteinasa K.....100 µg/ml
Añadir justo antes de usar.
Est. al autoclave, 20 min a 120 °C.

TAMPÓN TE:

Tris.....10 mM
EDTA 1 mM.....1 mM
Ajustar el pH a 7,5 con HCl 1 N.

SOLUCIÓN CTAB/NaCl:

CTAB.....10 %
NaCl.....0,7 M
Disolver primero el NaCl. Adicionar el CTAB y mezclar calentando a 65 °C hasta que el detergente se haya disuelto completamente.

Minipreparación de ADN genómico:

Alternativamente se ha utilizado una sencilla y rápida técnica para obtener ADN genómico a partir de pequeñas cantidades de tejido de *A. thaliana* (del orden de mg). El ADN obtenido permite, por ejemplo, confirmar por *PCR* la presencia de un transgén (apdo. V.5.4.1.):

1.-Moler el tejido de *Arabidopsis* en un tubo de microcentrifuga hasta obtener un polvo fino, trabajando siempre en presencia de N₂ líquido.

2.-Resuspender en 10 µl de NaOH 0,5N/mg de tejido triturado y seguir moliendo hasta homogeneidad. Agitar con ayuda del vórtex 10-15 min.

3.-Resuspender 20 µl del homogeneizado anterior en 980 µl de Tris-HCl 0,1 M a pH=8.

4.-Utilizar 5 µl de la solución anterior como molde para una *PCR* de control.

V.4.3.2. Obtención de ARN de *Arabidopsis thaliana*.

Se ha obtenido ARN procedente de tejidos de plantas adultas de *Arabidopsis*, de plántulas crecidas en condiciones estériles sometidas a distintos tratamientos, así como de células de la línea celular T87 [16]. Para ello se utilizó el kit de *Qiagen "RNAeasy plant mini kit"* siguiendo las instrucciones del proveedor. Se

obtienen así cantidades de alrededor de 10-40 µg de ARN más o menos limpio dependiendo del tipo de muestra. Sin embargo, existen tejidos que ofrecen problemas, particularmente las silicuas, debido a su alto contenido en compuestos fenólicos. Éstos, en contacto con el aire se oxidan rápidamente derivando en productos de coloración marrón que se acomplejan a proteínas y ácidos nucleicos, dificultando su extracción. Para evitar estos problemas, y para la obtención de ARN a mayor escala, se contempló la siguiente metodología que incluye extracciones con fenol:cloroformo. Por otro lado, el trabajo con ARN requiere extremar las precauciones para evitar las contaminaciones con ARNasas, enzimas particularmente abundantes, estables y activas que podrían degradar el ARN. Para evitarlo, se horneó todo el material de vidrio, porcelana y metal (al menos 6 horas a 200°C), se autoclavó 2 veces todo el material plástico fungible, y se trató todo el material restante (cubetas, portageles, etcétera) y todas las soluciones con DEPC (dietilpirocarbonato), reactivo que modifica los residuos de His y Tyr de las proteínas, inactivándolas indiscriminadamente.

Materiales:

- H₂O DEPC.
- Fenol tamponado a pH=6,7±0,2.
- Cloroformo.
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Etanol absoluto y al 70 %.
- Tampón de extracción.
- Solución de NaCl 5 M y de LiCl 4 M
- N₂ líquido.
- Mortero, mazo de porcelana y espátulas.

Método:

1.-Triturar alrededor de 200 mg de tejido en el mortero, manteniéndolo en todo momento en un baño de nitrógeno líquido. Una vez se ha obtenido un polvo muy fino, se traslada con la ayuda de una espátula a un tubo de microcentrífuga que contiene 2 vol (p:v) de fenol. El fenol es una sustancia altamente abrasiva para las mucosas, por lo que es aconsejable trabajar extremando las precauciones. Asimismo, deben respetarse las normas locales al efecto para la eliminación de los residuos correspondientes.

2.-Agitar enérgicamente con la ayuda del vórtex y añadir 4 vol de tampón de extracción de ARN. Continuar agitando durante 2-3 min más.

3.-Centrifugar durante 10 min a 14000 rpm y a T^aA.

4.-Recuperar la fase acuosa resultante (suavemente, evitando en lo posible alterar la interfase) y transferirla a otro tubo, procurando mantener la muestra en hielo en todo momento.

5.-Separar el volumen resultante en 2 tubos de microcentrífuga.

6.-Realizar 2 extracciones con 1 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v:v), centrifugando como en el paso 3 y recuperando en cada caso la fase acuosa sin perturbar la interfase.

7.- Adicionar sobre la fase acuosa 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C (que precipitará todos los ácidos nucleicos) y hasta 250 mM de la solución de NaCl. Las sales facilitan la resuspensión de los polisacáridos que puedan quedar en el sobrenadante. Para ello, incubar al menos 20 min a -20°C .

8.-Centrifugar 20 min a 4°C y 14000 rpm.

9.-Lavar el precipitado resultante con etanol al 70 % a -20°C . Secar el sedimento de ácidos nucleicos unos minutos a 37°C .

10.-Resuspender el precipitado anterior en 500 μl de H_2O -DEPC. Añadir el mismo volumen de LiCl 4 M. Precipitar al menos 4 horas a -20°C . El LiCl a esa concentración precipita selectivamente el ARN.

11.-Centrifugar 20 min a 14000 rpm y 4°C . Recuperar el sedimento y secarlo brevemente en la estufa a 37°C . Resuspender con la ayuda de una pipeta en 500 μl de H_2O -DEPC.

12.- Realizar una extracción con 2xvol de fenol:cloroformo; agitar al vórtex unos segundos y centrifugar 10 min a 4°C y 14000 rpm.

13.- Sobre la fase acuosa resultante realizar una extracción con 2 vol de cloroformo.

14.-Efectuar una última precipitación con etanol y sales como en los pasos 7 y 9. El precipitado de ARN resultante se resuspende en el volumen deseado de H_2O -DEPC.

14.-Cuantificar con la ayuda del espectrofotómetro como se describe en el apartado V.4.3.1, y conservar a -80°C . La integridad del ARN obtenido puede confirmarse resolviéndolo en un gel de agarosa en condiciones no desnaturalizantes.

H_2O -DEPC:

Tratar H_2O en botellas previamente horneadas con DEPC 0,1 %. Mantener en agitación al menos 2 horas sobre un agitador magnético y bajo la campana. Autoclavar 2 veces antes de usar.

Las soluciones de LiCl y NaCl se prepararon en H_2O tratada de este modo.

TAMPÓN de EXTRACCIÓN:

Tris-HCl pH=7,5.....10 mM
 EDTA.....10 mM
 SDS.....1 % (p/v)
 DTT.....5 mM
 LiCl.....0,5 M
 H_2O -DEPC.....c.s.p.
 Filtrar, separar alícuotas y conservar a -20°C .

V.4.4. Obtención de proteínas a partir de tejidos de *Arabidopsis thaliana*.

Mediante el protocolo detallado a continuación se consiguió obtener extracto crudo de proteína de *Arabidopsis* apto para resolverse en geles de electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS: *SDS-PAGE*. Para el trabajo con proteínas no es imprescindible trabajar con material autoclavado, pero sí es recomendable mantener las proteínas en hielo en todo momento, con el objeto de evitar la acción de las

proteasas.

Materiales:

- Tampón de homogeneizado.
- N₂ líquido.
- Reactivo de Bradford (*Biorad Protein Assay*).
- Lector de ELISA (modelo *Merck ELISA System Mios*).
- *Protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free (Roche)*.

Método:

1.-Triturar en un tubo de microcentrifuga de 100-500 mg de tejido de *Arabidopsis* congelado en N₂ líquido.

2.-Una vez obtenido un polvo fino, añadir 200-300 µl de tampón de homogeneizado por cada 100 mg de tejido inicial.

3.-Centrifugar a 4°C durante 5 min a 200 g (1740 rpm) y sin freno.

4.-Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.

5.-Para la cuantificación de proteínas, se ha seguido el método espectrofotométrico de Bradford [32], con la ayuda del reactivo *Biorad Protein Assay*. En cada caso, se han hecho dúPLICAS de las muestras a medir, y se han referido a una recta patrón elaborada con 5 puntos de albúmina de suero bovino (BSA). Las medidas se hicieron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

6.-Congelar en N₂ líquido y conservar a -20°C.

TAMPÓN de HOMOGENEIZADO:

MgCl₂10 mM
 EDTA.....1 mM
 FICOLL 400.....1 % (p/v)
 Sacarosa.....30 % (p/v)
 Tricina pH=7,5.....0,1 M
 Conservar a 4°C.

Para muestras a utilizar más de una vez, esta solución se completó con un cocktail de inhibidores de proteasas (*Roche*).

V.4.5. Preparación de muestras de tejido de *Arabidopsis thaliana* para observación al microscopio electrónico.

Para la obtención de cortes de *A. thaliana* para microscopía electrónica, se utilizaron hojas de plántulas crecidas, si no se apunta lo contrario, en placas con medio de germinación sólido bajo condiciones de fotoperíodo largo y a 22-24 °C. Se siguieron dos procedimientos diferentes si el objeto de las muestras era la observación de la ultraestructura, o si iban a ser utilizadas para el estudio de la localización subcelular

mediante técnicas de inmunocitoquímica. En el primer caso se optó por la resina Spurr, resina de tipo epoxi cuyas propiedades de densidad la hacen aconsejable para la infiltración de tejidos vegetales, preservando la integridad estructural. En este segundo caso, el tejido se incluyó en una resina especial de naturaleza acrílica (*Lowicryl K4M*), que por sus propiedades hidrofílicas y de baja viscosidad es especialmente permeable para los tratamientos subsiguientes de los cortes durante la reacción de inmunocitoquímica, conservando intacta la capacidad antigénica del tejido. En ambos casos, y después del proceso de inclusión en la resina, se generaron cortes ultrafinos para su observación por microscopía electrónica.

V.4.5.1. Obtención de cortes ultrafinos para ultraestructura.

Materiales:

- Tejido vegetal seleccionado.
- Solución de fijación.
- Solución de postfijación (osmificación).
- Soluciones de deshidratación (acetona a distintas concentraciones).
- Cabina de flujo laminar (adaptada al uso con agentes tóxicos como el osmio).
- Agitador orbital.
- Resina Spurr.

Fijación :

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C, pretemperando las soluciones utilizadas en cada caso. El objetivo principal de esta etapa es mantener la integridad estructural del espécimen, de modo que logre soportar los pasos subsiguientes.

1.-Recortar, con la ayuda del bisturí, muestras rectangulares de tejido vegetal de 1-2 mm de lado, y sumergir en solución de fijación dentro de viales de vidrio, haciendo el vacío de 2-4 horas, hasta que las muestras se hundan en el medio. Finalmente, dejar incubar a 4°C toda la noche. La solución de fijación contiene aldehídos que preservan la integridad estructural de los tejidos.

2.-Incubar a continuación en tampón cacodilato 0,1 M a pH=7,4 (pretemperado a 4°C) haciendo 4 lavados de 10 minutos cada uno. Estos lavados eliminarán el exceso de solución de fijación que pueda interferir en la osmificación.

3.-Tras estos lavados, incubar la muestra en solución de postfijación el tiempo suficiente para que torne completamente negra (4 horas son suficientes, más allá de este tiempo se corre el riesgo de extraer los componentes celulares). El tetróxido de osmio (OsO_4) es un excelente fijador de lípidos celulares, oxidando los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que se encuentran entre los componentes de membrana. Formará, además, puentes transversales entre las cadenas de estos compuestos produciendo monoésteres,

diésteres y monoésteres diméricos. El resultado de esta reacción es un producto de color negro que permite optimizar el contraste y, consecuentemente, la visualización de aquellas estructuras celulares. Reacciona además con los residuos de triptófano e histidina, estabilizando las proteínas. La combinación de OsO_4 con ferrocianuro potásico, permite intensificar la fijación de otros componentes celulares.

4.-Terminar con 5 lavados con agua miliQ, de 10 minutos cada uno.

SOLUCIÓN de FIJACIÓN:

Glutaraldehído.....2,5 %

Paraformaldehído.....2 %

En ambos casos se prepararon en tampón cacodilato 0.1 M a pH=7,4.

SOLUCIÓN de POSTFIJACIÓN:

Tetróxido de osmio.....1 %

Ferrocianuro potásico.....8 %

SOLUCIÓN STOCK de OSMIO:

Ferrocianuro potásico.....3,2 %

Osmio.....1 g

Agua bidestilada c.s.p.....25 ml

Agitar ligeramente y dejar de 24 a 48 horas en la nevera hasta su correcta solubilización.

El tetróxido de osmio es una sustancia extremadamente tóxica y altamente volátil, por lo que deben extremarse las precauciones trabajando en campanas de flujo especialmente diseñadas al efecto y separando todo el material que haya estado en contacto con él en recipientes especiales dedicados a esa función. Por otro lado, debe conservarse en viales protegidos de la luz y a 4°C, evitando en todo momento que se torne negro (señal de su oxidación), lo cual obligaría a reemplazarlo.

Deshidratación :

El procedimiento consiste en una serie de lavados sucesivos de la muestra a 4°C en soluciones de porcentaje creciente de acetona, siguiendo el programa siguiente:

1.-1 lavado de 10 minutos en acetona 50 %.

2.-2 lavados de 10 minutos en acetona 70 %.

3.-3 lavados de 10 minutos en acetona 90 %.

4.-3 lavados de 10 minutos en acetona 96 %.

5.-3 lavados de 10 minutos en acetona 100 %.

Esta etapa tiene como objeto la sustitución del agua libre de los tejidos (abundante en células vegetales altamente vacuoladas), por el solvente orgánico, en el que puedan disolverse las resinas de inclusión epoxi, extremadamente hidrofóbicas. El tratamiento con estos agentes deshidratantes puede ocasionar, por un lado, la retracción de los tejidos, y por otro, la extracción de algunos componentes subcelulares, especialmente lípidos. El proceso de osmificación contribuye a reducir este fenómeno. En cualquier caso debe minimizarse la duración del tratamiento y conservar el frío.

Infiltración y polimerización :

Se realiza en este momento la inclusión de la muestra en la resina de elección (Spurr). Para ello se

incuba manteniéndolo en agitación constante y suave con el agitador orbital en diluciones crecientes de resina con disolvente, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1.-3 horas en Spurr:acetona (1:3, v:v).
- 2.-Toda la noche en Spurr:acetona (2:2, v:v).
- 3.- 4 horas en Spurr:acetona (3:1, v:v).
- 4.-2 períodos de 4 horas y toda la noche en resina pura.

A continuación se aplica en un molde rectangular una gota de resina fresca sobre la que se disponen 2-3 muestras fijadas. Se cubre hasta formar una superficie convexa con otra gota y se incuba al menos 48 horas a 60 °C.

RESINA SPURR (para preparar 40 ml):

ERL 4206 (resina epoxi: dióxido de vinilciclohexeno).....10,0 g
DER 736 (resina de flexibilización).....6,0 g
NSA (endurecedor: (2-Nonen-1-il)succínico).....26,0 g
DMAE (S-1) (acelerador: 2-dimetilaminoetanol).....0,4 g
DBP (fragilidad: dibutil ftalato).....0,8 g

Se mezclan todos los componentes, según este orden, utilizando un agitador magnético y procurando evitar la formación de burbujas, en cuyo caso se debe dejar reposar, opcionalmente en la estufa de 60 °C.

Obtención de cortes semifinos y ultrafinos:

La obtención de los cortes semifinos y ultrafinos fue llevada a cabo por el personal de la *Unitat de Tècniques de M.E.T.* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*. Los cortes semifinos pueden depositarse sobre un portaobjetos de vidrio y teñirse a continuación con una solución de azul de metileno para poder ser observados al microscopio óptico. Esta operación nos permite determinar qué zonas del tejido han sido correctamente incluidas en resina, así como seleccionar que regiones han preservado mejor la estructura y proceder sobre ellos a la obtención de los cortes ultrafinos con la ayuda del ultramicrotomo (modelo “*UltraCut-E*” de *Reichert*). Los cortes ultrafinos se depositan en rejillas de cobre.

Como paso previo a la observación, las muestras han de ser contrastadas, para lo cual se utilizan metales pesados. El proceso es el siguiente:

- 1.-Incubación de las rejillas en acetato de uranilo 30 min a temperatura ambiente.
- 2.-Incubación de las rejillas en citrato de plomo en presencia de NaOH durante 10 min.

SOLUCIÓN de TINCIÓN con AZUL DE METILENO:

Azul de metileno.....0,5 %
BORAX (tetraborato de sodio cristalizado)..0,5 %
Filtrar la solución con un filtro de 0,20 µm.

REACTIVO de REYNOLDS:

Pb (NO₃)₂.....1,33 g

Na₃(C₆H₅O₇)·2H₂O.....1,76 g Acetato de uranilo(UO₂(CH₃COO)₂)·0,1.g
 NaOH 1 N.....8 ml Agua destilada.....5 ml

SOLUCIÓN de ACETATO de URANILO:

H₂O destilada c.s.p.....50 ml

Para preparar el reactivo de Reynolds, disolver primero el Pb(NO₃)₂ y el Na₃(C₆H₅O₇)·2H₂O en 30 ml de agua hirviendo y luego añadir el NaOH. Enrasar finalmente a 50 ml con agua muy caliente. Por su parte, la solución de acetato de uranilo tarda alrededor de media hora en resuspenderse convenientemente, y debe almacenarse en la oscuridad a temperatura ambiente. Es estable durante 2-3 meses.

V.4.5.2. Obtención de cortes ultrafinos para inmunocitoquímica.

Materiales:

- Tejido vegetal seleccionado.
- Solución de fijación.
- Solución de bloqueo.
- Resina *Lowicryl K4M*.
- Cápsulas de gelatina.
- Soluciones de deshidratación (etanol a distintas concentraciones).
- Cabina de flujo laminar.
- Agitador orbital.
- Arcón-congelador a -35°C.

Fijación :

Todos los pasos se llevan a cabo a 4°C, pretemperando las soluciones utilizadas en cada caso.

1.-Al igual que en el caso anterior, y con la ayuda del bisturí, se recortan muestras rectangulares de tejido vegetal de 1-2 mm de lado, y se sumergen en solución de fijación dentro de viales de vidrio, haciendo el vacío de 2-4 horas, hasta que las muestras están completamente sumergidas en el medio. Finalmente se deja incubar a 4°C toda la noche.

2.-Incubar a continuación en tampón cacodilato 0.1 M a pH=7,4, haciendo 4 lavados de 10 min.

3.-Colocar las muestras en solución de bloqueo a 4°C durante 30 minutos, realizando un cambio de solución a los 15 min. Esta etapa tiene como finalidad neutralizar el exceso de aldehído u otros residuos de la fijación, que podrían causar marcaje no específico.

4.-Repetir el paso 2, pudiendo dejar el último paso toda la noche si se desea.

SOLUCIÓN de FIJACIÓN:

Glutaraldehído.....0,1 %

Paraformaldehído.....4 % NH₄Cl.....150 mM

SOLUCIÓN de BLOQUEO:

En ambos casos se prepararon en tampón cacodilato 0.1 M a pH=7,4.

A diferencia del proceso de fijado descrito anteriormente en el protocolo para la obtención de cortes de ultraestructura de *Arabidopsis*, no se incluye en este protocolo un paso de osmificación, pues la presencia de osmio es incompatible con la utilización del *Lowicryl K4M*, ya que confiere a la muestra opacidad a la luz ultravioleta, impidiendo la polimerización de la resina. Aún más, el proceso de osmificación altera la estructura secundaria de las proteínas haciéndola no apta para los estudios de inmunomarcaje, como es el caso, o cuando se pretende detectar alguna actividad enzimática.

Deshidratación :

Este procedimiento consiste en una serie de lavados sucesivos en soluciones de porcentaje creciente de etanol, disminuyendo progresivamente la temperatura y según el siguiente programa:

1.-1 lavado de 30 minutos en etanol 25 %, a 4°C.

2.-1 lavado de 1 hora en etanol 50 %, a -20°C. A partir de este paso es conveniente mantener la muestra bajo agitación. Se opera en un arcón-congelador, sin retirar en ningún momento las muestras del mismo.

3.- 1 lavado de 1 hora en etanol 50 %, a -20°C.

4.- 1 lavado de 1 hora en etanol 90 %, a -35°C.

Infiltración y polimerización

Tiene lugar ahora el proceso de infiltración de la muestra. Trabajar en todo caso en el interior del arcón-congelador a -35 °C:

1.-4 horas en *Lowicryl*:etanol (1:3, v:v).

2.-Toda la noche en *Lowicryl*:etanol (2:2, v:v).

3.- 4 horas en *Lowicryl*:etanol (3:1, v:v).

4.-2 períodos de 4 horas y toda la noche en resina pura.

Para preparar los bloques, se utilizan cápsulas de gelatina que tienen por objeto evitar el contacto con el oxígeno, que inhibiría el proceso de polimerización.

5.-Llenar las cápsulas de gelatina, previamente enfriadas, con un poco de resina.

6.-Transferir las muestras a las cápsulas con la ayuda de un palillo o una pipeta Pasteur. El material utilizado debe haber sido preenfriado y todas las manipulaciones han de realizarse en el interior del arcón. Los tratamientos con etanol habrán extraído completamente los pigmentos del tejido vegetal, adquiriendo un aspecto traslúcido que dificulta su manipulación.

7.-Acabar de rellenar las cápsulas con gelatina de manera que quede dentro la mínima cantidad de aire posible.

8.-Incubar las cápsulas a -35°C durante 60 min.

9.-Polimerizar la resina con luz ultravioleta durante un mínimo de 24 h a -35°C .

RESINA LOWICRYL K4M (Para 21 ml):

Crosslynker A.....3,60 g

Monomer B.....17,30 g

Iniciador C.....0,10 g

Se deben mezclar todos los componentes evitando la incorporación de oxígeno. Para ello, la mezcla se realiza en el interior de una campana de flujo laminar, haciendo burbujear nitrógeno gaseoso a través de ella mediante la ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez preparada, atemperarla a -35°C .

Obtención de cortes semifinos y ultrafinos:

Se procedió como se ha descrito en el protocolo anterior. No obstante, en este caso, ha sido el oro el material de elección de las rejillas sobre las que se depositaron las muestras pues, entre otros motivos, resulta más inerte que el cobre frente a la azida sódica presente frecuentemente en las soluciones del anticuerpo.

El procedimiento de contrastado se realizó a continuación del protocolo de inmunocitoquímica (apdo. siguiente) con soluciones análogas a las empleadas en el apartado V.4.5.1. En todo caso, se utilizaron tiempos de incubación más cortos, que optimizan la visualización de las micropartículas de oro acopladas a los anticuerpos secundarios.

1.-Incubar las rejillas en acetato de uranilo (2 % acuoso) 5 min a temperatura ambiente.

2.-Incubar las rejillas 1 min en citrato de plomo.

V.4.5.3. Reacción de inmunocitoquímica:

Para este protocolo se trabaja siempre a T^{a} ambiente. Las rejillas se disponen sobre gotas de 30 μl de cada una de las soluciones que se utilizaron, dispuestas encima de una lámina de parafilm. Es conveniente extremar las precauciones al manejar las rejillas debido a su extrema fragilidad. Para ello, se manipularon siempre con pinzas finas. Los anticuerpos primarios empleados (anti-DXS1 y anti-DXR) aparecen detallados en el apartado V.5.3.1.

1.-Incubar la rejilla 15 min con la solución de bloqueo.

2.-Preparar las diluciones apropiadas de anticuerpo primario en la solución de bloqueo. Se ensayó en un primer experimento un rango de diluciones de anticuerpo con la intención de optimizar la concentración de trabajo.

3.-Lavar 4 períodos de 5 min con solución de bloqueo.

4.-Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Se utilizó anticuerpo preparado en cabra

contra IgG de ratón o conejo (según estuviesen dirigidos frente al anticuerpo anti-DXS1 o anti-DXR respectivamente) acoplados en ambos casos a partículas de oro de 15 nm (*British Biocell*) en dilución 1/25.

5.-Lavados:

-3x5 min con tampón TBS.

-4x5 min con H₂O.

-Finalmente lavar abundantemente con H₂O.

6.-Colocar la rejilla en una placa de Petri con papel secante. Es importante prestar atención a la orientación, procurando que la muestra quede siempre hacia arriba.

SOLUCIÓN de BLOQUEO:

Se prepara resuspendiendo Albúmina de Suero Bovina (BSA) al 1 % en TBS. No autoclavar.

TAMPÓN TBS:

Tris-HCl.....10 mM
NaCl.....150 mM
Ajustar a pH=7,4 con NaOH.

V.4.5.4. Observación de las muestras al microscopio:

Se utilizaron las instalaciones de la *Unitat de Tècniques de M.E.T.* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*. En cualquier caso, las observaciones se efectuaron en un microscopio electrónico de transmisión *Hitachi* modelo H 800 MT. Las imágenes obtenidas fueron captadas a través de una cámara digital acoplada al microscopio, utilizando la aplicación informática de adquisición de imágenes *Digital Micrograph* versión 3.3.0. (*Gatan Ltd.*).

V.4.6. Biolística sobre tejidos de *Arabidopsis thaliana*.

Con el propósito de estudiar la localización subcelular de las proteínas se ha combinado la capacidad de los sistemas de microbombardeo para transformar células vegetales con ADN con las propiedades de la proteína verde fluorescente (GFP) como delator en tejidos vegetales [271]. La visualización al microscopio confocal de la fluorescencia emitida por la GFP refleja la localización de la misma.

Como tejido vegetal se han utilizado hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* de 2 a 3 semanas. El protocolo seguido ha sido básicamente el descrito por el proveedor del sistema de biolística, con adaptaciones específicas destinadas al bombardeo de tejidos vegetales.

V.4.6.1. Descripción de las construcciones utilizadas para los experimentos de microbombardeo.

Las construcciones utilizadas para los experimentos de biolística fueron generadas a partir del vector pGFP-MRC [240]. Este vector incorpora una región de policlonaje que permite fusionar traduccionalmente un ADNc concreto a una variante de la GFP (sGFP:S65T) mejorada para multiplicar la señal fluorescente en células vegetales [59]. Las construcciones resultantes codifican para las distintas proteínas químéricas bajo el

control del promotor 35S-CaMV. Para este trabajo, se diseñaron construcciones en las que la secuencia codificante completa de los genes *DXS1* y *DXR* se fusionaron traduccionalmente con el extremo N-terminal de la proteína verde fluorescente GFP. En el caso de *DXS2*, la construcción era la resultante de la fusión traduccional del dominio correspondiente al hipotético péptido de tránsito del extremo N-terminal, concretamente hasta su posición 45, con la GFP. En todos los casos el clonaje se efectuó mediante reacciones de *PCR* (ver apdo. V.5.4) que amplificaron los fragmentos deseados y en los que los oligonucleótidos utilizados introducían los sitios de restricción necesarios para su integración en el vector de destino pGFP-MRC [240]. La Tabla V.2 muestra los juegos de oligonucleótidos utilizados en cada caso, así como los sitios de restricción empleados en el clonaje. La Figura II.10 incluye una representación esquemática de las construcciones empleadas en los experimentos de microbombardeo.

CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDO		SITIOS DE RESTRICCIÓN	
	5'	3'	5'	3'
DXS1:GFP	DXS.SallA	T7-21	Sall	Sall
DXS2.PT:GFP	DXS2.NcoIGFP	DXS2.Sall3GFP-TP	NcoI	Sall
DXR:GFP	DXR.SallA	T7-21	Sall	Sall

Tabla V.2: Pares de oligonucleótidos empleados en la generación de las construcciones de microbombardeo.

V.4.6.2. Protocolo de microbombardeo:

Material:

- Sistema Biorad PDS100/He-Particle Delivery System.
- Cabina de flujo laminar.
- Vórtex.
- Micropartículas de tungsteno M17, Ø medio=1,1 µm.
- Membranas de ruptura, membranas portadoras y rejillas de parada.
- Etanol absoluto y al 70 %.
- Glicerol 50 %.
- ADN purificado.
- Espermidina 0,1 M.
- CaCl₂ 2,5 M.

Preparación de microproyectiles:

- 1.-Pesar 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2.-Añadir 1 ml de etanol al 70 %. Agitar vigorosamente al vórtex durante unos 3-5 minutos.

3.-Incubación 15 min a temperatura ambiente.

4.-Precipitar las micropartículas mediante un pulso de unos 5 seg en la microcentrífuga. Eliminar el sobrenadante con la pipeta.

5.-Adicionar 1 ml de H₂O estéril y agitar con el vórtex 1 min. Dejar incubando las micropartículas 1 min hasta que sedimenten. Finalmente repetir el pulso en la centrífuga y eliminar el sobrenadante con la ayuda de la micropipeta.

6.-Repetir el paso anterior 2 veces más.

7.-Agregar 0,5 ml de glicerol 50 % estéril (concentración final=60 mg/ml). Conservar a -20 °C para prevenir la oxidación.

Precipitación del ADN sobre los microproyectiles:

1.-Mantener las micropartículas preparadas según el paso anterior en una plataforma vórtex. Es conveniente dejarlas el tiempo suficiente (mínimo 5 min) para poder resuspender y romper los aglomerados de micropartículas.

2.-Pasar 10 µl de micropartículas (600 µg) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

3.- Manteniendo en agitación el tubo anterior se añaden:

-1-2 µg de ADN plasmídico.

-14 µl de solución de precipitación (10 µl de CaCl₂ 2,5 M: 4 µl espermidina 0,1 M).

4.-Mantener agitando en el vórtex durante unos 5 min más.

5.-Dejar 1 min sedimentando las micropartículas.

6.-Aplicar un pulso de centrífuga de 5 seg y eliminar el sobrenadante cuidadosamente con la ayuda de la micropipeta.

7.-Lavar el precipitado sin levantarlo con etanol 70 %. Retirar el sobrenadante.

8.-Lavar el precipitado sin levantarlo con etanol 100 %. Desechar el sobrenadante.

9.-Resuspender en 8 µl de etanol absoluto valiéndose de la micropipeta.

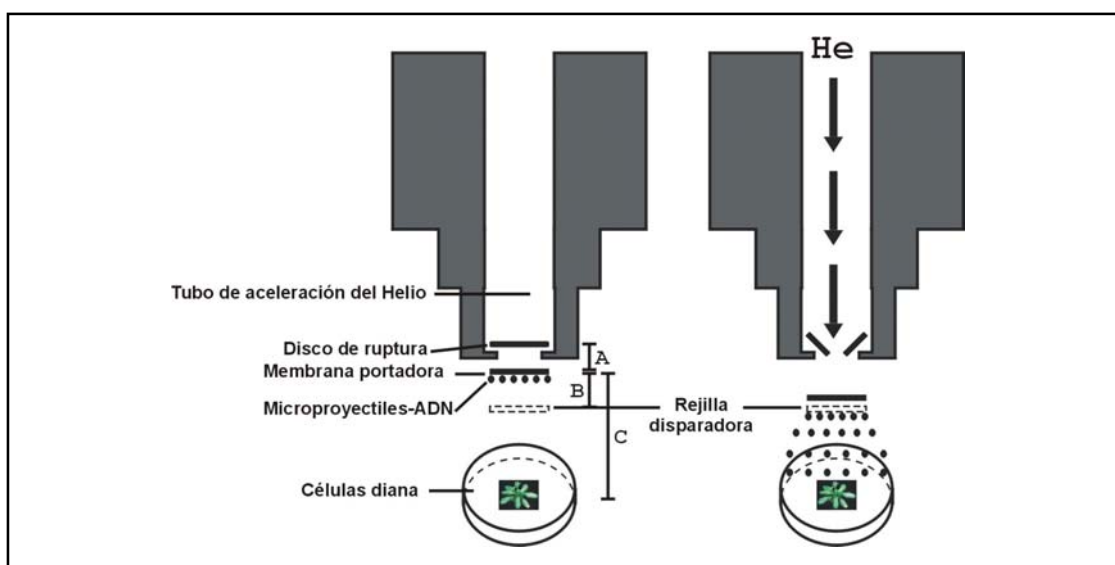
Microbombardeo:

El sistema de bombardeo utiliza la presión del helio suministrado por una bombona (dotada de un manómetro) para acelerar las micropartículas recubiertas de ADN e introducirlas directamente sobre las hojas de Arabidopsis, transformándolas.

Los parámetros del procedimiento de transfección fueron optimizados, y del modo en que se ilustra en la Figura V.2, se refieren a:

- Disco de ruptura (presión de helio a soportar, expresada en psi).
- Distancia disco de ruptura-membrana portadora (A)=4,5 cm.
- Distancia membrana portadora-rejilla de parada (B)=6 mm
- Distancia membrana portadora-muestra a bombardear (C)=12 cm.
- Presión de helio en la bombona de suministro.

Figura V.2: Representación esquemática del sistema de biolística, antes y después de aplicar la presión de



helio.

Asimismo, hay que considerar los parámetros biológicos relacionados con la muestra que se desea bombardear, elección de células diana, etcétera.

Para evitar contaminaciones con las construcciones entre un episodio y otro de bombardeo, conviene esterilizar la zona de trabajo (cabina y cámara de bombardeo) con etanol y lavar con agua. Lo mismo se hizo con el material fungible utilizado en cada bombardeo, manteniendo las membranas de ruptura, membranas portadoras y rejillas de parada en etanol absoluto, y manejándolos siempre con pinzas. También se esterilizaron y lavaron cuidadosamente las piezas metálicas y de plástico que sirven de soporte a aquellos elementos. Una vez secado este material sobre papel de filtro, se procede como sigue:

1.-Depositar los 8 μ l de micropartículas recubiertas de la muestra de ADN con la que se quiere transformar sobre una membrana portadora ya seca.

2.-Mientras se espera a que el etanol se evapore, ajustar el regulador de la bombona de helio a una presión de 1300 psi, unas 200 psi por encima de la soportada por el disco de ruptura.

3.-Ajustar la membrana portadora correctamente orientada sobre el soporte metálico con la ayuda de la pieza roja diseñada al efecto.

4.-Colocar una rejilla de parada en la plataforma. A continuación, el soporte metálico con la membrana portadora de modo que las micropartículas estén orientadas hacia la rejilla.

5.-Cerrar firmemente el montaje enroscando el cierre del soporte metálico.

6.-En este momento se esteriliza un disco de ruptura sumergiéndolo brevemente en etanol absoluto. Se dispone rápidamente sobre el soporte correspondiente y se enrosca en el tubo de aceleración del gas en el extremo superior de la cámara de bombardeo.

7.-Acto seguido colocar la plataforma con la membrana en el nivel 5. La cámara posee 6 niveles, lo cual permite adecuar la distancia entre los distintos elementos según conveniencia.

8.-Finalmente, disponer la plataforma con la muestra vegetal depositada en una placa de agar 0,8 % en el nivel 2. Este soporte absorberá el impacto resultante del bombardeo y mantendrá condiciones de humedad para el tejido durante la incubación posterior.

9.-En este momento cerrar la cámara de bombardeo y encender la bomba de vacío.

10.-Conectar la cámara de bombardeo y accionar el interruptor en la posición de vacío (posición superior).

11.-La presión de vacío irá subiendo. En el momento en que llegue a 27-29 mm (0,06 atm) de Hg, pasar el interruptor a la posición inferior, en la que se mantendrá la presión de vacío.

12.-Pulsar rápidamente el interruptor de disparo. La presión de Helio indicada en el manómetro del sistema se irá acumulando sobre el disco de ruptura hasta alcanzar el máximo soportado, momento en que estallará, despidiendo un ruido sordo y bajando bruscamente la presión de Helio desde el máximo alcanzado de 1100 psi hasta 0.

13.-Poner inmediatamente el interruptor en la posición intermedia para permitir la liberación del vacío. Es conveniente realizar los pasos 11 a 13 lo más velozmente posible a fin de reducir los daños que el vacío pueda causar en el tejido vegetal.

14.-Finalmente, recuperar la muestra bombardeada, que debe mostrar unas manchas negras debidas al tungsteno impactado. Se deja incubar 24 horas bajo luz continua a una temperatura de 22-24 °C para que tenga lugar la expresión de la construcción bombardeada.

15.-Descartar el disco de ruptura, que debe estar destrozado, la membrana portadora y la rejilla.

16.-Antes de proceder a un nuevo bombardeo, esterilizar y limpiar de nuevo la zona.

17.-Es conveniente, una vez terminado el experimento:

-Cerrar la manecilla del helio.

-Aplicar el vacío el tiempo suficiente para permitir que se encienda el botón disparador, y disparar cuantas veces sea necesario para liberar el gas retenido en el sistema. Confirmar que, efectivamente,

la manecilla del manómetro cae a 0.

-Liberar finalmente el vacío.

V.4.6.3. Observación de las muestras microbombardeadas.

Las muestras obtenidas tras el proceso de transformación transitoria mediante el sistema de biolística fueron examinadas en el *Servei de Microscopia Confocal* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*. Las observaciones se realizaron directamente utilizando un microscopio láser de escáner confocal modelo *Leica TCS 4D*, o bien *Olympus IX70*. La fluorescencia verde correspondiente a las proteínas de fusión con la GFP fue detectada a través de un filtro BP515-525 tras excitación con luz azul a 488 nm de longitud de onda, mientras que la autofluorescencia roja correspondiente a la clorofila se detectó usando un filtro LP590, tras excitar mediante la emisión con luz verde a 568 nm. Ocasionalmente, se efectuó una observación preliminar con la ayuda de la lupa binocular de fluorescencia *Leica DC250*, con el objeto de detectar en la muestra regiones que estuviesen expresando la GFP.

El análisis de la superposición de los dos tipos de imágenes obtenidas, así como el tratamiento de las mismas, fue efectuado mediante la aplicación *Corel Photo-Paint*, integrada en el paquete informático *Corel-Draw 9*.

V.4.7. Detección de la actividad GUS.

V.4.7.1. Análisis histoquímico de la actividad GUS.

Las plantas transgénicas portadoras de construcciones resultantes de la fusión de la región 5' flanqueante del gen a estudio con el gen *uidA* (*GUS*) de *E. coli* permiten estudiar su patrón de expresión a lo largo de los distintos estadios de desarrollo, tejidos y condiciones de crecimiento analizados gracias a la actividad β -glucuronidasa (*GUS*) codificada por dicho gen (apdo. V.4.1.1.). Para ello, se incubó la muestra problema en presencia del sustrato 5-bromo-4-cloro-indolilglucurónido (*X-Gluc*). La actividad *GUS* hidroliza este sustrato liberando una aglicona que al dimerizar adquiere una coloración azul fácilmente visualizable. La dimerización a su vez vendrá estimulada por el oxígeno atmosférico y puede incrementarse mediante agentes catalizadores [141].

Los análisis se llevaron a cabo con al menos 6 líneas de plantas transgénicas transformadas con cada una de las construcciones a analizar en la generación T₂. Se confirmó que las diferencias entre las distintas líneas pertenecientes a una misma construcción eran únicamente de naturaleza cuantitativa, esto es ligeras variaciones en la intensidad de tinción, y que cualitativamente el patrón de expresión espacio-temporal no variaba de unas a otras. De este modo, se seleccionó una de las líneas para cada construcción como representativa. Sobre estos individuos se llevaron a cabo los experimentos definitivos, siguiendo la metodología que se detalla a continuación:

Materiales:

- Tampón de ensayo.
- Desecador.
- Trampa de vacío.
- Etanol 70 %.

Método:

1.-Colocar las muestras en un recipiente adecuado (tubo de microcentrífuga, placa de Petri, etc.) y cubrirlas con el tampón de ensayo. Se han utilizado o bien plántulas crecidas en condiciones estériles o bien tejidos u órganos de planta adulta crecidos en tierra.

2.-Someter las muestras al vacío en el interior de un desecador conectado a una trampa de vacío durante 5 min.

3.-Seguidamente mantener las muestras de 6-24 horas en incubación a 37 °C, para que tenga lugar la reacción GUS. Es conveniente analizar distintos tiempos de incubación para poder observar diferencias precisas de expresión entre unos tejidos y otros dentro del mismo individuo.

4.-Para aumentar el contraste, se extraen los pigmentos vegetales por medio de lavados repetidos de la muestra con etanol 70 % a temperatura ambiente. Se pueden hacer tantos lavados como se crea necesario, siempre dejando alrededor de 1 día entre uno y otro y manipulando cuidadosamente el tejido que pierde consistencia como consecuencia de los tratamientos.

5.-La obtención de imágenes se llevó a cabo con una cámara digital fija modelo *Olympus DP10* adaptada a una lupa binocular *Olympus SZ-CTV*.

Tampón de ensayo:

Ferricianuro potásico.....100 µM
Ferrocianuro potásico.....100 µM
EDTA pH=8.....10 mM
Tritón X-100 (v/v).....0,1 %
β-mercaptoetanol.....0,5 mM
X-Gluc.....1 mg/ml
Tampón fosfato.....50 mM

Disolver primero el X-Gluc en N,N-dimetilformamida (50mg/0,5ml).

La solución así preparada es estable 2-3 días a 4°C, o 2-3 semanas a -20 °C.

V.4.7.2. Medición de la actividad GUS.

Para la cuantificación de la actividad GUS, se ha seguido el ensayo fluorimétrico descrito por Jefferson [141]. El ensayo se basa en la detección del producto fluorescente metilumbeliferona (MU), generado a partir del sustrato ácido metilumbeliferil-β-glucuronido (MUG) por la acción de la β-glucuronidasa [140]. Para asegurar la uniformidad en el análisis, se utilizaron líneas homocigóticas para cada una de las transgénicas portadoras de la construcción promotor:*GUS*, crecidas bajo distintas condiciones. En todos los casos los experimentos se llevaron a cabo con 2-3 réplicas.

Materiales:

- Minifluorímetro (modelo *Hoefler TKO-100*) de longitud de onda fija: excitación a 365 nm y emisión a 455 nm.
- Placas de multicultivo de 12 pocillos.
- Tampón de parada.
- Tampón de ensayo.
- MU (metilumbeliferil).
- MUG (4-metilumbeliferil β -D-glucuronido).

Método:

1.-Lisar la muestra. Para ello se resuspendieron alrededor de 25 mg de tejido en 200 μ l de tampón de extracción. A continuación se sumergen los tubos sucesivamente en N_2 líquido y en un baño de agua a 37°C, para lisar por congelación-descongelación. Repetir este proceso 3 veces.

2.-Centrifugar 10 min a 14000 rpm y recuperar el sobrenadante con el extracto proteico en un nuevo tubo. Conservar una alícuota para cuantificar la concentración de proteína según lo reseñado en el apartado V.4.4. Utilizar el resto para medir la actividad GUS.

3.-Previamente a las mediciones, calibrar el minifluorímetro con soluciones estándar. Asignar 50 unidades a una solución 5 nM de MU y 500 unidades a una solución 50 nM de MU. Estas soluciones deben ser preparadas justo antes de su utilización a partir de un stock de MU 1 mM diluyendo en tampón de parada, y protegiéndolas, en todo caso, de la luz.

4.-Diluir una alícuota del extracto proteico preparado anteriormente en tampón de ensayo hasta un volumen final de 5-10 μ l. Estimar las diluciones apropiadas en función de la actividad GUS dirigida por el promotor a estudio, de manera que los valores de fluorescencia no superen el umbral de linealidad del fluorímetro (5000 unidades).

5.-Incubar a 37 °C. Efectuar mediciones cada 15 min durante 1 hora y siempre por triplicado. Estos tiempos pueden también ser modificados en función de la actividad específica detectada. Para llevar a cabo las mediciones se transfieren 100 μ l de la mezcla de reacción a una placa de multicultivo con 900 μ l de solución de parada. Agitar unos minutos en un agitador orbital y llevar nuevamente una alícuota de 10-100 μ l hasta 2 ml con la solución de parada en una nueva placa. Efectuar la medición con esta última muestra.

6.-Una vez efectuadas todas las mediciones se determinaron los valores de actividad específica según las formulas siguientes:

$$\text{-ACTIVIDAD} = \Delta \text{fluorescencia} / \Delta \text{min}$$

$$\text{-Factor de Conversión} = 500 \text{ unidades} / 50 \text{ nM MU}$$

-Utilizando aquel factor de conversión, aplicar el factor de dilución correspondiente

considerando: vol reacción, vol solución de parada, vol extracto proteínas y vol total en la cubeta (2ml).

-Finalmente, referir los valores de actividad obtenida a la cantidad de proteína (unidades pmol MU/mg prot.min).

TAMPÓN de EXTRACCIÓN:

Tp FOSFATO POTÁSICO pH=7.....50 mM
EDTA pH=8.....0,1 g
Tritón X-100.....0,1 %
 β -mercaptoetanol.....10 mM
Preparar justo antes de su uso.

TAMPÓN de PARADA:

Na_2CO_30,2 mM
No autoclavar.

TAMPÓN de ENSAYO:

Tp FOSFATO POTÁSICO pH=7.....50 mM
EDTA.....0,1 g
Tritón X-100.....0,1 %
 β -mercaptoetanol.....10 mM
MUG.....1 mM

V.4.8. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos en Arabidopsis.

Para el análisis cuantitativo de pigmentos fotosintéticos de naturaleza prenilica, esto es, clorofilas y carotenoides [105], se ha seguido el método de extracción basado en el descrito por Lichtenthaler [170]. Se trabajó a escala de tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, partiendo de 10-40 mg de tejido pesado y congelado en N_2 líquido.

Materiales:

- Liofilizador-Evaporador-trampa de vacío (*B. Braun Christ-Loc I*).
- N_2 líquido.
- Agitador múltiple.
- Cloroformo, metanol, acetona y etilacetato.
- Solución de homogenización.
- Espectrofotómetro (modelo *Shimadzu UV-160A*).

Método:

1.-Homogeneizar el tejido en presencia de N_2 líquido. A partir de este momento, es conveniente reducir en lo posible la incidencia de la luz directa sobre la muestra con el objetivo de evitar la fotooxidación de los pigmentos durante el proceso. Asimismo, procurar mantener en todo momento por debajo de 4°C.

2.-Adicionar 200 μl de metanol y resuspender de 5-10 min con ayuda de un agitador múltiple.

3.-Añadir a la suspensión 400 μl de la solución de homogeneización, cuyo contenido en sales evita la

producción artefactual de feofitina durante el proceso, que podría alterar las mediciones. Mantener en agitación otros 5-10 min.

4.-A continuación se añaden 400 µl de cloroformo y se repite el paso de extracción.

5.-Una centrifugación de 5 min por encima de 3000 g (5000 rpm) y a 4°C permitirá la adecuada separación de la fase acuosa de la orgánica (inferior). Esta última se recupera cuidadosamente y se pasa a otro tubo. Opcionalmente se puede proceder a una segunda reextracción con cloroformo de la fase acuosa restante.

6.-La muestra es concentrada con la ayuda de un evaporador-concentrador. El residuo seco obtenido se resuspende en 20-40 µl de etilacetato. Evitar mantener el tubo abierto a partir de este momento pues el disolvente es extremadamente volátil.

7.-Finalmente, se determina la absorbancia en 500 µl de acetona con ayuda del espectrofotómetro a las siguientes longitudes de onda [170]:

- Clorofila A (C_a): 661,6 nm.
- Clorofila B (C_b): 644,8 nm.
- Carotenoides y xantofilas (C_{x+c}): 470 nm.

Dichos valores representan las $\lambda_{\text{máx}}$, coeficientes de absorción máximos específicos en presencia de acetona. Una vez obtenidos los valores de absorbancia a aquellas longitudes de onda, se aplican las siguientes fórmulas con el objeto de determinar las concentraciones de cada uno de los pigmentos analizados, refiriéndolos finalmente en µg/ml de extracto vegetal [170].

$$C_a = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$$

$$C_b = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$$

$$C_{a+b} = 7,05 \times A_{661,6} + 18,09 \times A_{644,8}$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b) / 214$$

SOLUCIÓN de HOMOGENIZACIÓN:

Tris-HCl pH=7,5.....25 ml

NaCl.....50 mM

No autoclavar.

Conservar a temperatura ambiente.

V.5. TÉCNICAS CLÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

V.5.1. Tecnología del ADN recombinante:

Bajo este epígrafe se engloban las técnicas que condujeron al clonaje de secuencias de ADN. La diversidad de estrategias metodológicas empleadas para la multitud de construcciones presentadas a lo largo de este trabajo hacen imposible describir cada una de ellas independientemente, de modo que se ha optado por enunciarlas brevemente.

En primer lugar, y en lo que concierne a la minipreparación de ADN plasmídico se ha utilizado el sistema “*QIAPREP spin miniprep kit*” de *Qiagen*. Las restricciones del ADN se llevaron a cabo con 2,5-5 unidades de cada enzima de restricción bajo las condiciones de salinidad, pH y temperaturas recomendadas por el fabricante en cada caso, y prolongando la incubación hasta ~16 horas cuando se trataba de una digestión preparativa o una enzima de baja actividad específica. Los productos de digestión (o en su caso los resultantes de la reacción de *PCR*, apdo. V.5.4.) se resolvieron en geles de agarosa de porcentaje adecuado al tamaño del fragmento o fragmentos a analizar, preparados en tampón TAE 1x (apdo. V.5.2.2.) con 0,5 µg/ml de Br-Et. Las bandas de interés se recuperaron cuidadosamente evitando prolongar la irradiación con la lámpara de UV, y se purificaron mediante los sistemas *Jetsorb (Genomed)* o *GENelute (Sigma)*. Una nueva separación electroforética en presencia de marcadores de tamaño y concentración conocidos permitieron comprobar y cuantificar los fragmentos recuperados. Se ajustaron las cantidades de vector e inserto en la reacción de ligación para cada tipo de clonaje. Los productos de ligación así obtenidos fueron empleados para transformar células bacterianas competentes de choque térmico (“*Subcloning Efficiency DH5α Chemically Competent E. coli*” de *Life Technologies*). El análisis de las colonias resultantes se llevó a cabo en primer lugar mediante escrutinio por *PCR* (apdo. V.5.4.1.), seguido de amplificación de la colonia candidata mediante cultivo en 3 ml de medio de crecimiento bacteriano suplementado con el/los antibióticos de selección y suplementos correspondientes en cada caso (apdo. V.2.2.). El estudio del patrón de restricción del ADN recuperado y su posterior secuenciación permitieron confirmar la integridad/identidad del clon generado. Finalmente, el sedimento de 1,5 ml de cultivo del clon en cuestión se resuspendió en 500 µl de medio suplementado con glicerol al 50 % o al 15 % previamente autoclavado para preparar los glicerizados a -20°C y -80°C respectivamente.

Materiales:

Se enuncian a continuación las herramientas de uso común en los experimentos de clonaje:

- Microcentrífuga de mesa.
- Vórtex.
- Enzimas de restricción.
- Agitador múltiple.
- Bloque térmico variable.
- Células competentes.
- Estufa y cámara de incubación con agitación a 37°C.
- Baño térmico.
- Sistemas de purificación de bandas sobre geles de agarosa *Jetsorb (Genomed)* o *GENelute (Sigma)*.
- Sistema de electroforesis de geles de agarosa.

V.5.1.1. Construcciones utilizadas en este trabajo:

Se describe aquí la obtención de las construcciones no incluidas en aquellos apartados en que se hace referencia expresa de su uso (como las utilizadas en la generación de plantas transgénicas o las empleadas en los ensayos de microbombardeo). Se trata, particularmente, de todas las construcciones relacionadas con los experimentos de complementación funcional de cepas mutantes de *E. coli*. El apartado V.5.4 proporciona los pormenores relativos a la técnica de *PCR*, de la que se ha hecho uso durante la generación de estas construcciones.

Todas estas construcciones están basadas en pBADM1, una versión modificada del vector pBAD-GFPuv [45]. En ella fue eliminado, mediante mutagénesis dirigida, el sitio *NdeI* en posición 4926, permitiendo el clonaje bajo la dirección del promotor pBAD.

Por un lado, se generaron dos construcciones que incluían, respectivamente, la forma deletada en todo el extremo N-terminal específico de las proteínas DXR vegetales (pBAD-At.DXR-C) y una versión truncada defectiva en el hipotético péptido de tránsito de dicha proteína y los primeros 7 residuos de la proteína madura (pBAD-At.DXR-L). Dichas construcciones fueron obtenidas amplificando por *PCR* con los oligonucleótidos DXR5'.MQQQ o DXR5'.MVKPI por el extremo 5' y DXR.end por 3' sobre la construcción pDXRAt.3 (apdo. V.5.4.1) utilizada como molde. Los fragmentos de ADNc obtenidos en cada caso fueron clonados en los sitios *NdeI* y *EcoRI* del vector pBADM1, sustituyéndolo, previa digestión con aquellas enzimas de restricción, por la secuencia codificante de la GFP.

Por otra lado, a partir de 3 reacciones de *PCR* efectuadas con la Pfu ADN polimerasa, utilizando como molde el vector pLBSDXS2.2 (que contiene el ADNc completo del gen *DXS2*, apdo. V.5.4.2) se generaron 3 fragmentos: DXS2.At, DXS2C.At y DXS2CC.At que contenían, en cada caso, la secuencia codificante completa para la *DXS2*, la secuencia truncada en la región correspondiente al extremo N-terminal a partir del residuo 33 y, finalmente, la secuencia truncada en los 44 aminoácidos del extremo N-terminal. Para ello se emplearon los oligonucleótidos DXS2.NheI, DXS2.CTpNheI y DXS2.CCTpNheI respectivamente como cebadores en dirección sentido (que introducían el sitio *NheI*), y el oligonucleótido universal T7, propio del sitio de clonaje flanqueante al inserto utilizado como molde, en dirección antisentido. Estos fragmentos, previamente digeridos por *NheI* y *EcoRI*, fueron directamente clonados en los sitios correspondientes del vector pBAD-GFPuv de destino, reemplazando la secuencia codificante de la GFPuv, y disponiendo el inserto en todos los casos bajo la dirección del promotor pBAD.

Finalmente, se generó la construcción pLBAD-At.DXS2-CCdom, que contenía la secuencia DXS2CC.At con una secuencia extra de 96 pb insertada en fase en la posición nucleotídica 639. Este clon fue generado mediante una reacción de *PCR* invertida con Pfu ADN polimerasa, basada en los oligonucleótidos DXS2.domA y DXS2.domB que amplificaron el vector pLBAD-At.DXS2CC extendiéndose cada uno hacia direcciones opuestas e incluyendo en 5' parte del dominio a introducir. El producto de *PCR* así obtenido fue purificado y digerido con la relictasa DpnI, que tiene la particularidad de reconocer específicamente sitios GATC metilados en la adenina, degradando únicamente la hebra parental y no los productos generados por la

reacción de *PCR*. La presencia de extremos 5'fosfato en los oligonucleótidos utilizados facilitó la religación del producto y su posterior transformación, de la que se obtuvieron clones positivos sobre los que finalmente fue verificada la secuencia.

V.5.1.2. Preparación de células competentes:

El siguiente protocolo permite la consecución rápida de células competentes de choque térmico con una eficiencia de transformación óptima para ADN plasmídico. Se ha utilizado para obtener células competentes de las cepas mutantes EcAB4-2 [45] y EcAB1-2 [239] de *Escherichia coli*, empleadas en los ensayos de complementación funcional.

Preparación rápida de células competentes de *E. coli*.

Materiales:

- Centrífuga *Beckman* J2-21 y rotor JA-10.
- Placa de cultivo con colonias aisladas de las cepas EcAB4-2 [45] y EcAB1-2 [239] de *Escherichia coli*.
- ADN de la construcción de interés (apdo. V.5.1.1).
- Medio 2xTY.
- Cloranfenicol 34 mg/ml, kanamicina 100 mg/ml y ampicilina 100 mg/ml en solución acuosa.
- Solución TSS.
- N₂ líquido.

Método:

1.-Inocular un precultivo de 3 ml de medio estéril 2xTY-CKAM (cloranfenicol 17 µg/ml, kanamicina 25, ampicilina 100 µg/ml y mevalonato 0,5 M) a partir de una colonia aislada de la cepa deseada de *E. coli* e incubar en agitación a 220-240 rpm y 37°C durante aproximadamente 16 h.

2.-Inocular 50 ml de 2xTY-CKAM con una dilución 1/100 del precultivo anterior. Incubar en agitación a 220-240 rpm y 37°C hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,3-0,4. Normalmente, y si el precultivo original no estaba excesivamente saturado, el cultivo tarda unas 2 h en alcanzar la DO deseada.

3.-Centrifugar las células durante 10 min a 4000 rpm y 4 °C con un rotor JA-10 preatemperado. A partir de este paso las células se mantuvieron en hielo extremando el cuidado al manipularlas para evitar lisarlas mecánicamente.

4.-Resuspender suavemente el sedimento en 2,5 ml de solución TSS previamente atemperada a 4°C.

5.-Distribuir las células en alícuotas de 200 µl. Congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C.

SOLUCIÓN TSS:

PEG 3350.....40 %
Esterilizar al autoclave.
Resuspender en medio 2xTY (previamente autoclavado) con:
MgCl₂.....100 mM
DMSO (*Sigma*).....10 %
Ajustar el pH a 6,5.

La transformación por choque térmico de las células competentes obtenidas de este modo se lleva a cabo igual que para las células competentes convencionales.

V.5.2. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

V.5.2.1. Sondas utilizadas en los experimentos de *Southern-blot*.

Las sondas utilizadas para los experimentos de *Southern-blot* fueron preparadas por reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, apartado V.5.4.1) utilizando una mezcla de desoxinucleótidos que contienen dUTP marcados con digoxigenina, el cual se incorpora aleatoriamente al producto amplificado en la *PCR*. Este marcador permite la detección posterior sobre la membrana a través del protocolo reseñado en el apartado V.5.2.5. Se han utilizado en cada caso las siguientes combinaciones de molde/oligonucleótidos:

-*DXS1*: Se ha utilizado el clon H2A12 como molde y los oligonucleótidos específicos DXS1.S1 y DXS1.S5, obteniéndose un fragmento de 907 pb.

-*DXR*: Se ha utilizado el clon pDXRA1.3 como molde (apdo. V.5.4.1) y los oligonucleótidos específicos DXR.S6 y DXR.RT2), recuperándose un fragmento de 1,042 kb.

Los productos de *PCR* fueron purificados utilizando el *High Pure PCR Purification Kit* (ROCHE) siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente se cuantificaron las bandas correspondientes resolviéndolas en un gel de agarosa.

V.5.2.2. *Southern-blot*.

El ADN purificado por CTAB, según el apartado V.4.3.1. reúne las condiciones de pureza para poder ser digerido con enzimas de restricción. Las muestras son separadas en un gel de agarosa y transferidas a una membrana de nailon, soporte sobre el cual se hibridarán con una sonda específica, con el objeto de analizar el número de copias del gen concreto presentes en el genoma.

Materiales:

- Enzimas de restricción: EcoRI, HindIII, XbaI y XhoI (*MBI Fermentas*).
- Soluciones de etanol absoluto y al 70 % frías.
- Horno de hibridación *Mini oven MKII* de *Hybaid* y tubos.
- HCl.

- Soluciones de desnaturalización y de neutralización.
- Membranas de nailon *Hybond N⁺*.
- Papel de filtro *Whatmann 3MM[®]* y papel de filtro normal.
- Tampón de carga
- Solución de Br-Et 10 mg/ml.
- Sistema de electroforesis.
- Sistema de transferencia de geles de agarosa.
- TAE 50x.
- SSC 20x
- SDS 10 %.
- Cámara de ultravioleta (*Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker* de *Spectronics Co.*) y estufa a 80°C.
- Solución de deshibridación.

Método:

Digestión del ADN genómico:

1.-Digerir del orden de 5-10 µg de ADN genómico con cada una de las enzimas de restricción indicadas. Llevar la digestión a un volumen final de 100 µl con 1 µl de la enzima correspondiente (5-10 unidades/µl). A las 4 horas de incubación a 37 °C, añadir 4 µl más de enzima y dejar toda la noche digiriendo. Se eligieron enzimas que desarrollan su actividad bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y salinidad.

2.-Recuperar las muestras para su purificación. Para ello se añaden a cada una 2,5-3 vol de etanol absoluto frío (pretemperado a -20 °C) y hasta 200 mM de NaCl, y se incuba 1 h a -20 °C.

3.-Centrifugar 20 min a 14000 rpm y 4 °C.

4.-Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70 % frío (pretemperado a -20 °C). Repetir el paso 3 de centrifugación.

5.-Descartar el sobrenadante y secar el precipitado a T^aA ó 37 °C.

6.-Resuspender en 25 µl de tampón TE pH=8.

Separación electroforética en gel de agarosa y Southern-blot:

1.-Tras añadir 5 µl de tampón de carga a cada digestión purificada, se cargan en un gel de agarosa al 0,8 % preparado en tampón de transferencia TAE 1x con Br-Et 0,5 µg/ml. Sembrar en un extremo un marcador de peso molecular marcado con digoxigenina: *DNA Molecular Weight Marker III DIG-*(ROCHE)*.

2.-Aplicar un voltaje de 45 V durante 2 horas y 65 V una media hora más. El frente de migración (banda de color azul debida al bromofenol contenido en el tampón de carga) debe haber recorrido al menos $\frac{3}{4}$ partes del recorrido del portageles.

3.-Confirmar la correcta digestión del ADN observando el gel sobre un transiluminador de UV a 312 nm.

4.-Lavar 10-15 min en solución de HCl al 250 mM. El proceso se prolongó el tiempo necesario hasta que el azul del frente tornó en amarillo, señal de que el gel se ha equilibrado con el ácido. Este proceso resulta en la depurinización parcial de los fragmentos de ADN, facilitando la transferencia de los fragmentos de mayor tamaño.

5.- Incubar seguidamente durante 2 períodos de 20 min en solución de desnaturalización. Esta solución es responsable del desapareamiento de la doble hebra de ADN, facilitando los pasos de hibridación ulteriores.

6.-Finalmente, lavar en solución de neutralización 2 ciclos de 15 min. El tratamiento ácido disminuye el pH del gel, facilitando la unión posterior del ADN a la membrana durante la transferencia.

7.-Montar el sistema de transferencia dentro de la cubeta de electroforesis (una vez lavada con agua y jabón y etanol absoluto) como se indica en el esquema de la Figura V.3.

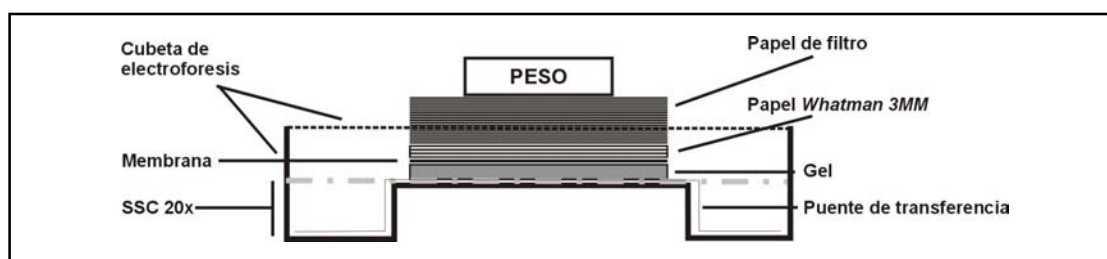
Con el objeto de evitar posibles interferencias en la transferencia, la zona de pocillos del gel fue recortada con la ayuda de un bisturí. A continuación se realizaron los siguientes lavados:

-2 de 20 min en H₂O estéril.

-1 de 1 min en SSC 20x (solución de transferencia).

Colocar el gel sobre el portageles encima del puente salino de transferencia obtenido recortando una tira de papel *Whatmann 3MM*[®] con las dimensiones adecuadas (30x7,5 cm) y que previamente se ha embebido en solución de transferencia. Sobre aquel, y manipulando en todo momento con unas pinzas milipore, situar cuidadosamente la membrana de nailon que se habrá recortado según las dimensiones del gel, previa incubación unos minutos en SSC 2x. Después de añadir unas gotas de SSC 2x, pasar una pipeta sobre el conjunto para evitar la formación de burbujas de aire y eliminar las que ya hubiesen aparecido. Añadir 2-3 papeles *Whatmann 3MM*[®], también prelavados en SSC 2x, y una torre de papel de filtro de 3-4 cm. Para terminar, se coloca un peso cuidando de que todo el sistema esté perfectamente horizontal. Una vez montado todo el conjunto, añadir SSC 20X a la cubeta hasta el nivel indicado en la Figura V.3, y cubrir todo la superficie del montaje con plástico *Saram-Wrap* para evitar la evaporación del tampón de transferencia.

Figura V.3: Representación esquemática del montaje de la transferencia del Southern-blot.



8.-Dejar toda la noche transfiriendo. Después de 12-20 h recuperar la membrana, lavarla unos 3 min en SSC 2x y secarla brevemente sobre un papel *Whatmann 3MM*. Conviene hacer un corte en una de las esquinas de la membrana con un bisturí para facilitar posteriormente la orientación.

9.- Para valorar la eficiencia en la transferencia, la membrana y el gel pueden fotografiarse después en el transiluminador de UV. Para fijar el ADN, se pueden utilizar dos métodos. El primero se basa en aplicar unos segundos radiación a 254 nm con una cámara de ultravioleta, una vez que la membrana está completamente seca. Con este método, se consigue que la unión del ADN a la membrana sea de naturaleza covalente, y por lo tanto más estable. Un segundo método consiste en proteger la membrana con papel *Whatmann 3MM*, envolverlo en papel de aluminio e incubar 2 horas a 80 °C en la estufa. Finalmente, señalar que puede conservarse la membrana en un lugar seco a 4 °C si no va a usarse inmediatamente.

Hibridación:

Los pasos descritos en este epígrafe y el siguiente se realizaron en un horno de hibridación giratorio atemperado a la T° deseada en cada caso.

1.-Lavar la membrana 5 min en H₂O y otros 5 min en SSC 2x.

2.-Prehibridación: 2 horas en solución *DIG Easy Hybridization (Roche)* en el horno de hibridación a 42 °C. Utilizar alrededor de 1-3 ml/10 cm² de membrana.

3.-Hibridación: Preparar la solución de hibridación añadiendo la sonda de ADNc preparada por *PCR* y marcada con DIGOXIGENINA (apdo. V.5.2.1.) a una concentración final de 15 ng/ml de solución de hibridación. La sonda habrá sido previamente desnaturalizada hirviéndola durante 10 min a 100 °C y pasándola luego 2 min a hielo. La solución de hibridación resultante se atemperó a 42 °C, dejando incubar la membrana en ella toda la noche a 42 °C.

Lavados de la membrana:

En general, las condiciones de los lavados deben ser tan severas como sea posible, ajustando la combinación de temperatura, concentración salina y detergente. La temperatura debe ajustarse unos 12-20 °C por debajo de la T_m del híbrido a estudio, que puede estimarse mediante la fórmula:

$$T_m = 81,5 \text{ } ^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,63 (\% \text{formamide}) - (600/l)$$

, donde l=longitud del híbrido, [Na⁺]=0,1M-0,4M (según la solución de hibridación), %G+C=composición en bases de la sonda.

Los demás parámetros (salinidad y detergentes) deben ajustarse empíricamente. Los siguientes lavados de alta severidad revelaron específicamente el patrón de bandas correspondiente al gen origen de la sonda utilizada en cada caso:

1.-2 lavados de 15 min a temperatura ambiente en SSC 2x/SDS 0,1 %.

2.-2 lavados de 20-25 min a 68 °C en SSC 0,1x/SDS 0,1 %.

3.-Una vez en este punto continuar con la detección quimioluminiscente, del modo como se detalla en el apartado V.5.1.5.

Una combinación de lavados de alta y baja severidad (que relaje el grado de homología necesario para que el híbrido se mantenga estable durante los lavados), permite analizar la posible presencia de múltiples genes homólogos en la muestra de ADN empleada.

De esta manera, después de deshibridar la membrana como se describe en el siguiente paso, se llevaron a cabo los lavados de baja severidad, del modo como se detalla a continuación.

1.-2 lavados de 5 min a temperatura ambiente en SSC 2x/SDS 0,1 %.

2.-2 lavados de 15 min a temperatura ambiente en SSC 0,5x/SDS 0,1 %.

3.-Continuar con la detección quimioluminiscente, apartado V.5.2.5.

Deshibridación de la membrana:

Con este sencillo protocolo se consiguen eliminar los restos de sonda unidos a una membrana de *Southern-blot*, permitiendo su rehibridación con otra sonda sin aumentar excesivamente el ruido de fondo.

1.-Lava la membrana de 1-5 min en H₂O a T^a ambiente.

2.-Incubar la membrana en solución de deshibridación a 37 °C 2 veces durante 20 min en el horno.

3.-Lavar la membrana a T^aA 2 veces durante 10 min en SSC 2x.

SOLUCIÓN de HCl 250 mM:

HCl 37 %.....25 ml
H₂O autoclavada.....1 l
No autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

Citrato sódico.....0,3 M
Ajustar a pH=7 con HCl.
Autoclavar 20 min a 120 °C.
Conservar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN de NEUTRALIZACIÓN:

Tris-HCl (pH=7,2).....500 mM
NaCl.....1,5 M
EDTA (pH=8).....1 mM
Autoclavar 20 min a 120 °C.
Conservar a temperatura ambiente.

TAE 50x:

Tris-Acético pH=7,8.....2 M
EDTA.....100 mM
Autoclavar 20 min a 120 °C.

SSC 20x:

NaCl.....3 M

SOLUCIÓN de DESNATURALIZACIÓN:

NaOH.....500 mM
NaCl.....1,5 M
Autoclavar 20 min a 120 °C.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Conservar a temperatura ambiente. SDS.....0,1 %
No autoclavar.

TAMPÓN de MUESTRA:

Azul de bromofenol.....0,25 % (p/v)
Glicerol.....30 % (v/v)
No autoclavar.

SOLUCIÓN de DESHIBRIDACIÓN:

NaOH.....0,2 M

V.5.2.3. Sondas utilizadas en los experimentos de *northern-blot*.

Para los experimentos de *northern-blot* se utilizaron sondas marcadas con dCTP-³²P. Para ello, se ha utilizado el “*Ready-To-Go DNA labelling beads*” (*-dCTP*) (*Amersham-Pharmacia Biotech*). El trabajo con isótopos radioactivos de este tipo requiere extremar las precauciones, en el sentido de evitar en lo posible la exposición directa a las partículas β emitidas, altamente penetrantes. Con esa finalidad, se trabaja siempre vistiendo dos pares de guantes y bata, protegiéndose de la fuente de radioactividad mediante mamparas de metacrilato. Asimismo, debe controlarse periódicamente la zona con un contador Geiger, así como respetar las normas al efecto para el tratamiento de residuos marcados radioactivamente con isótopos del P.

Materiales:

- [α -³²P]dCTP a 3000Ci/mmol (*Amersham Pharmacia Biotech*).
- *Ready-To-Go DNA labelling beads* (*-dCTP*) (*Amersham-Pharmacia Biotech*).
- Bloque térmico.
- Contador Geiger.
- Sonda ADN desnaturalizada.
- EDTA 0,5 M.
- Columnas cromatográficas *Poly-prep* (0,8x4cm) de *BioRad*.
- Resina *Sephadex G-50 SF* (*Amersham-Pharmacia Biotech*).
- Tampón TE.
- Contador de centelleo *1209 Rackbeta* de *Wallac*.

Método:

El kit de marcaje contiene una mezcla de reacción liofilizada y estable a T³A que contiene el tampón de reacción, mezcla de desoxinucleótidos (excepto dCTP), la subunidad Klenow de la ADN polimerasa así como una combinación aleatoria de oligodesoxinucleótidos de 9 bases. El sistema permite marcar radioactivamente fragmentos de restricción previamente purificados y desnaturalizados mediante una reacción de polimerización que utiliza los oligodesoxinucleótidos como cebadores. Los siguientes moldes fueron

utilizados en cada caso:

-*DXS1*: Como molde en la reacción de polimerización se utilizó el fragmento de restricción con EcoRV del clon H2A12, resultando en un fragmento de 829 pb correspondiente a la región 5' del gen *DXS1*.

-*DXS2*: La digestión de los sitios BglII y BamHI sobre el vector pLBSDXS2.2 (apdo. V.5.4.2), liberó un fragmento de 288 pb en el extremo 5' conteniendo la región 5' transcrita no traducida en la zona menos conservada con su homólogo *DXS1*.

-*DXR*: A partir de la construcción pDXRA1.3 (apdo. V.5.4.1) y tras digestión con la enzima de restricción EcoRV se recuperó un fragmento de 1378 pb procedente de la zona 5' del gen *DXR*.

1.-Desnaturalizar unos 50-100 ng de molde hirviendo durante 5 min a 95-100°C y pasando a continuación a hielo al menos 2 min más.

2.-Preparar la siguiente mezcla de reacción sobre el preparado del kit:

MEZCLA de REACCIÓN:

ADN molde desnaturalizado.....≈100 ng

[α -³²P]dCTP.....50 μ Ci

H₂O c.s.p.....50 μ l

3.-Incubar de 30 min a 1 hora en bloque térmico a 37 °C.

4.-Detener la reacción de la polimerasa agregando 2 μ l de EDTA 0,5 M, y pasar a hielo.

5.-Preparar una columna de cromatografía con 1 ml de resina *Sephadex-G50*. Lavar con tampón TE evitando en todo momento que llegue a secarse.

6.-Una vez eluida la columna completar la mezcla de reacción con TE hasta 200 μ l, y pasar por la columna, recuperando el volumen eluido en un tubo de microcentrífuga. Repetir el proceso 4 veces más, añadiendo en cada caso 200 μ l de TE y recuperando el eluido en un tubo nuevo.

7.-Recuperar alícuotas de 1 μ l de cada fracción eluida en un tubo de centelleo.

8.-Determinar la actividad de cada fracción en un contador de centelleo.

En función de los resultados obtenidos, aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad total de marca radioactiva a utilizar:

$\text{Vol. Sonda (en } \mu\text{l)} = \frac{[1-2 \times 10^6 \text{ c.p.m./ml}] \times [\text{vol (en ml) de sol de hibridación/activ sonda (en c.p.m./}\mu\text{l)}]}{[1-2 \times 10^6 \text{ c.p.m./ml}]}$

9.-Añadir el volumen resultante a la solución de hibridación, desnaturalizando previamente la sonda

como se indicó en 1.

V.5.2.4. Northern-blot.

El *northern-blot* constituye la técnica de referencia para la identificación y el análisis de transcritos de ARN. A la hora de trabajar con ARN, deben seguirse las precauciones referidas en el apartado V.4.3.2.

Materiales:

- Material de vidrio horneado.
- DEPC.
- Liofilizador- evaporador.
- Tampón de desnaturalización.
- Marcador de pesos moleculares de ARN: *0.24-9.5 Kb RNA ladder* de *Life Technologies* o *RNA Molecular Weight Marker I* (0,3-6,9 kb) (*Roche*).
- Solución de tinción.
- Solución de hibridación *Express-hyb Solution* (*Clontech*).
- MAE 20x.
- Tampón de carga.
- Membranas de nailon *Hybond N⁺*.
- Papel de filtro *Whatmann 3MM[®]* y papel de filtro normal.
- Solución de Br-Et 1 mg/ml.
- Sistema de electroforesis.
- Sistema de transferencia de geles de agarosa.
- SSC 20x
- SDS 10 %.
- Cámara de ultravioleta (*Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker* de *Spectronics Co.*) y estufa a 80°C.
- Agitador térmico.

Método:

1.-Preparar agarosa al 1,2 %. Una vez atemperado a 50 °C, completar con MAE hasta 1x y con formaldehído hasta un 2,2 %. El formaldehído es un alérgeno fuerte por lo que para evitar la inhalación de vapores fuertemente irritantes es aconsejable verter el gel dentro de una campana de extracción de gases. Este agente garantiza la propiedad desnaturalizante del gel, aunque tiene como contrapartida el hacerlo más quebradizo. Es recomendable además preparar el gel lo más delgado posible, pues facilitará el proceso

posterior de transferencia.

2.-Concentrar las muestras de ARN con la ayuda del liofilizador- evaporador. Se trabajó con cantidades de entre 10-20 µg de ARN.

3.-Desnaturalizar las muestras: Llevar hasta 20 µl con tampón de desnaturalización e incubar 10 min a 65°C. Enfriar y mantener en hielo hasta que sean sembradas en el gel.

4.-Añadir 3,22 µl de tampón de carga.

5.-Llenar la cubeta con MAE 1x hasta cubrir someramente el gel. Cubrir el gel salvo la zona de pocillos con plástico *Saram-Wrap*. El plástico evitará la evaporación del formaldehído del gel, manteniendo en todo momento la cualidad desnaturalizante del mismo. Con el objeto de limpiar los pocillos del gel puede aplicarse un voltaje reducido antes de cargar.

6.-Sembrar las muestras en el gel. Reservar uno de los pocillos para el marcador. Aplicar un voltaje de 3 V/cm de gel durante 15 min y, una vez que las muestras hayan entrado en el gel, se dejan migrando de 2-3 h a 5-7 V/cm, hasta que el frente de migración haya alcanzado los 2/3 de la longitud del gel. Es conveniente mezclar cada ½-1 hora la solución de migración de ambos lados de la cubeta, con tal de asegurar la conductancia del mismo, sobre todo teniendo en cuenta que la presencia del gel impide su recircularización.

7.-Verificar, con ayuda del transiluminador, la integridad de las muestras de ARN en el gel. Fotografiar el gel acompañado de una regla que permita precisar posteriormente sobre la película de autoradiografía el tamaño de la banda resultante. La imagen servirá, además, para normalizar los carriles en cuanto a la cantidad de ARN cargado.

8.-Lavar el gel 2 veces durante 20 min con H₂O para eliminar el exceso de formaldehído y Br-Et.

9.-Llevar a cabo la transferencia y la fijación de la membrana, del mismo modo descrito para el *Southern-blot* (apdo. V.5.2.2, puntos 7 a 9).

Hibridación:

Aún existiendo ciertas particularidades propias a la hibridación ARN:ADN, en general es válido lo descrito en el apartado correspondiente al *Southern-blot* respecto de los lavados de la membrana. La primera singularidad deriva del uso de la formamida en las soluciones de hibridación, admitiendo menores temperaturas, que minimizan además la degradación del ARN durante la incubación. No obstante, y por regla general, se ha utilizado la solución *Express-hyb Solution (Clontech)* siguiendo las instrucciones del proveedor:

1.-Lavar la membrana 10 min en SSC 2x.

2.-Prehibridación: Mantener la membrana al menos 1 hora a 65 °C en el tubo de hibridación que contiene la solución. Utilizar alrededor de 1-2 ml/10 cm² de membrana.

3.-Sustituir la solución de prehibridación por solución de hibridación suplementada con la sonda marcada con dCTP-³²P (apdo. V.5.2.3.), previamente desnaturalizada. Dejar incubar la membrana a 65 °C

toda la noche en el horno giratorio.

Lavados de membrana:

Se siguieron las instrucciones del proveedor de la solución de hibridación, obteniéndose resultados óptimos bajo las siguientes condiciones:

1.-3 lavados durante un total de 40 min a T^a ambiente en SSC 2x/SDS 0,05 %.

2.-2 lavados de 20-25 min a 50°C en SSC 0,1x/SDS 0,1 %.

3.- Retirar la membrana del tubo y eliminar la última solución de lavado. Poner a contactar con una película de autoradiografía el tiempo necesario hasta obtener una imagen satisfactoria. Se utilizaron dos tipos diferentes de películas fotográficas: “*Hyperfilm MP*” (AMERSHAM-Pharmacia Biotech) y “*BIOMAX MS*” (KODAK). Aquella es adecuada para la detección de bandas muy tenues ya que disminuye considerablemente los tiempos de exposición debido a su elevada sensibilidad fotográfica. El uso de las películas KODAK, aunque de una sensibilidad inferior, ofrece autoradiografías mucho más nítidas y limpias que las obtenidas con aquellas. En función del grado de decaimiento de la marca y de la abundancia relativa del transcrito a estudio fueron necesarios entre 12 horas y 14 días de contacto para obtener resultados satisfactorios.

Tinción de la membrana:

Este método permite teñir específicamente el ARN sobre una membrana de nailon con la ayuda del azul de metileno. De esta manera, se pueden comparar las cantidades de ARN que han sido eficientemente transferidas a la membrana:

1.-Incubar 30 min en SDS 1 % a T^aA para eliminar los restos de colorantes vitales del tampón de carga.

2.-Lavar 3 veces en H₂O a T^aA para eliminar el exceso de SDS.

3.-Teñir con solución de tinción de 5-10 min.

4.-Lavar en H₂O 2 ó 3 períodos de varios minutos hasta que se resuelvan correctamente las bandas de ARNr.

Deshibridación de la membrana:

Se consiguen resultados satisfactorios utilizando la misma membrana para varias rehibridaciones, siempre y cuando no llegue a secarse completamente.

1.-Lavar la membrana en H₂O.

2.-Llevar a ebullición una solución de SDS al 1 % sobre un agitador térmico.

3.-Sumergir la membrana y mantener unos 5 min.

4.-Lavar en H₂O a T^a ambiente seguido de SSC 2x.

5.-Proceder a la rehibridación con la nueva sonda desde el paso de hibridación.

MAE 20x:

MOPS.....0,4 M
 Acetato sódico.....200 mM
 EDTA 0,4 M.....20 mM
 H₂O mili Q-DEPCc.s.p
 Ajustar a pH=7 con lentejas de NaOH.
 Autoclavar 20 min a 120 °C.
 Conservar a 4 °C y protegido de la luz.

TAMPÓN de CARGA:

EDTA pH=8.....1 mM
 Glicerol.....50 % (v/v)
 Azul de bromofenol.....0,25 % (v/v)
 Xileno-cianol.....0,25 % (v/v)
 H₂O mili Q-DEPC.....c.s.p.
 Conservar a T^aA.

SOLUCIÓN de TINCIÓN:

Azul de metileno.....0,04 % (p/v)
 Acetato sódico pH=5,2-5,6.....500 mM
 H₂O mili Q-DEPC.....c.s.p.

TAMPÓN de DESNATURALIZACIÓN (30 muestras):

H₂O mili Q-DEPC.....236 µl
 MAE 20x.....30 µl
 Br-Et 1mg/ml.....8 µl
 Formaldehído.....30 µl
 Formamida.....300 µl
 Preparar en la campana antes de usar.

V.5.2.5. Detección quimioluminiscente.

Los ácidos nucleicos marcados con digoxigenina sobre una membrana pueden detectarse gracias a un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina. La señal se pone de manifiesto gracias al reactivo *CDP-Star*. Se trata de un 1,2-dioxietano cloro-sustituido, sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina que genera un intermediario metaestable defosforilado cuya descomposición emite luz a una longitud de onda de 466 nm. El máximo de señal lumínica generado se alcanza unos minutos después de la reacción y es estable al menos 1-2 días sobre membranas de nailon.

Materiales:

- Agitador orbital
- Solución B1.
- *Tween 20*.
- Solución B2.
- Reactivo de bloqueo específico para protocolos de detección de ADN marcado con digoxigenina (*Roche*).
- Anticuerpos ANTI-Digoxigenina (fragmentos Fab) acoplados a fosfatasa alcalina (*Roche*).
- Solución B3.
- Solución de lavado.
- *CDP-Star (Roche)*.

1.-Hacer un primer lavado de la membrana en un recipiente adecuado con solución de lavado 5 min a T^a ambiente y en el agitador orbital.

2.-Acto seguido, lavar 30 min en un volumen fijo de solución B2 de manera que cubra completamente la membrana. Mantener en agitación.

3.-Añadir Anti-DIG-AP según una relación 1/10000-1/20000. Para ello, debe retirarse la membrana momentáneamente el tiempo de asegurar la correcta resuspensión del anticuerpo en la solución B2. Incubar otros 30 min, siempre con agitación.

4.-Continuar con 2 lavados de al menos 30 min, que pueden prolongarse al menos hasta 2 horas, en solución de lavado.

5.-Traspasar la membrana unos 5 min a solución B3 para equilibrarla. Guardar unos ml (3-5) para resuspender el sustrato quimioluminiscente.

6.-Diluir el sustrato quimioluminiscente *CDP-Star* hasta 1/100-1/200 en solución B3 y aplicarla sobre la membrana durante 5 min con ayuda de la pipeta, barriendo la superficie de la misma en todas direcciones para asegurar su distribución homogénea sobre la membrana.

7.-Una vez seca la membrana, se cubre con plástico y se pone a contactar con una película de autoradiografía. Se harán entonces una serie de revelados a distintos tiempos de exposición (10 seg-5 min deberían bastar).

SOLUCIÓN B1:

Ácido maléico.....100 mM
NaCl.....150 mM
Ajustar el pH a 7,5 con NaOH.
Autoclavar 20 min a 120 °C.

SOLUCIÓN B2:

Solución de bloqueo.....1/10 (v/v)
Preparar el reactivo de bloqueo al 10 % en B1. Autoclavar. Con esta solución de bloqueo se prepara la B2 en solución B1. Conservar a 4 °C.

SOLUCIÓN de LAVADO:

Tween 20.....0,3 % (v/v)
Preparar esta solución en B1.

SOLUCIÓN B3:

Tris-HCl (pH=9,5).....100 mM
NaCl.....100 mM
MgCl₂.....5 mM

V.5.3. Hibridación de proteínas: *Western-blot*.

V.5.3.1. Anticuerpos utilizados.

Se han utilizado los siguientes anticuerpos:

-Anti-DXS1 [101]: Este anticuerpo fue amablemente cedido por el grupo de la Dra. Patricia León (Dpto. de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, México). Se obtuvo inmunizando ratones con la proteína de fusión GST-CLA1 (DXS1) purificada mediante cromatografía de afinidad.

-Anti-DXR: Mediante el uso de aplicaciones de software (apdo. V.6.1) se predijo la región incluida entre los residuos 71 y 81 de la proteína DXR como la más antigénica. Efectivamente, los valores óptimos de hidrofiliidad, flexibilidad estructural, probabilidad de exposición a la superficie, capacidad antigénica,

anfifilicidad y capacidad de organizarse en estructuras secundarias aconsejaron la elección del péptido con la secuencia Glu-Ala-Pro-Arg-Gln-Ser-Trp-Asp-Gly-Pro-Lys dispuesta entre aquellas posiciones a tales efectos. Dicho péptido fue sintetizado e inyectado (*Sigma*) en 2 conejos (N° 2003 y 2004). Tras 35 días de inmunización se recuperaron sangrados, cada dos semanas, hasta completar 4. Los estudios previos de titulación realizados sobre los sueros resultantes sugirieron el uso del 3^{er} sangrado del conejo N° 2003.

V.5.3.2. SDS-PAGE.

La electroforesis de geles de poliacrilamida en presencia de SDS, permite la separación efectiva y sencilla de las proteínas de una muestra. La porosidad del gel, las propiedades del tampón de migración y los parámetros de la electroforesis permite afinar las condiciones para mejorar la resolución.

Materiales:

- Fuente de voltaje.
- Equipo de electroforesis “*Mini-Protean II*” (*BioRad*).
- Tampón de migración.
- Tampón de desnaturalización.
- Isopropanol.
- Indicador de pesos moleculares para proteínas: “*Prestained SDS-PAGE Standards-Low Range*”, *BioRad* y “*Molecular weight marker 14-70 KDa*”, *Sigma*.
- Acrilamida/N,N'-metilen-bis-acrilamida 40 %.
- Tris-HCl pH=6,8 0,5 M y Tris-HCl pH=8,8 1,5 M
- Persulfato amónico.
- TEMED.
- Metanol.
- Membranas de PVDF (*Hybond-P, Amersham-Pharmacia Biotech*).
- Papel *Whatmann 3MM*.
- Sistema de transferencia proteica sobre membranas de PVDF (*Mini Trans-Blot, BioRad*).
- Solución de Zeller.
- Tampón de transferencia.
- Solución de tinción y destinción.
- Agitador orbital.
- Anticuerpos anti suero de conejo unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) y anticuerpos anti-suero de ratón unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) (*Amersham-Pharmacia Biotech*).

- Sistema de detección quimioluminiscente para antígenos conjugados a la HRP e inmovilizados sobre membranas de PVDF (“ECL+Plus Western blotting detection system”, Amersham-Pharmacia Biotech).

Método:

SDS-PAGE:

1.-Montar el sistema de preparación de geles. Adicionar H₂O unos minutos antes de verter el gel separador para confirmar que el ensamblaje de los vidrios deja un compartimiento completamente estanco. Retirar el agua y secar con papel de filtro antes de verter el gel apilador hasta 5 cm de altura. Añadir unas gotas de isopropanol de manera que cubra la superficie expuesta al oxígeno atmosférico, que inhibiría la polimerización. Dejar polimerizar el gel unos 20-30 min. No prolongar este paso más de una hora pues el alcohol provocaría la deshidratación del gel.

2.-Desechar el isopropanol y limpiar la superficie del gel con H₂O. Añadir gel apilador hasta el extremo superior de los vidrios, y encajar inmediatamente el peine correspondiente con el número de pocillos adecuado al número y volumen de muestras que vayan a ser cargadas. Aunque transcurridos otros 20-30 min se ha completado la polimerización, no es hasta unas 2 horas más tarde cuando está asegurada la homogeneidad en el tamaño de poro del gel. Marcar con un rotulador la base de los pocillos para poder visualizarlos posteriormente en el momento de cargar las muestras.

Se han utilizado generalmente vidrios de 0,75 mm de espesor y de 8 cm de alto x 10 cm de ancho. Bastan 7 ml de gel separador y 4 de gel apilador para preparar 2 geles de esas dimensiones.

3.-Ubicar el gel en el soporte correspondiente y éste a su vez en la cubeta de electroforesis. Añadir tampón de electroforesis 1x hasta rebasar los pocillos.

4.-Preparar las muestras proteicas preparadas y cuantificadas según se describe en el apartado V.4.4. Agregar el volumen adecuado de tampón de desnaturalización. Desnaturalizar hirviendo las muestras 5 min a 100°C, practicando un agujero en el tapón del tubo, y pasar a hielo.

5.-A continuación, sembrar con ayuda de una micropipeta o una pipeta Hamilton, dejando los carriles necesarios para cargar el volumen oportuno de marcador. Se analizaron cantidades de entre 10-30 µg de proteína.

6.-Aplicar el voltaje apropiado para la correcta separación de las proteínas contenidas en la muestra. Se fijaron amperajes de 20-40 mA, según el número de geles que estuvieran simultáneamente migrando en el sistema (1 ó 2). Una vez el frente de migración, marcado por el colorante del tampón de desnaturalización, ha alcanzado el extremo inferior del gel, interrumpir la electroforesis.

TAMPÓN de ELECTROFORESIS:

Trizma Base.....0,25 M

Glicina.....1,92 M
 SDS.....1 %
 H₂O destilada.....c.s.p.

TRIS-HCl pH= 6,8 0,5 M:

Trizma Base.....60,5 g
 H₂O miliQ c.s.p.....1 l
 Ajustar el pH a 6,8 con HCl.

TRIS pH=8,8 1,5 M:

Trizma Base.....181,5 g
 H₂O miliQ c.s.p.....1 l
 Ajustar el pH a 8,8 con HCl.

TAMPÓN de MUESTRA (DESNAT.) 4x:

Tris-HCl pH=6,8.....250 mM
 Glicerol.....40 %
 SDS.....8 %
 β -mercaptoetanol.....4 %
 Azul de bromofenol.....0,02 %
 H₂O miliQ c.s.p.....10 ml

Tris pH=8,8 1,5 M.....1,75 ml
 Acrilamida/Bisacrilamida 40 %..1,75 ml
 SDS 10 % SDS.....70 μ l
 PSA 10 % (p/v).....42 μ l
 TEMED.....5 μ l
 H₂O miliQ c.s.p.....7 ml

GEL APILADOR:

Tris pH=6,8 0,5 M.....0,5 ml
 Acrilamida/Bisacrilamida 40 %..0,39 ml
 SDS 10 %.....40 μ l
 PSA 10 % (p/v).....52,5 μ l
 TEMED.....3 μ l
 H₂O miliQ c.s.p.....4 ml
 La acrilamida es neurotóxica, por lo que debe manejarse siempre con guantes.

El Persulfato de Amonio (PSA) se prepara al momento en H₂O, o bien se hacen alícuotas y se congela a -20 °C.

GEL SEPARADOR:

Transferencia e inmunodetección quimioluminiscente:

La técnica de *western-blot* permite detectar la proteína a estudio en los distintos extractos de proteína resueltos mediante *SDS-PAGE*, utilizando anticuerpos específicamente dirigidos contra ella. Para ello, se transfiere la proteína del gel a membranas de PVDF. La membrana se deja entonces hibridar con el anticuerpo primario (apdo. V.5.3.1.). La incubación de la membrana con anticuerpos secundarios anti-IgG acoplados a la peroxidasa de rábano permite la detección quimioluminiscente de la proteína a estudio.

7.-Recuperar el gel y lavar en solución de transferencia unos 10 min. Descartar, con ayuda de un bisturí, el gel apilador.

8.-Lavar 10 seg en metanol absoluto un fragmento de membrana de PVDF de tamaño igual al del gel separador. Eliminar el metanol sobrante lavando 5 min con H₂O y finalmente mantenerla en solución de transferencia hasta que el equipo esté ensamblado. Estos pasos se hacen en una placa de Petri, manteniendo una agitación constante.

9.-Se ha utilizado el sistema de *BioRad "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell"* como equipo de transferencia. El sistema consta de un casete donde se mantiene la membrana íntimamente acoplada al gel de proteína recubriendo el conjunto por ambos lados con 3 hojas de papel *Whatmann 3MM* y una esponja. Un armazón diseñado al efecto mantiene hasta dos de aquellos casetes entre electrodos paralelos, que serán los que estimulen la transferencia. Este armazón se encaja en una cubeta, donde se añadirá una pieza de hielo que evitará la excesiva subida de temperatura que tiene lugar durante el proceso de transferencia como

consecuencia de los voltajes aplicados. A la hora de poner gel y membrana en contacto se debe evitar en lo posible la formación de burbujas de aire que interfieran en el proceso de transferencia de proteínas, o eliminar las que se hubiesen generado valiéndose para ello de una pipeta.

10.-El proceso de transferencia se prolonga durante al menos 1 hora (en el caso de geles de 1,5 mm de espesor media hora más) aplicando un voltaje constante de 100 V. Para mantener la temperatura del sistema homogénea se mantiene la solución de transferencia en constante agitación todo el proceso, además de llevarse a cabo a 4 °C.

11.-Transcurrido este tiempo se recupera la membrana. Una muesca en una esquina puede servir de ayuda para orientar posteriormente la cara de la membrana que estuvo en contacto con el gel durante la transferencia y poder identificar así los tamaños de las bandas detectadas.

12.-Se realiza un lavado de unos minutos en PBS 1x pH=7,6 con el objeto de eliminar restos de acrilamida que puedan haber quedado adheridos a la membrana.

13.-Lavar la membrana 2 veces 5 min en solución de Zeller. Durante este paso se persigue el bloqueo de los posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo primario a la membrana. Aunque el protocolo convencional refiere la utilización de leche en polvo desnatada al 5 % y Tween 20 al 0,1 % (v/v) en PBS 1x, los resultados obtenidos con la solución de Zeller fueron más satisfactorios.

14.-Incubar la membrana durante toda una noche a 4°C con la dilución adecuada de anticuerpo primario en solución de Zeller. Se utilizaron las siguientes diluciones:

-Anti-DXS: 1/500-1/1000.

-Anti-DXR: 1/200.

15.-Lavar de nuevo la membrana con solución de Zeller durante dos períodos de 5 minutos a T^a ambiente.

16.-Incubar la membrana con solución de Zeller conteniendo la dilución adecuada de anticuerpo secundario. Se utilizó una dilución de 1/10000 para ambos anticuerpos secundarios utilizados:

-Anticuerpos anti-suero de conejo unidos a la peroxidasa de rábano.

-Anticuerpos anti-suero de ratón unidos a la peroxidasa de rábano.

17.-Realizar un último lavado de la membrana en solución de Zeller durante 5 min.

18.-3xlavados en PBS pH=7,6 de 5 min cada uno.

19.-Llevar a cabo un último lavado en agua otros 5 min.

20.-Para el proceso de detección se incuba la membrana durante 5 min protegida de la luz en un volumen suficiente de los reactivos del sistema de detección (*ECL+Plus*), preparados según las proporciones descritas por el proveedor. Transcurrido este tiempo, envolver la membrana en una funda de plástico

transparente y eliminar el exceso de reactivo con la ayuda de papel secante de manera que no queden burbujas de aire entre la membrana y la funda que la envuelve.

21.-A continuación, se realizan los contactos con las películas de autoradiografía, haciendo pruebas sucesivas a distintos tiempos (normalmente de varios segundos a 10-15 minutos como máximo), hasta obtener una resolución y contraste óptimos de la imagen. Considerar que el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa presente en la solución de detección tiene una estabilidad de alrededor de 1 hora, por lo que es importante sincronizar el momento de la detección y los contactos posteriores.

SOLUCIÓN de TRANSFERENCIA:

Trizma Base.....	3 g
Glicina.....	14 g
Metanol (opcional).....	200 ml
H ₂ O destilada c.s.p.....	1 l

PBS 10x pH=7,6

Na ₂ HPO ₄	0,8 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
NaCl.....	0,1 M

SOLUCIÓN de ZELLER:

Tris-HCl pH=7,3.....	100 mM
MgCl ₂	100 mM
Tween-20.....	0,5 %
Tritón X-100.....	1 %
BSA (Albúmina Sérica Bovina).....	1 %
FCS (Suero Fetal Bovino).....	5 %
Alicuotar y conservar a -20°C.	

Tinción de proteínas:

La tinción de gel y membrana resulta de gran ayuda a la hora de visualizar la eficiencia de la transferencia, la integridad de la proteína, así como para confirmar la normalización en la carga entre los diferentes carriles. Dos son las soluciones de tinción más comúnmente usadas, la primera, basada en el azul de Coomassie, resulta en una tinción más intensa, pero tiene el inconveniente de resultar irreversible. La segunda, compuesta de rojo Ponceau S, es más débil, pero fácilmente eliminable con H₂O.

- 1.-Colocar la membrana en solución de tinción durante 5-10 min a T^a ambiente y con agitación.
- 2.-Desteñir la membrana en agua durante unos min (para soluciones de rojo Ponceau S) o en solución de destinción (soluciones de azul de Coomassie), reemplazando el líquido de lavado correspondiente cuantas veces sea necesario hasta que la relación entre la intensidad de las bandas y el ruido de fondo resulte óptima.
- 3.-Prolongando el lavado con agua de las membranas teñidas con rojo Ponceau S se consigue eliminar el colorante ligado a la proteína, lo que habrá de considerarse si se desea fotografiar la membrana.

SOLUCIÓN de PONCEAU S:

Rojo Ponceau S.....	0,5 g
Ácido acético glacial.....	1 ml
H ₂ O destilada c.s.p.....	100 ml

Ácido acético glacial.....25 ml
H₂O destilada c.s.p.....250 ml

SOLUCIÓN de COOMASSIE:

Azul brillante de Coomassie.....0,6 %
Metanol.....100 ml

SOLUCIÓN de DESTINCIÓN:

Ác. acético glacial.....10 %
Metanol.....40 %

Deshibridación de la membrana:

Tras la detección, la membrana puede someterse a un proceso de lavado del suero unido a fin de repetir la inmunodetección en diferentes condiciones o rehibridando con otros anticuerpos. El siguiente procedimiento permite llevar a cabo, de modo sencillo, este propósito:

1.-Incubar la membrana en un tubo de hibridación con solución S durante 30 min a 50°C. Se puede utilizar al efecto un horno de hibridación giratorio.

2.-Recuperar la membrana y lavar durante 2 etapas de unos 10 min en abundante PBS 1x a pH=7,6.

3.-Finalmente continuar con el proceso de inmunodetección descrito por el paso 13.

SOLUCIÓN S

Tris-HCl pH=6,7.....62,5 mM
β-mercaptoetanol.....100 mM
SDS.....2 %
Preparar en el momento de usarla.

V.5.4. Técnicas basadas en la utilización de ADN polimerasas termoestables.

V.5.4.1 .Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ha sido utilizada para multitud de aplicaciones a lo largo de este trabajo. Cada una de ellas contempla variaciones específicas, que se describen brevemente.

Materiales:

- Termociclador (modelo "*Mastercycler personal*", Eppendorf).
- Taq ADN polimerasa o Pfu ADN polimerasa (ADN polimerasas termoestables) y sus tampones de reacción correspondientes.
- Mezcla de dNTPs a 2,5 y 10 mM.
- Tubos de pared fina de 0,2 ó 0,5 ml.
- Oligonucleótidos a 5-10 μM.

Método:

Clonaje de ADNc:

Una de las aplicaciones más interesantes de la técnica de *PCR* es la de rescatar fragmentos de ADN a partir de moldes diversos. Se describe, como ejemplo de la utilización de esta técnica, la estrategia experimental planteada con el objeto de clonar el ADNc del gen *DXR* de *Arabidopsis*.

REACCIÓN:

*Molde.....ADNc
 dNTP.....0,2 mM
 Tampón de actividad.....1x
 Oligonucleótido DXR-34.....0,5 mM
 Oligonucleótido DXR-E2.....0,5 mM
 Pfu ADN polimerasa.....1,25 u
 H₂O miliQ autoclavada c.s.p.....25 µl

PROGRAMA PCR:

**"Hot start"
 Desnaturalización.....30 seg/94°C
 Anillamiento.....40 seg/55°C
 Extensión.....6,5 min/72°C
 Repetir 34xciclos.
 Extensión final.....15 min/72°C

Una segunda etapa de *PCR*, a partir de 0,5 µl del producto anterior bajo las mismas condiciones durante 15 ciclos y en un volumen final de 50 µl, permitió rescatar el producto deseado, que fue posteriormente purificado del gel de agarosa y finalmente clonado en el vector pBLUESCRIPT-SK⁺, obteniéndose pDXRAT.3.

*Como molde fueron utilizadas 4×10^5 unidades formadoras de calva de una librería de ADNc generada a partir de la suspensión celular T-87 de *A. thaliana* [16], previamente purificadas por etanol.

**La técnica de "Hot start" consiste en añadir la enzima ADN polimerasa en el momento en que el termociclador ha alcanzado la temperatura deseada, reduciendo la generación de productos inespecíficos resultantes de la hibridación de los cebadores a moldes no homólogos que puede tener lugar a bajas temperaturas.

Escrutinio de colonias:

La técnica de *PCR* puede también utilizarse para determinar la presencia de un inserto directamente sobre la colonia bacteriana resultante de una transformación. Para ello, basta añadir como molde a la reacción de *PCR* siguiente una punta de pipeta puesta en contacto con la colonia que se desee analizar.

REACCIÓN:

dNTPs.....0,2 mM
 Tampón de actividad.....1x
 Oligonucleótido sentido.....0,5-1 µM
 Oligonucleótido antisentido..0,5-1 µM
 Taq ADN polimerasa.....1-2 u
 H₂O miliQ autoclavada c.s.p.....10 µl

PROGRAMA PCR:

Desnaturalización.....3 min/95°C
 Desnaturalización...30 seg-1 min/94°C
 *Anillamiento....30 seg-1min/T^a≈T_M-5°C
 Extensión.....30 seg-1min/72°C
 Repetir 29xciclos desde el paso 2
 Extensión final.....6 min/72°C

*La T_M es una propiedad específica de cada oligonucleótido, que refiere la temperatura a la que la mitad de las moléculas de ADN bicatenarias se encuentran desnaturalizadas. Como regla general, se utiliza una temperatura de anillamiento al menos 5°C inferior a la T_M más baja del par de oligonucleótidos utilizados. Para oligonucleótidos de longitud menor a 24 nucleótidos se ha considerado la aproximación dada por la siguiente fórmula:

$$T_m = [4 \times (C + G)] + [2 \times (A + T)]$$

Para cebadores de longitud mayor, y en general aquellos con regiones del oligo inespecíficas, se aplicó esta otra:

$$T_m = [81,5 + (0,41 \times \% \text{ GC}) - (675/n) - ((m/n) \times 100)]^\circ\text{C}$$

, donde n es la longitud del oligonucleótido, % G+C es el porcentaje de bases G o C en la composición del mismo y m es el número de bases del oligonucleótido que no poseen homólogo en el ADN molde correspondiente.

Finalmente, hay que considerar que los tiempos de cada etapa en la *PCR* se ajustan en función de la longitud del fragmento que se desee amplificar, considerando que la Taq ADN polimerasa es capaz de sintetizar 2 kb ADN/min, mientras que la actividad de la enzima Pfu se reduce a 0,5 kb ADN/min.

Análisis de líneas transgénicas:

Partiendo del ADN preparado según se describe en el apartado V.4.3.1. (minipreparación de ADN genómico) y siguiendo este programa de *PCR* puede verificarse de forma sencilla la presencia del transgén a estudio en una planta.

REACCIÓN:

dNTPs.....0,2 mM
 Tampón de actividad.....1x
 Oligonucleótido sentido.....0,5-1 µM
 Oligonucleótido antisentido..0,5-1 µM
 Taq ADN polimerasa.....1-2 u
 H₂O miliQ autoclavada c.s.p.....10 µl

PROGRAMA PCR:

Desnaturalización.....5 min/95°C
 Desnaturalización..... 1 min/94°C
 Anillamiento.....1 min/T^a≈T_M-5°C
 Extensión.....1-2 min/72°C
 Repetir 29xciclos desde el paso 2
 Extensión final.....6 min/72°C

Mutagénesis:

Distintas han sido las aproximaciones basadas en la *PCR* utilizadas para llevar a cabo proyectos de mutagénesis. Utilizando los oligonucleótidos pertinentes y mediante sencillas reacciones de *PCR* se pueden crear sitios de restricción adecuados al clonaje a realizar. Para este uso resulta especialmente atractiva la enzima Pfu ADN polimerasa, debido a su capacidad correctora de errores.

La mutagénesis dirigida o la delección de fragmentos basadas en la *PCR* utilizando la enzima Pfu ADN polimerasa seguiría un esquema como el representado en la Figura V.4.

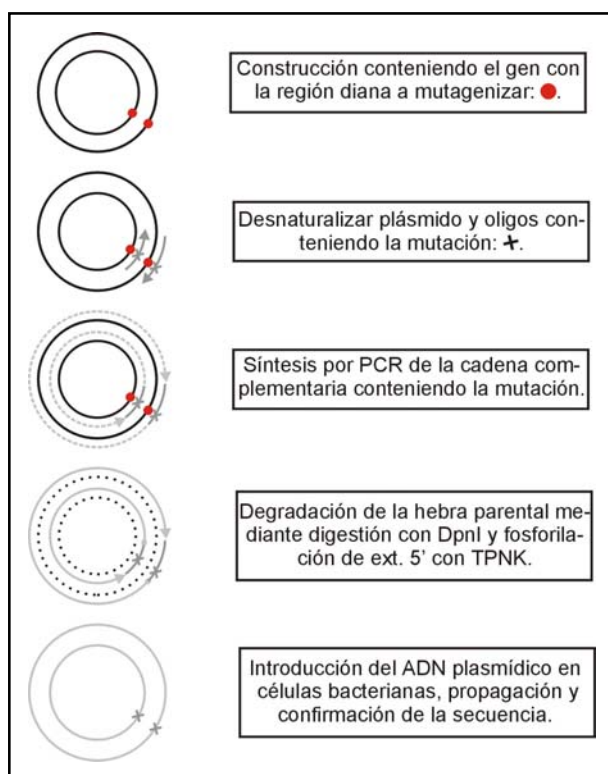


Figura V.4: Representación esquemática de la mutagénesis dirigida basada en la PCR. La enzima de restricción *DpnI* tiene la particularidad de cortar únicamente sitios metilados, atacando exclusivamente las hebras parentales. (TPNK: Polinucleotido kinasa terminal). Una estrategia similar fue diseñada para la generación de la construcción *pLBAD-At.DXS2-CCdom* (apdo. V.5.4.1).

V.5.4.2. RT-PCR.

Esta técnica combina la capacidad de la enzima Transcriptasa Reversa (RT), para sintetizar una cadena de ADNc a partir de un molde específico de ARN, con la facultad de amplificar secuencias nucleotídicas específicas que proporciona la técnica de *PCR*. Sus aplicaciones son múltiples como, por ejemplo, la de generar productos con la secuencia de ADNc deseada para su clonaje. Se detallan a continuación las condiciones seguidas en el proceso de clonaje del ADNc del gen *DXS2*, utilizando para ello el paquete "*RETROscript*" (*Ambion*) y siguiendo básicamente las indicaciones del proveedor, como modelo para otros experimentos de *RT-PCR*.

1.-Desnaturalización del molde:

REACCIÓN:

ARN total.....1-2 µg
 Mezcla de nucleótidos 50 µM.....2 µl
 H₂O miliQ c.s.p.....16 µl

PROGRAMA PCR:

Desnaturalización.....3 min/80°C

Se utilizó una mezcla de oligonucleótidos de 10 bases de longitud con el objeto de aumentar el rendimiento en el paso siguiente de síntesis de la cadena de ADNc. La decisión vino motivada por evidencias que sugerían que el molde sería limitante. La temperatura de desnaturalización se ajustó en función del porcentaje de bases G+C. Finalmente añadir que, en los periodos comprendidos entre cada paso, la muestra se mantenía en hielo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

2.-Reacción de RT:

REACCIÓN (añadir):

Tampón de RT 10x.....2 µl
Mezcla de dNTPs 2,5 mM.....4 µl
"RNase inh".....1 µl
Transcriptasa reversa (MMLV-RT)* 1 µl
H₂O miliQ c.s.p.....20 µl

PROGRAMA PCR:

Incubación.....1 h/42°C
Inactivación enzima.....10 min/92°C
*: Transcriptasa Reversa del virus de la leucemia murina de Moloney.

3.-Reacción de PCR:

REACCIÓN (añadir):

Tampón de PCR 10x.....2 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM.....4 µl
Reacción de RT.....1-5 µl
OLIGO DXS2.S1 10µM.....1 µl
OLIGO DXS2.S4 10µM.....1 µl

PROGRAMA PCR:

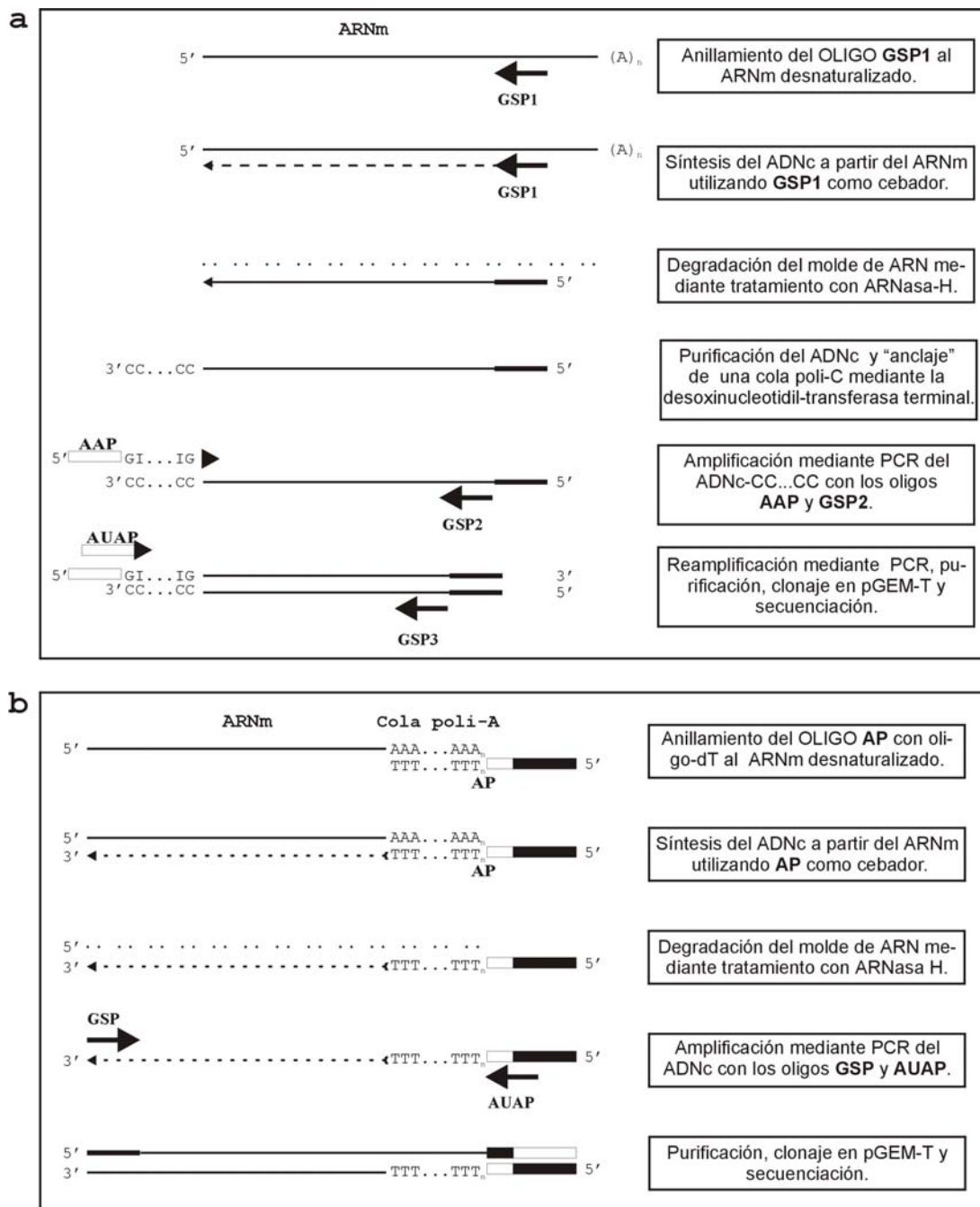
Desnaturalización.....3 min/95°C
Desnaturalización.....1 min/94°C
Anillamiento.....1 min/53°C
Extensión.....4 min/72°C
Repetir 34xciclos desde paso 2°.
H₂O miliQ c.s.p.....50 µl
Pfu ADN polimerasa.....1 µl

La reamplificación por PCR de una alícuota de 0,1 µl del producto obtenido permitió aumentar el rendimiento de la reacción, obteniéndose el producto deseado. En esta segunda etapa, el número de ciclos se redujo hasta 25, aumentándose la T^a de anillamiento en 2°C. El producto resultante fue aislado en gel, purificado y clonado en pBLUESCRIPT-SK⁻ mediante una reacción de ligación-restricción utilizando el sitio SmaI de la región de policlonaje. El plásmido final fue denominado pLBSDXS2.2.

RACE:

La técnica de RACE (Amplificación rápida de extremos de ADNc) constituye una variante de la técnica de RT-PCR que permite determinar de manera sencilla y fiable los extremos 5' o 3' de un transcrito a estudio. La dificultad de la técnica viene impuesta por conocer únicamente la secuencia de la región interna del ADNc a analizar. En el caso de la RACE 3' esta limitación se supera utilizando oligo-dT que anilla específicamente con la cola poli-A común a todos los ARNm eucarióticos en su extremo 3'. Para la RACE 5' se utiliza el potencial de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal, capaz de "anclar" colas homopoliméricas al extremo 3' del ADNc sintetizado. Finalmente, reacciones de PCR anidadas incrementarán la especificidad del producto amplificado. La Figura V.5 ilustra sinópticamente cada una de los 2 procedimientos.

Figura V.5: Representación esquemática de las técnicas de RACE5' (a) y RACE3' (b). GSP: "Gene Specific Primer" o cebador gen específico. Los oligonucleotidos AAP, AP y AUAP fueron proporcionados por el sistema de RACE5' y 3' del proveedor (Life Technologies).



V.5.4.3. Secuenciación.

Se ha utilizado el sistema "ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction" kit v.2.0 (Perkin-Elmer Biosystems). El sistema contiene una mezcla de terminadores etiquetados con marcadores fluorescentes, deoxinucleósidos-trifosfato, tampón de reacción, MgCl₂, y una versión mejorada de la Taq ADN polimerasa. De esta manera, basta con añadir a la mezcla de reacción el molde de ADN sobre el que queremos realizar la entrada de secuencia y el oligonucleótido correspondiente.

REACCIÓN:

Mecla de reacción.....4 µl
ADN plasmídico.....50-200 ng
OLIGO 10 µM.....0,3 µl (1,6 pmol)
H₂O miliQ autoclavada q.s.p.....10 µl

PROGRAMA PCR:

Desnaturalización.....10 seg/96°C
Anillamiento.....10 seg/50°C
Extensión.....4 min/60°C
Repetir 24xciclos.

A continuación, se sigue un paso de purificación de la mezcla de reacción con el objetivo de eliminar en lo posible los restos de terminadores no incorporados, y evitar así interferencias al inicio de la entrada de secuencia:

- 1.-Añadir 26 µl de H₂O miliQ y 64 de etanol al 95 %. Agitar y mantener 15 min precipitando a T^aA.
- 2.-Centrifugar 20 min a 14000 rpm.
- 3.-Eliminar el sobrenadante cuidadosamente con la ayuda de una pipeta.
- 4.-Realizar 2 lavados con 250 µl de etanol al 70 % seguidos de centrifugaciones durante 5 min a 14000 rpm para cada caso. Retirar el sobrenadante
- 5.-Secar el precipitado unos minutos en un bloque térmico a 37 °C.

Finalmente, el personal de la “Unitat de seqüenciació” de los “Serveis Científico-Tècnics” de la Universitat de Barcelona se ocupó de resolver el gel de secuencia y remitir el cromatograma con los resultados correspondientes.

V.6. INFORMÁTICA.

V.6.1. Bioinformática:

Los análisis de restricción de las secuencias de ADN así como los estudios físico-químicos de proteína se llevaron a cabo mediante el paquete *VECTOR NTi* versión 6.0 (*InforMax, Inc*). Los alineamientos se han obtenido utilizando el algoritmo *CLUSTALW* (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>), editándose a continuación con la aplicación *GENE-DOC* v. 2.6.002 (<http://www.cris.com/~ketchup/genedoc/html>). *MEGA* v 2.0 [155] ha sido el programa elegido para elaborar los dendrogramas, contrastando los resultados obtenidos con la aplicación específica para filogenias moleculares incluida en *VECTOR NTi* y basada en el algoritmo de “neighbor-joining” (*NJ*), uno de los cuatro utilizados a su vez por *MEGA*.

V.6.2. Ofimática:

Las aplicaciones comunes de procesador de textos, hojas de cálculo y elaboración de presentaciones utilizadas se incluyen en el paquete integrado *Microsoft Office* 1997 y en *Microsoft Word* 2000. Para la elaboración de representaciones gráficas vectoriales así como para el tratamiento de imágenes se utilizaron las

aplicaciones contenidas en la *suite Corel-Draw* v 9.0. (Corel Co.). Finalmente, la gestión de recursos bibliográficos y la elaboración de bibliografías se efectuó con la aplicación *ENDNOTE* v 5.0 (Isi Research Sofi).

V.7. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	LONG.	TM (°C)	POS.	DIRECCIÓN
T3 universAl	ATTAACCCTCACTAAAGGGAA	21mer	58		
T7 universAl	GTAATACGACTCACTATAGGG	21mer	52		
SP6 universAl	ATTTAGGTGACACTATAGAATACT	23mer	62		
p35S1.Lor	GTTTCATTTTCATTTGGAGAGGAC	22mer	62	35S-CaMV	
GUS.5R	TTCGCGATCCAGACTGAATGC			GUS	
DXS1.S1	CTGTCAAGGAACTGAAACAAC	21mer	62	474	sentido
DXS1.S2	GTTGATCAGCTGGTGCACCGTG	22mer	70	2276	antisentido
DXS1.S3	GAACAACGCCGATATCTAGAC	22mer	66	895	sentido
DXS1.S4	GAGATCTGCTTCATCTGATGG	21mer	62	1816	antisentido
DXS1.S5	GAAGTGTCTACCCGTTGCTGG	21mer	66	1381	antisentido
DXS1.S6	CGCGGAGAGAGCTGATGAC	19mer	62	1315	sentido
DXS1.S7	GGTCCGACACATTGTGGAGC	20mer	64	1727	sentido
DXS1.S8	CTCGATGGTCTTCTTGATGGC	21mer	64	2189	sentido
DXS1.S9	GCTGTGATTGGTGATGGTGGC	21mer	64	845	sentido
DXS1.S10	CGCACCATCACCACATCACAGC	21mer	66	865	antisentido
DXS1.GSP1	CCCTTCCTACCGCCATTCC	19mer	60	794	antisentido
DXS1.GSP2	CTTGACCCCAAATGTCACCGG	22mer	70	561	antisentido
DXS1.D	TGGGAATGTTGTTGGGTTTC	21mer	60	354	antisentido
DXS1.mut1	GAAGGAAAAGCAAATCTAGAGAAGCCATTGG	32mer		234	antisentido
DXS1.SallA	AAAACGTCGACTCCCTTGGTGCACCGATT	29mer		2358	antisentido
DXS1.XbaI	CATCTAGACATTTGTTTACTGTTTTGATAACC	34mer		83	sentido
DXS1.BamHI	CAGGATCCCATTTGTTTACTGTTTTGATAACC	34mer		83	sentido
DXS1.SstI	CAGAGCTCCACTGCTCGTACCAAAATATGTC	32mer		2680	antisentido
DXS1.NdeI	GTTGGTGGTCTGTTGAATACATATGACCCTTCTCTGCAAGTGAAG	46mer		426	antisentido
DXS1.ClaIA	GTTGTTTCAGTTCCTTGACAG	21mer	60	494	antisentido
DXS1.PROM4	CGTGGCCCAACCAAAATCTC	20mer	62	-188	sentido
DXS1.PROM6	GCCTTTATCGTCTTTGGTATG	21mer	60	-359	sentido
DXS1.PROM8	CTTGTAAGAACAGAGGAATATC	22mer	60	-605	sentido
DXS1.PROM11	CTAACCCAAATCATACTACTAG	23mer	64	-860	sentido
DXS1.PROM bAseXbaI	GGGGATCCCTCTAGAAGAAGC	20mer		217	antisentido
DXS2.S1	CGTTGGAATGTCATATCAAACAC	23mer	68	1	sentido
DXS2.S2	GGCTCTCTCCGTATTGGCCTTTC	23mer	74	46	sentido
DXS2.S3	GCACTCTCATGGAGATCCCGTTAC	24mer	74	2035	antisentido
DXS2.S4	CTTCTTCTAAGCGGGTCTCTCG	23mer	70	2080	antisentido
DXS2.S5	CGGGAAGAAGAGGAAAGATG	20mer	60	441	sentido
DXS2.S6	GCCCCGTGCCAAAAGAGTC	19mer	62	539	antisentido
DXS2.S7	GGGAGAGGTAGGATACTAAG	20mer	60	1613	sentido
DXS2.S8	GCCTCTAAACATCTTTGCAC	20mer	58	1692	antisentido
DXS2.S9	CGCAGAGAGAGCTGATGACAA	21mer	64	991	sentido
DXS2.S10	GCCTCTGCTCTGCAATCAAG	21mer	64	1125	antisentido
DXS2.NcoIGFP	CAAATTCTCTCCATGGCTCTCTCCGTATTGGCCTTTC	38mer	68	31	sentido
DXS2.Sall3GFP-TP	GGTGGTCTGTCGACATAAATTTACCTTTCTCTGAAAATG	40mer		195	antisentido
DXS2.domA	PTTGCTTTGTTCATACCCTTTTGGCAGTTCTCTCAACTCTCTGAGA GCCGGATTAGATTGCAGCCTACTAAG	69mer	58	808	antisentido
DXS2.domB	PATAGGCGGACCAATGCATCAGTTGGCGGCTAAGGTAGATGTGT ATGCTTGTGGAATGATTAGAGAGAC	68mer	56	809	sentido

V. MATERIALES Y MÉTODOS

DXS2.NheI	CAAATTC CGTAGC ATGGCTCTCTCCGTATTTGCCTTTC	38mer	74	31	sentido
DXS2.CTpNheI	GATCAAAAG CTAGCG CAACAACATTTTCAGAGAAAGG	37mer	80	137	sentido
DXS2.CCTpNheI	CAGAGAAAG CTAGC TATTATTCAAACAGACCACCAACTCC	40mer	72	162	sentido
DXS2.PROM5A	CTGTTAGAAGTAGTTAGAAAGTC	22mer	60	-1523	sentido
DXS2.PROM3XbaI	CCTATTTAT CTAGA AGGAAAGGCCAAATACGGAGAG	36mer	62	69	antisentido
DXS2.PROM5B	AGGAAAGGCCAAATACGGAGAG	21mer	62	69	antisentido
DXS2.PROM5C	GCCACAATATGGTGTAAAGTGATTC	24mer	68	-504	sentido
DXS2.PROM5D	GCTCGTCTCAATCACATCGACGTG	24mer	64	-367	antisentido
DXR.34	CAAGAGTAGTGCGGTTCTCTGG	22mer	68	34	sentido
DXR.E2	CAGTTTGCTTGTTCGGATCACAG	24mer	72	1668	antisentido
DXR.S1	GTAGCGGATGCGGTTGAAGC	20mer	64	899	sentido
DXR.S2	GCGCCGCCAATGAGAAAGC	19mer	62	1308	sentido
DXR.S3	CGTCATACTCAGCTCCAAAC	20mer	60	1025	antisentido
DXR.S4	CGTGCTCCGCTTGCCAACAA	21mer	66	765	sentido
DXR.S5	TTGTTGGCAAGCGGAAGCACG	21mer	66	744	antisentido
DXR.S6	GGCGGCGCTGAGAACTCCAGT	21mer	70	1315	antisentido
DXR.GSP1	ATTCGAACCAGCAGCTAGAG	20mer	60	436	antisentido
DXR.GSP2	CCAGTAGATCCAACGATAGAG	21mer	62	354	antisentido
DXR.GSP3	GGCCATGCTGGAGGAGGTTG	20mer	66	279	antisentido
DXR.RT2	GCAACAACAACCTCCTCCAGCATGG	25mer	76	254	sentido
DXR.D	CCTCTCCTTGATTCTCTCCTC	21mer	66	213	antisentido
DXR.SallA	TTCAT GTCCAC ACTGGCCTAGCACCAGAA	29mer		1520	antisentido
DXR.XbaI	CT CTAGA CAAGAGTAGTAGTGCAGTTCTCTGG	33mer		34	sentido
DXR.SstI	CAG AGCTCC AGTTTGGCTTGTTCGGATCACAG	32mer		1676	antisentido
DXR.PROM1	GTGAGCGGCTCGAAGCAAAACCGGA	24mer	78	-1438	sentido
DXR.PROM2	CCCTTGTAATGCATATTTCTAA	22mer	58	-224	sentido
DXR.PROM3	CTTGTCAAAGATCTAAACTAAG	22mer	60	-483	sentido
DXR.PROM4	GAGAGCACCATTCAAACAACAA	22mer	62	-784	sentido
5'-MVKPI	GGCATATGGTGAAACCCATCTCTATCGTTGGATC	34mer		315	sentido
5'-MQQQ	TGCATATGCAACAACAACCTCCTCCAGC	28mer		245	sentido
DXR.end	ACGAATTCATTATGCATGAACTGGCTAGCACC	33mer		1528	antisentido
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	36mer		RACE 5'	
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	23mer		RACE 5'	

Tabla V.3. Tabla de los oligonucleótidos empleados en esta memoria. Las secuencias señaladas en negrita corresponden a las regiones no homólogas al molde correspondiente. I, Inosina.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aach H, Bode H, Robinson DG y Graebe JE.** (1997). ent-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* **202(2)**: 211-9
2. **Adam KP, Thiel R y Zapp J.** (1999). Incorporation of 1-[1-¹³C]Deoxy-D-xylulose in Chamomile Sesquiterpenes. *Arch Biochem Biophys* **369(1)**: 127-32
3. **Adam KP, Thiel R, Zapp J y Becker H.** (1998). Involvement of the Mevalonic Acid Pathway and the Glycerinaldehyde-Pyruvate Pathway in Terpenoid Biosynthesis of the Liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. *Arch Biochem Biophys* **354(1)**: 181-7
4. **Ahumada-Díaz I.** (2001). *Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular de la acetoacetyl-coenzima A tiolasa de Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
5. **Alex D, Bach TJ y Chye ML.** (2000). Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive. *Plant J* **22(5)**: 415-26
6. **Altincicek B, Kollas A, Eberl M, Wiesner J, Sanderbrand S, Hintz M, Beck E y Jomaa H.** (2001). *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **499(1-2)**: 37-40
7. **Altincicek B, Moll J, Campos N, Foerster G, Beck E, Hoeffler JF, Grosdemange-Billiard C, Rodríguez-Concepción M, Rohmer M, Boronat A, Eberl M y Jomaa H.** (2001). Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* **166(6)**: 3655-8.
8. **Aluru MR, Bae H, Wu D y Rodermel SR.** (2001). The Arabidopsis *immutans* Mutation Affects Plastid Differentiation and the Morphogenesis of White and Green Sectors in Variegated Plants. *Plant Physiol* **127**: 67-77.
9. **An G.** (1987). Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol* **153**: 292-305
10. **Aoyama T, Chua, N.H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11(3)**: 605-12
11. **Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Niwa Y y Iba K.** (2000). Temperature -sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiologia plantarum* **108**: 19-24
12. **Arguello-Astorga GR y Herrera-Estrella LR.** (1996). Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiol* **112(3)**: 1151-66
13. **Arigoni D, Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M.H., Bacher, A.** (1999). Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(4)**: 1309-14
14. **Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A y Zenk MH.** (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(20)**: 10600-5
15. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K.** (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
16. **Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C y Lescure B.** (1992). A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Physiol Biochem* **30(1)**: 123-8
17. **Azcón-Bieto J y Talón M.** (1993). *Fisiología y Bioquímica vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana de España.
18. **Bach TJ.** (1995). Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants-a review. *Lipids* **30(3)**: 191-202
19. **Bach TJ y Lichtenthaler HK.** (1982). Mevinolin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants. *Z Naturforsch [C]* **37(1-2)**: 46-50
20. **Bach TJ, Lichtenthaler, H.K.** (1983). Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiologia plantarum* **59**: 50-60
21. **Bailey-Serres J y Gallie DR.** (1998). *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants*. Rockville, Mariland, USA: American Society of Plant Physiologists.
22. **Barkovich R y Liao JC.** (2001). Review: metabolic engineering of isoprenoids. *Metab Eng* **3(1)**: 27-39.

23. **Bartley GE y Scolnik PA.** (1993). cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol Chem* **268(34)**: 25718-21
24. **Bartley GE y Scolnik PA.** (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7(7)**: 1027-38
25. **Basson ME, Thorsness M y Rine J.** (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83(15)**: 5563-7
26. **Bechtold N, Ellis J y Pelletier G.** (1993). In plants *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie.* **316**: 1194-9
27. **Bergstrom JD, Dufresne C, Bills GF, M. N-O y Byrne K.** (1995). Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Annu Rev Microbiol* **49**: 607-39
28. **Bishop GJ y Koncz C.** (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S97-110
29. **Bohlmann J, Steele CL y Croteau R.** (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J Biol Chem* **272(35)**: 21784-92
30. **Bouvier F, d'Harlingue A, Suire C, Backhaus RA y Camara B.** (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* **117(4)**: 1423-31
31. **Bouvier F, Suire C, A DH, Backhaus RA y Camara B.** (2000). Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J* **24(2)**: 241-52
32. **Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54
33. **Brocks JJ, Logan GA, Buick R y Summons RE.** (1999). Archean Molecular Fossils and the Early Rise of Eukaryotes. *SCIENCE* **285**: 1033-6
34. **Broers STJ.** (1994). *Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in Escherichia coli. [On the early stages of isoprenoid biosynthesis in E. coli].* Tesis Doctoral. Zurich University, Zurich.
35. **Brooks J y Shaw G.** (1968). Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature* **219**: 532-3
36. **Brown JW, Smith P y Simpson CG.** (1996). *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Mol Biol* **32(3)**: 531-5
37. **Brown MS y Goldstein JL.** (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* **21(5)**: 505-17
38. **Buchanan BB, W. G y R.L. J.** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Ma.: American Society of Plant Physiologists.
39. **Budziszewski GJ, Lewis SP, Glover LW, Reineke J, Jones G, Ziemnik LS, Lonowski J, Nyfeler B, Aux G, Zhou Q, McElver J, Patton DA, Martienssen R, Grossniklaus U, Ma H, Law M y Levin JZ.** (2001). *Arabidopsis* genes essential for seedling viability. Isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**: 1765-78.
40. **Burda P y Aebi M.** (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426(2)**: 239-57.
41. **Busch M, Seuter A y Hain R.** (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **128(2)**: 439-53
42. **Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG y Boronat A.** (1989). Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol* **13(6)**: 627-38
43. **Campbell M, Hahn FM, Poulter CD y Leustek T.** (1998). Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **36(2)**: 323-8
44. **Campos N y Boronat A.** (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7(12)**: 2163-74
45. **Campos N, Rodríguez-Concepción M, Sauret-Gueto S, Gallego F, Lois LM 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**: 59-67.
46. **Campos N, Rodríguez-Concepción M, Seemann M, Rohmer M y Boronat A.** (2001). Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **488**(3): 170-3
 47. **Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G y Kuntz M.** (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**(1): 57-68.
 48. **Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A y 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): 1581-91
 49. **Casey WM, Keesler GA y Parks LW.** (1992). Regulation of partitioned sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**(22): 7283-8
 50. **Chaded K, Oudin A, Guivarc'h N, Hamdi S, Chenieux JC, Rideau M y Clastre M.** (2000). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells. *Plant Physiol Biochem* **38**: 559-66
 51. **Chapman A y Hill B.** (2000). Dictionary of Natural Products on CD-ROM (version 9.1.). London, New York: CRC Press
 52. **Chappell J.** (1995). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 521-47
 53. **Chappell J y Nable R.** (1987). Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol* **85**: 469-73
 54. **Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R y Saunders C.** (1995). Is the reaction catalyzed by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol* **109**: 1337-43
 55. **Charon L, Hoeffler JF, Pale-Grosdemange C, Lois LM, Campos N, Boronat A y Rohmer M.** (2000). Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J* **346 Pt 3**: 737-42.
 56. **Chen F, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E y Gershenzon J.** (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **15**(2): 481-94
 57. **Chen M, Choi Y, Voytas DF y Rodermel S.** (2000). Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *Plant J* **22**: 303-13.
 58. **Chen M, Jensen M y Rodermel S.** (1999). The yellow variegated mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *J Hered* **90**(1): 207-14.
 59. **Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H y Sheen J.** (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **6**(3): 325-30.
 60. **Choi D, Bostock RM, Avdiushko S y Hildebrand DF.** (1994). Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2329-33
 61. **Choi D, Ward BL y Bostock RM.** (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4**(10): 1333-44
 62. **Choisne N, Carneiro VT, Pelletier G y Small I.** (1998). Implication of 5'-flanking sequence elements in expression of a plant tRNA(Leu) gene. *Plant Mol Biol* **36**(1): 113-23
 63. **Chory J, Chatterjee M, Cook RK, Elich T, Fankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed J y Vitart V.** (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(22): 12066-71
 64. **Chye ML, Kush A, Tan CT y Chua NH.** (1991). Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-

- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* **16**(4): 567-77
65. **Chye ML, Tan CT y Chua NH.** (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed. *Plant Mol Biol* **19**(3): 473-84
 66. **Clough SJ y Bent AF.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**(6): 735-43.
 67. **Clouse SD.** (2002). Brassinosteroids. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)
 68. **Cogoni C y Macino G.** (1997). Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. *Trends Plant Sci* **2**(11): 438-43
 69. **Contin A, van der Heijden R, Lefeber AW y Verpoorte R.** (1998). The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett* **434**(3): 413-6
 70. **Cordier H, Karst F y Berges T.** (1999). Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. *Plant Mol Biol* **39**(5): 953-67
 71. **Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I y Wolstenholme BN.** (1997). Metabolic Control of Avocado Fruit Growth (Isoprenoid Growth Regulators and the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase). *Plant Physiol* **114**(2): 511-8
 72. **Croteau R.** (1992). Clomazone does not inhibit the conversion of Isopentenyl pyrophosphate to geranyl, farnesyl, or geranylgeranyl pyrophosphate *in vitro*. *Plant Physiol* **98**: 1515-7
 73. **Cunillera N, Arro M, Delourme D, Karst F, Boronat A y Ferrer A.** (1996). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* **271**(13): 7774-80
 74. **Cunillera N, Arro M, Fores O, Manzano D y Ferrer A.** (2000). Characterization of dehydrodolichyl diphosphate synthase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme in dolichol biosynthesis. *FEBS Lett* **477**(3): 170-4
 75. **Cunillera N, Boronat A y Ferrer A.** (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* **272**(24): 15381-8
 76. **Cunillera N, Boronat A y Ferrer A.** (2000). Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Mol Biol* **44**: 747-58.
 77. **Cunningham FX, Gantt, E.** (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-83
 78. **Cunningham FX, Jr., Lafond TP y Gantt E.** (2000). Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Bacteriol* **182**(20): 5841-8
 79. **Cvejic JH y Rohmer M.** (2000). CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochemistry* **53**(1): 21-8
 80. **Dahlin C y Cline K.** (1991). Developmental regulation of the plastid protein import apparatus. *The Plant Cell* **3**: 1131-40
 81. **Dale S, Arro M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, Hardie DG y Ferrer A.** (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* **233**(2): 506-13
 82. **Daudonnet S, Karst F y Tourte Y.** (1997). Expression of the farnesyldiphosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* in tobacco. *Mol Breeding* **3**: 137-45
 83. **Del Arco A.** (1999). *Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular del gen SQS1 que codifica para la escualeno sintasa de Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
 84. **Delourme D.** (1995). *Caractérisation génétique et propriétés biochimiques de la Farnésyl Diphosphate Synthase d'Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Université de Poitiers, Poitiers.
 85. **Denbow CJ, Lang S y Cramer CL.** (1996). The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem* **271**(16): 9710-5
 86. **Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ y Rohmer M.** (1998). Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the

- biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* **331**(Pt 2): 615-21.
87. **Disch A, Schwender J, Muller C, Lichtenthaler HK y Rohmer M.** (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J* **333** (Pt 2): 381-8
 88. **Döll M, Schindler S, Lichtenthaler HK y Bach TJ.** (1984). Differential inhibition by mevinolin of prenyllipid accumulation in cell suspension cultures of *Sylibum marianum*. In *Structure, function and metabolism of lipids*, ed. W Eichenberger, Amsterdam: Elsevier
 89. **Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halfords NG y MacKintosh C.** (1997). Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are required by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *Biochem J* **325** (Pt 1): 101-9
 90. **Dumas R, Curien G, DeRose RT y Douce R.** (1993). Branched-chain-amino-acid biosynthesis in plants: molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J* **294** (Pt 3): 821-8
 91. **Duvold T, Cali P, Bravo JM y Rohmer M.** (1997). Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters* **38**(35): 6181-4
 92. **Eberl M, Altincicek B, Kollas AK, Sanderbrand S, Bahr U, Reichenberg A, Beck E, Foster D, Wiesner J, Hintz M y Jomaa H.** (2002). Accumulation of a potent gamma delta T-cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. *Immunology* **106**(2): 200-11
 93. **Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ, Zenk MH y Bacher A.** (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(13): 6431-6
 94. **Eisenreich W, Rohdich F y Bacher A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**(2): 78-84.
 95. **Eisenreich W, Sagner S, Zenk MH y Bacher A.** (1997). Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Letters* **38**(22): 3889-992
 96. **Elmayan T y Tepfer M.** (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res* **4**(6): 388-96
 97. **Emanuelsson O, Nielsen H y von Heijne G.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**(5): 978-84
 98. **Enjuto M, Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., Boronat, A.** (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(3): 927-31
 99. **Enjuto M, Lumbreras V, Marin C y Boronat A.** (1995). Expression of the *Arabidopsis* HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7**(5): 517-27
 100. **Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S y 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
 101. **Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jimenez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y 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): 95-103
 102. **Fellermeier M, Kis K, Sagner S, Maier U, Bacher A y Zenk MH.** (1999). Cell-free conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate into [beta]-carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. *Tetrahedron Letters* **40**(14): 2743-6
 103. **Fellermeier M, Raschke M, Sagner S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Kis K, Radykewicz T, Adam P, Rohdich F, Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D y Zenk MH.** (2001). Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis. The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur J Biochem* **268**(23): 6302-10
 104. **Finkelstein RR y Rock CD.** (2002). Abscisic Acid Biosynthesis and Response. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)
 105. **Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE y Bramley PM.** (2000). Technical advance: application of high-

- performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J* **24**(4): 551-8
106. **Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM y Grierson D.** (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* **8**(5): 693-701
107. **Fujisaki S, Nishino T y Katsuki H.** (1986). Biosynthesis of isoprenoids in intact cells of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **99**(4): 1137-46
108. **Gavel Y y von Heijne G.** (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett* **261**(2): 455-8.
109. **Giuliano G, Bartley GE y Scolnik PA.** (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* **5**(4): 379-87.
110. **Goldstein JL y Brown MS.** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**(6257): 425-30
111. **Gondet L, Weber T, Maillot-Vernier P, Benveniste P y Bach TJ.** (1992). Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in a tobacco mutant that overproduces sterols. *Biochem Biophys Res Commun* **186**(2): 888-93
112. **González V.** (2002). *Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilmetilglutaril CoA reductasa de Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
113. **Goodwin TW y Mercer EI.** (1963). Introduction. In *The control of lipid metabolism*, ed. JK Grant, London: Academic Press
114. **Gray JC.** (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Advances in botanical research* **14**: 25-91
115. **Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B y Peterson T.** (1994). The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**(3): 543-53.
116. **Ha SH, Kim JB, Hwang YS y Lee SW.** (2003). Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 from pepper (*Capsicum annum*). *Biochim Biophys Acta* **1625**(3): 253-60
117. **Ha SH, Lee SW, Kim YM y Hwang YS.** (2001). Molecular characterization of Hmg2 gene encoding a 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase in rice. *Mol Cells* **11**(3): 295-302
118. **Hahn FM, Baker JA y Poulter CD.** (1996). Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes *idi*, a gene for isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol* **178**(3): 619-24
119. **Hahn FM, Eubanks LM, Testa CA, Blagg BS, Baker JA y Poulter CD.** (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **183**(1): 1-11
120. **Harker M y Bramley PM.** (1999). Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett* **448**(1): 115-9.
121. **Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA y Kay SA.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**(5499): 2110-3
122. **Hawkins CF, Borges A y Perham RN.** (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes.
123. **Hecht S, Eisenreich W, Adam P, Amslinger S, Kis K, Bacher A, Arigoni D y Rohdich F.** (2001). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 14837-42
124. **Hedden P y Phillips AL.** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**(12): 523-30.
125. **Heintze A, Görlach J, Leuschner C, Hoppe P, Hagelstein P, Schulze-Siebert D y Schultz G.** (1990). Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to a division-of-labor stage. *Plant Physiol* **93**: 1121-7
126. **Heintze A, Riedel A, Aydogdu S y Schultz G.** (1994). Formation of chloroplast isoprenoid from pyruvate and acetate by chloroplasts from young spinach plants. Evidence for a mevalonate pathway in immature chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* **32**(6): 791-7

127. **Heldt HW.** (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press.
128. **Helliwell CA y Gray JC.** (1995). The sequence surrounding the translation initiation codon of the pea plastocyanin gene increases translational efficiency of a reporter gene. *Plant Mol Biol* **29(3)**: 621-6.
129. **Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Luttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A y 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
130. **Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M y Korenaga T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300
131. **Hill RE, Himmeldirk K, I.A. K, Pauloski RM, B.G. S, Wolf E y Spenser I.** (1996). The Biogenetic Anatomy of Vitamin B6. A 13 C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 30426-35
132. **Hoeffler JF, Hemmerlin A, Grosdemange-Billiard C, Bach TJ y Rohmer M.** (2002). Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem J* **366(Pt 2)**: 573-83
133. **Holmes-Davies R y Comai L.** (1998). Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. *Trends Plant Sci* **3(3)**: 91-7
134. **Horbach S, Sahn H y Welle R.** (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? *FEMS Microbiol Lett* **111(2-3)**: 135-40
135. **Huang H, Mizukami Y, Hu Y y Ma H.** (1993). Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the Arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Res* **21(20)**: 4769-76.
136. **Initiative* TAG.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
137. **Itoh D, Karunagoda RP, Fushie T, Katoh K y Nabeta K.** (2000). Nonequivalent Labeling of the Phytyl Side Chain of Chlorophyll a in Callus of the Hornwort *Anthoceros punctatus*. *J Nat Prod* **63**: 1090-3
138. **Jain AK, Vincent RM y Nessler CL.** (2000). Molecular characterization of a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Mol Biol* **42(4)**: 559-69
139. **Jarvis P, Chen LJ, Li H, Peto CA, Fankhauser C y Chory J.** (1998). An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282(5386)**: 100-3
140. **Jefferson RA.** (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Report* **5**: 387-405
141. **Jefferson RA, Kavanagh TA y Bevan MW.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6(13)**: 3901-7.
142. **Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D y Beck E.** (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285(5433)**: 1573-6.
143. **Joshi CP.** (1987). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res* **15(23)**: 9627-40.
144. **Josse EM, Simkin AJ, Gaffe J, Laboure AM, Kuntz M y Carol P.** (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* **123**: 1427-36.
145. **Julliard JH y Douce R.** (1991). Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher-plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2042-5
146. **Kasahara H, Hanada A, Kuzuyama T, Takagi M, Kamiya Y y Yamaguchi S.** (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277(47)**: 45188-94
147. **Kay BK, Williamson MP y Sudol M.** (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14(2)**: 231-41.
148. **Kim SW y Keasling JD.** (2001). Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production. *Biotechnol Bioeng* **72(4)**: 408-15.

149. **Kizis D.** (2001). *Isolation and characterization of transcription factors that interact with the DRE2 cis-element from the promoter of the rab17 gene, from maize.* Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
150. **Kleinig H.** (1989). The Role Of Plastids In Isoprenoid Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 39-59
151. **Knoss W, Reuter B y Zapp J.** (1997). Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem J* **326**: 449-54
152. **Korth KL, Jaggard DA y Dixon RA.** (2000). Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J* **23(4)**: 507-16
153. **Kreuz K y Kleinig H.** (1984). Synthesis of prenyl lipids in cells of spinach leaf. *Eur J Biochem* **141**: 531-5
154. **Kribii R, Arró M, Del Arco A, González V, Balcells L, Delourme D, Ferrer A, Karst F y Boronat A.** (1997). Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase—involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *Eur J Biochem* **249(1)**: 61-9
155. **Kumar S, Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M.** (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*
156. **Kunkel TA, Roberts JD y Zakour RA.** (1987). Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**: 367-82
157. **Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S y Seto H.** (1998). Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **39(43)**: 7913-6
158. **Kuzuyama T, Takahashi S, Watanabe H y Seto H.** (1998). Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters* **39**: 4509-12
159. **Kuzuyama T, Takahashi, S., Takagi, M., Seto, H.** (2000). Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J Biol Chem* **275(26)**: 19928-32
160. **Laber B, Maurer W, Scharf S, Stepusin K y Schmidt FS.** (1999). Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett* **449(1)**: 45-8
161. **Lange BM y Croteau R.** (1999). Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* **365(1)**: 170-4
162. **Lange BM, Croteau, R.** (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(24)**: 13714-9
163. **Lange BM y Ghassemian M.** (2002). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **In press**
164. **Lange BM, Rujan, T., Martin, W., Croteau, R.** (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(24)**: 13172-7
165. **Lange BM, Wildung MR, McCaskill D y Croteau R.** (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(5)**: 2100-4
166. **Lawrence SD, Cline K y Moore GA.** (1997). Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Mol Biol* **33(3)**: 483-92
167. **Learned RM y Connolly EL.** (1997). Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11(3)**: 499-511
168. **Li Q y Hunt AG.** (1997). The polyadenylation of RNA in plants. *Plant Physiol* **115**: 321-35
169. **Liang PH, Ko TP y Wang AH.** (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* **269(14)**: 3339-54
170. **Lichtenthaler HK.** (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 351-82

VI. BIBLIOGRAFÍA

171. **Lichtenthaler HK.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65
172. **Lichtenthaler HK.** (2000). Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem Soc Trans* **28**: 785-9.
173. **Lichtenthaler HK, Rohmer M y Schwender J.** (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia plantarum* **101**: 643-52
174. **Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A y Rohmer M.** (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-4
175. **Lichtenthaler HK, Zeidler J, Schwender J y Muller C.** (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Z Naturforsch* **55(5-6)**: 305-13
176. **Lluch MA, Masferrer A, Arro M, Boronat A y Ferrer A.** (2000). Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **42(2)**: 365-76
177. **Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M y 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 USA* **95(5)**: 2105-10
178. **Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N y Boronat A.** (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22(6)**: 503-13
179. **Lopez-Juez E, Jarvis RP, Takeuchi A, Page AM y Chory J.** (1998). New *Arabidopsis* cue mutants suggest a close connection between plastid- and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol* **118**: 803-15
180. **Lumbreras V, Campos N y Boronat A.** (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J* **8(4)**: 541-9
181. **Lutcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF y Scheele GA.** (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *Embo J* **6(1)**: 43-8.
182. **Lütke-Brinkhaus F, Liedvogel B y Kleinig H.** (1984). On the biosynthesis of ubiquinones in plant mitochondria. *Eur J Biochem* **141**: 537-41
183. **Lüttgen H, Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A. Eisenreich, W.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**
184. **Mahmoud SS y Croteau RB.** (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **7(8)**: 366
185. **Mahmoud SS y Croteau RB.** (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98(15)**: 8915-20.
186. **Maillot-Vernier P, Gondet L, Schaller H, Benveniste P y Belliard G.** (1991). Genetic study and further biochemical characterization of a tobacco mutant that overproduces sterols. *Mol Gen Genet* **231(1)**: 33-40
187. **Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M y León P.** (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* **9(5)**: 649-58
188. **Margulis L.** (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*: 21-38.
189. **Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández-Busquets X, Moncalean P, Fernández B, Cunillera N, Boronat A y Ferrer A.** (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J* **30(2)**: 123-32
190. **Mau CJ y West CA.** (1994). Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(18)**: 8497-501

191. **McCaskill D y Croteau R.** (1995). Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* **197**: 49-56
192. **McClung CR, Salomé PA y Michael TP.** (2002). The Arabidopsis Circadian System. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)
193. **McHale NA, Hanson KR y Zelitch I.** (1988). A nuclear mutation in *nicotiana-sylvestris* causing a thiamine-reversible defect in synthesis of chloroplast pigments. *Plant Physiol* **88(3)**: 930-5
194. **Meyerowitz EM.** (2001). Prehistory and History of Arabidopsis Research. *Plant J* **125**: 15-9
195. **Milborrow BV.** (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* **52(359)**: 1145-64
196. **Miller B, Heuser T y Zimmer W.** (2000). Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **481(3)**: 221-6.
197. **Mitchell-Olds T y Clauss MJ.** (2002). Plant evolutionary genomics. *Curr Opin Plant Biol* **5(1)**: 74-9
198. **Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW y Dellapenna D.** (2001). Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* **45(3)**: 281-93
199. **Montamat F, Guilloton M, Karst F y Delrot S.** (1995). Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Gene* **167(1-2)**: 197-201
200. **Moore FD y Shephard DC.** (1977). Biosynthesis in isolated *Acetabularia* chloroplasts. II. Plastid pigments. *Protoplasma* **92(3-4)**: 167-75
201. **Morelli G y Ruberti I.** (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiol* **122(3)**: 621-6
202. **Mueller C, Schwender J, Zeidler J y Lichtenthaler H.** (2000). Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem Soc Trans* **28(6)**: 792-3.
203. **Nabeta K, Ishikawa T y OKuyama H.** (1995). Sesqui- and diterpene biosynthesis from ¹³C labeled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 3111-5
204. **Nabeta N, Kawae T, Saitoh T y Kikuchi T.** (1997). Synthesis of chlorophyll a and α -carotene from ²H- and ¹³C-labelled mevalonates and ¹³C-labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 261-7
205. **Nagano Y, Furuhashi H, Inaba T y Sasaki Y.** (2001). A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **29**: 4097-105
206. **Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T y Yoshida S.** (2000). Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* **211(6)**: 781-90
207. **Nagata N, Suzuki M, Yoshida S y Muranaka T.** (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* **216**: 345-50
208. **Nakamura A, Shimada H, Masuda T, Ohta H y Takamiya K.** (2001). Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Lett* **506**: 61-4
209. **Narita JO y Gruissem W.** (1989). Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1(2)**: 181-90
210. **Nemhauser J y Chory J.** (2002). Photomorphogenesis. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)
211. **Niyogi KK.** (1999). PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 333-59
212. **Oh SK, Han KH, Ryu SB y Kang H.** (2000). Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Implications in rubber biosynthesis. *J Biol Chem* **275(24)**: 18482-8
213. **Ohta S, Mita S, Hattori T y Nakamura K.** (1990). Construction and expression in tobacco of a β -Glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* **31(6)**: 805-13
214. **Okada K, Kawaide H, Kuzuyama T, Seto H, Curtis IS y Kamiya Y.** (2002). Antisense and chemical

- suppression of the nonmevalonate pathway affects *ent*-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* **215**: 339-44
215. **Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M y Kamiya Y.** (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122(4)**: 1045-56
216. **Olivier LM y Krisans SK.** (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1529(1-3)**: 89-102
217. **Ostrovsky D, Diomina G, Lysak E, Matveeva E, Ogel O y Trutko S.** (1998). Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch Microbiol* **171(1)**: 69-72
218. **Pandian S, Saengchjan S y Raman TS.** (1981). An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem J* **196(3)**: 675-81
219. **Parmryd I, Andersson B y Dallner G.** (1999). Protein prenylation in spinach chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10074-9
220. **Piechulla B, Merforth N y Rudolph B.** (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* **38(4)**: 655-62
221. **Piffanelli P, Ross JH y Murphy DJ.** (1997). Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J* **11(3)**: 549-62
222. **Piffanelli P, Ross JHE y Murphy DJ.** (1998). review: Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* **11(2)**: 65-80
223. **Pyke KA, Page, A.M.** (1998). Plastid ontogeny during petal development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **116(2)**: 797-803
224. **Querol J, Besumbes O, Maria Lois L, Boronat A y Imperial S.** (2001). A fluorometric assay for the determination of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase activity. *Anal Biochem* **296(1)**: 101-5.
225. **Querol J, Campos N, Imperial S, Boronat A y Rodríguez-Concepción M.** (2002). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **514(2-3)**: 343-6
226. **Querol J, Rodríguez-Concepción M, Boronat A y 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
227. **Ralston L, Kwon ST, Schoenbeck M, Ralston J, Schenk DJ, Coates RM y Chappell J.** (2001). Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Arch Biochem Biophys* **393(2)**: 222-35
228. **Rane MJ y Calvo KC.** (1997). Reversal of the nucleotide specificity of ketol acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis identifies the NADPH binding site. *Arch Biochem Biophys* **338(1)**: 83-9.
229. **Raven PH, Evert RF y Eicchorn SE.** (1999). *Biology of plants*. New York: W.H. Freeman and co. worth publishers.
230. **Rawn JD.** (1989). *Bioquímica*. Madrid: McGraw Hill-Interamericana de España.
231. **Ray J, Moureau P, Bird C, Bird A, Grierson D, Maunders M, Truesdale M, Bramley P y Schuch W.** (1992). Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Mol Biol* **19(3)**: 401-4
232. **Re EB, Jones D y Learned RM.** (1995). Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **7(5)**: 771-84
233. **Reiter RS, Coomber SA, Bourett TM, Bartley GE y Scolnik PA.** (1994). Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell* **6(9)**: 1253-64
234. **Reuter K, Sanderbrand S, Jomaa H, Wiesner J, Steinbrecher I, Beck E, Hintz M, Klebe G y Stubbs MT.** (2002). Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem* **277(7)**: 5378-84
235. **Rodermel S.** (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* **6(10)**: 471-8
236. **Rodermel S.** (2002). *Arabidopsis* Variegation Mutants. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)

237. **Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N y Boronat A.** (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* **27**: 213-22.
238. **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**: 1079-89
239. **Rodríguez-Concepción M, Campos N, Lois LM, Maldonado C, Hoeffler JF, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M y Boronat A.** (2000). Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **473**: 328-32.
240. **Rodríguez-Concepción M, Toledo-Ortiz G, Yalovsky S, Caldelari D y Gruissem W.** (2000). Carboxyl-methylation of prenylated calmodulin CaM53 is required for efficient plasma membrane targeting of the protein. *Plant Cell* **24**(6): 775-84
241. **Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S y Gruissem W.** (1999). Protein prenylation in plants: old friends and new targets. *Plant Mol Biol* **39**: 865-70
242. **Rohdich F, Eisenreich W, Wungstintaweekul J, Hecht S, Schuhr CA y Bacher A.** (2001). Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **268**(11): 3190-7
243. **Rohdich F, Hecht S, Gartner K, Adam P, Krieger C, Amslinger S, Arigoni D, Bacher A y Eisenreich W.** (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1158-63
244. **Rohdich F, Wungstintaweekul J, Eisenreich W, Richter G, Schuhr CA, Hecht S, Zenk MH y Bacher A.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6451-6
245. **Rohdich F, Wungstintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A y Zenk MH.** (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(21): 11758-63
246. **Rohdich F, Wungstintaweekul J, Lutgen H, Fischer M, Eisenreich W, Schuhr CA, Fellermeier M, Schramek N, Zenk MH y Bacher A.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8251-6
247. **Rohmer M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**(5): 565-74
248. **Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B y Sahn H.** (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**(2): 517-24
249. **Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S y Sahn H.** (1996). Glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpene biosynthesis. *J Am Chem Soc* **118**: 2564-6
250. **Rombauts S, Dehais P, Van Montagu M y Rouze P.** (1999). PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res* **27**: 295-6
251. **Romer S, Hugueney P, Bouvier F, Camara B y Kuntz M.** (1993). Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1414-21
252. **Routaboul JM, Fischer SF y Browse J.** (2000). Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol* **124**: 1697-705.
253. **Russell DW y Davidson H.** (1982). Regulation of cytosolic HMGR activity in pea seedlings: contrasting responses to different hormones, and hormone-product interaction, suggest hormonal modulation of activity. *Biochem Biophys Res Commun* **104**: 1537-43
254. **Sagner S, Eisenreich W, Fellermeier M, Latzel C, Bacher A y Zenk MH.** (1998). Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol in Plants by Rearrangement of the Terpene Precursor, 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate. *Tetrahedron Letters* **39**(15): 2091-4
255. **Sambrook R, Fritsch E y Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor.
256. **Schaller H, Bouvier-Nave P y Benveniste P.** (1998). Overexpression of an Arabidopsis cDNA encoding a

- sterol-C24(1)-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction. *Plant Physiol* **118**(2): 461-9
257. **Schaller H, Grausem B, Benveniste P, Chye ML, Tan CT, Song YH y Chua NH.** (1995). Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Müll. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in sterol overproduction. *Plant Physiol* **109**: 761-70
258. **Schenk G, Layfield R, Candy JM, Duggleby RG y Nixon PF.** (1997). Molecular evolutionary analysis of the thiamine-diphosphate-dependent enzyme transketolase. *J Mol Evol* **44**(5): 552-72
259. **Schindler S, Bach TJ y Lichtenthaler HK.** (1985). Differential inhibition by mevinolin of prenilylipid accumulation in radish seedlings. *Z Naturforsch* **40c**: 208-14
260. **Schorken U, Sprenger, G.A.** (1998). Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim Biophys Acta* **1385**(2): 229-43
261. **Schulze-Siebert D y Schultz G.** (1987). β -carotene synthesis in isolated spinach chloroplasts. Its tight linkage to photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol* **84**: 1233-7
262. **Schulze-Siebert D y Schultz G.** (1987). Spinach chloroplasts are fully autonomous in isoprenoid synthesis. *Plant Physiol Biochem* **25**: 145-53
263. **Schutze MP, Peterson PA y Jackson MR.** (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **13**(7): 1696-705
264. **Schwarz MK.** (1994). *Terpenbiosynthese in Ginkgo biloba: Eine überraschende geschichte.* Tesis Doctoral. Eidgenossische Technische Hochschule, Zurich.
265. **Schwender J, Gemunden C y Lichtenthaler HK.** (2001). Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* **212**(3): 416-23.
266. **Schwender J, Muller C, Zeidler J y Lichtenthaler HK.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **455**(1-2): 140-4
267. **Schwender J, Seeman M, Lichtenthaler HK y Rohmer M.** (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J* **316**: 73-80
268. **Schwender J, Zeidler J, Groner R, Muller C, Focke M, Braun S, Lichtenthaler FW y Lichtenthaler HK.** (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett* **414**,1: 129-34
269. **Seemann M, Campos N, Rodríguez-Concepción M, Hoeffler JF, Grosdemange-Billiard C, Boronat A y Rohmer M.** (2002). Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: accumulation of 2-C-methyl-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in a gcpE deficient mutant of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters* **43**(5): 775-8
270. **Seto H, Watanabe H y Furihata K.** (1996). Simultaneous Operation of the Mevalonate and Non-mevalonate Pathways in the Biosynthesis of Isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*. *Tetrahedron Letters* **37**(44): 7979-82
271. **Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H y Galbraith DW.** (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* **8**(5): 777-84.
272. **Shirano Y, Shimada H, Kanamaru K, Fujiwara M, Tanaka K, Takahashi H, Unno K, Sato S, Tabata S, Hayashi H, Miyake C, Yokota A y Shibata D.** (2000). Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. *FEBS Lett* **485**(2-3): 178-82
273. **Silverstone AL, Chang C, Krol E y Sun TP.** (1997). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**(1): 9-19
274. **Simkin AJ, Breitenbach J, Kuntz M y Sandmann G.** (2000). In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J Agric Food Chem* **48**: 4676-80.
275. **Singh KB.** (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol* **118**(4): 1111-20.
276. **Solano R, Nieto C, Avila J, Canas L, Diaz I y Paz-Ares J.** (1995). Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *Embo J* **14**(8): 1773-84.

277. **Soler E, Clastre M, Bantignies B, Marigo G y Ambid C.** (1993). Uptake of isopentenyl diphosphate by plastids isolated from *Vitis vinifera* L. cell suspensions. *Planta* **191**: 324-9
278. **Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S y Sahm H.** (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(24)**: 12857-62
279. **Spurgeon SL y Porter JW.** (1981). Introduction. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, ed. Wiley, Nueva York
280. **Staehein LA.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11(6)**: 1151-65
281. **Stermer BA, Bianchini GM y Korth KL.** (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35(7)**: 1133-40
282. **Strand A, Hurry V, Gustafsson P y Gardestrom P.** (1997). Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *Plant J* **12(3)**: 605-14.
283. **Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P y Stitt M.** (1999). Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol* **119(4)**: 1387-98.
284. **Strassburger E.** (1988). *Tratado de Botánica*. Barcelona: Ediciones Omega.
285. **Streatfield SJ, Weber A, Kinsman EA, Hausler RE, Li J, Post-Beittenmiller D, Kaiser WM, Pyke KA, Flugge UI y Chory J.** (1999). The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* **11(9)**: 1609-22.
286. **Suire C, Bouvier F, Backhaus RA, Begu D, Bonneau M y Camara B.** (2000). Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering A new role of oil bodies. *Plant Physiol* **124(3)**: 971-8
287. **Sun TP y Kamiya Y.** (1994). The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6(10)**: 1509-18
288. **Sundberg E, Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C., Coupland, G.** (1997). ALBINO3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* **9(5)**: 17-30
289. **Susek RE, Ausubel, F.M., Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74(5)**: 787-99
290. **Szkopiska A, Wiewska E y Karst F.** (2000). The Regulation of Activity of Main Mevalonic Acid Pathway Enzymes: Farnesyl Diphosphate Synthase, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase, and Squalene Synthase in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **267(1)**: 473-7
291. **Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H y 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 non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9879-84
292. **Takechi K, Sodmergen, Murata M, Motoyoshi F y Sakamoto W.** (2000). The YELLOW VARIEGATED (VAR2) locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **41**: 1334-46.
293. **Taylor LP y Hepler PK.** (1997). Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48(1)**: 461-91
294. **Terzaghi WB y Cashmore AR.** (1995). Light-Regulated Transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46(1)**: 445-74
295. **Thiel R y Adam KP.** (2002). Incorporation of [1-(¹³C)]1-deoxy-D-xylulose into isoprenoids of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry* **59(3)**: 269-74
296. **Tholl D, Ohnuma S, Farooq A y Gershenzon J.** (2001). *Arabidopsis thaliana*: a model system for the analysis of terpenoid secondary metabolism? Presentado en el 5th European Symposium of Plant Isoprenoids,

University of Bonn

297. **Thomashow MF.** (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* **118(1)**: 1-8.
298. **Trapp SC y Croteau RB.** (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158(2)**: 811-32
299. **Turner GW, Gershenzon J y Croteau RB.** (2000). Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol* **124(2)**: 665-80
300. **Valvekens D, Van Montagu M y Van Lijsebettens M.** (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5536-40
301. **Van Poecke RM, Posthumus MA y Dicke M.** (2001). Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J Chem Ecol* **27(10)**: 1911-28
302. **Vaucheret H, Beclin C y Fagard M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114**: 3083-91.
303. **Veau B, Courtois M, Oudin A, Chenieux J, Rideau M y Clastre M.** (2000). Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochim Biophys Acta* **1517(1)**: 159-63
304. **Villain P, Mache R y Zhou DX.** (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J Biol Chem* **271**: 32593-8
305. **Vogel BS, Wildung MR, Vogel G y Croteau R.** (1996). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J Biol Chem* **271(38)**: 23262-8
306. **Vogeli U y Chappell J.** (1991). Inhibition of a plant sesquiterpene cyclase by mevinolin. *Arch Biochem Biophys* **288(1)**: 157-62
307. **von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A y Kleinig H.** (1997). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **12(3)**: 625-34.
308. **Walter MH, 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)**: 571-8
309. **Walter MH, Hans J y Strack D.** (2002). Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J* **31(3)**: 243-54
310. **Wang H y Deng XW.** (2002). Phytochrome Signaling Mechanism. In *The Arabidopsis Book*, ed. EM Meyerowitz, Rockville: American Society of Plant Biologists (ASPB)
311. **Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malanchruvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF y Chory J.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122(4)**: 1003-13
312. **Weissenborn DL, Denbow, C.J., Laine, M., Lang, S.S., Yang, Z., Yu, X., Cramer, C.L.** (1995). HMG-CoA reductase and terpenid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiologia plantarum* **93**: 393-400
313. **Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleinig H y von Lintig J.** (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* **211**: 846-54.
314. **Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P y von Lintig J.** (2002). Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*
315. **West CA.** (1990). Terpene biosynthesis and metabolism. In *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*, ed. DH Turpin
316. **Wetzel CM, Jiang CZ, Meehan LJ, Voytas DF y Rodermeil SR.** (1994). Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant J* **6**: 161-75.
317. **Wetzel CM y Rodermeil SR.** (1998). Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf

- pigment content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **37(6)**: 1045-53.
318. **Wildermuth MC y Fall R.** (1996). Light-Dependent Isoprene Emission (Characterization of a Thylakoid-Bound Isoprene Synthase in *Salix discolor* Chloroplasts). *Plant Physiol.* **112(1)**: 171-82
319. **Wildung MR y Croteau R.** (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* **271(16)**: 9201-4
320. **Williams D, McGarvey DJ, Katahira EJ y Croteau R.** (1998). Truncation of Limonene Synthase Preprotein Provides a Fully Active 'Pseudomature' Form of This Monoterpene Cyclase and Reveals the Function of the Amino-Terminal Arginine Pair. *Biochemistry* **37(35)**: 12213-20
321. **Wright R, Basson M, D'Ari L y Rine J.** (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107(1)**: 101-14
322. **Wu G, Gu Y, Li S y Yang Z.** (2001). A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* **13(12)**: 2841-56
323. **Wungsintaweekul J, Herz S, Hecht S, Eisenreich W, Feicht R, Rohdich F, Bacher A y Zenk MH.** (2001). Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **268(2)**: 310-6.
324. **Yajima S, Nonaka T, Kuzuyama T, Seto H y Ohsawa K.** (2002). Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J Biochem (Tokyo)* **131(3)**: 313-7
325. **Yalovsky S, Rodríguez-Concepción M, Bracha K, Toledo-Ortiz G y Grissem W.** (2000). Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function. *Plant Cell* **12(8)**: 1257-66
326. **Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H y Kamiya Y.** (1998). The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes entkaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **116(4)**: 1271-8.
327. **Yoshioka H, Yamada N y Doke N.** (1999). cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol* **40(9)**: 993-8
328. **Zeidler J, Schwender J, Mueller C y Lichtenthaler HK.** (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans* **28(6)**: 796-8
329. **Zeidler J, Schwender J, Muller C, Wiesner J, Weidemeyer C, Beck E, Jomaa H y Lichtenthaler HK.** (1998). Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z Naturforsch* **53c**: 980-6
330. **Zeidler JG, Lichtenthaler HK, May HU y Lichtenthaler FW.** (1997). Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway ?. *Z Naturforsch* **52c**: 15-23
331. **Zhou D y White RH.** (1991). Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* **273(3)**: 627-34
332. **Zhou DX.** (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci* **4(6)**: 210-4

VI. BIBLIOGRAFÍA
