



Biosíntesi d'isoprenoides en bacteris i plantes. Aproximacions biotecnològiques

Jordi Perez Gil

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Biosíntesi d'isoprenoides en **bacteris** i plantes.
Aproximacions biotecnològiques

Jordi Pérez Gil

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT
Farmàcia

DEPARTAMENT
Bioquímica i Biologia Molecular

Biosíntesi d'isoprenoides en bacteris i plantes.
Aproximacions biotecnològiques

Jordi Perez Gil

Barcelona, 2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT
Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorat de Biotecnologia

BIENNI:

Biosíntesi d'isoprenoides en bacteris i plantes. Aproximacions biotecnològiques

Memòria presentada per Jordi Perez Gil per optar al títol de doctor per
la Universitat de Barcelona

El director de la tesi:

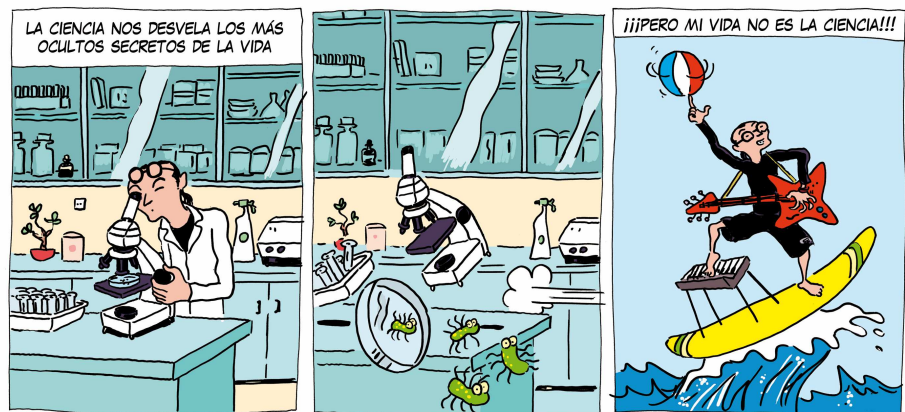
El candidat a doctor:

Manuel Rodríguez Concepción

Jordi Perez Gil

Jordi Perez Gil

2012



il·lustracions per Artur Laperla,
text per JPman

Índex de taules
Índex de figures
Abreviatures

Introducció

1.- Isoprenoides.	1
1.1-Consideracions Generals.	2
1.2- Biosíntesi d'Isoprenoides.	2
1.2.1.- Síntesis dels precursors universals IPP/DMAPP.	4
1.2.1.1.- La via del mevalonat o via clàssica.	5
1.2.1.2.- La via del MEP.	6
1.2.1.2.1.- Regulació de la via del MEP.	8
1.2.1.2.1a.- Regulació transcripcional.	9
1.2.1.2.1b.- Regulació post-transcripcional.	10
1.2.1.2.2.- Distribució diferencial.	11
1.2.1.2.3.- Diana per antibiòtics.	14
1.2.1.2.3.1.- Inhibidors de la via del MEP.	16
1.2.1.2.3.2.- La fosmidomicina.	17
1.2.1.2.3.3.- El problema de les resistències.	19
1.2.1.2.3.4.- Plasticitat gènica.	22
1.2.2 Síntesi de prenifosfats.	24
2.- Carotenoides.	25
2.1- Biosíntesi de carotenoides.	26
2.2- Regulació de la ruta carotenogènica.	31
2.2.1- Regulació transcripcional.	32
2.2.2- Regulació post-transcripcional.	34
2.3- Models per a l'estudi de la síntesi de carotenoides.	35
2.3.1.- Model bacterià basat en <i>Escherichia coli</i> .	35
2.3.2.- Models en plantes.	37
2.3.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .	38
2.3.2.2 Tomàquet (<i>Solanum lyopersicum</i>).	40
3.- Aplicacions tecnològiques.	41
3.1- Biotecnologia i enginyeria metabòlica.	41
3.2.- Aproximacions biotecnològiques per a la producció de carotenoides.	43
3.2.1.- Biotecnologia en bacteris.	44
3.2.1.1.- Model basat en <i>E.coli</i> .	45
3.2.1.2 Estratègies tecnològiques.	46
3.2.1.2.1 Millora de la disponibilitat dels precursors.	46
3.2.1.2.2.- Increment de les activitats catalítiques.	47
3.2.1.2.3.- Incorporació de la via del MVA.	48
3.2.1.2.4.- Modificacions del metabolisme central.	49
3.2.1.2.5.- Combinatoria i atzar.	49
3.2.1.2.6.- Capacitat d'emmagatzematge.	50
3.2.2.- Biotecnologia en plantes.	52
3.2.2.1 Millora d'aliments.	52

Materials i mètodes

1.- Material biològic	63
2.- Medis de cultiu de bacteris.	65
2.1 -Composició dels medis de cultiu	65
3.-Medi de cultiu de plantes	66
4.- Vectors Plasmídics	67
5.- Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)	68
6.- Tècniques basades en l'ús d'ADN polimerases termoestables.	71
6.1- Clonatge de gens	71
6.2.-Escrutini de colònies	72
7.-RT-PCR	73
8.- Sistema de Lligació-Restricció	74
9.- Introducció lligasa-independent de fragments d'ADN en vectors plasmídics.	76
10.- Transformació	77
10.1.- Preparació de cèl·lules competents per xoc tèrmic	77
10.2.- Preparació de cèl·lules competents per electroporació	78
10.3.- Transformació per xoc tèrmic	78
10.4.- Transformació per electroporació	79
11.- Digestió amb enzims de restricció	80
11.1.- Digestions parcials de DNA	82
12.- Generació i Rastreig d'una llibreria d'ADN genòmic d' <i>Escherichia coli</i> .	83
12.1.- Obtenció d'ADN genòmic bacterià.	83
12.2.- Digestió d'ADN genòmic d' <i>E.coli</i> per a la generació d'una genoteca	85
12.3.- Rastreig de la genoteca de <i>E.coli</i> .	87
13.- Defosforilació de ADN	88
14.- Klenow	88
15.- Electroforesi en gels d'agarosa	89
15.1.- Purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa.	90
16.- Lligació	90
17.- Seqüenciació	92
18.- Preparació de glicerinat cel·lulars.	92
19.- Mutagénesi dirigida	93
19.1.- Protocol Acurat	93
19.2.- Protocol ràpid	95
20.- Procés de clonatge amb la tecnologia Gateway®	96
21.- Obtenció dels enzims Recombinants.	98
21.1.- Sobreexpressió a <i>E. coli</i> .	98
21.2.- Obtenció dels extractes cel·lulars.	99
21.3.- Purificació dels enzims recombinants	100
21.4.- Purificació per FPLC	102
21.5.- Purificació en Batch	104
21.6.- Producció de proteïnes marcades amb seleno-metionina en BL21	104

22.- Anàlisi de les fraccions purificades.	106
22.1.- Electroforesi en gels de poliacrilamida SDS.	106
22.2.- Determinació del contingut en proteïna. Mètode de Bradford.	109
23.- Assaigs complementaris .	110
23.1.- Western-blot.	110

Tècniques aplicades en plantes

24. Extracció ràpida de DNA genòmic a partir de plàntules d' <i>A.thaliana</i> .	113
25a.- Extracció de proteïnes.	114
25b.- Preparació de cèl·lules competents d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	115
25b.1.- Transformació de cèl·lules competents d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	105
26.- Transformació d' <i>A.thaliana</i> .	116
26.1.- Condicions de creixement d' <i>A.thaliana</i> .	116
26.2.- Mètode: Immersió floral.	117
27.- Esterilització de llavors d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	118
28.- Anàlisi de pigments de naturalesa isoprenoide.	119
28.1.- Extracció de pigments per a quantificació.	119
28.2.- Extracció de pigments per anàlisi qualitatiu.	120
28.3.- Quantificació de pigments per espectroscòpia.	121
28.4.- Quantificació de carotenoides en <i>E.coli</i> .	122
29.- Aïllament de cloroplasts intactes.	123
30.- Experiments de marcatge isotòpic.	125
30.1.- Incorporació de 2H-DOX en esterols per GC-MS.	126
30.1.1 Quantificació d'esterols lliures per GC-MS.	126
30.2.- Incorporació 13C-MVA en pigments i clorofil·les.	127
30.2.1.- Quantificació de pigments i clorofil·les per LC-MS.	127
31.- Genotipat de línies mutants	128

Experiments específics

32.- Determinació d'activitat DXS i DXR.	128
32.1.- Determinació de l'activitat DRL per espectrofotometria.	130
33.- Determinació de l'estat d'oligomerització de DRL per Exclusió molecular.	131
34.- Determinació de paràmetres cinètics.	132
35.- Anàlisis de la variació d'activitat en funció de la temperatura.	133
36.- Anàlisis de la variació d'activitat en funció del pH.	133
37.- Determinació de IC50 per la FSM.	134
38.- Caracterització de l'activitat de DRL per UPLC-MS.	135
39.- Cromatografia en capa fina (TLC).	137
40.- Identificació "in vivo" de DXP.	139.

Resultats

1. Estudi dels factors limitants per a la producció de carotenoides.	145
1.1 L'aport de precursors a través de la via del MEP.	145
1.1.1 DXS i en menor mesura DXR i HDR són enzims clau.	145
1.1.2 HDS no juga un paper limitant en la regulació.	149
2. Estratègies per a la millora tècnica de l'enginyeria metabòlica.	153
2.1 La utilització d'enzims bifuncionals quimèrics.	153
2.1.1 L'enzim LcyE-LcyB (LY) produeix alfa i beta carotè en <i>E.coli</i> .	154
2.1.2 La proteïna quimèrica com a eina biotecnològica en plantes.	158
2.1.2.1 El mutant <i>lut2-3</i> d' <i>A.thaliana</i> .	158
2.1.2.2 LY no produeix alfa carotè en <i>A.thaliana</i> .	160
3. La via del MEP esta sotmesa a mecanismes post-transcripcionals en plantes.	163
3.1 Caracterització basada en l'estudi de mutants.	163
3.2 El mutant <i>rif18</i> .	164
3.2.1 Les activitats de DXS i DXR no estan alterades en <i>rif18</i> .	164
3.2.2 L'intercanvi d'IPP citosòlic i plastídic no està alterat en <i>rif18</i> .	167
3.2.2.1 Incorporació d'IPP en isoprenoides plastídics.	167
3.2.2.2 Incorporació d'IPP en isoprenoides citosòlics.	170
3.2.3 El mutant <i>rif18</i> mostra fenotip de fulles serrades i arrels curtes.	173
4. Alternatives a les activitats limitants de l'aport de precursors en bacteris.	175
4.1 Activitats alternatives als enzims claus de la ruta del MEP.	175
4.1.1 Activitats alternatives a DXS.	176
4.1.1.1 La mutació E636G en la subunitat E1 de la PDH.	176
4.1.1.2 Identificació de noves activitats alternatives.	183
4.1.1.2.1 La mutació G108S.	185
4.1.1.2.2 El gen <i>ribB</i> també presenta mutacions.	189
4.1.1.2.3 La mutació G108S en la DHBPS.	190
4.1.2 Activitats alternatives a DXR.	193
4.1.2.1 DRL un substitut de DXR en <i>Brucella abortus</i> .	193
4.1.2.1.1 DRL no presenta homologia amb DXR.	195
4.1.2.1.2 DRL complementa el mutant deficient.	195
4.1.2.1.3 DRL catalitza la mateixa reacció que DXR.	197
4.1.2.2 Caracterització bioquímica i filogenètica de DRL.	198
4.1.2.2.1 DRL en la seva forma activa és un Dímer.	198
4.1.2.2.2 Determinació de pH i Tª òptims.	199
4.1.2.2.3 Determinació dels paràmetres cinètics.	200
4.1.2.2.4 La activitat de DRL és inhibida.	202
4.1.2.2.5 DRL defineix una nova família de proteïnes.	203
4.1.2.2.6 La distribució de DRL i DXR no és excloent.	204
4.1.2.2.7 Anàlisi filogenètic de DRL.	205
4.1.2.2.8 La activitat de DRL no implica la pèrdua de DXR.	208
4.1.2.3 Determinació estructural.	211
4.1.2.3.1 DRL s'expressa correctament en <i>E.coli</i> .	211
4.1.2.3.2 DRL forma cristalls.	213
4.1.2.3.3 Estructura global de DRL.	214
4.1.2.3.4 El centre actiu de DRL.	218
4.1.2.3.5 Unió de FSM al centre actiu de DRL.	220

4.1.2.3.6 Estudis d'inhibició.	222
Discussió	
1. Consideracions generals.	233
2. Aproximacions a la millora dels recursos biotecnològics.	235
2.1 Estratègies biotecnològiques senzilles. Enzims bifuncionals.	235
2.1.1 L'enzim bifuncional L-Y en sistemes bacterians	237
2.1.2 L'enzim bifuncional L-Y en plantes.	238
3. Estudi de factors limitants de la biosíntesi de carotenoides.	243
3.1 Paper de PRL1.	243
3.2 Enzims de la via MEP.	249
3.2.1 En plantes.	249
3.2.2 En bacteris.	252
3.2.3 Correlació del model planta-bacteri.	256
4. La plasticitat i la biodiversitat com a font de noves eines biotecnològiques.	257
4.1 Activitats alternatives a DXS.	260
4.1.1 Mutacions en la subunitat E1 de la PDH.	261
4.1.1.1 El mutant E636Q permet la síntesi de DXP in vivo.	261
4.1.2. Mutacions en la 3,4-dihidroxí-2-butanona-4-fosfat.	264
4.1.2.1 El mutant DHBPS (G108S).	265
4.2 Activitats alternatives a DXR.	266
4.2.1 DRL, la identificació d'una nova família de proteïnes.	266
4.3 Aplicació biotecnològica.	270
5. Noves dianes per antibiòtics.	274
5.1 Llums i ombres de la plasticitat gènica i la biodiversitat.	274
5.2 DHBPS(G108S) una potencial eina per a l'estudi de la síntesi de riboflavina.	275
5.3 DRL i el disseny d'antibiòtics específics de la síntesi d'isoprenoides.	276
	.
Conclusions	281
Bibliografia	285
Publicacions	313

Índex de Taules

Introducció

Taula 1. <i>Classificació dels isoprenoides i les diverses subfamílies.</i>	2
Taula 2. <i>Relació de les diverses nomenclatures utilitzades per la via del MEP.</i>	7
Taula 3 <i>Distribució de les vies del MEP i del MVA en funció dels diversos grups taxonòmics.</i>	13
Taula 4. <i>Relació de soques d'E.coli amb modificacions de la biosíntesi d'isoprenoides.</i>	36
Taula 5. <i>Relació de recursos electrònics per l'organisme model Arabisopsis thaliana.</i>	39
Taula 6. <i>Relació de recursos electrònics per l'organisme model Lycopodium obscurum.</i>	40
Taula 7. <i>Relació de gens utilitzats per facultar E.coli per a la síntesi de carotenoides.</i>	45
Taula 8. <i>Resum dels rendiments assolits en estratègies biotecnològiques.</i>	51

Materials i mètodes

Taula 9. <i>Composició dels medis utilitzats pel creixement de bacteris.</i>	65
Taula 10. <i>Condicions de creixement habituals per cultius bacterians.</i>	65
Taula 11. <i>Composició bàsica dels medis de creixement de plantes en sistemes in vitro.</i>	66
Taula 12. <i>Característiques generals de les diverses ADN polimerases.</i>	69
Taula 13. <i>Composició estàndard de la mescla de reacció utilitzada pel clonatge.</i>	71
Taula 14. <i>Programa de cicles general, utilitzat per una PCR de clonatge.</i>	71
Taula 15. <i>Composició de la mescla de reacció per a PCR de colònia.</i>	73
Taula 16 <i>Composició de la mescla de reacció utilitzada per amplificar l'ADNc.</i>	74
Taula 17. <i>Mescla de reacció per la inserció d'ADN rom en un plàsmid.</i>	75
Taula 18. <i>Composició dels dos tampons per la preparació de cèl·lules competents (xoc tèrmic).</i>	77
Taula 19. <i>Composició general d'una mescla de reacció per tallar ADN.</i>	81
Taula 20. <i>Mescla de reacció per generar una genoteca de ADN genòmic</i>	86
Taula 21. <i>Composició d'una mescla de reacció per la lligació d'ADN (cohesiu) en un vector.</i>	91
Taula 22. <i>Mescla de reacció tipus per la recombinació catalitzada per l'enzim BP ClonasaTM.</i>	97
Taula 23. <i>Mescla de reacció tipus per la recombinació amb el vector de destinació.</i>	98
Taula 24. <i>Composició dels tampons per la purificació de proteïnes recombinants per (IMAC)</i>	103
Taula 25. <i>Medis de cultiu per a la producció de proteïnes marcades amb seleno-metionina.</i>	105

Taula 26. Composició dels dos gels que conformen un gel d'electroforesi SDS-PAGE.	107
Taula 26. Composició dels tampons d'electroforesi i de càrrega.	108
Taula 28. Composició de les mescles pel revelat de les proteïnes en gel de poliacrilamida.	109
Taula 29. Composició de les dues solucions necessàries per fer una assaig de Western-blot.	112
Taula 30. Composició dels tampons per l'aïllament de cloroplasts	125
Taula 31. Composició dels tampons per extracció i assajos d'activitat DXS i DXR.	130
Taula 32. Relació de proteïnes utilitzades per al calibrat de la columna d'exclusió molecular.	131
Taula 33. Mescles de reacció per realitzar les cinètiques de reacció de DRL i DXR.	132
Taula 34. Mescles de reacció per a la determinació de l'activitat de DRL segons la T^a .	133
Taula 35. Condicions de reacció per a la determinació de l'activitat de DRL en funció del pH.	134
Taula 36. Condicions de reacció per a la determinació de IC_{50} de la FSM en DRL.	135
Taula 37. Mescla de reacció utilitzada pel seu posterior anàlisi per UPLC-MS.	136
Taula 38. Solucions per separació en TLC.	138

Resultats

Taula 39. Microorganismes que presenten gens homòlegs per els enzims MEP a excepció de DXR.	194
Taula 40. Mescla de reacció per la determinació de l'activitat de BaDRL a diferents pH i T^a	200.
Taula 41. Establiment de les diverses classes d'organismes que tenen DRL en el seu genoma.	205

Índex de figures

Introducció

Figura 1. Esquema model de les diverses rutes biosintètiques per a la síntesi d'isoprenoides.	3
Figura 2. Rutes biosintètiques de síntesi de precursors per a la síntesi d'isoprenoides.	4
Figura 3. Biosíntesi de carotenoides a partir de l'IPP i DMAPP procedents de la via del MEP.	30
Figura 4. Esquema del sistema model EcAB4.	37
Figura 5. Esquema d'una cèl·lula de E.coli habilitada per a la síntesi de carotenoides.	46

Materials i mètodes

Figura 6. Esquema del mètode de digestió parcial per dilució de l'enzim.	83
Figura 7. Esquema de la introducció de mutacions puntuals a partir d'un motllo plasmídic.	95
Figura 8. Esquema del sistema de clonatge Gateway.	97
Figura 9. Visió de la interacció entre els residus d'histidina de la proteïna i el catió de níquel.	101
Figura 10. Diagrama model de la monitorització de la purificació de proteïnes recombinants.	103
Figura 11. Genotipat de plantes mutants SALK.	128

Resultats

Figura 12. Nivells relatius de licopè acumulats en E.coli contenint el plasmidi pLyc.	147
Figura 13. Sobreexpressió de HDS en bacteries.	151
Figura 14. Proteïna bifuncional amb activitats LCYE i LCYB.	153
Figura 15. Estratègia de clonatge utilitzada per a la generació de l'enzim quimèric LeLcyB-CrtY.	155
Figura 16. Caracterització de l'enzim bifuncional LCYE-CrtY en bacteris.	156
Figura 17. Cromatograma d'HPLC dels carotenoides en el model carotenogènic de E.coli.	157
Figura 18. Genotipat del mutant lut2-3.	158
Figura 19 Perfil cromatogràfic de carotenoides de plantes mutants lut2-3 homozigotes.	159
Figura 20. Estratègies d'inserció de les seqüències de fusió LY en el vector binari pCAMBIA.	160
Figura 21. Perfil qualitatiu de carotenoides obtingut per cromatografia HPLC.	161
Figura 22. Comparativa de la resistència poblacional del mutant rif18.	165
Figura 23. Quantificació de la activitat DXS en línies 35S:DXS.	166
Figura 24. Determinació in vitro de les activitats dels enzims DXS i DXR.	167

Figura 25. Efecte dels suplementes afegits al medi en el creixement de plàntules de rif18.	168
Figura 26. Incorporació de MVA marcat en carotenoides i clorofil·les de plantules Wt i rif18.	169
Figura 27. Cinètica de concentracions (μM) de clomazona (CLM).	171
Figura 28. Efecte dels diversos suplementes afegits al medi sobre el creixement en plàntules.	171
Figura 29. Incorporació de DX marcat en esterols de plantules Wt i rif18.	172
Figura 30. Trets fenotípics del mutant rif18.	173
Figura 31. Comparativa de creixement de les arrels.	174
Figura 32. PCR de comprovació dels plasmidis i la disrupció del gen dxs de la soca EcAB1-6.	178
Figura 33. Detecció i identificació de DXP en la soca aceE [E636G] per HPLC-MS/MS.	179
Figura 34. Quantificació dels nivells de DXP en la soca doble mutant EcAB1-6..	180
Figura 35. Caracterització inicial bàsica de les soques mutants.	184
Figura 36. Anàlisi de creixement de les soques de E.coli.	185
Figura 37. Estructura del Clon1 identificat en el rastreig de la genoteca del mutant EX8.	187
Figura 38. Fragmentacions generades a partir del Clon1 i complementació de la soca EcAB4-2.	188
Figura 39. Reacció catalitzada per l'enzim DHBPS.	189
Figura 40. Esquema de les mutacions identificades en el gen ribB.	190
Figura 41. Quantificació de DXP en cultius de la soca EcAB1-6 transformada.	191
Figura 42. Esquema de la estratègia per a la identificació de DRL de Brucella abortus.	195
Figura 43. Complementació de cèl·lules de E.coli deficients en dxr amb la proteïna DRL.	196
Figura 44. Detecció i identificació del MEP produït per la proteïna DRL a partir de DXP.	198
Figura 45. Determinació de l'estat d'oligomerització de la proteïna BaDRL.	199
Figura 46. Determinació del pH i temperatura òptims per a l'activitat de la proteïna BaDRL.	200
Figura 47. Determinació dels paràmetres cinètics bàsics de la proteïna BaDRL.	201
Figura 48. Efecte de l'inhibidor FSM sobre el creixement cel·lular de cultius de Brucella abortus.	203
Figura 49. Anàlisi filogenètic de les seqüències amb homologia a DRL.	206
Figura 50. Alineament múltiple de seqüències DRL.	208
Figura 51. Complementació amb les proteïnes DXR i DRL de bacteris de classe B.	209
Figura 52 . Alineament múltiple de diverses proteïnes DXR representatives.	210

Figura 53. Gel de poliacrilamida de l'expressió i purificació de DRL.	211
Figura 54. Proves d'estabilitat de la proteïna DRL purificada..	212
Figura 55. Imatges representatives dels cristalls de la proteïna BaDRL.	213
Figura 56. Estructura del dímer format per DRL en torn de l'eix binari molecular.	215
Figura 57. Estructura del monòmer de la proteïna DRL.	216
Figura 58. Alineament estructural de les proteïnes DRL de <i>B.abortus</i> i DXR de <i>E.coli</i> ..	217
Figura 59. Comparació de la estructura del domini C-terminal de BaDRL.	218
Figura 60. Configuració dels centres actius de DRL i DXR amb unió de FSM.	219
Figura 61. Expressió i purificació de les proteïnes DRL silvestres i mutants puntuals.	222
Figura 62. Estudis de posicionament d'inhibidors en el centre actiu de BaDRL i EcDXR.	223
Figura 63. Assajos d'inhibició de DXR i DRL.	225
Figura 64. Anàlisi dels nivells de licopè en soques transformades amb <i>aceE</i> i <i>ribB</i> mutades.	228
Figura 65. Anàlisi dels nivells de licopè acumulats en soques sobreexpressores de BaDRL.	229

Discussió

Figura 66. Vies per a la biosíntesi dels precursors d'isoprenoides.	259
--	-----

Abreviatures

ABA:	àcid absicic
Acetil-CoA:	acetil coenzim A
ADN:	àcid desoxiribonucleic
ARN:	àcid ribonucleic
ADNc:	ADN complementari
BSA:	albúmina Sèrica Bovina
CAP:	cloramfenicol
CDP-ME:	4-difosfocitidil-2-C-metil- D(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil.D-eritritol
CDP-MEP:	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfat
CLM:	Clomazona
CMK:	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa
DMAPP:	dimetilal·lil difosfat
DTT:	ditiotreitol
DX:	1-desoxi-D-xil·lulosa
DXP:	1-desoxi-D-xil·lulosa 5- fosfat
DXR:	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat reductoisomerasa
DXS:	1-desoxi-D-xil·lulosa 5- fosfat sintasa
EDTA:	àcid diaminotetraacètic
E.coli	Escherichia coli
FPP:	farnesil difosfat
FPS:	farnesil difosfat sintasa
FSM:	Fosmidomicina
GAP:	gliceraldehid 3- fosfat
GPP:	geranil difosfat
GGPP:	geranilgeranil difosfat
HDS:	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil 4-difosfat sintasa
HDR:	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil 4-difosfat reductasa
HIS:	Histidina
HMBPP:	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil 4-difosfat
HMGR:	3-hidroxi 3-metilglutaril Co-A reductasa
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography

HYG: higromicina

IDI: isopentenil difosfat isomerasa

IMAC: cromatografia d'afinitat per cations metàl·lics immobilitzats

IPP: isopentenil difosfat (2-metil-1,3-butadienfosfat)

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosid

LCYE: ϵ -ciclase

LCYB: β -ciclase

MCS: Multi Cloning Site

MCT: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidil transferasa

MDS: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat sintasa

MEcPP: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4- fosfat

MVA: mevalonat

MVE: Mevinolina

MVK: mevalonat quinasa

NADPH: Nicotinamidoadenin dinucleòtid fosfat

Pb: Parell de bases

PBSK: pBluescript

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PDH: Piruvat deshidrogenasa

PDS: Fitoè desaturasa

PK: piruvat quinasa

PMD: mevalonat difosfat descarboxilasa

PMK: fosfomevalonat quinasa

PSY: Fitoè sintasa

PTOX: Oxidasa plastídica terminal

PVDF: difluorur de polivinilidè

r.p.m: revolucions per minut

SDS: dodecilsulfat de sodi

SDS-PAGE: electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS

TLG: Transferència lateral gènica

TPP: pirofosfat de tiamina

1.- Isoprenoides

Els isoprenoides (o terpenoides) constitueixen la família més gran de productes naturals coneguda. Una família que no ha parat d'incorporar nous components identificats fins a pràcticament duplicar els seus membres en les últimes dècades i situar-se per sobre dels 45.000 compostos diferents coneguts (Yun *et al.*, 2012). Tot i que són produïts en tots els éssers vius, és en les plantes on assoleixen la seva màxima expressió en termes de diversitat funcional i estructural. La immensa majoria són catalogats com a metabolits secundaris, és a dir compostos no essencials per a la vida vegetal, la síntesi dels quals no és generalitzada sinó que queda acotada a famílies de plantes, o fins i tot a espècies molt concretes. (Bouvier *et al.*, 2005) El seu rol s'associa tradicionalment a la interacció de la planta amb l'entorn a diversos nivells. Alguns monoterpens i sesquiterpens juguen un paper important en la defensa de les plantes en front de patògens i herbívors, isoprenoides volàtils són els responsables d'atraure insectes per facilitar la polinització, i els pigments carotenoides que s'acumulen en moltes flors i fruits atrauen animals perquè actuin com a vehicles de polinització i dispersió de les llavors. Sense oblidar el seu paper com a al·leloquímics en les lluites que s'estableixen entre les diverses espècies de plantes pel domini de cada nínxol ecològic en alliberar substàncies inhibidores de la germinació de potencials competidors. (Croteau *et al.*, 2000) La enorme varietat de metabolits secundaris d'origen isoprenoide produïts per les plantes suposa la major part dels compostos descrits però en el món procariota també es sintetitzen metabolits secundaris. Aquest és el cas de diversos bacteris no fotosintètics que poden generar carotenoides, o els antibiòtics d'origen isoprenoide produïts per diverses soques d'actinomicets (Dairi, 2005)

Un grup més reduït d'isoprenoides formen part dels anomenats metabolits primaris, és a dir compostos essencials pel funcionament dels organismes (Hemmerlin *et al.*, 2012). El seu caràcter indispensable fa que la diferència de la exclusivitat de la distribució de molts metabolits secundaris, aquests compostos es trobin en pràcticament totes les espècies. (Bouvier *et al.*, 2005) En plantes participen de processos tan importants com la respiració (ubiquinona), la fotosíntesi (clorofil·les, carotenoides, o plastoquinones) o la regulació del creixement i el desenvolupament (fitohormones com citoquinines, brasinosteroides, giberelines, àcid abscísic o estrigolactones) (Sacchetti and Poulter, 1997) En procariotes intervenen en processos específics de gran importància com la biosíntesi de la paret cel·lular (Bouhss *et al.*, 2008)(undecaprenil fosfat, més conegut com bactoprenol), la fluïdesa de la membrana plasmàtica (Kannenberg and Poralla, 1999) (hopanoids, substituint els esterols típics de les cèl·lules eucariotes), el transport d'electrons durant la respiració cel·lular (ubiquinona i menaquinona) (Kawamukai, 2002) o (citocroms) (Mogi *et al.*, 1994), o la conversió de la llum en energia química (bacterioclorofil·les i bacteriorodopsines) (Chew and Bryant, 2007).

Però la diferenciació entre isoprenoides primaris i secundaris no sempre és evident i alguns compostos es troben en la frontera de les dues classificacions. Un cas evident és el dels carotenoides típicament associats a la coloració de flors i fruits o la generació d'aromes i sabors, però que també intervenen en processos essencials de captació de llum i protecció fotooxidativa, o regulació del desenvolupament a través d'hormones derivades de la seva degradació oxidativa. Un altre cas es el de la isopentenil adenosina en els ARN de transferència. La modificació de la adenosina amb el grup isoprenoide millora la eficiència del procés de traducció de manera que tot i que sense aquesta modificació la viabilitat de l'organisme no es veu compromesa si que provoca un increment significatiu en la taxa de mutacions espontànies amb el conseqüent perill que això suposa. (Persson *et al.*, 1994)

1.1- Consideracions generals

1.2- Biosíntesi d'Isoprenoides.

Tot i l'enorme complexitat estructural i funcional dels isoprenoides com a família de substàncies naturals, ja des del 1910 s'havia proposat que tots ells deriven d'una unitat estructural comú de 5 àtoms de carboni (McGarvey and Croteau, 1995). Anys més tard es verificaria aquesta afirmació en identificar el precursor biosintètic actiu de 5 carbonis, com isopentenil difosfat (2-metil-1,3-butadienfosfat: IPP). L'esquelet bàsic de tots els isoprenoides s'origina a partir de la condensació seqüencial d'unitats d'IPP sobre el seu isòmer al·lílic dimetil·lil difosfat (DMAPP), que presenta una diferent distribució dels dos dobles enllaços. Per la seva similitud estructural amb la molècula no fosforilada cada una de les molècules es coneix també amb el nom d'unitat d'isoprè. Cada una de les subfamílies d'isoprenoides es classifica en funció de les unitats d'isoprè que conformen aquest esquelet base o molècula parental (**Taula 1**): hemiterpens (C_5), monoterpens (C_{10}), sesquiterpens (C_{15}), diterpens (C_{20}), sesterterpens (C_{25}), triterpens (C_{30}), tetraterpens (C_{40}) i politerpens (més de 40 carbonis) (McGarvey and Croteau, 1995).

Àtoms de C (C_N)	Denominació	Molècula parental	Compostos
5	Hemiterpens	IPP	Isoprè, citoquinines, isopentenil-ARNt
10	Monoterpens	GPP	Olis essencials, essències volàtils
15	Sesquiterpens	FPP	Fitoalexines, piretrines, fracció isoprenoide de proteïnes prenilades
20	Diterpens	GGPP	Giberelines, Vitamina A, fracció isoprenoide de proteïnes prenilades, fitol, filoquinona, tocoferol i resines
25	Sesterpens	GFPP	Ceres
30	Triterpens	Escualè	Fitoesterols, brasinosteroides, saponines, triterpens pentacíclics
40	Tetraterpens	Fitoè	Carotenoides, ABA, strigolactones
>40	Politerpens	GGPP	Cautxú, làtex, dolicol i fracció isoprenoide de plastoquinona i ubiquinona

Taula 1. Classificació dels isoprenoides i les diverses subfamílies que deriven de cada una de les molècules parentals.

El procés biosintètic es pot dividir en tres parts. En un primer grup de reaccions, es sintetitzen les unitats bàsiques IPP i DMAPP. Seguidament una o varies molècules d'IPP són incorporades a una molècula de DMAPP per l'acció d'una sèrie d'enzims (prenil transferases) mitjançant reaccions successives de condensació cap-cua que rendeixen prenil difosfats de cadena creixent com geranil difosfat (GPP, C₁₀) farnesil difosfat (FPP, C₁₅) i geranilgeranil difosfat (GGPP, C₂₀). La unió d'alguns d'aquests prenil difosfats pot generar molècules lineals més llargues. Per exemple, el fitoè (C₄₀, precursor dels carotenoides) es sintetitza per condensació de dos molècules de GGPP (**Taula 1**). Finalment, es sotmet l'esquelet de carboni obtingut a tota una sèrie de possibles modificacions entre les que s'inclouen reaccions de dimerització, ciclacions, reaccions d'oxidació-reducció o isomerització, per arribar a l'estructura definitiva seguint les premisses de la química orgànica. Els dos primers conjunts de reaccions conformarien la part més o menys invariable del procés biosintètic mentre que la tercera englobaria tot un conjunt de rutes metabòliques que, utilitzant els diversos prenil fosfats com a punt de partida, generarien la enorme diversitat de productes finals de naturalesa isoprenoide (Figura 1).

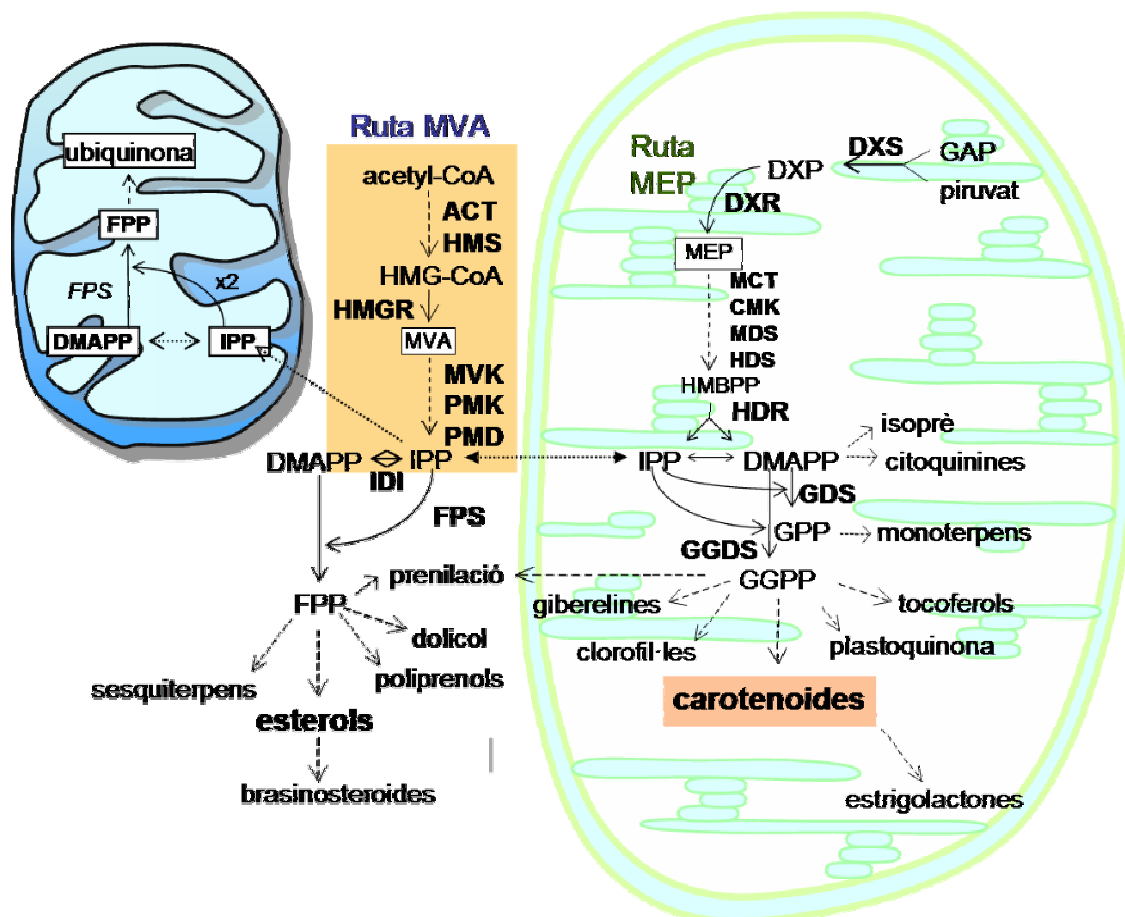


Figura 1. Esquema model, pel sistema de plantes, de les diverses rutes biosintètiques i els precursors utilitzats en cada una d'elles per a la síntesi d'isoprenoides. Les fletxes contínues indiquen un únic pas catalític, les fletxes discontinues indiquen diversos passos catalítics, i les fletxes puntejades indiquen transport.

1.2.1 Síntesis dels precursors universals IPP/DMAPP

En l'actualitat es coneix l'existència de dues rutes biosintètiques independents per a la formació d'IPP i DMAPP, els precursors universals que s'utilitzen com a unitats bàsiques a partir de les quals sintetitzar la totalitat dels isoprenoides. La via del mevalonat (MVA) va ser la primera en ser identificada i consta de 6 etapes, i la via del 2-c-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) formada per 7 passos catalítics (Figura 2). Totes dues sintetitzen IPP com a producte final però mentre la via del MVA ho fa exclusivament, en la via del MEP la darrera etapa produeix a l'hora l'IPP i el DMAPP. En tots dos casos una isomerasa, essencial per completar la via del MVA, i no essencial però que modula la proporció entre els dos compostos en la via del MEP, s'encarrega de convertir els dos isòmers.

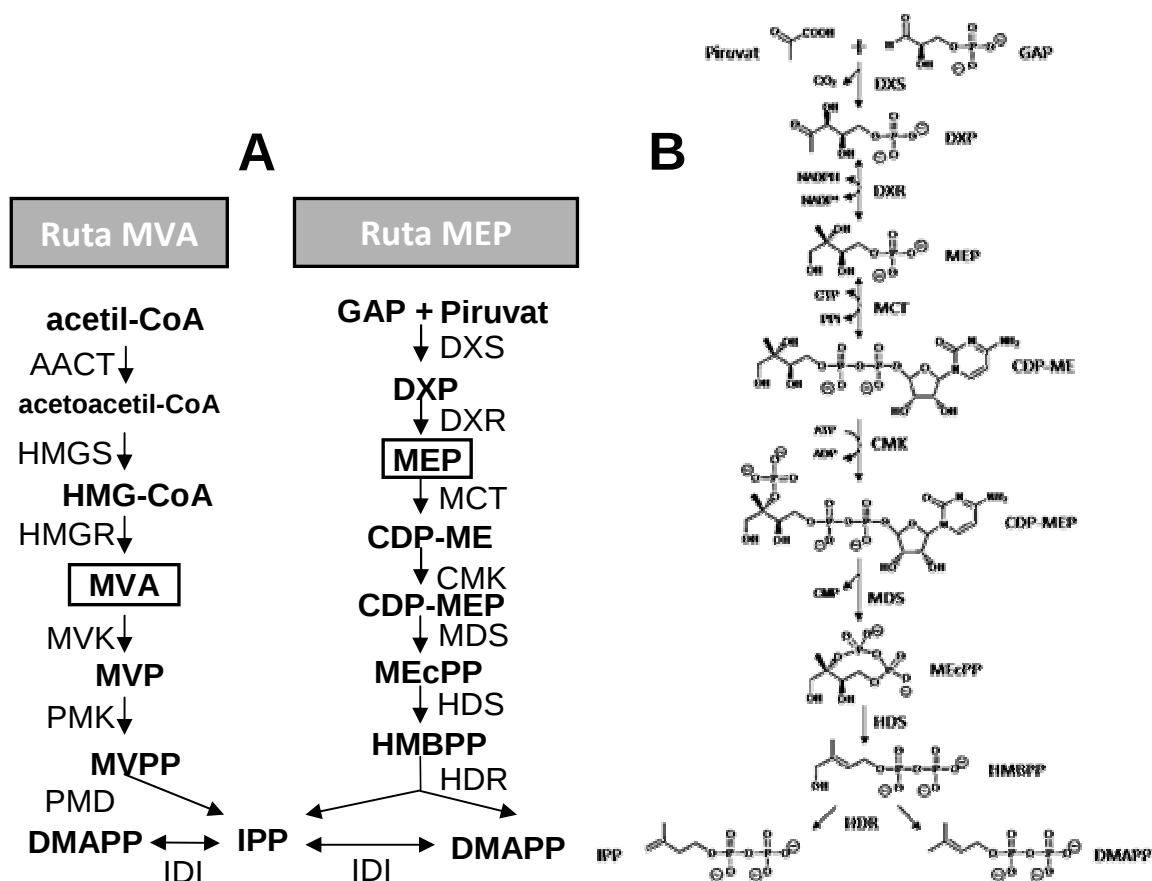


Figura 2. Rutes biosintètiques de síntesi de precursors universals per a la síntesi d'isoprenoides. A) **Ruta del MVA:** AACT, Acetoacetil-CoA tiolasa. HMGS, HMG-CoA sintasa. HMGR, HMG-CoA reductasa. MVK MVA quinasa. PMK, MVP quinasa. PMD, MVPP descarboxilasa. **Ruta del MEP:** DXS, DXP sintasa. DXR, DXP reductoisomerasa. MCT, CDP-ME transferasa. CMK, CDP-ME quinasa. MDS, MEcPP sintasa. HDS, HMBPP sintasa. HDR, HMBPP reductasa. Nomenclatura adoptada de (Phillips et al., 2008). B) Detall a nivell molecular dels intermediaris que es formen en la via del MEP.

1.2.1.1 La via del mevalonat o via clàssica.

Inicialment postulada com l'única via anabòlica de síntesi d'IPP, per ser la primera en descobrir-se, durant molt de temps s'ha denominat a la ruta de síntesi d'IPP a partir d'acetil-CoA com la via del mevalonat (MVA) o via clàssica. (Goldstein and Brown, 1990) Identificada als anys 50, fa temps que es treballa en ella a tots nivells, i, per tant, és àmpliament coneguda tot i que encara queden multitud d'incògnites per resoldre. L'inici de la resolució de la via coincideix amb els primers passos de l'aplicació de les tècniques de marcatge isotòpic en bioquímica. Utilitzant molècules d'acetat marcat amb ^{14}C en diferents posicions de la seva estructura, va ser com es va associar aquesta molècula precursora amb la síntesi d'alguns isoprenoides que passaven a incorporar la radioactivitat (Kuzuyama and Seto, 2012). Els pioners en aquest tipus d'estudis van ser Bloch i Rittenberg (Rawn, 1989) establint així unes sòlides bases per a l'estudi de la resta de la via. Es va determinar que la primera etapa irreversible de la via, i que més tard s'ha identificat com la més limitant, estava catalitzada per l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) reductasa (HMGR). Aquest enzim redueix la molècula de HMG-CoA per produir MVA, el primer intermediari específic que dona nom a la via (Figura 2).

La via del MVA està present en arqueobacteris, fongs, plantes, animals i alguns procariotes Gram positius. La successió de reaccions que porta a la formació de l'IPP, s'inicia amb una molècula d'acetat en la forma biològica activada d'acetil-CoA. Aquesta molècula inicial pateix dues condensacions seqüencials amb sengles molècules d'acetat actiu. La primera d'elles rendeix una molècula d'acetoacetil-CoA, per l'acció de l'enzim acetoacetil-CoA tiolasa (AACT), mentre que la segona produeix HMG-CoA per l'intervenció de la HMG-CoA sintasa (HMGS). Com s'ha comentat prèviament, en l'etapa limitant de la via (Wang and Tong, 1999), HMGR produeix àcid mevalònic (o mevalonat al pH fisiològic) per reducció del HMG-CoA amb consum de dues molècules de NADPH. Els enzims mevalonat quinasa (MVK), i fosfomevalonat quinasa (PMK) catalitzen successivament la doble fosforilació del grup hidroxil, del MVA i MVP respectivament per acabar generant una molècula de difosfomevalonat. L'última etapa de la via consumeix una tercera molècula d'ATP (com en les dues fosforilacions anteriors). En ella l'enzim difosfomevalonat descarboxilasa (PMD) catalitza dos passos successius, la fosforilació de l'hidroxil terciari i la descarboxilació per formar l'estructura definitiva de l'IPP (Figura 2). En la via s'inclou un últim pas, catalitzat per l'enzim IPP isomerasa (IDI) que permet la formació de l'isòmer al·lílic de l'IPP, el DMAPP (Miziorko, 2011).

Donat el seu important paper regulador del flux de la via del MVA i de la producció d'isoprenoides finals com esterols, la inhibició de l'activitat HMGR ha estat una eina molt eficaç per intentar controlar els nivells de colesterol (el principal esterol en cèl·lules animals) en humans (Wang and Tong, 1999). Algunes de les molècules inhibidores de l'activitat HMGR (estàtines) més utilitzades són la atorvastatina (que va ser el medicament més venut de la història), la mevastatina, la lovastatina (o mevinolina), o la pravastatina. El seu caràcter

hipocolesterolèmic atribueix a les estatines un potencial valor farmacològic en la lluita contra les malalties cardiovasculars. Aquesta troballa relacionada a tall d'exemple, il·lustra perfectament la seqüència lògica de coneixement - aplicació associada al descobriment d'una nova via. No s'ha d'oblidar però, que els animals sintetitzen molts altres compostos d'esquelet isoprenoide aprofitant el mateix IPP que produeix la via del mevalonat, de manera que la seva aplicació inevitablement implica un ampli ventall d'efectes secundaris (Kahri and Syvanne, 2012). Una actualitzada revisió de la ruta sintètica i la seva regulació ha estat recentment publicada. (Bach and Rohmer, 2013)

1.2.1.2 La via del MEP.

Durant molts anys, la via del MVA va ser majoritàriament acceptada com la via universal per a la síntesis d'IPP. Però a principis dels anys 1990s van començar a presentar-se resultats experimentals duts a terme en plantes i microorganismes que refutaven aquesta distribució universal, ja que no es podien explicar exclusivament en funció de la via del mevalonat (Horbach *et al.*, 1993). Els mateixos tipus d'estudis amb radioactivitat que havien tret a la llum la via clàssica (Cane D.E. *et al.*, 1981) ara feien palesa la inconsistència d'alguns resultats amb els models plantejats fins al moment. S'havia produït una escletxa en el model del MVA com a precursor universal dels isoprenoides i nous experiments van acabar d'obrir-la. Ja a mitjans dels 90 (Rohmer *et al.*, 1993), és quan apareixen els primers articles (Rohmer, 1996) que postulen l'existència d'aquesta nova via, i posen les bases per al seu posterior estudi en profunditat (Rohmer, 1999).

En un principi, degut al seu desconeixement i per contraposició amb la via clàssica, la nova via es va anomenar via alternativa. Va ser l'any 1999 quan es va arribar a l'acord de denominar-la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP, el primer intermediari específic d'aquesta ruta). Tot i això, no es estrany trobar-ne referències a la bibliografia com a via de Rohmer, via de la 1-desoxi-D-xil·lulosa 5-fosfat (DXP, la molècula precursora del MEP que també pot ser utilitzada per a la síntesi de compostos no isoprenoides) o ruta independent de MVA. Tots els estudis iniciats en aquell moment i els que s'hi han afegit a posteriori, van permetre identificar les 7 etapes que conformen la via (Lois *et al.*, 1998; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Per la seva joventut encara no ha trobat una nomenclatura universalment utilitzada per els intermediaris i enzims de la via del MEP (**Taula 2**), però recentment s'ha proposat una possible nomenclatura unificadora (Phillips *et al.*, 2008).

Activitat	Abreujat	Gens Planta	Gens Bacteri	Nova Nomen.
1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfat sintasa	DXP sintasa	DXS	dxs	DXS
1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfat reductoisomerasa	MEP sintasa	DXR	dxr/ispC	DXR
2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidil transferasa	CDP-ME sintasa	CMS	ygbP/ispD	MCT
4-(Citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinasa	CDP-ME quinasa	CMK	ychB/ispE	CMK
2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat sintasa	MEcPP sintasa	MCS	ygbB/ispF	MDS
4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat sintasa	HMBPP sintasa	HDS	gcpE/ispG	HDS
4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat reductasa	HMBPP reductasa	IDS	lytB/ispH	HDR

Taula 2. Relació de les diverses nomenclatures utilitzades per referir-se a cada una de les activitats que conformen la via del MEP. En la primera columna, l'activitat catalitzada per cada un dels enzims. En la segona la denominació abreujada. En la tercera i quarta la nomenclatura abreujada per cada un dels enzims en plantes i bacteris respectivament. En la cinquena, els acrònims proposats per unificar totes les nomenclatures en una de única y que ha estat la adoptada en aquesta memòria (Phillips et al., 2008).

La via del MEP (Figura 2) està present en la majoria d'eubacteris (inclosos *E.coli* i un ampli ventall de bacteris patògens), plantes superiors (confinada en els plasts), i alguns protozoos del grup dels Apicomplexa (com el paràsit de la malària *Plasmodium falciparum*). Els seus precursors inicials són una molècula de piruvat i una triosa, el D-gliceraldehid 3-fosfat (GAP) que en el primer pas de la via son utilitzats per generar DXP per l'enzim DXP sintasa (DXS) (Lange et al., 1998; Lois et al., 1998). DXS catalitza una seqüència de dues reaccions depenent de pirofosfat de tiamina (TPP) (Arigoni, 1997). En un primer moment provocaria la formació de l'intermediari hidroxietiltiamina per unió de la tiamina al piruvat i posterior descarboxilació d'aquest últim. A continuació es dona una reacció de condensació de l'intermediari sobre el GAP per atac nucleòfil sobre el grup aldehid. El resultat és la formació d'una pentosa, reconeguda com a intermediari en altres processos anabòlics com la síntesi de tiamina (vitamina B1) (Julliard and Douce, 1991) o piridoxol (vitamina B6) (Rohmer, 1999). Recentment s'ha proposat un mecanisme seqüencial aleatori totalment nou per aquesta classe d'enzims tiamina dependents (Brammer et al., 2011). En la segona etapa, la primera específica de la via, la DXP és transformada per l'acció de l'enzim DXP reductoisomerasa (DXR) (Takahashi et al., 1998). Com en el cas anterior és una reacció amb dues etapes diferenciades però consecutives. Inicialment té lloc una isomerització seguida d'una reducció en la qual el cofactor NADPH actua com a agent reductor. Tot seguit té lloc la conversió del MEP a 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) per l'acció de l'enzim 4-MEP citidiltransferasa (MCT). Immediatament el CDP-ME és fosforilat en una reacció dependent d'ATP per l'enzim CDP-ME quinasa (CMK) per rendir CDP-ME 2-fosfat (CDP-MEP) que, seguidament, és transformat a 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat (MEcPP) per la intervenció de l'enzim MEcPP sintasa (MDS). En les posteriors etapes el cicle és reduït a (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat (HMBPP) en una reacció catalitzada per l'enzim HMBPP sintasa (HDS) (Hunter, 2007). En últim lloc es dona una reducció conduïda per l'enzim HMBPP reductasa (HDR) que rendeix a l'hora IPP i DMAP (a diferència de la via del MVA que produeix únicament IPP) (Rodríguez-Concepción et al., 2000). Aquesta és una diferència significativa entre les dues vies, però tot i això també hi ha un enzim IPP isomerasa plastídic que en modula les proporcions. S'ha descrit que la via del MEP produeix IPP i DMAP en una proporció d'aproximadament 5:1 però l'eficiència biosintètica de

les etapes posteriors millora significativament quan aquesta proporció es mou al voltant de 3:1 (Rohdich *et al.*, 2002). (Figura 2)

Tot i la importància de molts dels compostos sintetitzats amb precursors produïts per la via del MEP, el fet que el seu descobriment sigui tant recent, fa que molts dels aspectes de la seva bioquímica i de la regulació del procés biosintètic encara es trobin en una fase inicial de coneixement obrint així un vast i verge camp d'estudi de gran interès.

1.2.1.2.1 Regulació de la via del MEP

Dels set enzims que configuren la ruta els dos primers, DXS i DXR, han estat els més àmpliament estudiats tant en bacteris com en plantes. La sobreexpressió de DXS tant en sistemes bacterians com en plantes condueix a un increment significatiu en l'acumulació de productes finals tant en teixits fotosintètics (Estévez *et al.*, 2001) com no fotosintètics (Enfissi *et al.*, 2005) suggerint un paper clau d'aquest enzim en el control del flux metabòlic. En el cas de DXR els efectes no son tan clars. En flors de *Anthirrhinum majus* el patró oscil·lant de biosíntesi i emissió d'isoprenoides volàtils sintetitzats en el cloroplast no es troba acompanyat per un patró equivalent dels nivells d'expressió de DXR (Dudareva *et al.*, 2005), patró que si s'observa en el cas de DXS. Tampoc s'estableix un increment en l'expressió del gen o en la quantitat de proteïna DXR en el fruit de tomàquet coincidint amb la gran acumulació de carotenoides que es dona durant el procés de maduració (Bramley, 2002; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001). No obstant plantes transgèniques sobreexpressores de DXR tant d'*Arabidopsis* com de menta mostren una major producció d'isoprenoides plastídics com carotenoides i clorofil·les (Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Carretero-Paulet *et al.*, 2006) en el primer cas, i monoterpens en el segon (Mahmoud and Croteau, 2001). En sistemes bacterians els estudis de l'efecte de la sobreexpressió de DXR en productes finals isoprenoides no mostren resultats coherents però la seva sobreexpressió en *Bacillus subtilis* per millorar la producció d'isoprè no mostra canvis significatius (Xue and Ahning, 2011). Molt més limitats són els estudis realitzats per la resta dels enzims de la via del MEP. Aquests estudis s'han centrat bàsicament en les dues darreres etapes catalitzades pels enzims HDS i HDR que han estat proposades com a potencials punts de control addicional. Els dos enzims presenten un cluster de ferro-sofre $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ (Altincicek and Jomaa, 2002; Seemann *et al.*, 2002) que assajos *in vitro* han demostrat que pot ser reduït pel sistema flavodoxina/ flavodoxina, dezaflavina foto-reduïda o NADPH/reductasa sent aquest últim el màxim candidat a estar duent a terme la reacció *in vivo* en *E.coli*. En plantes també s'ha demostrat una relació amb sistemes redox en observar-se que els dos enzims poden ser el blanc de la proteïna tioredoxina la qual forma part del sistema ferredoxina/tioredoxina present en els cloroplasts (Seemann *et al.*, 2006). De fet recentment s'ha descrit que en condicions d'absència de cofactors reductors la pròpia redoxina pot utilitzar els electrons del flux fotosintètic per subministrar els electrons necessaris per una correcta activitat de l'enzim HDS

(Seemann *et al.*, 2006). En el cas concret de HDS, estudis comparatius de seqüència entre els enzims bacterians i de plantes havien detectat l'existència d'una regió addicional en l'extrem N-terminal immediatament després del pèptid senyal que no apareix en els enzims d'origen bacterià (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2003). Aquesta diferència va fer que HDS fos proposada com un altre possible candidat a modular el flux de la via MEP. No obstant l'anàlisi dels nivells d'expressió del gen HDS en fruit de tomàquet durant el procés de maduració no va mostrar canvis significatius suggerint per tant que no exerciria un paper important en el control de la ruta. En canvi estudis similars d'expressió en tomàquet si que mostraven un increment en l'expressió del gen codificant per HDR, en paral·lel al procés de maduració del fruit (Botella-Pavía *et al.*, 2004). Aquesta correlació entre els nivells d'expressió de HDR y acumulació de carotenoides també es donava en el procés de desetiolació en *Arabidopsis*, quan es produeix la sortida a la llum de la planta i per tant la demanda de carotenoides i clorofil·les es molt elevada per generar tota la maquinaria fotosintètica dels teixits verds (Botella-Pavía *et al.*, 2004). Per últim la sobreexpressió de HDR tant en bacteris (Grawert *et al.*, 2004) com en plantes (Botella-Pavía *et al.*, 2004) deriva en un increment en l'acumulació de productes finals.

1.2.1.2.1a Regulació transcripcional

La regulació a nivell transcripcional és ara per ara el factor més estudiat en el control de la via del MEP, i ho és estretament vinculat a la llum en el cas de les plantes. En *Arabidopsis* s'ha observat una oscil·lació en l'expressió de gens de la via amb un pic màxim d'expressió abans de la sortida del sol que suggereix una coordinació de l'activitat de la ruta amb les hores de llum (Cordoba *et al.*, 2009). No obstant, caldrien estudis en profunditat per poder establir inequívocament aquesta aparent relació entre el rellotge circadià i la regulació de la ruta del MEP i establir-ne els lligams moleculars. En qualsevol cas la llum és un dels factors més importants en la regulació transcripcional de la via com demostra el fet que els nivells de transcrits de tots els gens s'incrementa en resposta a la llum durant el procés de desetiolació (Cordoba *et al.*, 2009), moment del desenvolupament de la planta en el que la demanda de pigments fotosintètics s'incrementa. Estudis *in silico* dels promotors dels diversos gens mostren l'existència en alguns d'ells de motius tipus G/E-BOX els quals s'associen a regulació per llum. La llum tot i ser un dels factors importants no és l'únic. Altres estímuls com el estrès abiòtic i biòtic o la simple disponibilitat de substrats o acumulació de productes també regulen l'acumulació transcripcional dels enzims clau de la via DXS, DXR i HDR (Phillips *et al.*, 2007). Un exemple molt clar és la inducció de l'expressió associada a l'activació del procés de maduració del fruit de tomàquet (Botella-Pavía *et al.*, 2004; Lois *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001).

1.1.1.2.1b Regulació post-transcripcional

Tot i que la regulació transcripcional seria la que lideraria el control general sobre la ruta, els canvis en els nivells de transcrit no sempre queden reflectits en els corresponents nivells de proteïna, l'activitat dels enzims, o la síntesi de metabolits. Un exemple il·lustrador d'aquesta circumstància es pot deduir de l'ús d'inhibidors específics. S'ha observat com en plàntules d'*Arabidopsis thaliana* en les que la conversió de DXP en MEP es troba inhibida ja sigui per un bloqueig farmacològic (amb fosmidomicina (FSM), inhibidor específic de DXR) o genètic, es produeix un increment en els nivells de proteïna DXS sense que s'alteri l'expressió del gen corresponent (Guevara-Garcia *et al.*, 2005). Altres evidències obtingudes en experiments d'aport de 1-desoxi-D-xilulosa (DX, que pot ser absorbida per les plantes i transformada en DXP (Hemmerlin *et al.*, 2006)), han alimentat la idea de que els nivells alterats de DXP podria donar lloc a una regulació per retroalimentació (Lois *et al.*, 2000; Wolfertz *et al.*, 2004). A data d'avui no s'ha aconseguit aclarir si seria la pròpia DX, la DXP o algun altre element el responsable d'actuar com a molècula senyal. Resultats similars de modificacions en el perfil d'expressió que no es corresponen amb variacions en el nivells de proteïna o viceversa s'han descrit per l'acumulació de proteïna DXS i/o HDR en mutants nuls per diversos enzims de la via del MEP. També s'han observat nivells pràcticament inalterats dels enzims de la via durant el desenvolupament de les plàntules tot i la gran inducció en l'expressió dels gens corresponents (Guevara-Garcia *et al.*, 2005).

Encara més recentment, el treball amb mutants d'*Arabidopsis thaliana* resistents a la inhibició farmacològica de la ruta del MEP ha tret a la llum nous mecanismes post-transcripcionals de regulació de la via i d'acumulació d'enzims biosintètics en plastidis. La resistència de molts dels mutants era deguda a un augment en els nivells dels enzims DXS i DXR sense que l'expressió dels gens es mostrés afectada. La caracterització del mutant *rim1* (un nou al·lel defectiu en l'activitat del fotoreceptor fitocrom B) va suggerir un paper de la llum en el control de l'intercanvi de precursors comuns dels isoprenoides entre el citosol i els plastidis. (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). En el cas dels mutants *rif1* i *rif10* el mecanisme identificat involucrava al complex proteolític de la Clp proteasa estromal amb la regulació dels nivells d'enzims clau de la via del MEP com DXS, DXR, i HDR (Flores-Pérez *et al.*, 2008; Sauret-Güeto *et al.*, 2006a). La disminució d'activitat Clp proteasa (Koussevitzky *et al.*, 2007) provoca un increment en els nivells d'aquests enzims en forma activa, però encara no es disposa d'evidències concloents de que aquestes proteïnes siguin substrat directe del complex ni com estaria regulat. Aquesta falta d'informació no amaga però el potencial mecanisme regular que aquest complex podria dur a terme sobre els enzims de la via MEP per adequar la síntesi d'isoprenoides a l'estat fisiològic, funcional i de desenvolupament de plastidis individuals.

1.2.1.2.2 Distribució diferencial de les vies de síntesi d'IPP. Qüestió d'evolució.

L'avenç en l'estudi de les dues vies en un nombre creixent de sistemes diferents junt amb la informació que ens aporta la resolució d'un gran nombre de genomes complets, ha permès establir la distribució filogenètica de les dues vies (**Taula 3**). Aquesta distribució de les dues vies no segueix un patró clar tot i que a grans trets sí que es compleix una associació de la ruta del MVA amb arqueobacteris, fongs, plantes i animals i una distribució de la ruta del MEP en bacteris i plantes (Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Entre els eucariotes la via del MVA és clarament predominant. Organismes com *Saccharomyces cerevisiae* o *Homo sapiens* sintetitzen l'IPP exclusivament a través d'aquesta via (**Taula 3**). En el cas de les plantes coexisteixen les dues d'una forma compartimentalitzada i organitzada. La via del MVA queda confinada a la regió citoplasmàtica i del reticle i genera els precursors que acabaran donant lloc a esterols, brasinosteroides, sesquiterpens, triterpens, o la ubiquinona mitocondrial. En canvi la via del MEP es localitza en plasts per produir monoterpens, giberelines, tocoferols, plastoquinones, i els propis carotenoides (Bouvier *et al.*, 2005). Segons el model endosimbiont aquest grup d'eucariotes haurien obtingut la via del MEP a través de la transferència dels gens de la cianobacteria original que acabaria donant lloc als actuals plastidis ((Gross and Bhattacharya, 2011). L'existència de material genètic propi en els cloroplasts (tot i que en el procés evolutiu la major part dels gens han estat transferits al nucli) sembla reforçar aquest model.

Entre els organismes procariotes la totalitat d'arqueobacteris dels que es disposa d'informació dels seus genomes presenten gens que codifiquen per enzims de la via MVA. No obstant, i amb la única excepció d'algunes espècies de *Sulfolobus*, no s'han pogut identificar la totalitat dels gens que conformarien la via (Lange *et al.*, 2000). En canvi entre els eubacteris la via del MEP seria la dominant però s'han identificat algunes espècies que utilitzen la via del MVA. En alguns casos ho fan de manera exclusiva, com la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* o els cocs Gram positiu *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* (Lange *et al.*, 2000). En d'altres hi ha coexistència de les dues vies com és el cas de *Listeria monocytogenes* i algunes soques de *Streptomyces*. En aquest darrer cas és conegut que tots els *Streptomyces* utilitzen la via del MEP per a la síntesi dels isoprenoides essencials però en determinades condicions utilitzen també la via del MVA i ho fan associat a la síntesi de metabolits secundaris com antibiòtics (Kuzuyama and Seto, 2003). En l'altre extrem apareixen alguns bacteris paràsits com *Rickettsia prowazekii* que no tenen cap de les vies (Andersson *et al.*, 1998). En aquest cas tot i no tenir els enzims necessaris per la síntesi d'IPP sí que posseeix els enzims necessaris per catalitzar-ne la seva condensació de manera que molt probablement obté els precursors de la cèl·lula hoste. En el cas d'altres paràsits obligatoris intracel·lulars com *Mycoplasma* ni tan sols tenen els enzims per a la síntesi d'isoprenoides finals (Peterson *et al.*, 1995), que poden obtenir directament de l'hoste.

La distribució de les dues vies entre els diversos grups d'organismes ha permès hipotetitzar abastament sobre els fenòmens evolutius que implicaria. En els darrers anys s'ha consolidat la hipòtesis de que la via del MEP seria la ancestral en bacteris mentre que la del MVA ho seria en arqueas i els eucariotes n'haurien heretat els gens. La variabilitat que ha generat l'elevat nombre d'excepcions observats actualment s'associen a fenòmens de transferència lateral gènica entre els diversos dominis i en tots els sentits segons rebel·len estudis filogenètics (Boucher and Doolittle, 2000). La transferència lateral gènica (TLG o transferència horitzontal) es un fenomen que es dona amb una relativament alta freqüència. Per exemple, el genoma de *E.coli* s'estima que conté al voltant d'un 18% de gens incorporats a través de fenòmens de TLG (Lawrence and Ochman, 1998). La TLG confereix al receptor dels gens noves combinacions funcionals que en cas de resultar favorables poden ser seleccionades i fixades. Un exemple clar es el de l'enzim HMGR que catalitza la reacció clau de la via del MVA. S'han descrit dos classes de HMGR en base a estudis de comparació de seqüència (Bochar *et al.*, 1999). La classe I es troba habitualment en arqueobacteris i eucariotes mentre que la classe II és la predominant en bacteris. L'arqueobacteri *A.fulgidus* té una HMGR de classe II tot i que el seu ancestre *Archaeoglobus* la té de classe I i per tant l'hauria rebut per TLG (Doolittle and Logsdon, 1998). A la llarga s'hauria produït un reemplaçament entre el gen de classe I original i el de classe II adquirit (Boucher and Doolittle, 2000) que molt probablement s'hauria fixat com a conseqüència de la millor resistència d'aquest a les estatines naturals que inhibeixen de manera preferent l'enzim de classe I (Boucher *et al.*, 2001).

Recentment s'ha postulat una nova hipòtesis basada en amplis estudis filogenètics. Segons aquesta nova teoria la tradicional visió bipartita de la distribució de les rutes de biosíntesi d'isoprenoides es convertiria en una visió tripartita en la que la via del MEP s'associaria a bacteris, la del MVA a eucariotes i els arqueobacteris utilitzarien una via del MVA alternativa (Lombard and Moreira, 2011). El treball encara va més enllà i proposa que la via del MVA seria la present en l'ancestre comú dels tres dominis de manera que els bacteris també haurien disposat en algun moment d'aquesta ruta. Això suposaria un trencament brusc en la arrelada creença de que la via del MEP i els bacteris han anat de la mà des de temps immemorials (Lombard and Moreira, 2011). En cas de consolidar-se aquesta hipòtesis ens trobaríem davant d'un dels pocs casos en què una ruta metabòlica mostraria característiques més antigues en eucariotes que en bacteris, els quals haurien fet la substitució per la via MEP posteriorment.

Organisme	MEP	MVA
Eubacteris		
Escherichia coli	√	
Bacillus subtilis	√	
Haemophilus influenzae	√	
Mycobacterium tuberculosis	√	
Synechocystis sp.	√	
Termotoga maritima	√	
Helicobacter pylori	√	
Vibrio colerae	√	
Listeria monocytogenes	√	√
Streptomyces sp. Soca CLI90	√	√
Staphylococcus aureus		√
Streptococcus pneumoniae		√
Borrelia burgdorferi		√
Rickettsia prowazekii	-	-
Arqueobacteris		
Methanococcus jannaschii		√
Thermoplasma acidophilum		√
Pyrococcus abyssi		√
Archaeoglobus fulgidus		√
Pyrococcus furiosus		√
Protozous		
Plasmodium falciparum	√	
Leishmania sp.		√
Trypanosoma sp.		√
Eucariotes		
Arabidopsis thaliana	√	√
Lycopersicon esculentum	√	√
Capsicum annum	√	√
Menta piperita	√	√
Homo sapiens		√
Drosophila melanogaster		√
Saccharomyces cerevisiae		√

Taula 3 Distribució de les vies del MEP i del MVA en funció dels diversos grups taxonòmics. Cada un dels grups mostra una clara tendència tot i que apareixen excepcions en tots ells.

1.2.1.2.3 La via del MEP, una nova diana pel desenvolupament d'antibiòtics

El descobriment casual de la penicil·lina a mans d'Alexander Flemming l'any 1928, va revolucionar la lluita contra els microorganismes patògens, iniciant l'era dels antibiòtics. Louis Pasteur ja havia postulat l'existència d'aquestes substàncies molts anys abans, en constatar les situacions d'antagonisme que es donaven en diversos medis de cultiu. La confirmació però, va haver d'esperar fins l'any 1939, quan es va aïllar, per primera vegada, el compost conegut com penicil·lina, per iniciar-ne el seu estudi (Chroma and Kolar, 2010). No seria fins la dècada dels 40 que aquest descobriment cristal·litzaria en un producte apte per l'ús en humans (Keshavjee and Farmer, 2012; Zaffiri *et al.*, 2012).

Des d'aquest primer moment la recerca de nous antibiòtics, ha seguit dos camins. La primera, l'escrutini de productes naturals, va ser molt explotada sobretot durant les dècades dels 40 als 60. Darrerament s'ha centrat el focus d'atenció sobre els organismes submarins que suposen una enorme font de diversitat fins ara poc explorada. La segona és la síntesi *de novo* d'antibiòtics sintètics amb estructures que no es troben en la natura. Els quatre punts bàsics d'actuació dels antibiòtics hàbils per l'ús en humans, es centren en els processos de síntesi de la paret cel·lular dels bacteris, la síntesi de proteïnes, la replicació d'àcids nucleics, i la biosíntesi del coenzim folat (essencial per a síntesi del nucleòtid timina). S'imposa doncs la recerca de noves dianes que es trobin sota l'acció de compostos d'estructura totalment nova. Amb aquesta intenció s'ha dirigit l'atenció cap a nous objectius com la transglicosilació del peptidoglicà durant la construcció de la paret cel·lular, l'activitat de l'ARN ribosomal o la síntesi de riboflavina (essencial en microorganismes però absent en animals). Dintre d'aquest nou grup d'interès s'ha afegit la síntesi d'IPP/DMAPP a través de la ruta del MEP.

La distribució filogenètica diferencial de la via del MVA, majoritària en arqueobacteris, i eucariotes, en contrast amb la del MEP, predominant en bacteris, ràpidament va ser concebuda com una oportunitat per l'ús de la via MEP com una nova diana molt prometedora per al desenvolupament d'antibiòtics (Rodríguez-Concepcion, 2004). Aquesta via és absent en animals (i entre ells els humans) però es troba, i és essencial, en protozoos com *Plasmodium*, *Cryptosporidium* o *Toxoplasma* així com també en una gran majoria d'eubacteris patògens i oportunistes que afecten a l'home. El cas de *Plasmodium*, responsable de la malària (o paludisme), resulta especialment rellevant considerant la enorme prevalença (representa entre 1 i 2 milions de morts anualment) amb que es dona aquesta malaltia en els països del tercer món com a conseqüència de la deficiència en la prevenció i el fet de que la forma més virulenta del patògen resulta endèmica (Murray *et al.*, 2012). Hi ha, això si, algunes excepcions de microorganismes patògens que no utilitzen la via del MEP com són els casos de *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Borrelia*.

Considerant que, en una visió general, els enzims de la via del MEP estan altament conservats i no mostren homologia significativa amb enzims de mamífers es pot esperar que inhibidors específics de qualsevol dels set enzims que conformen la via signifiquin el primer pas cap a noves drogues antimicrobianes amb un ampli espectre d'activitat i una toxicitat mínima pels humans (Lange *et al.*, 2000).

La recerca de nous inhibidors d'una via anabòlica com en el cas de la via del MEP s'ha vingut afrontant de dues maneres oposades però complementaries. Una primera opció és l'escrutini massiu de quimiotèques sobre cada un dels enzims per determinar el potencial efecte sobre les diferents activitats enzimàtiques. En el cas de la via del MEP s'han fet esforços per desenvolupar sistemes d'escrutini que simplifiquin al màxim el procés. El cas més recent és el d'un mètode que permet avaluar l'efecte dels compostos directament sobre soques de *Salmonella typhimurium* que han estat modificades per poder establir l'especificitat de la inhibició sobre la via del MEP (Testa and Johnson, 2012). Una plataforma d'aquestes característiques permet dur a terme un escrutini basat en resultats finals.

L'altre opció és entendre al detall el funcionament de cada un dels enzims a nivell mecànic i estructural per poder fer un estudi racional previ en funció de la informació obtinguda de la disposició del centre actiu, l'estat d'oligomerització o les possibles interaccions necessàries per a un correcte funcionament (Gimenez-Oya *et al.*, 2011).

Entre aquestes dues opcions, en els darrers anys, n'ha sorgit una de nova que camina entre les dues anteriors que intenta determinar els principis actius que actuen en els tractaments de la medicina tradicional (principalment chinesa) (Liu *et al.*, 2012). En certa manera intenta racionalitzar els efectes observats durant milers d'anys com a resultat de proves empíriques basades en la filosofia d'assaig i error.

Tot i que la via del MEP es present en un ampli ventall de microorganismes patògens i per tant els compostos capaços d'actuar a nivell d'aquesta ruta haurien de ser d'ampli espectre, la variabilitat biològica entre els procariotes fa que existeixin algunes particularitats a tenir en compte a l'hora de preveure els efectes d'una nova droga *in vivo*. La resistència o insensibilitat a una droga pot ser conseqüència de varis factors. **I)** La incapacitat del compost d'arribar a l'interior cel·lular degut a la gran impermeabilitat de la paret cel·lular i l'absència d'un mecanisme de transport cap a l'interior cel·lular. (Brown and Parish, 2008) **II)** La inactivació del compost a l'interior de la cèl·lula. **III)** Lleugeres modificacions espècie específiques en la diana de la droga que impossibilitin el mecanisme d'acció d'aquesta. **IV)** L'existència d'un transportador que expulsi la substància al medi impedit el seu efecte. (Fujisaki *et al.*, 1996)

1.2.1.2.3.1 Inhibidors de la via del MEP

En l'actualitat es coneixen un nombre limitat de compostos amb capacitat d'inhibir la via del MEP. La fosmidomicina (FSM) també coneguda com FR-31564, va ser el primer compost identificat amb capacitat d'inhibició de la via, i a dia d'avui és el que mostra els resultats més prometedors. Es va identificar inicialment com un antibiòtic natural que produïa el microorganisme *Streptomyces lavadulae*, aïllat per primera vegada a finals dels 70 (Okuhara *et al.*, 1980), i que es mostrava efectiu contra una gran majoria de bacteris Gram negatius i alguns bacteris Gram positius. No va ser però fins una dècada més tard que es va identificar la ruta de biosíntesi d'isoprenoides com la diana d'acció del compost (Shigi, 1989) quan ja s'havien dut a terme els primers assajos clínics per el tractament d'infeccions del tracte urinari (Kuemmerle *et al.*, 1985). Encara haurien de passar deu anys més per demostrar que la FSM actua com un inhibidor de tipus competitiu de DXR (Kuzuyama *et al.*, 1998), el segon enzim de la via del MEP. La FSM i derivats han demostrat la seva eficàcia envers bacteris multi resistents així com també envers el paràsit de la malària en assajos clínics realitzats a Gabon i Tailàndia (Lell *et al.*, 2003). Posteriorment un segon grup de compostos, els àcids fosfohidroxàmics també han estat descrits com a inhibidors específics per DXR (Behrendt *et al.*, 2010). El compost més representatiu de les possibilitats d'aquest grup és l'àcid 4-[hidroxi(metil)amino]-4-oxobutil fosfònic. Algun d'aquests compostos presenten una activitat inhibidora *in vitro* similar a la de la FSM, així com també una activitat antibacteriana envers *E.coli* crescut en placa, comparable a la d'aquesta (Behrendt *et al.*, 2010).

La clomazona és un compost àmpliament utilitzat com a herbicida que actua sobre l'enzim DXS, el primer de la via del MEP (Tomco and Tjeerdema, 2012). Aquest compost és capaç de reduir els nivells d'isoprenoides plastídics en plantes de la mateixa manera com ho fa la FSM però en canvi no inhibeix el creixement bacterià. Estudis posteriors han demostrat que la clomazona no és capaç d'inhibir l'enzim DXS de plantes en assajos *in vitro* (Mueller *et al.*, 2000) però en canvi la 5-cetoclomazona, un producte de degradació de la clomazona si és capaç de fer-ho. A més, la 5-cetoclomazona es mostra encara més eficient com a inhibidor de la síntesi d'isoprenoides plastídics en plantes (Zeidler *et al.*, 2000) i mostra activitat antibacteriana (limitada) envers *E.coli* i *Haemophilus influenzae* (Matsue *et al.*, 2010). Aquest conjunt de resultats apunten que seria la 5-cetoclomazona l'agent inhibidor que estaria actuant realment i que únicament les plantes, però no així els bacteris, tindrien la capacitat de convertir la clomazona en el compost actiu. Estudis *in vitro* utilitzant la proteïna DXS bacteriana recombinant purificada han establert recentment que la 5-cetoclamazona actuaria com un inhibidor acompetitiu sobre el complex format per l'enzim amb el seu substrat, el piruvat, però sense efecte sobre l'enzim lliure (Matsue *et al.*, 2010). No obstant la capacitat antibacteriana d'aquest compost està clarament per sota de la mesurada per la FSM de manera que pel seu potencial us futur *in vivo* encara caldria millorar la seva eficiència a través de derivats.

Els resultats que s'han obtingut fins al moment per la inhibició de DXS amb la 5-cetoclomazona, o de DXR amb la FSM son força prometedors reforçant les esperances que des del descobriment de la via MEP es van disposar en aquesta nova potencial diana. Els majors avenços es focalitzen a dia d'avui en els dos primers enzims de la via però estudis realitzats amb mutants de cada un dels enzims involucrats en la síntesi d'IPP i DMAPP han demostrat que la inhibició de qualsevol dels 7 enzims de la via del MEP són dianes vàlides (Rodríguez-Concepcion, 2004). De fet, estudis recents han mostrat que tot i que tots els enzims són dianes potencials, (ja que la seva pèrdua comporta un fenotip de letalitat), en microorganismes com *E.coli* la capacitat de superar aquesta letalitat de manera espontània és major en els casos de DXS i DXR que no pas per la resta dels enzims (Sauret-Güeto *et al.*, 2006b). Aquesta diferència suggereix que a l'hora d'afrontar el desenvolupament racional de nous antibiòtics aquests haurien d'anar dirigits preferentment cap a la resta dels enzims de la via (Heuston *et al.*, 2012) amb l'objectiu de minimitzar el possible desenvolupament de mecanismes de resistència de manera espontània. En aquesta línia s'han dut a terme alguns passos orientats cap a la identificació de nous farmacòfors que actuïn sobre l'activitat de la CMK, el quart enzim de la ruta (Figura 2). Aquests estudis s'han plantejat amb una orientació novedosa, ignorant l'acció sobre el centre actiu de l'enzim per centrar-se en interferir la formació de l'homodímer, la unitat oligomèrica funcional (Gimenez-Oya *et al.*, 2009). Els primers resultats obtinguts han demostrat que metodologies com la cerca virtual dirigida de molècules podrien ser una alternativa a les aproximacions més tradicionals basades en estudis bioquímics o estructurals.

1.2.1.2.3.2 DXR i la fosmidomicina

La fosmidomicina (FSM) és un inhibidor específic de DXR, tot i que un treball recent ha aportat evidències de que MCT (ispD) podria ser una diana secundària d'aquest compost (Zhang *et al.*, 2011). DXR és el segon enzim de la via del MEP que catalitza la formació de MEP a partir de DXP (Figura 2). La reacció, que és reversible i NADPH depenent, té lloc en dos passos que impliquen una reordenació intramolecular. El primer d'ells consisteix en la isomerització de la DXP i el segon és la reducció fins al producte final. Experiments de pertorbació de l'equilibri de la reacció realitzats amb isòtops marcats en *E.coli* han identificat el mecanisme com de tipus retroaldol/aldol (Lauw *et al.*, 2008; Munos *et al.*, 2009). El mateix mecanisme s'ha observat per la DXR de *Mycobacterium tuberculosis* però amb algunes diferències. Mentre en *E.coli* el NADPH és el primer compost en unir-se a l'enzim i el NADP⁺ és l'últim en alliberar-se, les mesures en *Mycobacterium tuberculosis* estableixen que els substrats s'uneixen a l'enzim en ordre aleatori mentre que els productes s'alliberen seguint un ordre en que NADP⁺ surt primer i el MEP a continuació (Liu and Murkin, 2012).

La FSM va ser el primer compost identificat amb capacitat d'inhibició de la via en aïllar-se a partir de *Streptomyces lavadulae* (Kuzuyama *et al.*, 1998; Okuhara *et al.*, 1980; Shigi, 1989), i és el més àmpliament estudiat. El compost presenta una elevada similitud estructural tant amb

el substrat de la reacció catalitzada per DXR (DXP) com amb l'intermediari (la metil eritrosa 4-fosfat) de la conversió d'aquesta fins a MEP. Estudis estructurals basats en la resolució de la estructura cristal·lina de l'enzim DXR complexat amb l'inhibidor han permès proposar que la FSM actua unint-se al centre actiu de l'enzim de la mateixa manera que ho fa el substrat de la reacció (Steinbacher *et al.*, 2003). La unió al centre actiu es dona per la formació d'un quelat de la cua d'àcid hidroxàmic amb el metall divalent del centre actiu per un costat, i la cua fosfònica mimetitzant el grup fosfat del substrat (DXP) per l'altre. Actualment hi ha resoltes una quantitat considerable d'estructures cristal·lines, entre elles les de l'organisme model *E.coli* (Mac Sweeney *et al.*, 2005; Steinbacher *et al.*, 2003; Yajima *et al.*, 2007), microorganismes com *Thermotoga maritima* (Takenoya *et al.*, 2010) i *Zymomonas mobilis* (Ricagno *et al.*, 2004), o de patògens com *Plasmodium falciparum* (Umeda *et al.*, 2010) i *Mycobacterium tuberculosis* (Henriksson *et al.*, 2007). L'anàlisi de les estructures amb el suport d'estudis de mutagenesis dirigida ha portat a la identificació de residus essencials per a l'activitat de l'enzim. Tot i que els assajos de mutagenesis dirigida no son sempre concloents respecte al paper essencial de determinats aminoàcids (Peracchi, 2001) si que s'ha observat com per exemple les mutacions E231K i H257Q produeixen un descens dràstic en l'activitat de l'enzim de *E.coli* (Kuzuyama, 2000), o la doble mutació D151/E222Q en l'enzim de *Mycobacterium tuberculosis* evita la fixació del catió divalent al centre actiu el qual es necessari per mantenir la activitat (Henriksson *et al.*, 2007).

La FSM ha demostrat un gran poder d'inhibició de la DXR de diversos organismes en proves *in vitro* (Jomaa *et al.*, 1999) amb valors de IC50 d'ordre nanomolar (Jawaid *et al.*, 2009; Koppisch *et al.*, 2002; Kuzuyama *et al.*, 1998; Proteau, 2004; Rohdich *et al.*, 2006). No obstant les proves equivalents *in vivo* han posat de manifest l'existència de variables que cal tenir en compte de cara a la seva aplicació en tractaments contra patògens. La molècula de FSM conté un grup fosfat carregat. Aquesta hidrofobicitat fa que la seva biodisponibilitat per via oral sigui moderada (Tsuchiya *et al.*, 1982) (menor del 30%) ja que al pH fisiològic el grup fosfat es troba altament ionitzat i per tant dificulta la seva entrada a l'interior de la cèl·lula que requereix d'un transportador actiu. L'existència i la identitat d'aquest transportador va ser revelada per Sakamoto i col·laboradors l'any 2003 (Sakamoto *et al.*, 2003). Cèl·lules de *E.coli* mutants pel gen *glpT*, que codifica per un transportador de glicerol 3-fosfat depenent de cAMP, es tornaven insensibles a FSM. Aquesta circumstància pren especial rellevància en determinats casos com el de *Mycobacterium tuberculosis*. Aquest patògen mostra una resistència intrínseca a l'inhibidor tot i que les proves realitzades *in vitro* amb l'enzim DXR recombinant purificat (Dhiman *et al.*, 2005) havien demostrat prèviament la capacitat d'inhibició (Brown and Parish, 2008). Aquest microorganisme no presenta cap homòleg del gen *glpT* de *E.coli* y a l'hora està cobert per una paret cel·lular de naturalesa especialment hidrofòbica que impedeix l'entrada de la molècula i per tant l'acció sobre la seva diana. Per evitar el requisit de la entrada de la molècula a l'interior cel·lular s'han intentat generar anàlegs que emmascarin la forta càrrega associada al grup fosfat facilitant d'aquesta manera la entrada del compost per difusió a través

de la paret cel·lular. La disminució de la polaritat de la fosmidomicina generant enllaços èster amb els oxígens del grup fosfat ha permès obtenir derivats que inhibeixen el creixement de diversos bacteris inclòs el FSM insensible *Mycobacterium tuberculosis* (Ponaire *et al.*, 2012). Derivats del tipus aciloxialquil esters han millorat sensiblement l'activitat anti-malàrica *in vivo* en estudis realitzats sobre models de ratolí de *Plasmodium vinckei*. (Ortmann *et al.*, 2003). Pel correcte funcionament d'aquests compostos es requereix l'acció d'una esterasa intracel·lular que regeneri la forma activa de l'inhibidor el que limita els possibles derivats a aquells que són substrat per aquests enzims.

En *E.coli* també s'ha descrit l'existència d'un polipeptid transmembrana codificat en el gen *fsr* que presenta homologia amb proteïnes d'exportació bacterianes (Fujisaki *et al.*, 1996). Aquesta proteïna actua com a bomba exportant a l'exterior de la cèl·lula la FSM. Organismes com *Burkholderia cepacia* responen al tractament amb FSM amb un increment de l'expressió del gen homòleg a *fsr* que es tradueix en la resistència del microorganisme a l'inhibidor (Messiaen *et al.*, 2011). Tant els mutants defectius en *gltT* com els organismes sobreexpressors de *fsr* adquireixen resistència a FSM.

1.2.1.2.3.3 El problema de les resistències.

L'aparició dels antibiòtics ha salvat milions de vides en les últimes dècades, però aquest període de temps també ha posat de manifest la capacitat dels microorganismes de sobreposar-se a l'efecte d'aquests compostos, és a dir de generar resistències (Walsh, 2003a). Quan s'introdueix en el mercat un nou antibiòtic, aquest resulta efectiu en un primer moment, però progressivament va perdent aquesta eficàcia. Les línies que dibuixen el mecanisme pel qual un grup de bacteris supera l'acció bactericida d'un antibiòtic, es fonamenten en la combinació dels fenòmens de transferència vertical i transferència horitzontal. De tota la població de bacteris, n'existeix una petita proporció (1 de cada 10^8) que és resistent a l'acció de l'antibiòtic (Walsh, 2003b). Aquesta resistència pot ser adquirida (transferència horitzontal) o intrínseca, però en qualsevol dels dos casos una exposició perllongada en el temps a l'agent letal, acabarà per invertir les proporcions de poblacions resistents i no resistents en les posteriors generacions (transferència vertical). El temps necessari perquè s'arribi a aquesta situació oscil·la entre 1 i 10 anys. El procés d'adquisició d'una resistència és multifactorial i depèn de varis paràmetres com la quantitat d'antibiòtic utilitzat, el número de vegades que es prescriu, la freqüència d'aplicació en dosis sub-terapèutiques, o la quantitat de mutacions necessàries en el patogen per arribar a la resistència (Walsh, 2003b).

El desenvolupament de resistències segueix quatre vies principals. **I) Porines:** Alguns antibiòtics actuen des de l'interior cel·lular. Per penetrar en aquests utilitzen les porines uns espais que es troben en la paret bacteriana. Alguns microorganismes han desenvolupat la

capacitat de respondre a l'antibiòtic disminuint el nombre de porines en la paret generant així el fenomen de la resistència. **II) Mutacions:** Les penicil·lines actuen fixant-se a proteïnes específiques que es troben en la paret cel·lular (PBP: *Penicillin-Binding Proteins*). Mutacions en es gens que les codifiquen poden generar proteïnes funcionals però amb una nova conformació que no és reconeguda per l'antibiòtic i que impossibilita la seva acció. Aquest és el cas del germen de la gonorrea. **III) Refuncionalització:** Quan un antibiòtic inhibeix l'activitat d'un enzim essencial, els microorganismes són capaços de reclutar proteïnes que duen a terme altres activitats enzimàtiques per substituir a la perduda per efecte del compost. **IV) plasmidi:** Els bacteris en alguns casos són capaços de desenvolupar un gen que codifica per una proteïna nova amb la capacitat d'inutilitzar la molècula antibiòtica. Aquest és el cas de les β -lactamasas, proteïnes que destrueixen els anells β -lactamàmics típics de les penicil·lines. La inclusió d'aquests gens en fragments autoreplicatius de ADN com són els plasmidis junt amb el fenomen de la transferència horitzontal d'aquests plasmidis fa que aquest tipus de resistència es dissemini amb gran facilitat i rapidesa (Chroma and Kolar, 2010).

La plasticitat que mostren els microorganismes en front d'un entorn hostil, no a nivell d'individu però si com a espècie, generen una necessitat constant d'innovació amb noves drogues antibacterianes que atenuïn el problema. Durant els darrers anys aquesta innovació s'ha limitat a la modificació de les estructures bàsiques preexistents (típicament macròlids, fluoroquinones i anells β -lactàmics) per produir antibiòtics de segona i tercera generació que milloren l'eficiència i la farmacocinètica del producte. Actualment però, ens trobem en una època on es combinen dos factors que amenacen amb acabar amb la era daurada dels antibiòtics iniciada 80 anys enrera i que havia permès introduir més de 200 molècules amb efecte antibiòtic en el mercat mundial. Per una banda s'ha produït una important desacceleració en la descoberta de nous antibiòtics, i per l'altre s'ha accentuat el desenvolupament de resistències als tractaments per part dels agents patògens tal i com es reflexa en el descobriment d'una forma de tuberculosi incurable a la Índia (Dalton *et al.*, 2012) o l'increment detectat de casos de gonorrea que no responen a cap dels tractaments tradicionals (Bolan *et al.*, 2012).

Dos casos paradigmàtics són els de *Plasmodium falciparum* i el grup de patògens englobats dintre dels bacteris Gram negatius. *Plasmodium falciparum*, l'agent causant de la malària, ha desenvolupat una resistència generalitzada que afecta a la majoria de drogues antimalàriques desenvolupades fins al moment (Nayyar *et al.*, 2012). Únicament els derivats de la artemisina mantenen l'eficiència en front d'aquest paràsit amb l'afegit de que recentment han estat detectats els primers brots de resistència a aquests fàrmacs al sud-est asiàtic. (Mordmuller and Kremsner, 2006) En el cas dels bacteris Gram negatius la problemàtica es focalitza en les infeccions associades a ingressos hospitalaris (HAI: Hospital-acquired infection) responsables de mes de 90.000 morts anuals (Maragakis, 2010). Els organismes Gram negatius multi resistents (coneguts com a *superbugs*) es tracten preferentment amb drogues de la família dels carbapenems, uns antibiòtics β -lactàmics d'ampli espectre que s'administren per via

intravenosa degut a la seva baixa absorció per la via oral i que presenten una especial resistència a les β -lactamases (Siegel, 2008). No obstant, la ampla distribució del plasmidi *bla_{NDM-1}* (*New Delhi metallo-beta-lactamasa*) que expressa una metalo β -lactamasa que genera resistència a tots els antibiòtics β -lactàmics (Yong *et al.*, 2009) ha provocat el retorn a l'ús de compostos que havien estat abandonats degut a la seva toxicitat (considerats com a antibiòtics de reserva) com és el cas de la colistina o la polimixina (utilitzats durant la dècada dels 50) que presenten nefrotoxicitat però que en alguns casos extrems suposen la única alternativa (Zaffiri *et al.*, 2012).

En el cas de la via del MEP com a diana per a nous antibiòtics encara no s'ha arribat a comercialitzar cap droga que permeti seguir la evolució de les resistències associades. No obstant, l'ampli coneixement assolit respecte l'eficiència de la FSM, el mode d'unió a la seva diana (DXR), i el mecanisme d'entrada a la cèl·lula dels organismes patògens representen una certa garantia de futur i permeten fer un seguit de consideracions més enllà de la possibilitat de desenvolupar resistència en base a un increment en els nivells d'expressió de DXR. En primer lloc la necessitat d'un transportador per l'entrada de l'inhibidor a l'interior cel·lular introdueix un nou element en joc. La FSM és importada per GlpT un transportador que pertany a la superfamília MFS (Saier *et al.*, 1999) i s'ubica dintre de la subfamília de permeases sucre fosfat caracteritzat per dotze segments transmembrana que permeten el transport de fosfat inorgànic a favor de gradient promovent la entrada de glicerol-3-fosfat a contragradient. L'estructura cristal·lina obtinguda d'aquest transportador revela la regió d'unió dels substrats a la proteïna així com també el possible mecanisme de translocació (Lemieux *et al.*, 2005). En aquest mecanisme s'han identificat dues arginines (Arg45 i Arg269) altament conservades entre els diversos homòlegs que en interaccionar amb grups fosfat promourien el moviment de translocació. Estudis de mutació d'aquests aminoàcids realitzats en el homòleg UhpT demostren una pèrdua total d'activitat del transportador en mutar qualsevol de les dues arginines (Fann *et al.*, 1998). Per tant, mutacions en el transportador de manera indirecte podrien ser una potencial font de generació de resistències. De fet estudis realitzats en *Francisella novicida* demostren que aquest organisme sensible a FSM adquireix resistència com a conseqüència de mutacions en el gen *glpT* (Mackie *et al.*, 2012), indicant la conveniència de treballar en pro-drogues capaces de superar per si soles les parets cel·lulars.

En segon lloc, estudis de mutació espontània sobre els enzims de la via del MEP han mostrat una major facilitat d'adquirir resistència d'*E.coli* a la pèrdua de funció pels enzims DXS i DXR per sobre de la resta (Sauret-Güeto *et al.*, 2006b) el que podria ser origen de resistències a FSM.

1.2.1.2.3.4 Plasticitat gènica. Activitats alternatives.

La capacitat adaptativa dels organismes i especialment dels procariotes en condicions de pressió selectiva fa que siguin capaços de trobar solucions alternatives a situacions que comprometen la seva supervivència. Podem trobar multitud d'exemples d'aquesta plasticitat en la naturalesa, alguns d'ells en la pròpia via de síntesi d'isoprenoides tant en la via del MEP com en la via del MVA. Els isoprenoides resulten essencials per a la supervivència i això fa que la selecció actuï mantenint la seva síntesi en tot moment però no sempre a nivell dels enzims individuals que conformen la via. Així s'han descrit en bacteris dos tipus diferents d'enzims IDI que tot i no mostrar cap similitud a nivell de seqüència, estructura ni mecanisme catalític, dirigeixen la interconversió entre IPP i DMAPP (Hahn *et al.*, 1999; Laupitz *et al.*, 2004). A diferència del que es podria pensar, la distribució dels dos tipus de IDI no correlaciona amb l'ús de la via MEP o de la via MVA per a la producció de l'IPP. De fet diversos bacteris en els que opera la via del MEP no tenen un homòleg de IDI de cap dels dos tipus el que no resulta tan sorprenent si tenim en compte que aquesta via produeix els dos isòmers simultàniament. En aquest cas l'activitat isomerasa s'associa més a una capacitat de reordenar el balanç dels dos isòmers en funció dels requeriments puntuals en diferents condicions de creixement. El normal creixement de soques de *E.coli* deficientes en l'enzim IDI així ho suggereix (Hahn *et al.*, 1999; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000).

L'exemple anterior exemplifica la capacitat d'adaptar enzims alternatius per aconseguir un mateix objectiu enzimàtic que s'han fixat amb el temps. Però la capacitat adaptativa dels microorganismes pot arribar a ser sorprenentment ràpida. Així ho demostra part dels treballs realitzats per Sauret-Güeto i Uròs en les seves respectives tesis doctorals i publicats l'any 2006 (Sauret-Güeto *et al.*, 2006b) en els que exploraven la possibilitat de que mutacions espontànies revertissin la letalitat associada al bloqueig de la via del MEP. Soques de *E.coli* bloquejades genèticament en els enzims DXS i DXR (però no en el cas de soques bloquejades en els 5 enzims restants de la via del MEP) eren capaces de superar la pèrdua d'activitat DXS o DXR amb unes freqüències relativament altes de $6,4 \times 10^9$ i $2,4 \times 10^9$ cèl·lules. La caracterització dels mutants obtinguts va permetre identificar mutacions en gens de *E.coli* responsables del rescat en un i altre cas. La proteïna mutant PDH E636Q és la responsable de permetre la supervivència de les soques deficientes en DXS, mentre que la proteïna mutada GATC ho és per les soques deficientes en DXR. La caracterització del mutant deficient en DXS per identificar el gen responsable del rescat en base a un escrutini de la genoteca generada a partir del genoma d'aquesta soca va revelar la capacitat d'un segon enzim, la transcetolasa (TKT), de rescatar la soca deficient en DXS quan era sobreexpressada (Sauret-Güeto, 2005; Sauret-Güeto *et al.*, 2006b). En conjunt aquests resultats mostren la capacitat de microorganismes com *E.coli* de reclutar enzims, nadius o mutats que realitzen altres funcions, per compensar en la mesura del possible la pèrdua de funció d'un enzim essencial.

Un altre cas en el que la via del MEP està involucrada és el descrit per la cianobacteria fotosintètica *Synechocystis* (soca:PCC6803). En el genoma d'aquest organisme s'han identificat gens homòlegs per la via del MEP però no per la via del MVA (Kaneko *et al.*, 1996). No obstant, estudis de marcatge han demostrat que en condicions autotròfiques, no és la via del MEP la principal per la qual es sintetitzen els isoprenoides ja que la addició en el medi d'intermediaris de la via del MEP a altes concentracions no provoca un increment en la incorporació de marcatge en isoprenoides finals, com tampoc s'observa efecte sobre el creixement de l'organisme en presència de l'inhibidor FSM (Ershov *et al.*, 2002) tot i que aquest compost sí que és capaç d'inhibir l'enzim DXR *in vitro* (Woo *et al.*, 2006). En canvi sí que hi ha una correlació entre els nivells de GAP addicionats i els nivells d'incorporació de marcatge en productes finals. Tenint en compte que el GAP és un intermediari comú entre la via del MEP i els productes de la fotosíntesi s'ha proposat que en condicions de creixement fotosintètiques aquest organisme utilitzaria productes del cicle de les pentoses fosfat que s'incorporarien a la via del MEP per sota del pas catalitzat per DXR (Ershov *et al.*, 2002), però sempre per sobre del pas catalitzat per HDR ja que s'ha demostrat que aquest enzim és essencial per a la supervivència de *Synechocystis* (Cunningham *et al.*, 2000). Per tant s'ha postulat l'ús de la via del MEP per a la síntesi d'isoprenoides en *Synechocystis* en condicions fotoheterotròfiques, i la adaptació d'una via alternativa que permet aprofitar els productes de la fotosíntesi en condicions fotosintètiques tot i que no se'n coneixen els detalls a nivell molecular.

En la via del MVA també apareix un cas que il·lustra la plasticitat dels microorganismes. L'anàlisi dels genomes disponibles ha permès observar en els darrers anys que els gens que codifiquen per PMK i PMD no es troben en una gran majoria dels arqueobacteris (Boucher *et al.*, 2004; Lombard and Moreira, 2011). En aquests organismes la conversió del MVP fins a IPP no passa per la formació de MVPP sinó que segueix una seqüència alternativa en la que el fosfomevalonat és convertit en isopentenil fosfat (IP) i posteriorment IPP (Grochowski *et al.*, 2006). S'han postulat dos enzims alternatius que durien a terme aquestes dues reaccions. El primer d'ells seria la fosfomevalonat descarboxilasa (PMVD), un enzim del que actualment encara no es disposa d'evidències clares que confirmen la seva implicació en la ruta. Si s'ha caracteritzat, tant a nivell bioquímic (Chen and Poulter, 2010) com estructural (Mabanglo *et al.*, 2010), el segon dels enzims, IP quinasa (IPK) encarregat de fosforilar l'isopentenil fosfat per produir l'IPP. Aquestes dues activitats alternatives dibuixen una variació sobre la ruta del mevalonat clàssica que tal i com ja s'ha introduït anteriorment ha donat lloc recentment a postular-la talment com una ruta alternativa pròpia d'arqueobacteris (Lombard and Moreira, 2011).

La plasticitat que mostren els bacteris és un recurs molt poderós que els permet superar situacions ambientals adverses. Aquesta capacitat d'adaptació és una font de variabilitat que es pot utilitzar per obtenir noves eines de tipus biotecnològic per a l'ús en la producció optimitzada de carotenoides i isoprenoides en general. Un enzim que readapta la seva funció i adquireix una nova activitat capaç de suplir-ne un d'anterior presenta una potencial aplicació com a

enzim probablement deslligat dels mecanismes de regulació forjats durant la evolució sobre el seu predecessor. Però el que per una banda pot ser beneficiós en termes biotecnològics té també una cara fosca. Aquesta mateixa plasticitat és en gran part la responsable de la pèrdua d'efectivitat de molts antibiòtics existents en el mercat de manera que és un factor que cal tenir present.

1.2.2 Síntesi de prenifosfats

El segon gran bloc de reaccions que conforma la biosíntesi d'isoprenoides la duen a terme un conjunt d'enzims que col·lectivament reben el nom de preniftransferasas. La reacció que catalitzen aquest tipus d'enzims és la condensació d'un acceptor de naturalesa isoprenoide o no isoprenoide sobre un difosfat al·lílic. Fins a tres tipus diferents de reacció estan descrites per aquest grup d'enzims. La condensació cap-cua, la cap-cap o cap-regió central, o una condensació que implica l'alquilació d'un acceptor no isoprenoide. El nucli central d'aquest grup d'enzims està format per tres enzims que catalitzen la condensació de una o varies unitats d'isoprè activat (IPP), sobre una molècula de DMAPP. Els enzims geranildifosfat sintasa (GPS) i farnesildifosfat sintasa (FPS) catalitzen respectivament la condensació de una i dos molècules de IPP sobre una de DMAPP per generar els intermediaris C_{10} (GPP) i C_{15} (FPP). Cada un d'aquests intermediaris són els precursors dels monoterpens (C_{10}), o sesquiterpens i triperpens (C_{15} i $2 \times C_{15}$). El tercer enzim, la geranilgeranildifosfat sintasa (GGPPS), que es descriu de manera més detallada en l'apartat 2.1, catalitza la addició de tres molècules d'IPP sobre una de DMAPP per sintetitzar l'intermediari C_{20} geranilgeranildifosfat (GGPP). Aquesta és la molècula parental de diterpens i tetraterpens (C_{20} i $2 \times C_{20}$) entre els que s'inclouen els carotenoides (**Taula 1**). Els tres enzims catalitzen la formació d'enllaços C-C entre dues unitats prenil en una reacció depenent de magnesi resultat d'una substitució nucleofílica que allibera una molècula de pirofosfat (Sacchetti and Poulter, 1997) i que segueix una estequiometria de tipus *trans*. Aquests enzims són els elements principals d'una primera categoria de preniftransferasas que generen el grup d'esquelets bàsics que rarament constitueixen en ells mateixos productes isoprenoides finals. Existeixen altres preniftransferasas que generen un ampli ventall d'esquelets tant amb una estequiometria *trans* com *cis* que han estat àmpliament revisades en (Bouvier *et al.*, 2005). Algunes d'elles presenten característiques específiques per poder generar cadenes de longituds molt superiors de fins a 1500 carbonis (Oh *et al.*, 2000) com en el cas de la síntesi de cautxú de *Hevea brasiliensis*.

Entre les preniftransferasas existeix el que es podria catalogar com una segona categoria d'enzims amb la capacitat de transferir grups prenil a substrats de naturalesa no isoprenoide. Cadenes de diverses mides s'introdueixen als precursors de la ubiquinona, plastoquinona o citocrom A. De manera equivalent molècules de GGPP s'incorporen a la clorofil·la, el tocoferol, o la filoquinona. Les reaccions es produeixen de manera anàloga a les descrites anteriorment

dirigint la incorporació d'un grup de gran hidrofobicitat que permet la integració de grups funcionals hidrofílics dintre de la estructura de les membranes. Un tercer substrat d'aquest grup de prenilttransferasas són les proteïnes (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). De forma general aquests enzims uneixen derivats alcohol de FPP i GGPP a les cisteïnes properes a l'extrem carboxi terminal de la proteïna a través d'un enllaç de tipus tioester (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). Aquesta unió covalent de grups prenil als pèptids facilita la associació d'aquestes amb les membranes o inclòs amb altres proteïnes dirigint així la seva funció i/o localització subcel·lular.

A partir d'aquest punt les terpenosintases utilitzen el GPP, FPP o GGPP com a substrat per sintetitzar els diversos esquelets hidrocarbonats que donen lloc a les diferents famílies d'isoprenoides (Figura 1). D'entre totes elles la unió cap-cap de dues molècules de GGPP és la responsable d'un dels punts de ramificació i especialització de la síntesi d'isoprenoides cap al subgrup de compostos dels carotenoides, que són de particular interès per aquest treball de tesi.

2.- Carotenoides. Una font de compostos d'interès.

Dintre de la gran família dels isoprenoides, un grup particularment important són els carotenoides sintetitzats predominantment en plantes (en els plastidis) però també per alguns bacteris no fotosintètics i fongs. Històricament s'havia assignat als carotenoides un paper secundari restringit a la coloració de flors i fruits o la generació d'aromes i sabors característics resultat de la seva degradació. No obstant la seva importància va molt més enllà. En plantes s'associen a les proteïnes que formen els complexos fotosintètics col·laborant en la captació de la llum i exercint un paper essencial per a la fotoprotecció contra l'excés de llum. Però també estan implicats en processos essencials de regulació del desenvolupament a través d'hormones com l'abastament estudiat àcid abscísic o les més recentment identificades estrigolactones que es sintetitzen utilitzant carotenoides com a compostos de partida.

La importància dels carotenoides supera les fronteres de la biologia i s'instal·la en el terreny de la indústria i la medicina. Molts d'aquests compostos s'utilitzen com a font natural de pigments o aromes per a la indústria. En l'àmbit de la salut també juguen un paper important. Els animals som auxòtrofs pels carotenoides ja que no som capaços de sintetitzar-los *de novo* però els necessitem per a la producció de retinoides de manera que els hem d'adquirir a través de la dieta. Un dèficit de β -carotè en la dieta ha estat relacionat amb un increment del risc de patir alteracions de la visió com cataractes o degeneració macular ja que aquest compost és un precursor de la vitamina A (o retinol) a partir de la qual es sintetitzen els pigments associats al funcionament de la retina. Un cas paradigmàtic és el que afecta a països amb una dieta basada en el consum d'arròs (molt pobre en β -carotè) com és el cas del sud-est asiàtic on la

prevalença de la ceguesa infantil es troba molt per sobre de la mitjana mundial. El caràcter antioxidant d'aquest conjunt de compostos i els possibles beneficis sobre la salut humana també han captat l'atenció de la indústria farmacèutica en forma de nutracèutics com a complementos alimentaris. Diversos estudis publicats han reforçat aquesta creença relacionant una ingesta diària elevada de carotenoides amb la prevenció de determinats tipus de càncer (de pit i de pròstata en el cas del licopè, o de colon en el cas del la luteïna) i de malalties coronaries (Chen *et al.*, 2012; Eliassen *et al.*, 2012; Meinke *et al.*, 2012; Tamimi *et al.*, 2009).

Tot aquest conjunt de factors han generat en les últimes dècades una demanda creixent de carotenoides que es preveu que les fonts d'obtenció actuals (síntesi química i extracció a partir de fonts naturals) no podran abastir. En aquestes circumstàncies pren gran importància la utilització de la biotecnologia ja sigui utilitzant sistemes bacterians com a biofactories cel·lulars o incrementant els nivells acumulats en sistemes vegetals. Aquesta alternativa ja és una realitat en el pla teòric però encara cal millorar el coneixement de la regulació de la síntesi i degradació de carotenoides, del seu emmagatzematge i de la relació amb altres rutes biosintètiques per optimitzar els processos productius.

2.1- Biosíntesi de carotenoides. La via carotenogènica.

Els carotenoides són tetraterpens, per tant molècules de 40 carbonis que es caracteritzen per formar una llarga cadena alifàtica amb un nombre que varia entre 3 i 15 insaturacions. Si seguim el model general descrit per la síntesi d'isoprenoides la seva producció es divideix en tres blocs: la síntesi de precursors (IPP i DMAPP), l'ensamblat de prenil fosfats, i la via estrictament carotenogènica (Figura 3).

Com ja s'ha descrit en detall en apartats anteriors la síntesi dels precursors (IPP/DMAPP) es pot dur a terme a través de la via del MVA (a partir d'acetil-CoA) o mitjançant la via del MEP (a partir de piruvat i GAP). El cas de les plantes la via del MEP es la que proporciona la major part dels precursors dels carotenoides (Rodríguez-Concepcion, 2010; Ruiz-Sola and Rodríguez-Concepcion, 2012).

En el segon bloc de reaccions la condensació seqüencial de tres molècules d'IPP sobre una primera de DMAPP dona lloc al GGPP. Aquesta reacció múltiple està catalitzada per l'enzim GGPP sintasa (GGPPS) un dels representants de la família d'enzims de les preniltransferasas. El cas de GGPPS representa una interessant singularitat dintre de l'organisme model *Arabidopsis thaliana*. En aquesta espècie una majoria d'enzims de la síntesi d'isoprenoides estan codificats per un únic gen, però en canvi pel cas de GGPPS s'han identificat 12 seqüències que codifiquen diferents isoformes putatives de l'enzim (Lange and Ghassemian, 2003). Fins a 10 d'elles s'han mostrat actives en assajos *in vitro*, i mostren variats patrons

d'expressió i localització subcel·lular, amb la majoria de formes dirigides a plasts però amb representants també en mitocondria i reticle endoplasmàtic (Joyard *et al.*, 2009; Okada and K., 2000). De totes les isoformes la més estudiada ha estat la GGPPS1, la única que fins al moment mostra un fenotip de letalitat en el mutant nul (dades no publicades). Tenint en compte que l'existència de gens paràlogs només es fixen en els genomes si es produeixen expressions diferencials, diferències d'activitat segons les condicions, associació diferencial a rutes metabòliques específiques o altres factors que suposin un benefici per l'organisme, l'existència d'aquest grup tan nombrós de gens compartint una mateixa activitat catalítica podria estar associada a una especialització de diferents formes de GGPPS en la producció de diferents grups d'isoprenoides (entre ells els carotenoides).

El tercer i últim bloc de reaccions conformen la via carotenogènica pròpiament dita (Figura 3). Des dels anys 50 s'ha avançat progressivament en el coneixement en profunditat tant dels enzims implicats en cada una de les reaccions com en la regulació de la via i la interacció que estableix amb el conjunt del metabolisme a diferents nivells.

La primera reacció, catalitzada per l'enzim fitoè sintasa (PSY), produeix el fitoè a partir de la condensació de dues molècules de GGPP generant així l'esquelet bàsic poliinsaturat de 40 carbonis que defineix als carotenoides. En plantes com arròs, tomàquet, tabac o blat s'han descrit fins a tres gens diferents que codifiquen per aquest enzim demostrant-se en alguns casos la seva especialització funcional. (Arango *et al.*, 2010; Giorio *et al.*, 2008; Welsch *et al.*, 2008) En canvi en *Arabidopsis thaliana* s'ha identificat un únic gen *PSY* (Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012). Aquesta etapa representa la primera reacció específica de la via carotenogènica i ha estat proposada com la etapa limitant. Diversos estudis han demostrat que la sobreexpressió d'aquest enzim produeix un increment significatiu de l'acumulació de productes finals (Couso *et al.*, 2011; Maass *et al.*, 2009) indicant la seva importància en el control del flux de la via (Welsch *et al.*, 2000). En bacteris l'activitat fitoè sintasa la realitza l'enzim CrtB en una reacció que com en plantes és dependent d'ATP i el ió divalent Mn^{2+} .

A continuació el fitoè (incolor) pateix una sèrie de reaccions d'insaturació que introdueixen diversos dobles enllaços en la cadena poliènica inicial i que són els responsables d'una de les característiques més evidents d'aquest grup de compostos, la seva coloració. El color observat en cada compost està directament relacionat amb el nombre de dobles conjugats i la estructura de la molècula que permeten a partir de les diverses formes ressonants distribuir la càrrega electrònica amb major eficiència. Per tant les molècules són capaces d'absorbir fraccions de la llum de longitud d'ona menors és a dir més energètiques fins arribar a situar-se en la regió de la llum visible de l'espectre electromagnètic. A mesura que s'incrementa l'energia que cada compost pot absorbir, es produeix un desplaçament en l'espectre visible des de el color vermell cap al groc passant per les diverses tonalitats de taronges. Aquest és el cas del licopè que presenta una coloració vermella-rosada resultat de la introducció seqüencial de 4 insaturacions.

En plantes aquestes insaturacions s'afegeixen en dos passos catalitzats pels enzims fitoè desaturasa (PDS) i ζ -carotè desaturasa (ZDS). Aquestes són reaccions d'oxidació i per tant necessiten una parella que a l'hora es redueixi. Aquest paper l'assumeixen les plastoquinones que actuen com a acceptores dels àtoms d'hidrogen (Klassen, 2010). La reoxidació de les quinones és catalitzada per l'enzim oxidasa plastídica terminal (PTOX) que utilitza l'oxigen com a acceptor final dels electrons amb la conseqüent formació d'aigua (Carol and Kuntz, 2001). En proposar aquest model es va observar que el pas de 15-cis fitoè a trans-licopè suposava una incongruència isomèrica. Més tard es va demostrar experimentalment l'existència de dos passos d'isomerització catalitzats pels enzims carotè isomerasa (ZIS) i el denominat isomerasa de carotenoides (CRTISO) que completava de forma coherent el model (Chen *et al.*, 2010). La fitoè desaturasa bacteriana (CrtI) és capaç de dur a terme totes les desaturacions i isomeritzacions necessàries per generar el trans-licopè, la forma isomèrica majoritària d'aquest compost. Aquest enzim bacterià, tal i com es podria esperar, no presenta homologia amb les desaturases ni les isomerasas vegetals. Aquesta diferència permet explicar el perquè el compost inhibidor de l'enzim PDS vegetal, el norflurazon (producte comercialitzat com a agent herbicida que provoca un fenotip albi letal) no té efecte sobre l'activitat de CrtI (Iwata-Reuyl *et al.*, 2003).

Seguidament la molècula lineal de licopè és sotmesa a una ciclació que genera un anell de sis carbonis en cada un dels extrems. En plantes superiors aquest és un punt important de la ruta perquè es produeix una bifurcació (branca del β -carotè formada per carotenoides amb dos anells tipus β , i branca del α -carotè, formada per carotenoides amb un anell tipus β i un anell tipus ϵ). Existeixen dos enzims amb capacitat de ciclació del licopè, β -ciclasa (LCYB) i ϵ -ciclasa (LCYE) l'activitat enzimàtica dels quals es diferencia únicament en la posició en que ubiquen el doble enllaç del ciclohexè que construeixen. El primer produeix els anomenats anells β que manté el doble enllaç conjugat amb la resta d'insaturacions mentre que el segon produeix anells ϵ en els que la conjugació queda interrompuda (Figura 3). LCYB és capaç de catalitzar per si sola la producció de β -carotè (β,β -carotè) introduint de manera seqüencial dos anells de tipus β en els extrems de la molècula de licopè. En canvi la LCYE només pot introduir un sol anell de tipus ϵ . En conseqüència la formació del α -carotè (ϵ,β -carotè) requereix de l'acció consecutiva de les dues ciclasas passant per la forma monocíclica de δ -carotè (Cunningham *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1996). La síntesi de carotenoides amb dos anells de tipus ϵ és poc usual en plantes tot i que se'n coneixen casos com el de l'enciam (Cunningham and Gantt, 2001).

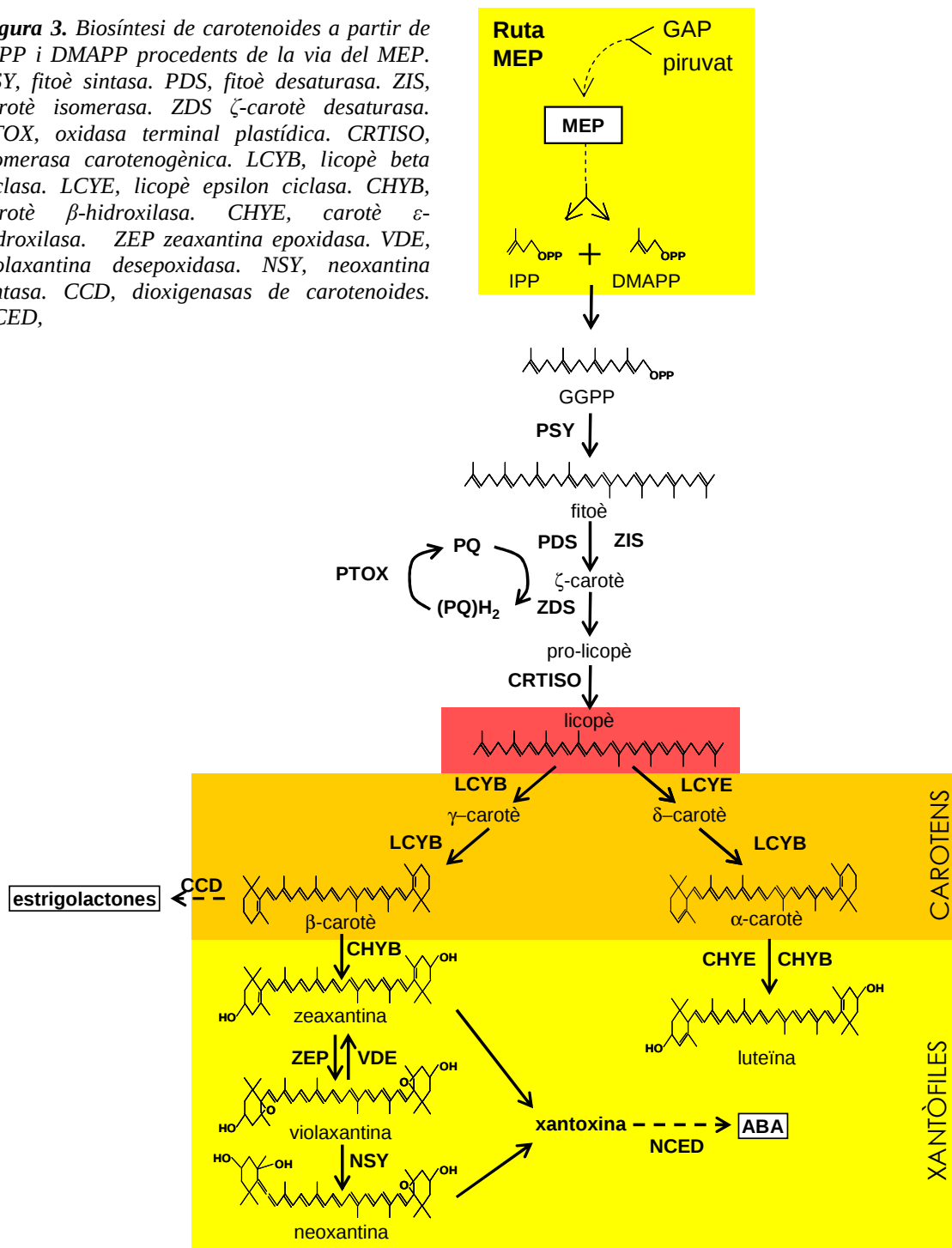
A partir de la oxidació dels carotens es sintetitzen un grup de molècules anomenades xantòfiles (del grec xanthos que significa groc). La introducció de grups electronegatius en l'estructura de dobles enllaços conjugats contribueix a la deslocalització de càrregues i per tant desplaça la longitud d'ona de la llum absorbida cap a valors menors d'esplaçant la coloració ataronjada dels carotens cap al groc dintre de l'espectre visible.

L'hidroxilació del α i β -carotè produeix la luteïna i la zeaxantina respectivament. L'oxidació dels anells β pot ser catalitzada per dos tipus de carotenoid β -hidroxilases (CHYB) diferents, no-hemo (BCH) i citocrom P450 (CYP97) (Kim and DellaPenna, 2006). En canvi l'oxidació de l'anell ϵ és catalitzada exclusivament per ϵ -hidroxilases (CHYE) de tipus CYP97 (Quinlan *et al.*, 2012).

La luteïna, el pigment més abundant en els cloroplasts de la immensa majoria de plantes, es el producte final de la branca ϵ,β . L'altre branca, β,β continua amb la conversió de la zeaxantina en violaxantina en una reacció catalitzada per l'enzim zeaxantina epoxidasa (ZEP) que introdueix un grup epoxi en cada anell (passant per l'intermediari mono epoxidat, la anteraxantina) prèviament hidroxilat (Tian *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2004) La violaxantina es pot reconvertir altre cop en zeaxantina per l'acció de la violaxantina desepoxidasa (VDE) establint-se un cicle (cicle de les xantòfiles) que en funció de la seva regulació promourà l'acumulació preferent d'un compost o l'altre (Demmig-Adams *et al.*, 1996). S'ha descrit que en condicions de gran irradiació de llum sobre les plantes aquestes responen incrementant els nivells de zeaxantina que és més eficaç que la violaxantina prevenint el dany foto-oxidatiu i protegint les membranes lipídiques de la peroxidació (Havaux *et al.*, 2007).

L'últim pas en aquesta branca produeix la neoxantina com a producte final per la intervenció de la neoxantina sintasa (NSY). Aquest enzim allibera la tensió d'anell intrínseca al grup epoxi amb la conseqüent formació d'un grup hidroxil. A diferència de la majoria de la resta dels enzims de la via, NSY només modifica un dels extrems del substrat violaxantina (Figura 3). L'existència d'aquest enzim és suportada per múltiples evidències però la seva identificació encara no és clara. Els primers gens identificats amb aquesta activitat mostraven una elevada homologia amb LCYB. Posteriorment en *Arabidopsis* s'ha identificat un segon tipus d'enzim amb activitat neoxantina sintasa, molt més divergent (North *et al.*, 2007).

Figura 3. Biosíntesi de carotenoides a partir de l'IPP i DMAPP procedents de la via del MEP. PSY, fitoè sintasa. PDS, fitoè desaturasa. ZIS, carotè isomerasa. ZDS ζ -carotè desaturasa. PTOX, oxidasa terminal plastídica. CRTISO, isomerasa carotenogènica. LCYB, licopè beta ciclasa. LCYE, licopè epsilon ciclasa. CHYB, carotè β -hidroxilasa. CHYE, carotè ϵ -hidroxilasa. ZEP zeaxantina epoxidasa. VDE, violaxantina desepoxidasa. NSY, neoxantina sintasa. CCD, dioxigenasas de carotenoides. NCED,



A partir d'alguns dels productes de la via carotenogènica es generen productes de degradació, els apocarotenoides (Alder *et al.*, 2008; Auldridge *et al.*, 2006). Un dels casos més conegut és el de l'àcid abscísic, una fitohormona implicada en la regulació de nombrosos processos associats al creixement vegetal així com també en la coordinació de les respostes a condicions d'estrès abiòtic i que ha estat àmpliament estudiat i revisat (Hauser *et al.*, 2011; Sauter *et al.*, 2001). Aquesta hormona es sintetitza a partir de la xantoxina un apocarotenoid derivat del catabolisme tant de la violaxantina com la neoxantina (Parry and Horgan, 1992). Molt més recent és el cas de les estrigolactones un grup d'hormones que estarien encarregades de regular l'arquitectura de les plantes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Les estrigolactones representen l'exemple més clar del camí que encara queda per recórrer. Les primeres (strigol i strigol amb un anell de lactona característic) van ser aïllades per primera vegada a partir de l'exudat d'arrels del cotó tot just l'any 1996, i ràpidament es van associar a senyals que utilitzaven les plantes paràsit per detectar possibles hostes propers. Posteriorment es va establir un efecte beneficiós en observar que també era agent atraient de fongs amb els quals la planta establia relacions simbiotes beneficioses sobretot en condicions de dèficit de fòsfor i nitrogen en el sòl. Considerant els temps evolutius d'aquest tipus de relació simbiota amb els de l'aparició de les plantes paràsit sembla clar que aquestes últimes van desenvolupar la capacitat d'identificar els senyals enviats per establir la associació amb els fongs per detectar hostes propers. Però la detecció d'aquestes molècules en plantes que a priori no estableixen aquest tipus d'interacció amb fongs com el cas d'*Arabidopsis* va posar de manifest l'existència d'altres funcions. No ha estat fins l'any 2008 en que s'ha establert el paper d'aquestes molècules com el d'un nou conjunt d'hormones implicades en la inhibició de la ramificació de la part aèria obrint tot un nou camp d'estudi a investigar (Xie and Yoneyama, 2010). La ruta sintètica encara roman incompleta però diversos estudis indicarien que s'inicia a partir del β -carotè (Alder *et al.*, 2012; Matusova *et al.*, 2005).

2.2- Regulació de la ruta carotenogènica

L'avenç realitzat en l'estudi de la ruta biosintètica dut a terme en les últimes dècades ha permès identificar gairebé la totalitat de gens i enzims involucrats. No obstant, l'estat actual del coneixement de com es regula específicament la producció de carotenoides està lluny de ser complet. Cada vegada però, és més clar que aquesta regulació integra un ampli ventall de factors com la interconnexió amb d'altres rutes metabòliques, (principalment aquelles directament relacionades ja sigui sintetitzant les molècules substrat inicials o que impliquen l'ús dels seus productes finals), la diferenciació dels plastidis (diferents tipus de plastidis acumulen proporcions quantitat i composicions variables de carotenoides), o les respostes als canvis ambientals (Cazzonelli and Pogson, 2010). Les carències en aquest àmbit del coneixement de la via han demostrat la seva importància en les diverses aproximacions biotecnològiques que s'han dut a terme en els darrers anys amb l'objectiu de millorar l'acumulació d'aquests compostos ja sigui en sistemes bacterians o plantes. Tot i que s'han aconseguit èxits

importants en diversos sistemes els resultats obtinguts no sempre han estat els esperats per les estratègies utilitzades. A mesura que s'han investigat aquests fenòmens de regulació s'han anat desvetllant nous mecanismes i sistemes de regulació posant de manifest la complexitat i varietat d'elements que poden arribar a entrar en joc.

2.2.1- Regulació transcripcional

La modulació dels nivells d'expressió dels gens implicats en la biosíntesi de carotenoides actua com a primer nivell, i probablement com a nivell central, de regulació. Un dels factors que provoca una resposta a nivell transcripcional és l'estat de desenvolupament de les plantes el qual a l'hora estableix un estret vincle amb les condicions ambientals a les que es veuen sotmeses. El coneixement de com es produeix aquest control en el sistema model d'*Arabidopsis* és molt limitat però l'estudi de les dades d'expressió dels diversos gens obtingudes en microarrays permeten establir una correlació (Winter *et al.*, 2007) entre els gens induïts/reprimits i el perfil de carotenoides observats en els diversos òrgans i estadis de desenvolupament. A tall d'exemple es pot observar com els nivells en l'expressió dels gens codificants per PSY, LCYB i CHYB correlaciona amb les abundàncies relatives dels diversos carotenoides en els diferents tipus de plastis (Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012). Molt més estudiat és el cas del fruit de tomàquet que s'ha utilitzat àmpliament com a model de la regulació carotenogènica degut a la magnitud i transcendència que es dona durant el procés de maduració. Aquest procés segueix un programa transcripcional de desenvolupament que provoca la degradació de la clorofil·la i paral·lela acumulació massiva de carotenoides, i de la transformació dels cloroplasts en cromoplasts. Aquests canvis són els responsables directes del canvi de coloració del fruit del verd inicial fins al vermell intens (Giovannoni, 2001). L'increment dels carotenoides es troba precedit d'una inducció en els nivells de DXS i PSY. A aquesta inducció n'hi segueix una segona immediatament posterior que incrementa l'acumulació de transcrits corresponents a les desaturases i isomerasas que s'acompanya d'una reducció dràstica en els nivells de transcrit de les ciclasses (Ronen *et al.*, 1999). Aquests canvis transcripcionals generen una elevada producció de licopè que s'acumula en el fruit. En condicions normals el procés evoluciona seguint aquest programa de desenvolupament preestablert però aquest es pot alterar en funció bàsicament de les condicions ambientals de llum i temperatura (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Giovannoni, 2007).

Però més enllà dels patrons genètics establerts per el desenvolupament han d'existir factors capaços de dotar de plasticitat i capacitat d'adaptació als sistemes en funció de les condicions. Tenint en compte el paper dels carotenoides, la llum és un factor clau que ha de poder-ne modular la seva biosíntesi. Un clar exemple és el procés de desetiolació segons el qual les llavors en germinar segueixen un programa de desenvolupament en foscor (escotomorfogènic) que centre els esforços de la planta en emergir de la terra. La llum és la responsable directe

d'aturar aquest programa que potencia el creixement de l'hipocotil i reprimeix tota la maquinaria fotosintètica i iniciar-ne un d'alternatiu (fotomorfogènic) en el que el creixement de l'hipocotil es redueix ostensiblement i s'obren els cotilèdons a l'hora que es permet la diferenciació dels cloroplasts (Jiao *et al.*, 2007). Aquest canvi de programa demanda una gran quantitat de carotenoides que produeix una inducció de l'expressió de la gran majoria dels gens involucrats en la biosíntesi de carotenoides (Rodríguez-Concepcion, 2010). La coordinació s'accentua pels enzims clau pel control del flux, DXS i PSY, i té lloc a l'hora amb la producció de clorofil·les amb qui comparteixen motius altament conservats en el seus promotors que podrien ser el punt d'integració (Meier *et al.*, 2011). A dia d'avui, però, no hi ha estudis que corroborin aquesta teoria.

La llum, però, s'ha demostrat que incideix sobre el funcionament de la via d'altres maneres integrant-se en les senyals mediades pels fitocroms. Recentment s'ha descrit la unió directa de PIF1 (Phytocrome Interacting Factor1) al promotor del gen PSY d'*Arabidopsis* a través de la seqüència consens CACGTG (G-Box) reprimint-ne la seva expressió (Toledo-Ortiz *et al.*, 2010). La llum activa els fitocroms els quals a l'hora en la seva forma activa promouen la degradació dels factors de transcripció de la família PIF i en conseqüència s'habilita l'expressió de PSY. Aquest paper és d'especial rellevància durant la desetiolació però s'ha demostrat que es manté en plantes desetiolades indicant la seva participació durant els diversos estats de desenvolupament de la planta (Toledo-Ortiz *et al.*, 2010). L'efecte de la llum també es pot donar de manera més indirecte a través del rellotge circadià, el mecanisme pel qual les plantes simulen cicles de 24 hores paral·lels als cicles diaris de llum i obscuritat. Diversos estudis han demostrat un comportament d'aquest tipus tant en els nivells de diversos enzims de la ruta carotenogènica (entre ells PSY i alguns dels enzims de la via del MEP) com en l'acumulació de productes finals de naturalesa isoprenoide (Covington *et al.*, 2008).

La llum tot i jugar un paper important no és l'únic element que repercuteix en l'expressió dels gens de la via. Un altre factor que hi intervé és la hormona ABA. La regulació a través d'ABA presenta diferències en diferents espècies de plantes però en tots els casos estudiats es produeix utilitzant PSY com a mitjancer (Arango *et al.*, 2010; Barrero *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012). En sistemes com arròs o blat es produeix una especialització funcional en la que diferents isoformes de l'enzim s'expressen i responen de manera diferent a estímuls de llum o ambientals. En el cas d'*Arabidopsis* hi ha una única isoforma d'expressió ubíqua i en arrel s'indueix la seva expressió en condicions d'estrès osmòtic que també induceix la síntesi d'ABA (Meier *et al.*, 2011). Algunes evidències apunten que la inducció de PSY podria ser deguda al propi ABA suggerint un mecanisme de regulació de tipus *feedback* encara per confirmar.

2.2.2- Regulació post-transcripcional

La falta de correlació que s'observa en determinats casos entre els patrons d'expressió gènica i l'acumulació de productes finals revela l'existència de mecanismes que actuen a nivell post-transcripcional modulant la via. Alguns d'aquests mecanismes repercuteixen de manera directe sobre els enzims mentre que d'altres ho fan a altres nivells. La llum pot incidir també sobre l'activitat dels enzims responsables de la biosíntesi per l'efecte dels sistemes redox associats a la fotosíntesis. Ja sigui per mitja del sistema ferredoxina tioredoxina o mediat per la plastoquinona (que actua com a acceptora d'hidrogen de les activitats catalitzades per PDS i ZDS), s'estableix una connexió entre la llum, la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesis i l'activitat final dels enzims (Carol and Kuntz, 2001). Més directe és l'efecte de la llum sobre el cicle de les xantòfiles per modular els nivells de zeaxantina i violaxantina. Tot i que l'expressió dels gens hi juga un paper, la força motriu que fa girar el cicle en una direcció o l'altra radica en la diferència de pH en l'estroma dels tilacoids. En condicions de baixa il·luminació el pH es manté neutre i l'activitat de ZEP es manté per sobre de la de VDE que roman pràcticament inactiva en forma soluble. Quan la quantitat de llum s'incrementa la maquinaria fotosintètica provoca una acumulació de protons que provoca una acidificació. A pH's àcids es promou la incorporació de VDE a la membrana tilacoidal provocant la seva activació i invertint el sentit del cicle per promoure la formació de zeaxantina (Yamamoto, 2006).

Altres factors incideixen en la ruta però no ho fan directament sobre els enzims. La pròpia llum té un paper estimulador de la diferenciació dels cloroplasts amb la consegüent formació d'estructures membranoses que són necessàries per la correcta activitat de diversos enzims de la via que es s'hi troben associats, entre ells PSY . També s'ha postulat en diverses ocasions la formació de complexos multi-enzimàtics en les membranes dels plastidis (Bai *et al.*, 2009) que podrien canalitzar la seqüència de reaccions en base als estudis de localització dels enzims i la detecció de complexos que inclouen alguns dels enzims (Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012). La diferenciació cap als diversos tipus de plastidis té repercussions importants en l'emmagatzemat dels productes finals ja que una major disponibilitat d'estructures membranoses permet acomodar una major quantitat de carotenoides. Un exemple són els fruits dels tomàquets mutants *hp* (High Pigment) que presenten un nombre i mida de plastis superior al normal i mostren un increment de la quantitat de carotenoides total sense que s'alteri l'expressió de cap dels gens de la via (Lazzeri *et al.*, 2012). En aquest sentit resulta determinant el tipus de plastidi en el que es dona l'acumulació. Durant la diferenciació dels cloroplasts a cromoplasts es degrada la maquinaria fotosintètica i es desenvolupen grans plastoglobuls i diverses estructures de segrest de carotenoides que permeten acomodar grans quantitats d'aquests compostos en una matriu de lipoproteïnes. La quantitat total de carotenoides acumulats es depenen, a l'hora, de dos dels processos dels que encara resta molt per conèixer. El *turnover* dels carotenoides, i la seva degradació (Beisel *et al.*, 2010).

2.3- Models per a l'estudi de la síntesi de carotenoides.

2.3.1.- Model bacterià basat en *E.coli*.

E.coli s'ha erigit com a microorganisme model des de que al segle XX, concretament a partir de la dècada dels 50 la ciència va adoptar la metodologia reduccionista de l'estudi dels processos biològics en els organismes més senzills. El seu genoma reduït, la facilitat per créixer en medis poc complexes, i la rapidesa de creixement (en condicions òptimes es duplica cada 20 min) el van situar en una posició privilegiada. Des de llavors, i potenciat per la publicació del seu genoma complet l'any 1997 (Blattner *et al.*, 1997), s'ha convertit en l'organisme més estudiat. La infinitat d'eines genètiques i el seu profund coneixement permeten una versatilitat a l'hora de treballar amb aquest organisme que facilita l'estudi de tots els processos biològics, entre ells la síntesi de carotenoides.

Dues grans eines estan enfocades a l'estudi de la biosíntesi de carotenoides a diferents nivells utilitzant *E.coli* com a model. La primera esta centrada en l'estudi de l'aport de precursors sintetitzats per la via MEP. La segona, que es detalla en apartats posteriors, faculta les cèl·lules de l'organisme no carotenogènic *E.coli* per sintetitzar un ampli ventall de carotenoides introduint diversos gens heteròlegs. La primera de les eines enumerades ha estat àmpliament utilitzada al llarg d'aquest treball. Es tracta d'un grup de soques (**Taula 4**) que han estat modificades de forma estable en dos aspectes partint d'una soca MG1665: Per una banda s'ha integrat en el genoma un operó sintètic (MVA+) que inclou els gens *mvk* (mevalonat quinasa) i *pmd* (5-difosfomevalonat carboxilasa), de llevat, el *pmk* (5-fosfomevalonat quinasa) humana, i el *idi* de *E.coli* sota el control d'un promotor pBAD induïble per arabinosa (Campos *et al.*, 2001a). A l'hora inclou un gen de resistència a l'antibiòtic kanamicina que permet seleccionar la soca que incorpora l'operó. La presència d'aquest operó permet al microorganisme sintetitzar els precursors de la síntesi d'isoprenoides isopentenildifosfat (IPP) i el dimetilal·lildifosfat (DMAPP), a partir de MVA exogen addicionat en el medi de cultiu (Campos *et al.*, 2001b). Per l'altra, la presència d'aquest operó ha permès disruptar, mitjançant recombinació homòloga en cada una de les soques, un dels gens que conformen la via del MEP de síntesi d'IPP substituint-los per un gen CAT de resistència a cloramfenicol o TET de resistència a tetraciclina (Campos *et al.*, 2001b).

La combinació d'aquestes dues modificacions en el genoma (Figura 4) acaba generant una soca que en principi té un fenotip letal perquè té la via del MEP inactiva (els isoprenoides són molècules essencials per a la viabilitat del microorganisme), però que es pot rescatar sempre i quan es suplementi el medi de cultiu amb una quantitat mínima de MVA (0,5 mM) que li permeti sintetitzar els precursors necessaris a través de la via sintètica incorporada en forma d'operó.

Alternativament es pot rescatar la soca en absència de MVA introduint en forma de vector el gen disruptat en el genoma de la soca o un gen equivalent capaç de catalitzar la mateixa reacció (Sauret-Güeto *et al.*, 2003).

Soca	Fons genètic	genotip	MVA+
EcAB4	MG1655	Silvestre	-
EcAB4-1	MG1655	Silvestre	+
EcAB4-2	MG1655	dxs::CAT	+
EcAB4-3	MG1655	dxs::TET	+
EcAB4-4	MG1655	gcpE::CAT	+
EcAB4-5	MG1655	dxs::TET/gcpE::CAT	+
EcAB4-6	MG1655	dxs::TET/yfgB::CAT	+
EcAB4-7	MG1655	ygbP::CAT	+
EcAB4-8	MG1655	ygbB::CAT	+
EcAB4-9	MG1655	ychB::CAT	+
EcAB4-10	MG1655	dxr::CAT	+
EcAB4-11	MG1655	idi::CAT	+
EcAB1-2	MC4100	dxs::cat/dxr::TET	-

Taula 4. Relació de soques d'*E.coli* amb modificacions de la biosíntesi d'isoprenoides. El genotip descriu els gens endògens disruptats per recombinació homologa. **CAT**: gen de resistència a cloramfenicol. **TET**: gen de resistència a tetraciclina. **MVA+** presència (+) o absència (-) de l'operò mevalonat. En gris les soques utilitzades al llarg d'aquest treball.

Aquestes soques permeten realitzar diversos tipus d'aproximacions a l'estudi de la biosíntesi d'isoprenoides en general i carotenoides en particular des del punt de vista de l'aport de precursors. Però la potencia de la eina va molt més enllà ja que permet dur a terme assajos de complementació per comprovar activitats de gens candidats per cada una de les 7 reaccions catalitzades per la via del MEP, analitzar el comportament de l'organisme en front la pèrdua de funció de cada un dels passos que formen la via del MEP, o modular els nivells de precursors disponibles en cada moment treballant amb soques amb la via MEP intacta crescudes en medis suplementats amb concentracions variables de MVA que produiran increments controlats dels nivells de IPP i DMAPP respecte els nivells normals resultat de la síntesi per la via MEP endògena.

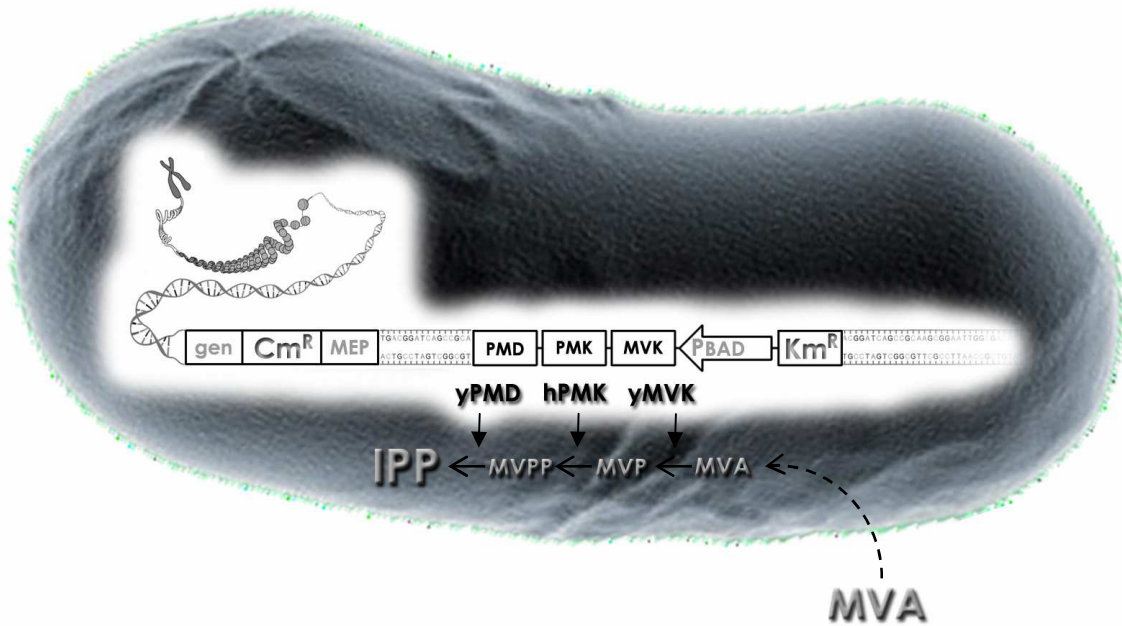


Figura 4. Esquema del sistema model EcAB4. Les cèl·lules de *E. coli* tenen disruptat un dels 7 gens de la via del MEP que ha estat substituït per un gen de resistència a cloramfenicol. A l'hora en el genoma s'ha integrat un operó (fletxes blaves) sintètic (MVA) que permet a les cèl·lules sintetitzar IPP a partir de MVA (fletxa vermella) addicionat al medi de cultiu i que inclou un gen de resistència a kanamicina.

2.3.2.- Models en plantes

Els carotenoides són sintetitzats per totes les plantes. No obstant, en el transcurs de les últimes dècades dos d'elles s'han imposat per sobre de les altres com a models per a l'estudi de la ruta i la seva regulació, *Arabidopsis thaliana* i tomàquet (*Solanum lycopersicum*). En el cas d'*Arabidopsis* ha estat la conseqüència lògica del profund estudi realitzat sobre aquesta espècie des de el moment en que es va adoptar com a organisme model per a l'estudi de la biologia de les plantes. Aquesta elecció es va gestar en base una sèrie de característiques d'aquesta planta com la seva reduïda mida, el seu cycle vital curt, la gran quantitat de llavors que produeix o la mida del seu genoma que compensaven la escassa repercussió agronòmica de la espècie. Per la seva banda el tomàquet ha estat i encara és un model més especialitzat d'estudi de la carotenogènesis ja que n'acumula grans quantitats en els fruits. Tot i que moltes altres plantes acumulen grans quantitats de carotenoides en flors, fruits o llavors que els donen coloracions típiques, el tomàquet presenta unes característiques de mida, quantitat de llavors i cycle de vida adequats per al seu estudi. Aquests models generals no poden però substituir altres sistemes d'estudis més específics com el de la pastanaga (*Daucus carota*) per a l'estudi de carotenoides que s'acumulen en arrels, patata per a l'estudi de carotenoides que s'acumulen en tubercles, o Menta piperina per l'especialització en òrgans com els tricomes.

2.3.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Diversos són el motius que han convertit *Arabidopsis* en un organisme atractiu per als estudis de biologia vegetal. Entre ells destaca el seu ràpid cicle de vida que permet regenerar una planta adulta amb llavors ja madures en un termini d'entre 6 i 8 setmanes per acabar rendint una gran quantitat de noves llavors que es situa al voltant de les 10.000 unitats. Paral·lelament la seva mida continguda (d'aproximadament 30 cm d'alçada) facilita el seu creixement en espais confinats. El seu ús ha senyalat la seva gran adaptabilitat en diverses condicions de cultiu mostrant un correcte creixement en medis estèrils de composició definida i sota llum artificial controlada. La creixent abundància d'eines genètiques ha anat complementant el seu atractiu. A partir de la dècada dels 50 comencen a proliferar les primeres col·leccions de mutants resultat de la exposició de llavors a radiacions ionitzants o agents alquilants. A més, el fet que el mode habitual de reproducció d'aquesta planta sigui la autofecundació facilita la obtenció d'homozigots per les mutacions (Koornneef and Meinke, 2010).

És però a principis dels 80 amb la irrupció de la genètica molecular quan *Arabidopsis* es consolida com a planta model en detriment d'altres espècies com el tabac o el tomàquet. La reduïda mida del seu genoma (aprox. 125 megabases), totalment seqüenciat des de l'any 2000 (Initiative*, 2000), facilita el clonatge de qualsevol seqüència genètica, i l'èxit aconseguit a l'hora de transformar-la amb ADN exogen van acabar de convertir aquest organisme en el preferit pels biòlegs per l'estudi de tots els processos bàsics de la vida. Progressivament la generació de noves col·leccions de mutants d'inserció de T-DNA, així com la transformació rutinària amb protocols senzills i eficients mediat per *Agrobacterium* que han posat a disposició dels investigadors una enorme quantitat d'informació que actualment es recullen en una gran varietat de bases de dades accessibles a través de la xarxa **(Taula 5)**.

Tot aquest conjunt d'eines suposen un gran avantatge per a l'estudi en general de la biologia de la planta i per extensió per a la síntesi de carotenoides. Els cromoplasts són els tipus de plastids on s'acumulen majors quantitats de carotenoides. *Arabidopsis* no disposa d'aquests orgànols però sí que permet l'estudi d'aquests compostos en cloroplasts on també s'acumulen de manera important en teixits fotosintètics. De fet la composició de carotenoides en els cloroplasts mostra un perfil molt similar en totes les plantes de manera que els estudis sobre un model són fàcilment extrapolables. Típicament la luteïna suposa un ~45% del total de carotenoides seguida del β -carotè amb un 25-30%, la violaxantina amb un 10-15% i la neoxantina amb un 10% com a components més abundants (Britton, 1993).

Font	Adreça electrònica (URL)
The Arabidopsis Information Resource	http://www.arabidopsis.org/
The Gene Index Project (TIGR)	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/resourcerer/plant_search.shtml
LEHLE seeds	http://www.arabidopsis.com/
The European Arabidopsis Stock Centre (NASC)	http://arabidopsis.info/
ASPB Publications: The Arabidopsis Book	http://my.aspb.org/members/group.asp?id=68456
Arabidopsis Genome Resource (AGR)	http://ukcrop.net/agr/
Arabidopsis thaliana project	http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/
PlantGDB	http://www.plantgdb.org/AtGDB/
The Arabidopsis thaliana Integrated Database	http://atidb.org/
The Arabidopsis thaliana Isoprenoid Pathway Database (AtIPD)	http://www.atipd.ethz.ch/
MASCP Gator	http://gator.masc-proteomics.org/
AT_CHLORO Database	http://www.grenoble.prabi.fr/at_chloro/

Taula 5. Relació de recursos electrònics disponibles a la xarxa per l'organisme model *Arabidopsis thaliana*.

D'especial rellevància en l'estudi de la carotenogènesi ha estat l'estudi de mutants amb perfils de carotenoides alterats per identificar diversos dels gens de la via entre ells el més recent proposat amb activitat NSY (Al-Babili *et al.*, 2000; Bouvier *et al.*, 2000). Però també per entendre el rol dels carotenoides plastídics en la fotosíntesi. La caracterització de mutants com els *lut*, *npg* o *aba* ha permès establir la funció de diverses xantòfiles en la fotoprotecció, i la informació obtinguda en altres processos paral·lels amb repercussió sobre els perfils de carotenoides a permès avançar decididament en l'estudi de la regulació de la via (Somerville and Koornneef, 2002).

Les noves tecnologies tant genòmiques com proteòmiques han generat una gran quantitat de dades ja sigui d'expressió gènica, respostes a diverses condicions, etc.. recopilades en bases de dades específiques del procés de biosíntesi d'isoprenoides, o compilant tota la proteòmica coneguda del cloroplast (**Taula 5**). Aquesta darrera resulta d'especial importància ja que estableix la localització subcel·lular de la majoria dels enzims involucrats en la biosíntesi de carotenoides, factor que resulta de gran importància per l'activitat d'alguns d'ells.

En conjunt les eines desenvolupades i la impressionant quantitat de dades experimentals acumulades en les últimes dècades suposen un marc immillorable per entendre i a partir d'aquí alterar racionalment els mecanismes moleculars que controlen la biosíntesi de carotenoides en plantes.

2.3.2.2 Tomàquet (*Solanum lycopersicum*)

El tomàquet (*Solanum lycopersicum*) juntament amb el pebrot (*Capsicum annuum*) van ser els organismes més utilitzats per a l'estudi de la biosíntesi de carotenoides degut a la gran acumulació d'aquests compostos que es dona en els fruits madurs.

Aquesta característica va fer que els primers estudis en el camp dels carotenoides es centressin en aquests organismes donant lloc a avenços importants. Posteriorment la major versatilitat d'*Arabidopsis* va desplaçar el focus d'atenció cap a aquest altre sistema. No obstant, el tomàquet continua sent un model de gran interès per a l'estudi dels carotenoides sobretot associat a la maduració de fruits climatèrics. Cada planta rendeix un elevat nombre de fruits i completa el seu procés de creixement (uns 3 mesos) i maduració del fruit (entre 3 i 6 mesos segons la varietat) en un interval de temps raonablement curt. La disponibilitat del genoma complet publicat durant l'any en curs (Consortium, 2012), junt amb un ampli ventall de recursos genètics que inclou col·leccions de mutants, mapes genètics d'alta densitat (Tanksley *et al.*, 1992), possibilitat de transformacions transitòries o estables eficients (An *et al.*, 1986), bases de dades de EST (Alba *et al.*, 2004), o diversos microarrays recollits en diverses bases de dades (**Taula 6**) el converteixen en un model molt important. Permet l'estudi dels fruits carnosos, processos de maduració (Giovannoni, 2007), o biosíntesi de carotenoides. La elevada acumulació que es produeix durant el procés de maduració respon a un programa genètic preestablert en el que s'indueix l'expressió dels gens de la ruta a l'hora que es produeix una progressiva degradació de les clorofil·les i una conversió dels cloroplasts en cromoplasts.

Font	Adreça electrònica
Gramene	http://www.gramene.org/
DFCI Tomato Gene Index	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato
Tomato Functional Genomics Database	http://ted.bti.cornell.edu/
SOL Genomic Networks	http://solgenomics.net/
Tomato Genetics Resource Center	http://tgrc.ucdavis.edu/

Taula 6. Relació de recursos electrònics disponibles a la xarxa per l'organisme model *Solanum lycopersicum*

Els cromoplasts són els tipus de plastids que típicament acumulen una major quantitat de carotenoides però a diferència dels cloroplasts el perfil que mostren és bastant variable en funció de l'òrgan, la espècie o la varietat. L'estudi d'aquestes estructures és de gran importància a l'hora d'entendre els mecanismes que permeten aquesta elevada concentració a l'hora d'afrontar estratègies biotecnològiques orientades a incrementar l'acumulació de carotenoides utilitzant les plantes com a biofactories.

3.- Aplicació tecnològica

3.1- Biotecnologia i enginyeria metabòlica.

La biotecnologia és un camp relativament jove amb infinitat d'aplicacions ja sigui per la síntesi de productes químics senzills de gran producció (com dissolvents, o precursors de polímers), productes més elaborats de química fina amb superior valor afegit (com amino àcids, vitamines, fragàncies o pèptids), o molècules de gran complexitat com els productes naturals. Actualment la matèria prima que suposa el petroli i els seus derivats fa que en termes econòmics la producció de molècules senzilles o de química fina resultin més rentables en processos de síntesi química orgànica tradicional. No obstant l'increment del preu d'aquesta matèria primera i la seva disponibilitat limitada fan que la biotecnologia tingui una possibilitat de futur a mitjà termini per aplicar-se massivament en la síntesi d'aquest tipus de productes. De fet, en algun cas ja s'està produint algun d'aquest compostos de manera rendible. Un exemple és la síntesi del 1,3-propandiol (1,3-PDE), un intermediari utilitzat per a la síntesi de poliuretans i polièsters que s'està generant amb finalitats comercials en cèl·lules d'*E.coli* modificades amb gens de *Klebsiella pneumoniae* i *S. cerevisiae* utilitzant glucosa com a font de carboni (Nakamura and Whited, 2003). En una fase molt avançada també es troben alguns dels denominats biocombustibles avançats (Peralta-Yahya *et al.*, 2012). Entre aquests potencials nous combustibles un subgrup deriven d'isoprenoides. El farnesà és el que es troba més proper de la seva comercialització (Renninger, 2008) en un procés híbrid de síntesi de farnesè utilitzant una soca modificada de *S.cerevisiae* (Ubersax, 2010) i posterior hidrogenació química. Molt més recent però molt prometedora és la identificació i producció de bisabolà (C₁₅) com a biocombustible de característiques molt similars a les del dièsel (Peralta-Yahya *et al.*, 2011). Com en el cas anterior la seva síntesi es du a terme en un procés híbrid de síntesi de bisabolè utilitzant organismes modificats (*E.coli* o *S. cerevisiae*) i posterior hidrogenació química fins a bisabolà.

Més interessant resulta la síntesi de productes naturals que, per la seva complexitat, són molt costosos de produir a través de mètodes químics. Els productes naturals tenen una ampla gamma d'aplicacions però aquella en la que la biotecnologia resulta especialment un avantatge respecte als mètodes tradicionals són el coneguts com ingredients farmacèutics actius (API) pel seu altíssim valor afegit que justifica el cost associat al desenvolupament d'un organisme modificat. Aquests compostos es poden dividir en tres grans grups de productes naturals, (1) els alcaloides, (2) els poliquètics, i (3) els isoprenoides (Keasling, 2010). Històricament la seva obtenció era el resultat de la extracció a partir de les fonts originals o, en comptades excepcions, de síntesi química. La revolució que va significar la tecnologia recombinant durant els anys 70 va obrir les portes a tot un conjunt de noves possibilitats que poc a poc cristal·litzaria en el que actualment denominen biotecnologia i enginyeria metabòlica (terme utilitzat per primera vegada a finals dels 80 (Bailey, 1991)). Aquest tipus d'aproximacions han

anat incrementant la seva complexitat i eficiència a mesura que el coneixement de les vies biosintètiques s'ha anat enriquint, però també com a conseqüència de superar les dificultats que han anat apareixent darrera de cada nova experiència. Així s'ha passat de la més senzilla de les aproximacions consistent en generar la màxima sobreexpressió d'un dels gens implicats en una ruta preexistent fins a la introducció de rutes metabòliques completes en sistemes heteròlegs on aquesta no es present, generant pel camí una ampla diversitat d'estratègies. En l'actualitat les estratègies més habituals per millorar la productivitat de les factories biològiques en base a la millora del flux de la via d'interès son bàsicament 4: **(1)** Eliminar vies endògenes que dirigeixen els precursors cap a productes finals que no son el desitjat, **(2)** sobreexpressar els gens de la via, **(3)** utilitzar la enginyeria de proteïnes per incrementar la activitat dels enzims, **(4)** superar els mecanismes reguladors que limiten el flux de la via. El futur de la enginyeria metabòlica mira cap a la anomenada biologia sintètica que pretén facilitar la implementació de processos a través de la caracterització i estandardització de blocs biològics que es puguin combinar i el desenvolupament d'eines informàtiques que permetin preveure les respostes metabòliques i per tant ajustar de manera òptima cada un d'aquests blocs (Keasling, 2012).

Per implementar un procés biotecnològic en microorganismes com *E.coli*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* o *Streptomyces coelicolor* cal tenir en compte varis paràmetres a l'hora de fer el disseny. El primer de tots el cost i la disponibilitat dels materials de partida que en la majoria dels casos és la font de carboni. En segon lloc és important escollir un organisme hoste adequat en funció del producte final que es vulgui obtenir. Segons si l'hoste incorpora o no la ruta que es pretén utilitzar caldrà definir els enzims a modificar o a incorporar de manera heteròloga. També caldrà incorporar un sistema de control genètic per la via, i compatible amb l'hoste escollit, que permeti evitar els colls d'ampolla en la via i a l'hora permeti maximitzar el rendiment final. Actualment es disposa de diversos recursos per afinar les condicions del sistema per controlar, i encara més important, coordinar de manera balancejada l'expressió dels gens implicats per evitar l'acumulació de substàncies tòxiques i colls d'ampolla metabòlics. Per fer-ho es pot treballar amb diversos tipus de promotors constitutius (de força variable) o induïbles, treballar amb operons que agrupin grups de gens, modificar les seqüències d'unió del ribosoma (RBS) per modular els nivells de traducció, o variar la estabilitat dels RNA missatgers. En conjunt la combinació d'elements permet regular la quantitat de cada enzim produït.

Tot i les enormes possibilitats disponibles és molt complicat preveure a priori el comportament del sistema. És per això que s'ha optat per aproximacions de tipus combinatòries en les que s'avalua cada una de les variables del sistema i l'efecte dels canvis introduïts en les restants variables (Jin and Stephanopoulos, 2007; Wang *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2006). Aquest mètode permet optimitzar de manera empírica el rendiment final sense la necessitat expressa d'identificar els paràmetres limitants però suposa un elevat esforç en forma d'escrutinis massius. Una solució de compromís per obtenir una millora dels rendiments restringint el volum

d'escrutinis s'ha aconseguit en la anomenada enginyeria metabòlica modular (Ajikumar *et al.*, 2010).

Aquesta metodologia consisteix en dividir el conjunt de la via d'interès en grups d'enzims o mòduls i provar diferents combinacions de nivells d'expressió de cada mòdul amb diferents promotors i numero de còpies dels gens fins a obtenir el rendiment màxim del producte final. Un clar exemple de la potencia d'aquest sistema es la síntesi del taxadiè, un diterpè cíclic que és el precursor del taxol un agent antitumoral molt potent que va ser aïllat per primera vegada l'any 1968 a partir de l'escorça del teix (Wani *et al.*, 1971). L'obtenció del producte a partir dels extractes dels arbres requereix sacrificar entre 2 i 4 arbres adults (200 anys) per una única dosi del fàrmac i la síntesi química d'una estructura de la complexitat del taxol implica més d'una trentena de passos que redueix el rendiment final per sota del 0,5% en el millor dels casos. (Nicolaou *et al.*, 1995) Per aquests motius s'han dut a terme aproximacions biotecnològiques per a la producció de taxadiè en bioreactors utilitzant tècniques d'enginyeria metabòlica. Les primeres aproximacions van ser en els hosts *E.coli* (Huang *et al.*, 2001) i *S.cerevisiae* (Engels *et al.*, 2008). En el primer cas sobreexpressant l'enzim de la via del MEP, DXS i introduint els gens codificants per IDI, GGPPS i taxadiè sintasa (TS) per facultar l'hoste per a la síntesi del taxadiè a partir del IPP endogen. En el cas de *S.cerevisiae* es va expressar una forma truncada de la HMGR de la via del MVA i de la GGPPS per incrementar l'aport de precursors i es va introduir la TS per produir el taxadiè. Els resultats donaven produccions moderades de 1,3 i 10 mg per litre de cultiu respectivament. La aplicació de enginyeria metabòlica modular ha aconseguit millorar el rendiment fins a un prometedor gram per litre de cultiu (Ajikumar *et al.*, 2010).

3.2.- Aproximacions biotecnològiques per a la producció de carotenoides

Tal i com ja s'ha introduït en apartats anterior els productes naturals d'origen isoprenoide i especialment els carotenoides tenen una àmplia gamma d'aplicacions ja sigui en medicina, agricultura, farmàcia, o indústria alimentària. Com que una gran majoria dels compostos d'interès es produeixen en les plantes, la seva font bàsica d'obtenció eren i en molts casos encara són, les pròpies fonts naturals. Per intentar optimitzar la rendibilitat dels processos d'extracció s'ha intentat millorar el contingut del compost d'interès en les plantes de cultiu seguint metodologies de creuament tradicionals. Alternativament, en els casos d'estructures més senzilles, també es podien arribar a produir per síntesi química total o parcial. En el cas dels carotenoides es pretén incorporar noves metodologies com la enginyeria genètica de plantes, l'ús de cultius cel·lulars o la producció en sistemes microbians com a alternatives de present i futur.

3.2.1.- Biotecnologia en bacteris

La utilització de sistemes microbiològics en aquest camp, en contraposició als vegetals, tot i que encara no es mostra totalment robusta, sí que ha fet passos endavant molt importants gràcies sobretot a la seva versatilitat. Un dels valors afegits d'aquesta nova tecnologia és el factor ecològic, que suposa una gran millora respecte els mètodes de síntesi química. Els hostes més habituals en la actualitat són curiosament organismes no fotosintètics, principalment *E.coli*, *S.cerevisiae*, i *Candida utilis*, que s'han convertit en productors de carotenoides transformant-los amb gens procedents d'organismes carotenogènics capaços de catalitzar les reaccions. Diverses combinacions d'aquests gens han permès sintetitzar un gran registre de compostos d'interès com el licopè, el β -carotè, la zeaxantina, la astaxantina o la luteïna (Taula 7). Fins i tot aprofitant la promiscuïtat que mostren alguns d'aquests enzims per diversos substrats s'han explorat noves architectures químiques poc habituals en la naturalesa (Albrecht *et al.*, 2000). *E.coli* s'ha erigit com el gran hoste per a la producció de pigments sustentant el seu èxit en la gran varietat d'eines biològiques i genètiques de les que es disposa per a la seva modificació.

No obstant, encara queden diversos problemes que cal afrontar per a obtenir processos biotecnològics eficients, principalment en *E.coli*. Els més evidents a dia d'avui es poden agrupar en dos grans blocs. **(1)** Una síntesi de substrats suficient i equilibrat que es canalitzi correctament cap als productes finals sense alterar el metabolisme del conjunt de la cèl·lula, i **(2)** Una manera de reduir l'efecte de l'acumulació dels pigments (lipofílics) sobre la integritat de la membrana plasmàtica. El primer dels problemes és inherent a tot sistema viu que és alterat significativament en l'equilibri metabòlic en potenciar específicament una de les seves rutes. El segon es dona de manera especialment important en hostes originalment no carotenogènics. Per aquest motiu s'ha estudiat l'ús de microorganismes carotenogènics ja sigui com a nous hostes en estratègies alternatives a *E.coli*, o per identificar els mecanismes que utilitzen per suportar grans acumulacions de carotenoides sense posar en compromís la seva viabilitat. Un dels organismes més estudiats en aquest sentit és la microalga *Dunaliella salina* ja que es una espècie que acumula elevats nivells de β -carotè, concretament fins a un 10% del pes sec en condicions ambientals d'elevada intensitat de llum i salinitat (Lamers *et al.*, 2008). De fet s'utilitza com a font comercial d'aquest producte a gran escala. Altres microalgues com *Haematococcus pluvialis* (Kang *et al.*, 2007), *Muriellopsis sp.* (Blanco *et al.*, 2007), o *Coelastrella striolata* acumulen importants quantitats d'astaxantina, luteïna i cantaxantina respectivament. En el cas de *Dunaliella salina* s'han aconseguit establir les condicions que potencien l'acumulació del pigment però molt poc es coneix dels mecanismes que ho regulen com tampoc de com es dirigeixen cap als glòbuls on s'acumula.

3.2.1.1.- Model basat en *E.coli*.

E.coli és un microorganisme no carotenogènic de manera que no sintetitza carotenoides de manera natural i per tant no disposa dels enzims que catalitzen la biosíntesi d'aquests compostos. Això no ha estat un impediment perquè aquesta enterobacteria hagi esdevingut un model i un dels hostes més importants per a l'estudi i la síntesi biotecnològica d'aquests compostos.

E.coli sintetitza diversos grups d'isoprenoides a partir de l'IPP i DMAPP generats a través de la via del MEP, però no disposa d'un enzim per produir GGPP, l'esquelet bàsic dels carotenoides. Per poder sintetitzar aquests compostos s'ha utilitzant la tecnologia recombinant per introduir-li tota una sèrie de gens d'altres organismes carotenogènics (típicament *Pantonea ananas*) que el facultin per a la síntesi de cada un dels compostos. Com a exemple, per a la síntesi del pigment vermell licopè cal introduir els gens *crtE*, *crtB* i *crtI* (que codifiquen les activitats GGPPS, PSY i PDS/ZIS/ZDS/CRTISO) que catalitzen les reaccions seqüencials de síntesis de GGPP, fitoè, i licopè respectivament (Figura 5). En la **Taula 7** es detallen els gens més utilitzats així com les construccions disponibles per promoure la síntesi de diversos carotenoides. Una revisió extensa de l'ús de gens clonats de bacteris, plantes, algues i fongs per a la síntesi de carotenoides en microorganismes no carotenogènics ha estat publicada per Lee i col·laboradors (Lee and Schmidt-Dannert, 2002)

Gen	Activitat	Producte	Construcció	referencia
<i>crtE</i>	GGPP sintasa	GGPP	pACCRT-E	(Chamovitz <i>et al.</i> , 1992)
<i>crtB</i>	Fitoè sintasa	Fitoè	pACCRT-EB	(Misawa <i>et al.</i> , 1995)
<i>crtI</i>	Fitoè desaturasa	Licopè	pACCRT-EIB	(Cunningham <i>et al.</i> , 1993)
<i>crtY</i>	Licopè ciclasa	β-carotè	pACCRT-16ΔCrtX	(Misawa <i>et al.</i> , 1995)
<i>crtZ</i>	β -carotè hidroxilasa	Zeaxantina	pACCRT-25ΔCrtX	(Najiwara <i>et al.</i> , 1996)
<i>crtW</i>	β -carotè cetolasa	Cantaxantina	-	-
<i>crtO</i>	β -carotè oxigenasa	Astaxantina	-	-

Taula 7. Relació de gens utilitzats per facultar a l'hoste *E.coli* per a la síntesi de diversos carotenoides. En negreta els gens i construccions utilitzats en aquest treball.

Aquestes eines per una banda permeten utilitzar *E.coli* com a biofactoria per a la producció de carotenoides a l'hora que permeten estudiar l'efecte de noves estratègies biotecnològiques sobre la producció final dels compostos.

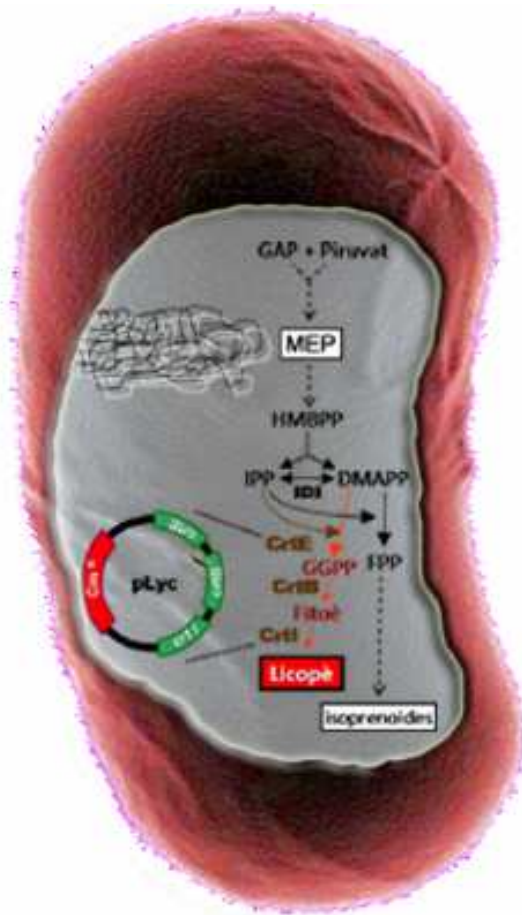


Figura 5. Esquema d'una cèl·lula de *E. coli* habilitada per a la síntesi de carotenoides. L'organisme produeix IPP i DMAPP per la via del MEP pròpia i que transforma en isoprenoides a través de la molècula parental FPP. Les cèl·lules es transformen amb el vector pLyc que incorpora les seqüències que codifiquen pels enzims CrtE, CrtB, i CrtI de *Pantonea ananas*. Aquests enzims faculden l'organisme per sintetitzar el carotenoid vermell licopè que en acumular-se dona coloració rosada a les cèl·lules. Les línies discontinues mostren diversos passos catalítics, i les continues indiquen un únic pas. En negre la ruta endògena de *E. coli*. En vermell la ruta alternativa introduïda per a la síntesi de licopè.

3.2.1.2 Estratègies tecnològiques.

3.2.1.2.1 Millora de la disponibilitat dels precursors.

La síntesi dels carotenoides es fonamenta en l'ensamblatge de les peces bàsiques que produeix la via del MEP, el IPP i el DMAPP. No es estrany per tant que l'aport d'aquest precursors sigui clau per modular els nivells de productes finals en bacteris. S'ha descrit que una concentració intracel·lular excessiva de IPP pot provocar toxicitat, però a l'hora un descens excessiu en els nivells pot repercutir també de manera negativa en el creixement cel·lular que requereix d'aquest intermediari per la síntesi de quinones i de bactoprenol per la correcta construcció de la paret cel·lular (Maury *et al.*, 2005). Per optimitzar l'aport d'IPP i DMAPP s'han dut a terme diversos tipus d'aproximacions des de les més directes com incrementar el flux de la via a través de la sobreexpressió dels enzims que la conformen, fins les més subtils com la identificació de mutants en altres rutes que evitin la dispersió de la font de carboni. A continuació es repassen les més significatives.

3.2.1.2.2.- Increment dels nivells d'enzims biosintètics

La estratègia més directa per aconseguir incrementar la quantitat de IPP i DMAPP en cèl·lules de *E.coli* és la sobreexpressió dels gens de codificants pels enzims de la via endògena (MEP) per incrementar-ne el seu flux. Diversos treballs han analitzat l'efecte de la sobreexpressió d'alguns d'aquests gens en l'acumulació de productes finals en cèl·lules de *E.coli* convertides en carotenogèniques (tal i com s'ha descrit en apartats anteriors). La major part d'ells estan centrats en DXS, l'enzim que catalitza el primer pas de la via MEP, i en tots els casos produeixen un increment important en els nivells de licopè (Harker and Bramley, 1999). Destacable és el fet que en diversos dels estudis s'establia una correlació negativa entre els nivells d'expressió més alts del gen i la acumulació de productes.

Un punt que ha demostrat tenir una incidència en l'eficiència del disseny biotecnològic és el catalitzat per IDI, el que es pot considerar l'últim enzim de la via del MEP. Increments en la activitat d'aquest enzim millora l'acumulació de productes finals. La isomerasa mantenint l'equilibri (ja descrit com a important en condicions normals) entre els dos isòmers IPP i DMAPP quan la variació en el flux de la via provoca un increment general dels dos compostos (Albrecht *et al.*, 1999).

El paper dels nivells d'expressió dels gens de la ruta del MEP i de la ruta de carotenogènesi queda clarament de manifest en diferents estudis. Un primer estudi generant operons dels 5 enzims necessaris per la conversió de FPP fins a zeaxantina sota el control d'un únic promotor permutant l'ordre dels gens demostrava que els millors rendiments finals s'obtenien en el cas en el que els gens es situaven seguint el mateix ordre de la via (Yuan *et al.*, 2006). A l'hora un anàlisi comparatiu de producció de β -carotè entre cèl·lules transformades amb vectors d'expressió i soques en les que el promotor endogen dels gens s'ha substituït pel promotor del bacteriòfag T5 (P_{T5}) demostrava una millora en el segon cas, fet que també s'ha observat més tard pel cas de la síntesi d'artemisina (Yuan *et al.*, 2006).

En aquest mateix estudi també es suggereix el paper modulador dels enzims MCT i MDS (Figura 2 i **Taula 2**) ja que les soques PT5-ispD i PT5-ispF acumulaven nivells majors de β -carotè que les cèl·lules silvestres. La proximitat en el genoma d'aquests dos gens i l'existència d'un gran nombre de casos en els que els dos transcrits es troben fusionats formant un únic pèptid bifuncional de manera natural (Gabrielsen *et al.*, 2004; Perez-Gil *et al.*, 2010) suggereix a l'hora que l'efecte es fonamenta en una acció coordinada com a operó.

En conjunt els diversos estudis posen de manifest la importància de mantenir un equilibri entre els passos claus de la via biosintètica per sobre d'incrementar descontroladament l'activitat en un punt concret de la via del MEP. La sobreexpressió proteica consumeix una elevada proporció dels recursos cel·lulars a l'hora que pot provocar nous colls d'ampolla que tinguin com a resultat l'acumulació de metabolits que resultin tòxics (Ajikumar *et al.*, 2010) o una alteració del metabolisme central que repercuteixi negativament en la cèl·lula.

3.2.1.2.3.- Incorporació de la via del MVA

La incorporació parcial o completa d'una ruta metabòlica que no és present en l'hoste permet treballar evitant els factors de regulació endògena de la cèl·lula. Sota aquesta premissa s'han dut a terme diversos treballs utilitzant una via del MVA sintètica (operó MVA) per incrementar l'aport d'IPP i DMAPP en sistemes que utilitzen la via del MEP. Resumidament el sistema consisteix en introduir un conjunt de gens que facultin a l'organisme hoste a sintetitzar IPP i DMAPP a partir de MVA addicionat en el medi de cultiu (el sistema ha estat detallat en l'apartat 2.3.1). Treballs previs focalitzats en *S.cerevisiae* (que sintetitza tots els seus isoprenoides exclusivament a través de la via del MVA) ja havien demostrat el paper clau de l'enzim HMGR en el control del flux de la via. Intentos de millora en aquest sentit modificant la proteïna per alterar-ne la seva regulació havien rendit majors nivells d'IPP. Per altra banda el creixement cel·lular es veia compromès en el que s'ha interpretat com un efecte tòxic resultat de la acumulació d'aquest intermediari. La situació és similar a la descrita anteriorment en cèl·lules de *E.coli* amb elevats nivells de sobreexpressió de DXS (Maury *et al.*, 2005). En aquest cas el fet d'introduir gens carotenogènics que consumissin aquest excés d'IPP tendia a recuperar la viabilitat cel·lular en el que s'interpreta com un reforç de la toxicitat de l'IPP (Kirby and Keasling, 2009). Una manera alternativa d'incrementar els productes finals en *S.cerevisiae* era la sobreexpressió dels gens acetaldehid deshidrogenasa i acetil-CoA sintasa que catalitzen la conversió d'acetaldehid a acetat i aquest a acetil-CoA amb el conseqüent increment del substrat que arriba a la via del MVA (Shiba *et al.*, 2007).

Els resultats obtinguts incorporant la via del MVA han estat molt importants en *E.coli*. La acumulació de lycopè s'incrementava significativament en soques que incorporaven l'operó del mevalonat quan es comparaven amb les soques que utilitzaven la via del MEP (Yoon *et al.*, 2006). Efectes similars però encara més importants s'observaven en l'acumulació de β -carotè en soques que combinaven l'operó MVA amb la sobreexpressió de DXS aconseguint rendiments per sobre dels 0,5g / litre de cultiu (Yoon *et al.*, 2007). La incorporació de la ruta exògena del MVA, ja sigui completa o parcial demostra el potencial que un hoste com *E.coli* ofereix quan incorpora una ruta desregulada.

3.2.1.2.4.- Modificacions del metabolisme central

Els substrats que utilitzen tant la via del MVA (acetil-CoA) com la via del MEP (piruvat i GAP) estan involucrats en el metabolisme central a través de la via glicolítica de manera que el seu consum pot provocar alteracions importants. En el cas de la via del MEP es requereixen quantitats equimolars dels dos compostos però tot i no disposar de quantificacions intracel·lulars en més d'una ocasió s'ha suggerit que seria el GAP el que actuaria com a limitant en estratègies de sobreexpressió de DXS (Kim and Keasling, 2001). El piruvat és un precursor utilitzat per diverses rutes metabòliques de manera que s'assumeix que es troba més accessible que no pas el GAP. Alguns estudis donen suport a aquesta idea ja que la modificació de rutes que té com a resultat una orientació dels nivells de piruvat cap a GAP, donen lloc a sistemes de major producció de licopè (Farmer and Liao, 2001). De fet la inactivació de rutes no essencials que consumeixen tan piruvat com acetil-CoA poden generar increments en la producció de licopè de fins a un 45% (Vadali *et al.*, 2005).

3.2.1.2.5.- Combinatoria i atzar.

Alguns dels factors que limiten la producció de carotenoides en sistemes heteròlegs resulten difícils d'identificar de manera trivial. Per poder treure a la llum alguns d'aquests factors s'han desenvolupat estratègies massives sense partir d'una suposició *a priori*.

Estudis exhaustius de balanç de flux estequiomètrics (FBA) realitzats *in silico* intentant establir els enzims que en eliminar-se podrien produir un increment net del flux de carboni cap a IPP i en conseqüència establir els efectes sobre els productes finals i la taxa de creixement en *E.coli*, van proposar diversos gens candidats: **(1)** aceE (piruvat deshidrogenasa), **(2)** gdhA (glutamat deshidrogenasa), **(3)** gpmA (fosfoglucomutasa), **(4)** gpmB (fosfoglucomutasa), i **(5)** fdhF (formiat deshidrogenasa). Cap d'ells estava directament vinculat a la ruta del MEP però si amb la disponibilitat de precursors. En paral·lel, es va combinar aquest estudi amb un escrutini de gens knockout amb un sistema de mutagènesis a l'atzar a través de transposons. Es van identificar un segon grup de gens candidats relacionats amb la cinètica o possibles mecanismes reguladors. La generació de mutants combinant els candidats obtinguts per una i altre metodologia va mostrar que els màxims nivells d'acumulació de licopè de les diverses soques eren màxims en dues de les combinacions. Una era la triple mutant $\Delta gdhA \Delta aceE \Delta fdhF$ amb candidats obtinguts del modelat, i l'altre $\Delta gdhA \Delta aceE \Delta pyiD$ combinant candidats dels dos mètodes. Aquestes soques incrementaven el licopè en més d'un 40% en el que sembla indicar que altres factors diferents a l'aport de precursors estarien implicats en la producció del pigment (Alper *et al.*, 2005).

Per altre banda, un escrutini a l'atzar en base a la coloració dels cultius d'una llibreria completa del genoma de *E.coli* obtinguda pel mètode de shotgun, va permetre identificar un altre conjunt de gens (Kang *et al.*, 2005). En aquest cas es tractava dels gens *crl*, *rpoS* i *appY*. *rpoS* codifica per un factor Sigma S que estimula la transcripció de gens de la fase estacionaria, mentre que *appY* i *crl* codifiquen per reguladors transcripcionals relacionats amb el metabolisme energètic i la formació de fibres en la superfície cel·lular. Els clons que contenien aquests gens junt amb la sobreexpressió de DXS resultava en una millora (especialment en el cas de *appY*) de la acumulació de licopè comparada a la soca únicament sobreexpressora (Kang *et al.*, 2005).

3.2.1.2.6.- Capacitat d'emmagatzematge.

Els carotenoides tenen un marcat caràcter lipofílic (hidrofòbic) degut a la llarga cadena alquílica i la relativament baixa funcionalització. És per això que es creu que en acumular-se ho fan bàsicament en les membranes insertant-se en elles o unint-s'hi. Nivells molt elevats d'aquest tipus de compostos poden tenir efectes tòxics per a les cèl·lules arribant a comprometre el creixement cel·lular o fins i tot desorganitzant les membranes. Aquest problema es especialment accentuat en organismes que naturalment no sintetitzen carotenoides, com *E.coli*, perquè no disposen de mecanismes per canalitzar la acumulació de compostos d'aquesta naturalesa. Tot i la aparent importància d'aquest factor pocs treballs han profunditzat en aquesta problemàtica. En estudis d'acumulació de licopè (el més lipofílic de tots els carotenoides d'interès comercial) la inclusió de quantitats moderades de detergents com Tween o SDS millorava el rendiment del sistema en condicions de sobreproducció sobretot en termes de inhibició de creixement cel·lular (Yoon *et al.*, 2006). Aquesta resposta s'ha associat a un efecte preventiu sobre la formació d'agregats insolubles de licopè.

En sistemes carotenogènics com plantes o microalgues s'estableixen una sèrie de mecanismes dels quals pocs detalls se'n coneixen. En plantes es dona la unió entre els carotenoides i les proteïnes de membrana (unió al sistema fotosintètic dels cloroplasts on actuen com a auxiliars en la captació de llum, i protectors en front dels excessos energètics que se'n deriven) o a lipoproteïnes (el cas dels cromoplasts). En microalgues com *Dunadella salina* es formen glòbuls on s'acumula gran quantitat de β -carotè que s'associen a membrana plasmàtica amb un paper protector (Lamers *et al.*, 2008). Algunes incursions intentat traslladar algun d'aquests sistemes a *E.coli* no han donat resultats apreciables (Wurtzel *et al.*, 1997). En definitiva el desenvolupament d'estratègies eficients futures en bioreactors requerirà de mecanismes que permetin millorar la capacitat d'acumulació ja sigui incrementant la superfície de les membranes en les cèl·lules o associant els productes a proteïnes que les capturin per evitar el dany cel·lular.

Agafats en conjunt tots aquests estudis demostren que la biotecnologia aplicada a carotenoides amaga una gran complexitat on la limitació de precursors juga un paper central però molts

d'altres factors hi prenen part. A dia d'avui l'interès que tenen aquests compostos ha conduït a multitud d'estudis que han rebel·lat la importància de variables més obvies com la necessitat d'un correcte emmagatzematge o d'altres menys evidents com els factors energètics, l'equilibri metabòlic, o el control de la formació d'agents tòxics. Tots aquests elements han estat abordats en diferents proves de concepte aïllades (**Taula 8**) però a dia d'avui encara no hi ha cap estudi que hagi intentat integrar el conjunt de factors per analitzar com s'interrelacionen entre ells.

Carotenoide	Hoste	Rendiment	referencia
Licopè	Escherichia coli	4,28 mg/l	Vadali et al. 2005
Licopè	Escherichia coli	6600 µg/g DCW	Alper et al. 2005a
Licopè	Escherichia coli	18000 µg/g DCW	Alper et al. 2005b
Licopè	Escherichia coli	16000 µg/g DCW	Jin and Stephanopoulos 2007
zeaxantina	Escherichia coli	820 µg/g DCW	Nishizaki et al. 2007
β-Carotè	Escherichia coli	6000 µg/g DCW	Yuan et al. 2006
Licopè	Escherichia coli	22000 µg/g DCW	Yoon et al. 2006
β-Carotè	Escherichia coli	49300 µg/g DCW	Yoon et al. 2007b
β-Carotè	Saccharomyces cerevisiae	5900 µg/g DCW	Verwaal et al. 2007
Licopè	Escherichia coli	4700 µg/g DCW	Kang et al. 2005
β-Carotè	Escherichia coli	465 mg/l	Yoon et al. 2009
Licopè	Escherichia coli	59 mg/l	Yoon et al. 2007 ^a
Astaxantina	Escherichia coli	88% of total carotenoid	Tao et al. 2006
Astaxantina	Methylomonas sp. 16a	95% of total carotenoid	Ye et al. 2007
Astaxantina	Haematococcus pluvialis	11400 µg/g DCW	Steinbrenner 2006
Licopè	Escherichia coli	220 mg/l	Alper et al. 2006
β-Carotè	Escherichia coli	390 mg/l	Kim et al. 2006
Licopè	Escherichia coli		Rodríguez-Villalon et al. 2008

Taula 8. Resum dels rendiments assolits en estratègies biotecnològiques per a la producció de diversos carotenoides.

3.2.2.- Biotecnologia en plantes

L'enginyeria metabòlica en plantes ofereix grans possibilitats en el camp dels nutracèutics i la millora de les propietats d'alguns aliments. Un exemple és el cas del Golden Rice que permet l'acumulació de β -carotè en l'endosperm d'arròs per millorar les qualitats dietètiques d'aquest aliment i repercutir beneficiosament en la salut dels països en desenvolupament que basen la seva dieta diària en aquest aliment (Tang *et al.*, 2009). Seguint aquest exemple el blat s'ha postulat com el següent candidat a ser modificat per seguir els passos marcats amb l'arròs (Wurtzel *et al.*, 2012). En canvi el seu ús com a biofactories tot i ser un camp prometedor encara queda lluny dels límits marcats per la rendibilitat. A l'hora de produir compostos, els rendiments obtinguts no poden competir amb altres mètodes d'obtenció més barats. Encara són molts els factors que limiten la producció eficient d'aquests compostos, bàsicament relacionats amb la complexitat del sistema i l'incomplet coneixement del que es disposa en referència a la regulació de la ruta biosintètica així com també de com aquesta es relaciona amb la resta de les funcions de l'organisme.

3.2.2.1 Millora d'aliments

Els animals, i per tant el humans, no tenen la capacitat de sintetitzar carotenoides però aquests els són essencials. Per tant els han d'adquirir a través de la dieta. Els carotenoides obtinguts de la ingesta són responsables de la típica coloració d'ocells o invertebrats però molt més important és que satisfan els requeriments nutricionals essencials d'animals i humans. Els carotenoides obtinguts de la alimentació, i molt especialment el β -carotè, s'utilitzen en les cèl·lules animals com a precursors de la producció de retinoides. Retinol (vitamina A), retinal, i àcid retinoic duen a terme importants funcions com a pigments visuals i molècules de senyalització. De fet la deficiència en vitamina A és un dels problemes nutricionals més importants en tot el món i especialment en els països en vies de desenvolupament que afecta especialment als nens (Humphrey *et al.*, 1992; Roels *et al.*, 1958).

No obstant, aquest no és l'únic benefici en nutrició humana. En els darrers anys diversos estudis han establert una correlació positiva entre les dietes riques en carotenoides i la millora respecte a diverses afeccions. Aquesta acció beneficiosa s'associa al seu caràcter antioxidant i la seva capacitat d'inactivar radicals lliures (DiMascio *et al.*, 1989) que actuaria com a preventiu del dany cel·lular. Així s'ha establert una relació inversa entre la ingesta d'aliments rics en carotenoides com fruites i/o verdures i la incidència de determinats tipus de càncers (pulmó, pit, colon i pròstata), dany de la pell induït per la radiació ultravioleta, malalties coronaries, o degeneració macular (Demmig-Adams and Adams, 2002; Fraser and Bramley, 2004; Handelman, 2001; Stahl and Sies, 2005). Aquests estudis han incrementat l'interès en aquests compostos propiciant un potencial increment en la demanda que difícilment podrà ser satisfet a

través dels sistemes de síntesi química disponibles per alguna carotenoides (licopè, β -carotè, luteïna...) o a partir de la extracció de les fonts naturals. En aquest context i sota la premissa d'una actuació de tipus preventiva d'aquests compostos ha pres una major rellevància la aplicació de la biotecnologia per a incrementar la quantitat de carotenoides amb interès nutricional o fins i tot de promoure'n la producció en aliments que en són deficitaris (Botella-Pavía and Rodríguez-Concepción, 2006). Els aliments amb un valor nutricional afegit són una alternativa als suplementes dietètics amb l'avantatge addicional apuntat en diversos estudis de la sinergia positiva que suposa la ingesta de barreges de varis carotenoides i/o en combinació amb altres agents antioxidants (Stahl and Sies, 2005).

La majoria de les aproximacions biotecnològiques dutes a terme en aquest sentit s'han fet, lògicament, sobre sistemes amb elevada rellevància agronòmica especialment tomàquet centrats bàsicament en la millora dels nivells de lycopè o β -carotè. Resultats prometedors s'han obtingut també en el cas de patata o arròs.

En tomàquet s'han anat afinant diverses aproximacions noves en funció dels resultats obtinguts en intents anteriors. Les primeres aproximacions es van basar en la sobreexpressió de PSY, l'enzim descrit com a clau en la regulació de la via carotenogènica amb la sobreexpressió constitutiva de la forma específica de cromoplast, PSY1. Els fruits madurs d'aquestes plantes transgèniques mostraven un decrement en la quantitat de lycopè acumulat respecte els tomàquets silvestres que es va associar a fenòmens de co-supressió que de fet reduïrien la quantitat efectiva de proteïna final i per tant d'activitat PSY (Fray *et al.*, 1995). Un segon intent es va dur a terme dirigint la proteïna bacteriana crtB cap a cromoplast sota el control d'un promotor específic de fruit. D'aquesta manera es concentra la acció en el fruit i s'evita la co-supressió. Les quantitats de lycopè i β -carotè obtinguts pràcticament duplicaven i triplicaven respectivament els nivells dels tomàquets silvestres tot i que s'observava una acumulació molt important de fitoè suggerint que el coll d'ampolla que suposa PSY s'havia desplaçat a altres punts de la via (Fraser *et al.*, 2002).

L'acció directa sobre la conversió del fitoè en lycopè s'ha abordat sobreexpressant el gen bacterià *CrtI* que catalitza les 4 reaccions necessàries (**Taula 7**). Els resultats obtinguts van ser inesperats. L'expressió constitutiva del gen va produir fruits madurs transgènics amb acumulació total de carotenoides reduïda amb un descens en els nivells de lycopè però amb el doble de β -carotè respecte els fruits no transformats (Römer *et al.*, 2000). De manera natural durant el programa de maduració l'expressió de ciclases és veu reprimida promovent la típica acumulació de lycopè responsable del color vermell del fruit (Cheung *et al.*, 1993). En els fruits transgènics es produïen una sèrie d'alteracions dels patrons d'expressió normals, entre ells un increment en els nivells de β -ciclases endògenes responsable de l'acumulació de β -carotè observada.

Els treballs orientats específicament a incrementar els nivells de licopè i/o β -carotè en fruits s'han abordat a través de la sobreexpressió de les ciclasses sota el control d'un promotor específic de maduració ja siguin del propi tomàquet o d'*Arabidopsis thaliana* (Rosati *et al.*, 2000). En aquests casos els resultats mostraven un increment general del total de carotenoides i una acumulació efectiva de β -carotè de fins a set vegades els presents en un fruit silvestre.

Una alternativa a l'expressió dels gens directament implicats en la síntesi dels compostos d'interès és la millora de l'aport de precursors sintetitzats per la via del MEP. En aquest sentit i considerant el paper clau assignat a DXS en el sistema model d'*Arabidopsis* (Estévez *et al.*, 2001), la sobreexpressió del gen *dxs* bacterià en fruit de tomàquet va repercutir en una major acumulació de licopè i β -carotè (Enfissi *et al.*, 2005). No obstant, l'increment moderat en els nivells observats sembla indicar que l'increment aïllat de precursors compartits per a la síntesi d'altres compostos de naturalesa isoprenoide es pot diluir entre tots ells de manera que la aproximació requeriria d'una canalització cap a la via carotenogènica ja sigui incrementant l'activitat PSY o a través d'alguna estratègia alternativa.

El tomàquet és un fruit climatèric i com a tal presenta una gran susceptibilitat a temperatura i llum. En aquest sentit l'alteració de les vies de transducció de senyals associades a llum es presenta com una alternativa totalment diferent per a la millora dels nivells de carotenoides. Els mutants *hp1* i *hp2* que codifiquen pels homòlegs de DDB1 i DET1 d'*Arabidopsis* (descrits com a implicats en senyalització per llum) mostren nivells incrementats de carotenoides (Lazzeri *et al.*, 2012; Mustilli *et al.*, 1999). En aquesta línia la estratègia més reeixida ha estat la disminució dels nivells de DET1 per tècniques de ARNi utilitzant promotors específics de fruit mostrant uns nivells d'acumulació de licopè i β -carotè dues i deu vegades per sobre dels d'un tomàquet silvestre respectivament (Davuluri *et al.*, 2005). Els valors assolits amb aquest tipus d'aproximacions són molt prometedors tot i que cal tenir en compte que tenen una orientació menys focalitzada i que per tant poden tenir efectes co-laterals no desitjats tal i com demostra el fet que aquests tomàquets presenten paral·lelament acumulació de flavonoides i un perfil metabolòmic amb un ampli ventall de metabolits alterats (Bino *et al.*, 2005). Les diferents aproximacions afrontades durant els últims anys demostren la possibilitat de millora en un aliment tan important com el tomàquet però a l'hora també demostren que no sempre les aproximacions més directes donen el millor rendiment i que la falta d'un coneixement exhaustiu del control de la regulació de les vies endògenes dificulta la previsió de les diverses estratègies testades.

Estratègies similars s'han aplicat també al cultiu de patata per millorar els nivells de diversos carotenoides en els tubercles. La sobreexpressió del gen bacterià *crtB* en dues varietats de patata va donar un increment en la quantitat total de carotenoides i una alteració del perfil de compostos passant de predominar-hi la violaxantina a acumular alts nivells de luteïna (fins a 19 vegades els nivells del tubercle silvestre) i β -carotè (Ducreux *et al.*, 2005). Altres estratègies

també han millorat els nivells de carotenoides a través del silenciament de la LCYE (Diretto *et al.*, 2006) o de les carotè hidroxilases (CHY1 i CHY2) (Diretto *et al.*, 2007) per potenciar l'acumulació de β -carotè (Diretto *et al.*, 2006), o promoure l'acumulació de zeaxantina inhibint l'activitat zeaxantina epoxidasa que converteix el compost en violaxantina (Romer *et al.*, 2002).

L'estratègia de major repercussió mediàtica però també biotecnològica s'ha realitzat en arròs. En aquest cas la estratègia ha permès la síntesi de carotenoides amb especial èmfasis en el β -carotè a l'endosperm (on normalment no s'acumulen aquests compostos) amb l'objectiu d'aportar una eina que ajudi a mitigar el problema nutricional de la deficiència de vitamina A en països en desenvolupament en els que l'arròs es l'element central de la dieta. En l'endosperm d'arròs s'expressen diversos dels gens de la via carotenogènica però no ho fa el primer enzim de la via PSY impedit la síntesi de carotenoides (Schaub *et al.*, 2005). La introducció dels transgens *psy* i *LcyB* de *Narcissus pseudonarcissus*, i *CrtI* bacteriana dirigit a plastidis va permetre completar exitosament la producció de β -carotè (precursor de la vitamina A) produint grans d'arròs de coloració daurada que van donar el nom de Golden rice (Ye *et al.*, 2000). Posteriorment la substitució del gen *psy* inicial pel de blat de moro (*Zea mays*) va permetre millorar la quantitat de β -carotè acumulada des de els inicials 1,6 fins a 37 $\mu\text{g/g}$ de pes sec en el que es coneix com *Golden rice 2*. (Paine *et al.*, 2005) S'estima que calen aproximadament 150 g d'aquest arròs per obtenir l'aport dietètic recomanat de vitamina A. Estudis posteriors han demostrat la eficiència d'aquest organisme modificat genèticament per subministrar el β -carotè necessari en humans (Tang *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2009).

Objectius

L'objectiu general en el que s'emmarca aquest treball de tesi doctoral és el d'explorar i aprofundir en aspectes bàsics i aplicats del metabolisme d'isoprenoides amb especial èmfasi en la via del MEP i la biosíntesi de carotenoids.

Dintre d'aquest marc els objectius plantejats són:

- 1.- Estudi i avaluació d'estratègies que permetin millorar la producció d'isoprenoides d'interès com els carotenoides en *Escherichia coli*.
- 2.-Validació en *Arabidopsis thaliana* dels punts de control identificats en bacteris i estudi de nous mecanismes de regulació específics de plantes.
- 3.- Exploració de la plasticitat metabòlica dels bacteris com a font de noves eines biotecnològiques

1.- Material biològic

A) Material vegetal

***Arabidopsis thaliana* (Heyn) varietat Columbia-3.** Aquesta és la varietat que va ser escollida com a material de partida a l'hora de dur a terme el programa de seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*. Concretament sobre aquesta línia número 3, es van obtenir les dades de mapeig gènic per RFLP (sigles en anglès de Polimorfisme en la Longitud dels Fragments de Restricció) al laboratori del Dr. Elliot Meyerowitz. La seqüència completa del genoma està disponible desde l'any 2000.

***Arabidopsis thaliana* (Heyn) varietat Columbia-0.** Aquesta varietat es un descendent directe de la columbia-1. Correspón a l'ecotip original Columbia el qual va ser seleccionat pel doctor Redei a partir de la població no irradiada Laibach Landsberg. Inicialment es va seleccionar per la vigorositat i elevada fertilitat que presentava així com la seva bona resposta a canvis en el fotoperíode.

B) Soques bacterianes

***Escherichia coli* M15 pRep4.** Genotip: *nalS, strS, rifS, thi-, lac-, ara+, gal+, mtl-, F-, recA+, uvr+, Lon+, pRep4* (Qiagen). Aquesta soca s'associa a vectors d'expressió controlats pel promotor T5, rendeix alts nivells de proteïna a l'hora que permet una acurada regulació gràcies a l'expressió constitutiva del gen *lacI* present en el plàsmid de baixa còpia pRep4 (que confereix a la soca resistència a l'antibiòtic kanamicina).

***Escherichia coli* DH5α.** Genotip: *F- Φ80, lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen). Aquesta soca es va utilitzar com a vehicle de propagació cel·lular rutinari en la totalitat dels passos intermedis realitzats al llarg del procés de clonatge dels diversos gens estudiats. Aquesta és una soca àmpliament utilitzada degut a la seva versatilitat, al dilatat coneixement sobre el seu genotip, i al fet que és capaç de suportar l'escrutini (screening) per coloració Blanca/Blava (basada en la degradació de l'anàleg estructural X-Gal per efecte de l'enzim β-galactosidasa codificat en el vector). Les mutacions sobre els gens endògens *recA1* i *endA1* limiten la seva funció de recombinació d'ADN i activitat endonucleasa inespecífica respectivament. Aquest fet incrementa molt l'estabilitat dels inserts que es vol amplificar.

***Escherichia coli* TOP10.** Genotip: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*. Aquesta soca es va utilitzar indistintament amb l'anterior per a la propagació de vectors i tota la sèrie de passos associats a les tècniques d'ADN recombinant per a la generació de construccions en base a la tecnologia dels enzims de restricció. En aquest cas també es tracta d'una soca optimitzada per a minimitzar els fenòmens de recombinació i degradació d'àcids nucleics reconeguts com exògens naturals que podrien afectar a les construccions incorporades, i amb capacitat de suportar l'escrutini per coloració Blanca/Blava. A diferència del cas anterior per dur a terme la selecció per coloració no és necessària l'addició de l'agent inductor (IPTG) per a induir expressió a partir del promotor *lac*.

***Escherichia coli* BL21(DE3).** Genotip: *F- ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm* (DE3). (Invitrogen). Aquesta soca també s'associa a vectors d'expressió però en aquest cas els que són controlats pel promotor T7. Aquest és un promotor fort que en condicions d'inducció dona elevats nivells d'expressió tot i que només ho fa en resposta a l'acció de l'ARN polimerasa de T7 i no de l'ARN polimerasa d'*E. coli*. És per aquest motiu que la soca BL21 integrada en el seu genoma el gen que codifica per la polimerasa del fag T7. Un segon element que fa molt adequada aquesta soca per la sobreexpressió de proteïnes recombinants, i que també és el resultat d'una manipulació genètica estabilitzada del seu genoma, és el fet que moltes de les proteases endògenes del microorganisme han estat deshabitades de manera que es redueix significativament la degradació de la proteïna recombinant durant el procés de purificació.

***Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS.** Genotip: *F- ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm* (DE3) pLysS (Invitrogen). Les condicions d'aquesta soca són idèntiques a les de l'anterior tant pel que fa a l'absència d'un gran nombre de proteases, com al sistema d'inducció basat en la combinació del promotor i l'ARN polimerasa del fag T7 però introdueix un plàsmid que li dona resistència a cloramfenicol i que codifica per la proteïna lisozim de T7 la qual és inhibidora de l'acció de la T7 ARN polimerasa. Amb aquest sistema suplementari s'aconsegueix reduir al mínim l'efecte de l'expressió basal de la polimerasa. La utilització de la soca complementada amb el plàsmid pLysS s'associa a proteïnes recombinants que resulten tòxiques per la cèl·lula hoste de manera que resultés molt important de cara al rendiment final aconseguir un pols d'inducció de res/tot molt acotat en el temps.

***Escherichia coli* BL21(DE3)pT-groE.** Genotip: *F- ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm* (DE3) pT-groE (Invitrogen). Les condicions d'aquesta soca són idèntiques a les de l'anterior però conté un plàsmid amb resistència a cloramfenicol que incorpora la seqüència codificant per dues proteïnes, groES (60 KDa) i groEL (10 KDa), del propi *E.coli* que són expressades sota el control del promotor T7 (Yasukawa *et al.*, 1995). Aquestes dues proteïnes formen el complex GroESL el qual catalitza el correcte plegament de les proteïnes sintetitzades *de novo*

***Escherichia coli* EcAB4-10 (MG1655 *dxr::CAT*, Operó MVA+)** (Sauret-Güeto *et al.*, 2006) El fons genètic de la soca resultant es correspon amb el de la soca MG1655 (Jensen, 1993) la qual deriva directament de la soca salvatge K-12. Únicament presenta dues variacions en el seu genotip obtingudes a partir de l'estudi de les cèl·lules K-12 mutagenitzades per efecte de la llum UV: *F-*, i λ^- . A partir d'aquesta soca inicial i mitjançant enginyeria genètica, es va disruptar el seu gen *dxr* endogen (mutació letal) mitjançant l'incorporació d'un gen de resistència a cloramfenicol. En segon lloc se li va incorporar de forma estable en el seu cromosoma l'operó mevalonat, que inclou els gens *yPMD* (5-difosfomevalonat descarboxilasa de llevat), *hPMK* (5-fosfomevalonat quinasa humana), *yMVK* (mevalonat quinasa de llevat), i *ecIDI* (isopentenil difosfat isomerasa d'*E. coli*). Aquest operó li permet sintetitzar IPP i DMAPP a partir del mevalonat suplementat al medi de cultiu.

***Escherichia coli* EcAB4-2 (MG1655 *dxs::CAT*, Operó MVA+)** (Sauret-Güeto *et al.*, 2006) En aquest cas ens trobem en un cas similar a l'anterior, amb el fons genètic de la soca MG1655 i la incorporació de forma estable en el seu cromosoma de l'operó mevalonat però amb la inhabilitació del gen *dxs* endogen que com en el cas anterior impossibilita la síntesi de IPP i DMAPP.

***Escherichia coli* EcAB4-7 (MG1655 *ygbP::CAT*, Operó MVA+)** (Sauret-Güeto *et al.*, 2006). Un altre cas de soca MG1655 amb l'operó mevalonat i la inhabilitació de la síntesi de IPP i DMAPP. en aquest cas per la disrupció del gen *ygbP*.

***Escherichia coli* EcAM5-1 (BL21(DE3), Operó MVA+)** (Rodríguez-Villalon *et al.*, 2008). Aquesta soca és el resultat d'introduir l'operó sintètic MVA+ procedent de la soca EcAB4-1 en la soca BL21(DE3) per transducció mediada pel fag P1. Per tant les seves característiques i fons genètic són idèntics als descrits prèviament per la soca BL21(DE3) amb la inclusió de la capacitat de sintetitzar IPP a partir de mevalonat administrat exògenament al medi de cultiu.

***Escherichia coli* EcAB1-6 (MC4100 *dxs::CAT*, *dxr::TET*, pAB-M3)** (Perez-Gil *et al.*, 2012) En aquest cas el fons genètic de la soca és el MC4100 (*F- araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 deoC1 rbsR fthD5301 fruA25 λ-*). En aquesta soca, per recombinació homòloga, s'han disruptat els gens *dxs* i *dxr* amb gens que confereixen resistència a cloramfenicol i tetraciclina, respectivament. La incorporació del plasmidi pAB-M3, amb l'operó MVA+ permet el creixement d'aquestes cèl·lules en medi suplementat amb ampicilina i mevalonat.

***Agrobacterium tumefaciens* C58C1-pGV2260 (pTiB6S3_T-DNA):** (Hellens *et al.*, 2000) Soca utilitzada inicialment per a la transformació de plantes en base al mètode de la immersió floral. En aquesta soca s'ha desarmat la seva capacitat de generar tumors en la planta hoste mantenint però, la capacitat de transferir fragments de T-DNA al genoma de la planta. El genoma incorpora un gen marcador en el seu propi genoma associat a resistència al antibiòtic rifampicina. Incorpora el plasmidi Ti (inductor de tumors) pGV2260 que li confereix resistència a ampicilina.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101- pMP90 (pTiC58_T-DNA): (Hellens et al., 2000)** Soca derivada de l'anterior però amb el vector pTi: pMP90, el qual confereix resistència a gentamicina.

2.- Medis de cultiu de bacteris.

Els medis de cultiu s'han preparat en aigua destil·lada, i van ser autoclavats 20 min a 121° C per aconseguir la seva esterilitat. Els antibiòtics, inhibidors o complements metabòlics requerits per cada ocasió s'afegien a posteriori un cop s'havien temperat les solucions a aproximadament 50° C. Aquests mateixos medis es van utilitzar per treballar amb cultiu sòlid en placa de Petri, afegint-hi agar bacteriològic al 1,5% (p/v) abans d'autoclavar.

Com a primera opció pel creixement d'*E. coli* s'ha utilitzat el medi LB. El 2xTY (més ric), es va utilitzar alternativament en aquells casos en que es requeria un creixement més ràpid o la soca bacteriana presentava més dificultats de les normals per assolir un creixement adequat. El medi SOC s'ha utilitzat exclusivament pel creixement de cèl·lules competents en la fase immediatament posterior al tractament tèrmic o l'electroporació per incrementar al màxim el percentatge de cèl·lules capaces de recuperar-se del tractament físico-químic. Pel creixement de *A. tumefaciens* s'ha utilitzat típicament el medi YEB tot i que també creix adequadament, però a un ritme menor, en medi LB.

2.1. -Composició dels Medis de Cultiu

MEDI LB (1L)	Medi 2xTY (1L)
Tryptona 10 g	Tryptona 16 g
Extracte de Llevat 5 g	Extracte de llevat 10 g
NaCl 10 g	NaCl 5 g
MEDI SOC (1L)	Medi YEB (1L)
Tryptona 20 g	Extracte de llevat 1g
Extracte de Llevat 5 g	Peptona 5g
NaCl 0,5 g	Extracte de vedella 5g
KCl 2,5 ml (Solució 1M)	Sacarosa 5g
	Sulfat de magnesi 0,48g

Taula 9. Composició dels medis utilitzats pel creixement de bacteris.

Com a norma general, i per arribar a la fase de creixement estacionari, es van seguir les condicions de cultiu indicades:

	Medi Sòlid	Medi Líquid
<i>E. coli</i>	37°C (18h)	37° C tota nit en agitació (250 r.p.m.)
<i>A. tumefaciens</i>	28°C (48h)	28° C tota nit en agitació (180 r.p.m.)

Taula 10. Condicions de creixement habituals per cultius bacterians.

3.-Medi de cultiu de plantes

El medi de germinació i creixement en placa es va preparar amb aigua bidestilada-desionitzada (MilliQ) autoclavant la solució a 121°C durant 20 minuts i atemperant el medi a 55°C abans de suplementar-lo amb antibiòtics, inhibidors o herbicides quan era requerit.

Rutinàriament la composició del medi utilitzat va ser el denominat MS 0,5X-, que es correspon a la meitat de la concentració del medi canònic (MS) i sense sacarosa i vitamines complementaries. Per cultiu sòlid en placa de Petri es va afegir agar (fitoagar) al 0,8% (p/v) abans d'autoclavar.

Medi MS 0,5x- (1L)
Murashige & Skoog 4,4g (Basal Mixture Salts)
MES 0,5g
Ajustar a pH 5,7 amb KOH 1M

Taula 11. Composició bàsica dels medis de creixement de plantes en sistemes *in vitro*.

Relació de suplementes utilitzats en els medis de cultiu:

-Fosmidomicina: àcid (3-N-formil-N-hidroxi-amino)propilfosfat (Sigma). Inhibidor específic de l'enzim DXR (desoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa). Es prepara una solució mare 100 mM en aigua que s'esterilitza utilitzant filtres de mida de porus 0,2 µm. Va ser aïllat inicialment de la bacteria *Streptomyces lavendulae* que el produïa naturalment amb efecte antibiòtic.

-Clomazona: 2-(2-clorobencil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona (Sigma). Inhibidor específic de l'enzim DXS (deoxixilulosa 5-fosfato sintasa). Diversos estudis apunten que el compost realment actiu contra aquest enzim es un producte de degradació d'aquesta substància, la 5-cetoclomazona o 5-oxoclomazona. Es prepara una solució mare 50 mM en metanol al 50% que s'esterilitza amb filtres de 0,2 µm.

-Mevalonat: Intermediari de la via MVA per a la síntesi d'isoprenoides. Es prepara a partir de mevalolactona (Sigma) per hidròlisi alcalina incubant 1 volum de solució 1M en aigua amb 1,05 volums de KOH 1M a 37°C durant 30 minuts. La solució resultant presenta típicament un pH pròxim a 7,5.

-Mevinolina: Inhibidor específic de l'enzim HMGR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase). També anomenat lovastatina (Sigma). Aquest compost va ser aïllat inicialment a partir de cultius del fong *Aspergillus terreus*. Es prepara a una concentració 10 mM en metanol al 50% i s'esterilitza per filtració.

-2-C-Metil-D-eritritol: És un polialcohol metilat en el C2 que fosforilat dona lloc al metileritritol 4-fosfat, el primer intermediari específic de la via del MEP. Per tant es pot incorporar a la via de síntesi d'isoprenoides.

-1-Desoxi-D-xilulosa: És un monosacàrid de 5 àtoms de carboni que fosforilat forma la desoxixilulosa 5-fosfat, la qual es pot incorporar a la via del MEP per a la síntesi d'isopentenil difosfat i per tant d'isoprenoides. Tant en *E.coli* (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001) com en *Arabidopsis thaliana* (Hemmerlin *et al.*, 2006) s'han descrit enzims capaços de fosforilar aquesta molècula permetent completar així l'assimilació d'aquesta molècula quan es subministra com a complement en el medi de creixement.

4.- Vectors Plasmídics

pBluescript (Fermentas). Família de vectors de 2961 pb d'alta còpia que confereix resistència a ampicilina i que té la regió del multi cloning site (MCS) en mig de la pauta de lectura del gen *lacZ*. Aquest gen codifica per l'enzim β -galactosidasa el qual és capaç de generar coloració blava de les colònies en presència de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D-galactopiranosida (X-gal). La coloració de les colònies permet un escrutini ràpid a l'hora d'introduir un insert dins del plàsmid tot i que el sistema no té una fiabilitat del 100% i pot ser necessari confirmar el resultat per altres mètodes. Aquest vector ha estat utilitzat rutinàriament en el clonatge sempre com a element auxiliar pels passos intermedis del procés. Típicament la introducció de productes generats per PCR a través del sistema de lligació-restricció.

pQE-3x (Qiagen). Inclou una sèrie de tres vectors d'expressió, pQE-30/31/32, que comprenen les tres possibles pautes de lectura, de 3461 3462 i 3463 pb, respectivament. És un plàsmid d'alta còpia (amb origen de replicació COIE1) que aporta resistència a ampicilina, i que és controlat en la cèl·lula hoste per la combinació d'un operó *lacI* i un promotor fort T5 que és reconegut per l'ARN polimerasa de *E.coli*. La característica principal d'aquests vectors cal buscar-la en el fet que introdueixen en el extrem N-terminal de la proteïna recombinant, un fragment extra de sis histidines que posteriorment facilitarà el procés de purificació posterior. A més de la cua d'histidines, el plàsmid inclou tres codons previs que codifiquen pels aminoàcids RGS, i que en conjunt formen l'epítop RGS-His. Aquest epítop ens proporciona un sistema de detecció de la proteïna d'elevada sensibilitat a través de l'ús d'un anticòs específic i la tècnica de Western-blot

pCRII (Invitrogen). És un plàsmid de 3971 pb que confereix resistència a ampicilina i/o kanamicina que està dissenyat per facilitar al màxim la introducció de fragments amplificats per PCR utilitzant ADN polimerases termòfiles que afegeixen un nucleòtid A (adenosina) terminal (com és el cas de la *Taq* polimerasa). A diferència de la majoria dels plàsmids, es suministra linealitzat, i se li han afegit en els dos extrems 3', un nucleòtid T (timidina) que és complementari de la A de l'insert amplificat. Com en el cas del pBluescript, el MCS i les T estan inserides en mig de la pauta de lectura del gen *lacZ* permetent també en aquest cas el posterior escrutini de colònies per coloració Blau/Blanc

pET-23a-d (+) (Novagen). Comprèn una sèrie de quatre vectors d'expressió, pET-23 a/b/c/d, que inclouen les tres possibles pautes de lectura (a-c), amb dues dianes de restricció alternatives en 5' (d). El mida del conjunt oscil·la entre 3663 i 3666 pb. És un plàsmid d'alta còpia (amb origen de replicació pBR322) que aporta resistència a ampicilina, i que és controlat en la cèl·lula hoste per la combinació d'un operó *lacO* i un promotor fort T7 que és reconegut per l'ARN polimerasa del fag T7. Les característiques del plàsmid permeten modificar la proteïna recombinant introduint una cua de T7 (que es pot obviar utilitzant les dianes de restricció adequades) en la regió N-terminal, i/o una cua de 6 histidines en la regió C-terminal que, posteriorment, facilitaran el procés de purificació.

pGFPuv (Clontech). És un vector de 3300 pb d'alta còpia que confereix resistència a ampicilina i que té la regió del multi cloning site (MCS) en mig de la pauta de lectura del gen GFPuv. Aquest gen codifica per la variant de la proteïna GFP (Green Fluorescent Protein) descrita per Crameri et al (Crameri et al., 1996) la qual genera colònies que es veuen de color verd quan s'irradien amb llum UV. La coloració de les colònies permet un escrutini ràpid a l'hora de discernir entre aquelles que tenen el plàsmid que ha incorporat l'insert (blanques perquè s'ha disruptat la seqüència del gen GFPuv) i les que tenen el plàsmid buit.

pPZP3425: És un vector binari modificat a partir de la sèrie pPZP100 per optimitzar-ne l'ús en transformació d'*Arabidopsis thaliana* a través d'*Agrobacterium tumefaciens*. Inclou les dues seqüències que delimiten la regió d'integració estable en el genoma de l'hoste: RB i LB. Dintre d'aquesta regió inclou un gen reporter GUS sota el control del promotor 35S i el terminador *nos*. També inclou un gen de selecció en planta per resistència a kanamicina sota el control del promotor feble *nos*. Fora de la regió d'integració incorpora una doble resistència a kanamicina i cloramfenicol per a la seva selecció en bacteris.

pCAMBIA-1302/03/04: Sèrie de vectors binaris per a la transformació estable de diverses espècies vegetals com *Arabidopsis*, tabac, tomàquet o arròs l'estructura dels quals deriva dels vectors pPZP. Inclou les dues seqüències de recombinació, RB i LB, per a la integració estable de tots els elements compresos entre aquestes dues seqüències, el gen *hptII* que confereix resistència a higromicina per a la selecció en planta sota el control del promotor fort 35S, un segon promotor 35S que dirigeix l'expressió del transgen d'interès, i un terminador *nos*. A banda i banda del segon dels promotors 35S esmentats es disposa d'un ampli ventall de dianes de restricció que permeten la seva substitució per una seqüència alternativa. A l'hora, la presència de diferents gens reporters permet realitzar estudis de patrons d'expressió espai-temporals de regions promotores. Aquesta sèrie de vectors utilitza dos gens reporters, la fluorescència de la proteïna GFP provinent del gen *mgfp5** d' *Aequoria victoria*, o la tinció en base a l'activitat β -glucoronidasa generada a partir del gen *gusA* d' *E.coli* (N358Q per eliminar un punt de glicosilació). Concretament el vector 1302 incorpora únicament *mgfp5** mentre els 1303 i 1304 incorporen les fusions 5'-*gusA-mgfp5*-3'* i 5'-*mgfp5*-gusA-3'* respectivament. En les regions flanquejants als gens reporters diverses dianes de restricció permeten la seva substitució per qualsevol altre gen. Fora de la regió delimitada per les dues seqüències d'integració genòmica els plasmidis inclouen un origen de replicació fort provinent del vector pBR322 que el converteixen en un vector d'alta copia quan es treballa amb bacteris. Per aquest tipus de treball també incorpora el gen *nptII* que permet la seva selecció en base a la resistència a kanamicina.

pDONOR207: (Invitrogen). Vector intermediari del sistema Gateway[®] de 5585 parells de bases que es selecciona en base al gen de resistència a gentamicina que incorpora. És un vector molt senzill que inclou els elements mínims per a la seva funció de receptor de fragments d'ADN que incorporin les seqüències de recombinació *attB1* i *attB2*. Per fer-ho, incorpora les seqüències de recombinació complementaries *attP1* i *attP2* flanquejant a un doble sistema de selecció format per un gen de resistència a cloramfenicol i el gen de letalitat *ccdB*. Aquests dos elements són substituïts pel gen d'interès quan el procés de recombinació es realitza exitosament permetent optimitzar al màxim la posterior cerca de clons ja que els vectors que no incorporen el gen d'interès tot i tenir resistència a gentamicina no produeixen colònies ja que les cèl·lules que l'incorporen no proliferen degut a l'efecte letal del gen *ccdB*.

pH9: És un vector d'expressió adaptat al sistema Gateway[®] a partir de l'esquelet del vector pET28 (Novagen) segons les instruccions detallades en el manual Gateway[®] Technology subministrat per la casa comercial Invitrogen. Aquest vector inclou un promotor, un inici de transcripció i un terminador de tipus T7 induïble per IPTG. Afegeix una cua de 9 histidines en l'extrem N-terminal i ho fa en una única pauta de lectura possible ajustada al procés de recombinació. Aquesta és possible com a resultat de la substitució del MCS original del vector pET28 per un cassette que inclou les dues regions de recombinació *attR1* i *attR2* flanquejant els gens de resistència a cloramfenicol i de letalitat *ccdB*. Com en el vector original incorpora el gen *nptII* que confereix resistència a kanamicina en bacteris.

5.- Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La tècnica de la PCR ha estat tota una revolució en la Biologia Molecular per la seva gran potència, especificitat, i versatilitat per adaptar-se a infinitat d'aplicacions. Originàriament la tècnica aprofitava l'ús d'una polimerasa de gran resistència a la temperatura, obtinguda a partir d'un organisme termòfil, per generar una sèrie de cicles consecutius de separació de les hebres d'ADN, unió específica d'oligonucleòtids, i replicació de la cadena motllo per acció de la ADN polimerasa termòfila. Actualment aquesta estructura bàsica es manté però s'ha perfeccionat la tècnica amb aparells que faciliten l'execució experimental, i s'han millorat els components que intervenen en el procés per arribar a nivells d'eficiència molt alts.

La tècnica de la PCR ha estat utilitzada en varies aplicacions al llarg d'aquest treball, principalment per l'amplificació de gens, l'escrutini de colònies, o la seqüenciació. Cada una d'elles persegueix una finalitat concreta, la qual cosa genera variacions en cada cas que es descriuen breument a continuació:

Materials comuns a totes les reaccions d'amplificació:

- Termociclador
- ADN polimerasa termoestable comercial i el seu tampó de reacció corresponent.
- Mescla de dNTPs 10 mM total (2,5mM de cada).
- Tubs de paret fina de 0.2 o 0.5 ml.
- Oligonucleòtids comercials a 5 - 10 µM (Sigma-Genosys i IDT)

En el mercat existeixen diverses ADN polimerases totes elles funcionals però amb diferents característiques que les fan més o menys adients per cada una de les aplicacions:

	Tª Extensió	Velocitat replicació	Fidelitat
<i>Taq</i> (*)	72º C	1min/Kb	Baixa
<i>Pfu</i>	68º C	2 min/Kb	Alta
<i>Taq DNA hf</i> (**)	68º C	1 min/Kb	Alta

Taula 12. *Característiques generals de les diverses ADN polimerases utilitzades durant el transcurs d'aquest treball. Totes elles es troben disponibles en els catàlegs de diverses cases comercials. En tots els casos es tracta de proteïnes recombinants obtingudes de diferents microorganismes: Taq de Thermus aquaticus, i Pfu de Piroccoccus furiosus, mentre que la Taq DNA hf es una barreja de polimerases.*

Un dels punts clau a l'hora de triar la polimerasa, és tenir molt clar l'ús que es vol fer del producte amplificat. Així quan l'objectiu és clonar un gen a partir d'un ADN motllo ja sigui un genòmic o un ADNc, ens interessa que totes les molècules generades a partir d'ell tinguin idèntica seqüència sense el menor canvi. En aquest cas serà important utilitzar una polimerasa d'elevada fidelitat, com la *Pfu* o la *Taq DNA hf*. Per contra, per observar l'aparició o no d'una banda d'amplificació, o per diferenciar el resultat en funció de la mida d'aquesta, com seria el cas de l'escrutini de colònies, no és tant important mantenir la seqüència de la banda analitzada com el fet d'assegurar que la tècnica funciona, de manera que s'utilitzen condicions més relaxades. Es tria una polimerasa que sigui més ràpida i fiable, típicament la *Taq*, encara que la seva fidelitat de replicació sigui menor.

(*) La *Taq DNA* polimerasa es va utilitzar tan com a enzim purificat (Gene Craft) o com a part de la mescla comercial GoTaq Green Mix (Promega) on l'enzim és subministrat juntament amb el tampó de reacció, els nucleòtids fosfat, el magnesi i el tampó de càrrega de manera que per dur a terme la reacció d'amplificació únicament cal incorporar el DNA motllo, el encebadors específics i el volum d'aigua necessari per aconseguir la concentració òptima de treball de cada un dels elements.

(**) La *Taq DNA* polimerasa hf (hifh fidelity) de fet es una barreja d'enzims composta per *Taq DNA* polimerasa i Polimerasa de la soca GB-D de *Pyrococcus*. La primera aporta una elevada

capacitat processiva mentre que la segona millora la fidelitat de copia gracies a la seva activitat 3' -> 5' exonucleasa. Aquest sistema comercial (Invitrogen) inclou també, en la mescla, l'anticos Platinium que es complexa amb la polimerasa inhibint l'activitat d'aquesta a temperatura ambient. L'activitat es recupera després del pas inicial de desnaturalització a 94°C durant la termociclació millorant així l'eficiència i especificitat de la reacció.

A l'hora de dissenyar els oligonucleòtids cal tenir en compte tota una sèrie de factors que poden marcar el seu funcionament correcte:

- la mida estàndard d'un oligonucleòtid, oscil·la entre els 20 i 35 nucleòtids en funció de si és totalment complementari o si introdueix regions extra no homòlogues com dianes de restricció.
- Si introdueix una diana anàloga a la del plasmidi de destinació en els extrems d'un insert en el oligonucleòtid, cal comprovar prèviament que aquesta diana no es troba dins de la regió codificant del nostre gen.
- En aquest cas és important que, com a mínim, dues terceres parts del primer siguin totalment complementàries.
- Finalment, si s'introdueix una diana de restricció, serà important també afegir un parell o tres de nucleòtids addicionals per tal de protegir-la de la possible activitat exo-nucleasa d'algunes ADN polimerases que podrien tallar l'extrem de la seqüència.
- La composició ha de tendir a igualar les proporcions de G/C vs A/T.
- Dels últims 5 nucleòtids en l'extrem 3' és recomanable que almenys tres siguin G o C i que la darrera posició no la ocupi una A o T, ja que la seva unió al parell complementari és més feble i desafavoreix així l'acció inicial de la polimerasa.
- S'ha de procurar que les T_m dels dos oligonucleòtids siguin suficientment pròximes
- Per últim, hem d'estar segurs que no anellen entre ells ni poden formar estructures secundàries que els inhabilitin.

La T_m és una propietat específica de cada oligonucleòtid, que es refereix a la temperatura a la qual la meitat de les molècules d'ADN motllo-primer bicatenàries es troben desnaturalitzades. Dit en altres paraules, es tracta de la temperatura a la qual la meitat de les molècules de primer introduïdes, estan unides a la seva seqüència complementària del motllo. Com a regla general s'utilitza una temperatura d'anellat de 5-10 °C inferior a la T_m més baixa del parell d'oligonucleòtids dissenyats.

Per a oligonucleòtids de longitud menor a 24 nucleòtids, el càlcul s'ha fet considerant la fórmula:

$$T_m = [4 \times (N^\circ \text{ de C} + \text{G})] + [2 \times (N^\circ \text{ de A} + \text{T})]$$

En el cas de primers de longituds superiors, i sobretot per aquelles amb regions no complementàries, la fórmula aplicada va ser:

$$T_m = [81,5 + (0,41 \times \%GC) - (675/n) - ((m/n) \times 100)]^\circ\text{C}$$

on %GC representa el percentatge de bases G o C en la composició final, n es la longitud de l'oligonucleòtid, i m és el nombre de bases que no tenen complementari en l'ADN motllo.

6.- Tècniques basades en l'ús d'ADN polimerases termoestables.

6.1- Clonatge de gens

Una de les aplicacions més interessants de la tècnica de la PCR, és la de recuperar fragments d'ADN a partir de diversos motllos. En aquest treball, totes les amplificacions s'han fet sobre l'ADN de microorganismes, que no tenen introns en la seqüència dels seus gens, de manera que resulta directe el clonatge d'aquest fragment codificant. Les condicions utilitzades en el cas d'utilitzar com a motllo l'ADN genòmic del microorganisme o el gen prèviament inserit en un plàsmid portador, es detallen a continuació:

Producte	[] inicial	[] final	Volum
Tampó reacció	10x	1x	3 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1 µl
dNTPs	2.5 mM (cada)	200 µM	2.4 µl
PrimerF	10 µM	0.5 µM	1.5 µl
PrimerR	10 µM	0.5 µM	1.5 µl
<i>Pfu</i> (Biotools)	1U/µl	1U	1 µl
DNA genòmic	25 ng/µl	10 ng	0.4 µl
Aigua destil·lada estèril	-	-	19,2 µl
			30 µl

Taula 13. Composició estàndard de la mescla de reacció utilitzada pel clonatge de gens a partir d'ADN genòmic.

Programes de PCR ("Hot Start")			
Per motllo de ADN genòmic		Per motllo Plasmídic	
Desnaturalització	94°C (4 min)	Desnaturalització	94°C (1 min)
Desnaturalització	94°C (40 s)	Desnaturalització	94°C (40 s)
Anellat	T _m °C (45 s)	Anellat	T _m °C (45 s)
Extensió	68°C	Extensió	68°C
	(2 min/Kb)		(2 min/Kb)
Repetir 30 cicles		Repetir 30 cicles	

Taula 14. Programa de cicles general, utilitzat per una PCR de clonatge. El nombre de cicles en que es repeteixen els passos de desnaturalització, anellat i extensió no hauria de ser superior perquè és el nombre màxim de cicles que estadísticament ens asseguren un clonatge 100% fidel tenint en compte les taxes d'error de les polimerases *Pfu* o *Pfx*.

La tècnica de Hot Start consisteix en afegir l'enzim ADN polimerasa en el moment en el que el termociclador ha assolit la temperatura de desnaturalització, reduint així la generació de productes inespecífics resultat de la hibridació dels encebadors a motllos no homòlegs que es pot donar a baixes temperatures durant el gradient d'escalfat inicial. Algunes de les polimerases comercials disponibles al mercat actualment estan unides a anticossos que aturen la seva activitat i s'alliberen amb la temperatura. Amb aquesta tecnologia s'aconsegueix simular l'efecte "Hot Star" de manera automàtica.

6.2.-Escrutini de colònies

Com s'havia apuntat, la tècnica de la PCR també pot utilitzar-se per determinar la presència d'un insert directament sobre la colònia bacteriana resultant de la transformació d'una determinada construcció. En aquest cas n'hi ha prou amb afegir com a motllo per a la reacció, una punta de pipeta posada en contacte amb la colònia a analitzar. El fet de treballar amb cèl·lules senceres comporta que l'ADN es trobi aïllat, així que cal assegurar de que es trenquen les cèl·lules per alliberar el motllo abans d'iniciar tots els cicles. Això s'aconsegueix allargant el primer pas de desnaturalització a 94°C durant 6-8 min.

Per a l'anàlisi de colònies es poden fer servir dues estratègies segons els oligonucleòtids que utilitzem: A) O bé dos primers del plàsmid que flanquegin el lloc de clonació de l'insert de manera que si hi ha insert s'amplificarà una banda de la mida correcte independentment de la orientació d'aquest, o B) podem utilitzar un oligonucleòtid del plàsmid i un de l'insert, de forma que la presència de banda ens aporta una doble informació ja que només es podrà donar l'extensió si hi ha insert, i si aquest es troba en la orientació adequada.

La primera opció té l'avantatge de que cada una de les mostres actua com control positiu, ja que si no hi ha insert, es detecta una banda petita però molt clara que ens informa que la PCR ha funcionat correctament. S'ha aplicat al escrutini de colònies transformades de lligació-restricció on la orientació no resulta rellevant.

En el segon cas la informació és major, però té l'inconvenient de que si no apareix banda es genera el dubte de si falla la construcció o la tècnica de manera que requereix de la disponibilitat d'un bon control positiu que sigui representatiu de la nostra construcció. S'ha aplicat a l'escrutini de les colònies en que s'havia introduït l'insert en el plàsmid d'expressió final.

Mescla de Reacció			Programa PCR	
Producte	Mix (25x)	[] final	Passos	Condicions
Tampó	30 µl	1x	Desnaturalització	94°C (8 min)
MgCl ₂	9 µl	1,5 mM	Desnaturalització	94°C (40 s)
dNTPs	24 µl	200 µM	Anellat	T _m °C (45 s)
PrimerF	15 µl	0.5 µM	Extensió	72°C (2 min/Kb)
PrimerR	15 µl	0.5 µM	Repetir 33 cicles	
Taq (5U/ µl)	4 µl	1U	Extensió final	72°C (5 min)
ADN	-	1 colònia		
Aigua estèril	203 µl	-		
	300 µl			

Taula 15. Composició de la mescla de reacció per a PCR de colònia. Es detallen les concentracions finals i els volums necessaris per preparar l'anàlisi de 22 colònies, i 1 control negatiu al qual no se li posa colònia o si es disposa d'ella una colònia que inclogui el plàsmid buit. Es treballa per un nombre de mostres superior al real per compensar l'error associat a pipetejar un volum moltes vegades. Es fa servir una polimerasa de menor fidelitat però molt processiva com és la Taq, i amb un nombre de cicles més elevat per afavorir l'amplificació del fragment respecte la correcta amplificació de la seva seqüència.

7.-RT-PCR

Aquesta tècnica, combina la capacitat de l'enzim transcriptasa reversa (RT) per sintetitzar cadenes d'ADN a partir de motllos d'ARN, amb la facultat de la PCR d'amplificar seqüències nucleotídiques específiques. Una de les aplicacions més obvies és la de generar productes amb la seqüència de l'ADNc, d'organismes superiors com les plantes pel seu posterior clonatge.

Aquesta tècnica es va utilitzar per obtenir la seqüència codificant del gen *LcyE* d'*Arabidopsis thaliana* pel seu posterior clonatge i expressió en un sistema heteròleg d'*E.coli*. Com que aquest microorganisme no té la capacitat de madurar els ARNs que contenen introns i exons (com sí és el cas de la maquinària cel·lular de les plantes), per aconseguir una correcta expressió de la proteïna en un sistema bacterià cal suministrar-li exclusivament la regió codificant del gen, és a dir eliminar els introns. La manera de fer-ho, és a partir del teixit de planta, recuperar l'ARNm que ja està madurat, per retrotranscriure'l al codi d'ADN i obtenir així l'ADNc que sí es podrà utilitzar pel clonatge.

A grans trets el procés consta dels següents passos:

1.- Obtenció d'un conjunt d'ARN's a partir del teixit de la planta. S'utilitza un kit comercial per fer-ho, però és un pas delicat degut a la gran facilitat de degradació d'aquest tipus de macromolècules.

2.- A partir del conjunt de ARNs, es retrotranscriuen tots els ARNm aprofitant que tots ells inclouen en 3' una cua de poli-A, que ens permet utilitzar com a oligonucleòtid universal,

l'anomenat oligo dT que complementa amb la cua dels ARNm, i permet l'acció de la transcriptasa reversa, que en actuar, ens acaba generant una solució amb un conjunt de tots els ADNc possibles. "RETROscript" (Ambion)

3.- A partir d'aquest pool d'ADNc, i aprofitant la potència de la PCR, s'amplifica selectivament a través dels encebadors adequats, exclusivament la regió codificant del nostre gen. A partir d'aquí es pot iniciar el procés normal de clonatge seguint les pautes habituals.

Una vegada obtinguts els ADNc's per retrotranscripció, l'amplificació específica es va aconseguir amb les condicions següents:

Component	Volum
cDNA's	4 µL
Tampó 10x	5 µL
dNTP (10 mM total)	2,5 µL
(F) (10 µM)	1,5 µL
(R) (10 µM)	1,5 µL
<i>Pfu</i> (Biotools) 1U/µL	2 µL
Aigua	up to 50

Taula 16 Composició de la mescla de reacció utilitzada per amplificar específicament l'ADNc d'entre tot el pool d'ADNc's generats per retrotranscripció. Utilitzem una polimerasa d'elevada fidelitat.

8.- Sistema de Lligació-Restricció

La idea d'aquest pas intermedi de clonatge és la de introduir en un suport Plasmídic, un gen amplificat per la tècnica de la PCR al qual se li han afegit a través dels oligonucleòtids unes dianes de restricció concretes en els extrems 5' i 3'. El motiu pel qual es recorre a aquest pas afegit, cal buscar-lo en el fet que quan amplifiquem el gen amb les noves dianes introduïdes, aquestes queden molt properes als extrems de la seqüència i això resulta un impediment a vegades insalvable a l'hora de tallar les dianes amb els enzims de restricció que no disposen d'un suport físic per dur a terme la seva activitat. Per això si l'insert s'introdueix en un plàsmid aconseguim millorar en dos aspectes: Per una banda estem afavorint el tall dels enzims en proporcionar un suport físic d'ADN on assentar-se, i per l'altra podem estar segurs que les restriccions han funcionat o no segons si s'allibera el fragment d'insert o no (i, per tant, els extrems seran els idonis per la posterior lligació) quan es faci l'anàlisi del resultat, per electroforesi en gel d'agarosa.

La idea general consisteix en:

1. Introduir el gen en un plàsmid, típicament el pBluescript SK+ sense importar la orientació en la que ho fa, de manera que es fan servir extrems roms per facilitar-ho al màxim.
2. Seleccionar les construccions que han incorporat l'insert
3. Amplificar la construcció i recuperar-ne el plàsmid per tallar-lo en cohesiu per les dianes introduïdes en la PCR.
4. Recuperar l'insert tallat amb els extrems correctes

Per aconseguir introduir l'insert en el plàsmid utilitzem la diana de restricció *Sma*I (tot i que si també es troba en el nostre fragment es pot canviar per altres com *Hinc*II o *Eco*R5), que genera extrems roms i que té la peculiaritat de que la temperatura òptima d'acció de l'enzim que la talla és de 30° C enlloc dels 37° C de la majoria d'enzims de restricció. Aquesta característica té una certa rellevància perquè la incubació de l'insert i el plàsmid amb l'enzim de restricció, es du a terme en presència d'una lligasa que té una temperatura òptima d'actuació de 16° C, de manera que la incubació es fa tota la nit a 25° C com a temperatura de compromís perquè els dos enzims siguin suficientment actius. Així en la mescla tenim un plàsmid que és tallat per la diana *Sma*I (Fermentas), i que pot ser religat per la *T4* DNA lligasa (Roche) recuperant la estructura circular inicial o pot incorporar l'insert (que es troba en excés) per lligació directa en rom (en les dues possibles orientacions). Si recupera la forma inicial la diana *Sma*I es regenera i, per tant, pot tornar a ser atacada per l'enzim de restricció donant una nova oportunitat a la inclusió de l'insert, mentre que si, efectivament, es lliga l'insert, la diana queda inutilitzada i ja no podrà escindir-se. Per tant a la llarga, la gran majoria de les molècules de plàsmid acabaran per acollir un insert en el seu interior.

Mescla de reacció	
Plàsmid (PBSK)	20-30 ng
Insert	80-100 ng
Enzim <i>Sma</i> I (10U/ µl)	1 µl
Enzim Lligasa <i>T4</i> (1U/ µl)	1 µl
Tampó 10x de lligasa <i>T4</i>	1 µl
Aigua destil·lada Estèril	fins a 10 µl

Taula 17. Mescla de reacció per dur a terme la inserció d'un fragment d'ADN sobre un plàsmid tallat per una diana que genera extrems roms. El tall i la posterior lligació es donen en un únic pas després d'una incubació a 25°C tota la nit. Afegim una petita quantitat de plàsmid i un gran excés d'insert per compensar que la lligació en rom és molt eficient.

Després de la incubació es transformen les cèl·lules DH5α amb la construcció resultant i es sembra en plaques de LB, que contenen ampicilina (100 µg/ml) per seleccionar les colònies que han incorporat el plàsmid, i X-Gal (40 µg/ml) per realitzar l'escrutini per coloració blanc/blau que ens aporta el pBluescript SK+.

L'escrutini per coloració ens dona una idea general de si el procés de lligació restricció ha funcionat bé o no per la proporció de colònies de cada color obtingudes (típicament un resultat favorable rendeix en un 80% de colònies blanques). La selecció però, no ens genera un 100% de certesa degut a que el temps d'incubació és molt llarg i això permet que activitats exonucleasa residuals de les solucions dels enzims utilitzats puguin tallar algun nucleòtid terminal; alterant la pauta de lectura del gen *lacZ* del plàsmid. Aquesta possibilitat pot generar una petita població de falsos positius de manera que s'imposa una comprovació prèvia d'algunes de les colònies blanques. Per comprovar-ho es realitza una PCR directament sobre les colònies utilitzant dos oligonucleòtids que anellen als dos extrems del MCS.

En analitzar el resultat per electroforesi en gel d'agarosa es podran diferenciar els falsos positius sense insert que donen una banda d'amplificació corresponent al mida del MCS (250 pb), dels positius que donen una banda d'amplificació de la mida de l'insert.

9.- Introducció lligasa-independent de fragments d'ADN en vectors plasmídics.

Un sistema alternatiu i més ràpid per introduir fragments de DNA en vectors plasmídics, però més costos econòmicament respecte el de la lligació-restricció es el desenvolupat per la casa comercial Invitrogen amb el nom de TOPO TA Cloning[®]. El sistema es fonamenta en la formació de l'enllaç fosfodiester entre cadenes de ADN enzim-independent i que per tant té lloc de manera pràcticament instantània. S'aprofita la característica d'algunes polimerases termófiles com la *Taq* polimerasa que introdueixen una desoxiadenosina en els extrems 3' gracias a la seva activitat transferasa terminal. Així el vector d'entrada es subministra linealitzat i amb una única timina protuberant a cada extrem 3' que permet una lligació molt eficient entre els dos fragments. A l'hora el grup fosfat d'aquesta timina està formant un enllaç covalent amb un residu de tirosina de la proteïna Topoisomerasa I. Un cop la complementació adenosina/timina té lloc, el grup hidroxil de l'extrem 5' del fragment amplificat per PCR és capaç de realitzar un atac nucleofilic sobre el grup fosfat generant l'enllaç fosfodiester i alliberant la Topoisomerasa com a grup sortint.

Per dur a terme la reacció n'hi ha prou amb mesclar el vector subministrat (pCRII/pCR2.1) amb el producte de PCR fresc en presència de sals i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts

10.- Transformació

Per tal de propagar una construcció o expressar-la cal fer-ho en una cèl·lula hoste que porti tota la maquinària cel·lular necessària en cada cas, ja sigui la de replicació o la de transcripció i traducció. Però per introduir un ADN exogen en una cèl·lula cal preparar-la prèviament perquè sigui capaç d'afavorir i suportar aquest procés, és a dir fer-la competent.

10.1.- Preparació de cèl·lules competents per xoc tèrmic

Tot el material utilitzat durant la preparació ha d'haver estat autoclavat prèviament i atemperat en gel a 4°C abans de posar-lo en contacte amb les cèl·lules ja que durant els passos més importants hi ha absència de medi per alimentar les cèl·lules de manera que cal mantenir-les en tot moment a una temperatura tal que el seu metabolisme es trobi pràcticament aturat, ja que si aquest s'activa, els requeriments nutricionals no podran ser satisfets i es provocarà una mort massiva.

Dia1) Creixement en placa + antibiòtic selectiu (si s'escau) per obtenir colònies aïllades.

Dia2) Inòcul de 3 ml de medi LB (+ antibiòtic) amb 1 colònia i incubació (o/n) a 37°C i 180 r.p.m.

Dia3) Inocular amb 1 ml de pre-cultiu per cada 100 ml de medi LB, i incubar a 37°C i 180 r.p.m. fins a $D.O_{600} = 0,5$ (per les cèl·lules BL21 que són més sensibles es redueix a 0,35). Centrifugar 15 min. a 5000 r.p.m (4° C) per recolectar el pellet.

Resuspendre les cèl·lules en 7.5 ml de tampó TfbI amb molt de compte mantenint en tot moment la suspensió en gel.

Incubar 5 min. la suspensió en gel i centrifugar 5min. a 5.000 r.p.m (4° C).

Resuspendre amb molt de compte el pellet amb 2 ml de tampó TfbII fred i repartir-ho en alíquotes de 100 µl que es congelen en nitrogen líquid i es conserven a -80° C.

Tampó TfbI	250 ml	Tampó TfbII	100 ml
30 mM KAc	636,1 mg	10 mM Mops PH=7	209,3 mg
50 mM MnCl ₂	2474 mg	75 mM CaCl ₂	15 ml (500 mM)
100 mM RbCl	3023 mg	10 mM RbCl	120,9 mg
10 mM CaCl ₂	5 ml (500 mM)	5% glicerol	5 ml
15 % glicerol	37,5 ml		
PH=5,8 ajustat amb Àc.acètic 2 N.			

Taula 18. Composició dels dos tampons utilitzats per la preparació de cèl·lules competents per xoc tèrmic. S'especifiquen les concentracions de cada un dels components i les quantitats de cada un d'ells necessàries per preparar-ne un volum de 250 i 100 ml, respectivament. Les solucions es conserven a 4° C i és habitual autoclavar-les després de varis usos encara que aquests es facin sota la protecció de la flama.

10.2.- Preparació de cèl·lules competents per electroporació

Dia1) Creixement en placa + antibiòtic selectiu (si s'escau) per obtenir colònies aïllades.

Dia2) Inòcul de 10 ml de medi LB + antibiòtic amb 1 colònia i incubació (o/n) a 37°C i 180 r.p.m.

Dia3) Inocular amb 2,5 ml de pre-cultiu per cada 500 ml de medi LB, i incubar a 37° i 180 r.p.m. fins a D.O = 0,6 (per les BL21 que són més sensibles es redueix a 0,4). Atemperar el cultiu en gel durant 15 min. i centrifugar 10 min. a 5000 r.p.m (4° C) per recolectar el sediment.

Resuspendre les cèl·lules en 5 ml d'aigua estèril en primer terme i amb 100ml totals al final mantenint en tot moment la suspensió en gel.

Centrifugar 20 min. a 5.000 r.p.m (4° C) i rentar amb 100 ml d'aigua estèril per triplicat

Fer un últim rentat amb 10 ml de glicerol al 10% estèril i concentrar finalment el pellet per resuspendre'l en 700 µl de glicerol al 10% (v/v).

Es divideix la suspensió en alíquotes de 50 µl que es congelen en N₂ líquid i es conserven a -80° C.

A partir de les cèl·lules competents el mètode de transformació marcarà el protocol a seguir. Tot i que el sistema d'electroporació resulta en una major eficiència de transformació els dos mètodes donen uns resultats suficientment bons com per poder utilitzar-los indistintament. Únicament l'electroporació s'imposa quan treballem amb llibreries d'ADN o construccions extremadament diluïdes.

10.3.- Transformació per xoc tèrmic

1.-En condicions estèrils afegir a una alíquota de cèl·lules competents (descongelades just en el moment previ) la quantitat necessària de l'ADN a incorporar (*)

2.- Deixar reposar en gel durant 30 min.

3.- Aplicar 37°C o 42°C durant un període d'entre 30 - 60 s en bloc tèrmic o bany.

4.-Tornar al gel i mantenir-ho 5 min. més.

5.- Afegir 1ml de medi 2xTY (o LB) estèril (prèviament atemperat a 37°C).

6.- Incubar les cèl·lules a 37°C i 180 r.p.m durant 1h.

7.- Plaquejar en LB + antibiòtic per seleccionar les cèl·lules que incorporen la construcció respecte de les que no ho han fet.

(*). La quantitat d'ADN a transformar depèn de la concentració de la solució utilitzada i de l'eficiència de les cèl·lules competents. Tot i així per construccions de plàsmids tancats recuperats per mini-prep 0,2 µl resulten més que suficients mentre que en el cas d'una lligació on part del plàsmid es pot mantenir lineal, es transformen directament els 10 µl preparats.

10.4.- Transformació per electroporació (o electroporabilització)

La electroporació o electroporabilització es basa en la formació de porus en la membrana plasmàtica cel·lular com a conseqüència del voltatge que la travessa, resultat de l'aplicació d'un camp elèctric extern. Per aconseguir aquest efecte cal aplicar un voltatge suficient per superar la rigidesa elèctrica de la membrana (és a dir aconseguir convertir la membrana que té propietats aïllants, en conductora) i mantenir-lo durant un període de temps tal que permeti que els porus formats es tornin a sellar ràpidament. Una exposició excessiva induirà processos d'apoptosis o necrosis cel·lular. Durant el temps que es manté el porus obert s'habilita la possibilitat d'entrada de compostos del medi a l'interior cel·lular, entre ells fragments de ADN com plàsmids.

Per evitar contaminacions i preservar la integritat de les cèl·lules competents, tot el material es renta amb etanol i es refreda en gel.

- En condicions estèrils, s'afegeix la quantitat adequada de la construcció en una al·lquota de cèl·lules competents acabada de descongelar.
- Es passa la mescla a una cubeta d'electroporació de 0,1 cm i s'aplica un breu pols elèctric (temps marcat pel propi aparell amb un senyal acústic de l'ordre dels 5 milisegons) de característiques: 250 μ F (Capacitance Extender), 200 Ω (Pulse Controller), 1,6 V (Gene Pulser) (Bio-Rad). Per a un correcte funcionament de la electroporació és molt important la puresa de la suspensió. Una concentració massa alta de sals en solució provocarà l'anomenat arc elèctric (que es reflexa en una petita explosió) quan un excés d'ions positius en moure's en el sentit oposat al moviment d'electrons provoca un increment puntual molt elevat de la temperatura que mata les cèl·lules.
- S'afegeix 1 ml de medi 2xTY estèril (prèviament atemperat a 37°C) a la cubeta i s'homogeneïtza la mescla per recuperar el màxim de cèl·lules.
- Es passa la suspensió a un microtub, i s'incuba 1h a 37°C i 180 r.p.m perquè les cèl·lules es recuperin.
- Finalment es plaqueja en LB+antibiotic de selecció de la construcció. per afavorir la propagació d'aquelles cèl·lules que, realment, han incorporat l'ADN exogen.

11.- Digestió amb enzims de restricció

Per a introduir un insert en una posició concreta d'un plàsmid es fa servir un dels grans descobriments que va impulsar la Biologia Molecular, com són els enzims de restricció. Aquests enzims es troben de forma natural a la majoria de microorganismes i tenen la característica de tallar les molècules d'ADN, no de forma indiscriminada, sinó en regions de seqüència concreta (dianes). Les dianes típicament estan formades per 6 nucleòtids tot i que n'hi ha un ventall molt ampli entre les que s'inclouen dianes de 4, 8 o més nucleòtids.

Aprofitant la gran especificitat d'aquests talls i del fet que dos fragments d'ADN tallats amb el mateix enzim per donar extrems cohesius, són complementaris i regeneren la diana. Es generen en la PCR dianes en l'insert equivalents a les del plàsmid de destí i tots dos es tallen amb els mateixos enzims de manera que es generen extrems complementaris que la lligasa és capaç d'unir.

A l'hora de dur a terme una restricció tant sigui de l'insert com del plàsmid cal tenir en compte algunes consideracions per tal d'evitar un tall inespecífic de l'ADN:

- 1.- Un excés d'unitats d'enzim (unitat de mesura que determina la quantitat d'activitat de l'enzim que talla una quantitat definida de nmols d'DNA per unitat de temps) afegides sobre una quantitat baixa d'ADN.
- 2.- Un excés de temps d'incubació (el temps estàndard utilitzat és de tres hores)
- 3.- Els enzims comercials es subministren en 50% (v/v) de glicerol per evitar processos successius de congelació/descongelació al guardar-los a -20°C que els inactiven. A l'hora d'utilitzar-los cal tenir en compte que la quantitat final de glicerol en la mescla de reacció no ha de superar el 10% (v/v), segons recomenació del fabricant.

A l'hora de preparar les mescles de reacció només cal mesclar l'ADN, l'enzim amb el que volem tallar, i el tampó que ens dona l'activitat òptima d'entre tota la gama que ofereix el fabricant (especificat en el seu catàleg de productes). En el cas de voler tallar per dos dianes diferents tenim dues possibilitats que estaran marcades per la compatibilitat dels tampons dels enzims. Si els dos enzims funcionen amb el mateix tampó o existeix algun tampó alternatiu compatible amb els dos (tampó universal o tampó que ofereix nivells d'activitat menors del 100% però prou alts) la digestió doble es fa a l'hora en un únic pas. Si això no és possible caldrà fer una primera restricció amb un dels enzims (comprovant per electroforesi en gel d'agarosa que la digestió ha funcionat). En el cas d'un plàsmid circular, s'ha de veure que aquest s'ha linealitzat totalment perdent així el patró de tres bandes corresponent a l'ADN circular, ADN circular enrollat i ADN circular superenrollat. Es renta la mescla de la restricció (kit mini-prep de Qiagen) per eliminar el primer tampó i fer una segona restricció per la segona diana.

Així, la composició d'una mescla de reacció estàndard, seria:

Mescla de reacció tipus	
Solució a tallar	15 - 25 μ l (1-4 μ g)
Enzim1 (10 U/ μl)	1 μ l
Enzim2 (10 U/ μl) -si s'escau-	1 μ l
tampó 10x	1/10 volum final
Aigua destil·lada estèril	fins total de 25 - 40 μ l

Taula 19. Composició general d'una mescla de reacció per tallar un fragment d'ADN, ja sigui per una o dues dianes. Per assaigs analítics, es treballa amb volums de la part baixa del rang mentre que si es pretén alliberar un insert a partir d'un plàsmid per després utilitzar-lo en successius passos de clonatge, es treballa amb els volums de la zona alta del rang. El volum exacte a utilitzar dependrà de la concentració de la solució a tallar.

A l'hora de fixar el volum final cal tenir en compte la concentració de la solució a tallar. Si és molt concentrada serà recomanable utilitzar volums de reacció una mica més grans per permetre una millor accessibilitat del/s enzim/s a la seva diana, mentre que si estem en l'extrem oposat serà més recomanable utilitzar volums petits per no diluir en excés el producte final.

La restricció no té només aplicacions preparatives sinó també analítiques. En el nostre cas la restricció s'ha utilitzat sistemàticament per obtenir informació complementària a la de la PCR, per confirmar les construccions generades. A l'hora d'abordar aquests tipus d'anàlisi, hi ha varies estratègies possibles a seguir.

Opció A: Tallar la construcció per dues dianes interiors de l'insert. Així si no hi ha insert, el plàsmid es manté inalterat en forma circular i mostra el patró típic de 3 bandes. En canvi, si hi ha insert, s'allibera un fragment de mida predit i el plàsmid es linealitza donant un únic senyal de mida ben definit.

Opció B: Tallar només per una diana única de l'insert. Així si no hi ha insert, el plàsmid es manté inalterat en forma circular i mostra el patró típic de 3 bandes. Si hi ha insert la construcció es linealitza i dona una sola banda de mida equivalent al plàsmid+insert.

Opció C: Tallar per una diana del vector i per una diana de l'insert. En aquest cas el que definirà el resultat és la distribució de les diferents bandes predites.

Opció D: Tallar per una diana única del plàsmid que també es trobi en l'insert. Així si no hi ha insert es talla el plàsmid i s'obté una banda de la seva mida mentre que si tenim l'insert, el que passa és que es genera un patró de com a mínim dues bandes de mides previsible.

L'estratègia escollida en cada cas vindrà donada per les possibles combinacions de dianes que ens ofereixi el conjunt plàsmid/insert i de la disponibilitat dels diversos enzims necessaris.

11.1.- Digestions parcials de DNA

En algunes ocasions resulta especialment útil generar fragments d'ADN tallats únicament en algunes de les dianes de restricció presents en la seva seqüència. Aquest es el cas del clonatge de segments d'ADN en els que la diana de restricció utilitzada per dur a terme les tècniques d'ADN recombinat es troba present dintre de la seqüència del segment de treball. Per aconseguir una digestió parcial es poden explorar diferents condicions de concentració d'enzim o de temps d'incubació per a una concentració i enzim definits. Una manera alternativa d'evitar les múltiples proves que això implica és treballar amb bancs de dilució.

1. Preparar una mescla de reacció de 100µl totals barrejant el ADN a tallar, (quantitats variables segons aplicació posterior. Típicament 1-4 µg), el tampó òptim per a l'activitat de l'enzim escollit i aigua per completar el volum.
2. Repartir la mescla en 5 tubs de manera que el primer d'ells tingui 30µl, els tres següents 20µl, i l'últim 10µl. Mantenir-los en tot moment en gel.
3. Afegir la endonucleasa de restricció seleccionada (5U/µg ADN) en primer tub, vortejar ràpidament per homogeneïtzar la mescla i tornar al gel altre cop.
4. Afegir 10µl del primer tub en el segon, vortejar ràpidament i tornar al gel. Es repeteix successivament aquesta operació del tub 2 al 3 i d'aquest al 4 per acabar en el 5 de manera que al final es disposa de cinc tubs amb 20µl cada un d'ells en gel amb una concentració idèntica d'ADN però una dilució seriada de 54 vegades la concentració inicial d'enzim en el primer tub. Per a la correcta dilució de cada solució resulta de vital importància canviar cada vegada la punta de la pipeta i mantenir cada solució fora del gel el mínim del temps possible.
5. Incubar els cinc tubs durant exactament 15 minuts a la temperatura òptima de treball de l'enzim de restricció (típicament 37°C) i aturar la reacció incubant-la a la temperatura i temps especificats pel proveïdor per cada enzim.
6. L'evolució de la digestió s'analitza per electroforesis en gel d'agarosa. El fragment de la mida desitjada es pot recuperar a partir de la escissió de la regió específica del gel on aquest queda localitzat.

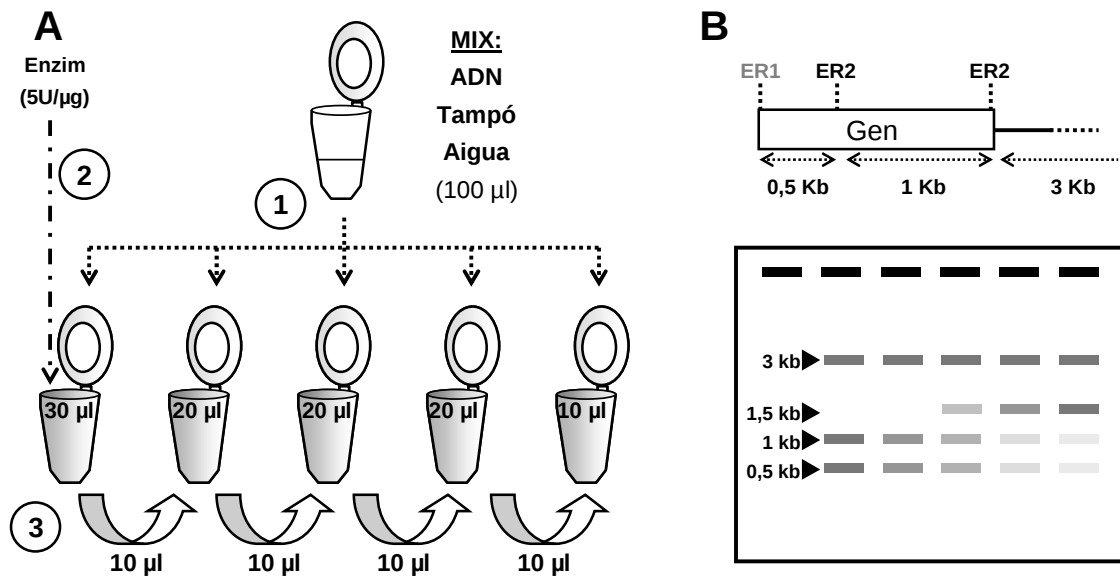


Figura 6. Esquema del mètode de digestió parcial per dilució de l'enzim. A) Representació gràfica de la metodologia utilitzada per obtenir una dilució seriada de l'enzim mantenint la quantitat de material genètic invariable. B) Visualització teòrica del resultat de la digestió.

12.- Generació i Rastreig d'una llibreria d'ADN genòmic d'*Escherichia coli*.

El procés de generació i rastreig d'una llibreria d'ADN genòmic en termes metodològics engloba tres etapes independents. La obtenció d'un ADN genòmic de qualitat, la seva digestió en fragments de mida òptima, i el seu rastreig. Una vegada obtinguda una bona genoteca representativa de la totalitat d'un genoma, aquesta es pot utilitzar en repetides ocasions per dur a terme diferents rastrejos. La generació i rastreig d'una genoteca permet la identificació d'esdeveniment genètics singulars és a dir associats a un únic gen.

12.1.- Obtenció d'ADN genòmic bacterià.

L'aïllament d'ADN genòmic es pot dur a terme de manera més grollera per algunes aplicacions com l'amplificació de gens per PCR o la comprovació de mutants. Per a la generació d'una bona genoteca és important partir d'un material genètic de qualitat, és a dir ben net d'altres macromolècules com lípids, proteïnes o polisacàrids que dificultin els successius passos. Un mètode per obtenir-lo es descriu a continuació:

1. Centrifugar 20 ml de cultiu crescut a 37°C i 200 r.p.m fins a fase estacionaria (15' a 2500g)
2. Rentar el pellet obtingut amb 1 ml d'aigua destilada.
3. Resuspendre el pellet en 200 μl de buffer TE

4. Afegir 1ml de solució de lisis. Homogenitzar i lisar a temperatura ambient entre 5 i 10 minuts.
5. Neutralitzar la solució amb 500 µl de solució d'acetat d'amoni 7,5 M i refredar la mescla en gel.
6. Fer una extracció amb 1ml d'una solució de Cloroform/Alcohol isoamilic (24:1), agitant fins a obtenir una única fase homogènia.
7. Separar les fases aquosa i orgànica centrifugant a 13x103 r.p.m durant 5 minuts.
8. Recollir la fase aquosa (fase superior) evitant recollir part de la interfase.
9. Sobre la fase aquosa recollida repetir la extracció tantes vegades com sigui necessari per acabar observant una interfase totalment neta
10. Precipitar l'ADN cromosòmic afegint 0,54 volums d'isopropanol a temperatura ambient durant 5 minuts. Instantàniament s'observa l'aparició d'un precipitat blanquinós.
11. Centrifugar a 13x103 r.p.m durant 5 minuts
12. Eliminar amb compte el sobrenedant i rentar-lo 3 vegades amb 1 ml de etanol 70% centrifugant 1 minut cada vegada.
13. Retirar l'etanol i deixar assecar el precipitat a l'aire.
14. Resuspendre l'ADN amb 100-150 µl de tampó TE estèril.

Solució de lisis:

Tiocianat de Guanidina 5M
EDTA 0,1 M (pH 8)
Sarkosyl 0,5%

12.2.- Digestió d'ADN genòmic D'E.coli per a la generació d'una genoteca

A l'hora de generar una genoteca que sigui representativa del total del contingut genòmic d'un organisme cal dividir la macromolècula d'ADN en fragments amb els que es pugui treballar còmodament. A l'hora de decidir la mida d'aquests fragments s'ha de considerar quina és la mida del genoma complet i la quantitat de clons que caldrà generar perquè tot ell quedi estadísticament representat. En el cas d'E.coli el genoma és de aproximadament $4,2 \times 10^6$ bases de manera que treballant amb fragments d'una mitja de 3Kb el nombre de clons necessaris perquè tots els gens quedin representats amb una probabilitat superior al 95% es manté dins dels límits raonables. Per fer la digestió, típicament es realitza una bateria de proves modificant el temps d'incubació o la quantitat d'enzim de restricció per escollir aquella condició que genera un patró de digestió enriquit en la franja de mides en les que volem fragmentar l'ADN. En aquest cas s'ha intentat obtenir un patró més variat a través d'agrupar el resultat de diverses digestions. Les condicions eren molt similars però no idèntiques per moure'ns sempre al voltant de les condicions que fragmenten l'ADN dintre dels intervals desitjats però intentant que les regions de tall fossin lleugerament diferents i per tant els fragments es solapessin. Amb aquesta metodologia el protocol utilitzat va ser el descrit a continuació:

- En 5 microtubs es van preparar 100 µl d'una solució amb aprox. 200 ng d'ADN genòmic, el tampó per l'enzim de restricció, i aigua. En gel
- En el primer tub es van afegir 10 Unitats d'enzim SAU3A i es va barregar bé mantenint en tot moment la mescla en gel
- A la resta de tubs es van afegir quantitats decreixents d'enzims a raó d'una dilució consecutiva de 1/3.
- Les mescles es van incubar a 37°C durant 10 min.
- Immediatament es va aturar la reacció escalfant a 70°C durant 5 min
- Les 5 diferents mostres es van resoldre en un gel d'agarosa al 1%.
- Per a cada una de les mostres resoltes es va retallar la regió del gel que comprenia el rang de mides de 2 a 5 Kb.
- A partir del gel es van recuperar els ADN amb l'ajut del kit comercial de Roche (High pure PCR product purification kit). Les 5 mostres es van portar en paral·lel fins el pas final en el que

totes elles es van passar per una única columna d'on els ADN es van recuperar amb 20 µl de tampó d'elució (Tris-HCl 10 mM pH 8.0).

Per generar la genoteca cal introduir tots els fragments generats, en un vector plasmídic. Per fer-ho amb la màxima eficiència es va utilitzar un vector pUC19 comercial tallat per la diana de restricció BamHI i defosforilat. Els extrems generats per l'enzim BamHI són compatibles amb els generats per l'enzim SAU3A. La defosforilació és imprescindible quan es treballa amb un vector tallat amb una única diana per evitar el relligat del propi vector i per tant la caiguda de l'eficiència d'aquest pas. La lligació es va fer utilitzant la màxima quantitat possible de barreja de fragments de ADN, 1 µg de vector linealitzat i defosforilat, i una unitat de T4 DNA lligasa. La mescla es va incubar a 16°C tota la nit.

	Mescla de lligació tipus
Fragments ADN	8 µl (quantitat màxima disponible)
pUC19(BamHI-DeP)	1 µl (1 µg)
Tampó lligasa 10x	1 µl
Lligasa	1 µl (1 Unitat)
Aigua	Fins a 12 µl

Taula 20. *Mescla de reacció per generar una genoteca de ADN genòmic*

La lligació es va transformar per xoc tèrmic en una soca TOP10 per amplificar la genoteca i millorar així les possibilitats en la etapa del rastreig. Els posteriors passos seguits fins a obtenir la genoteca s'esquematitzen a continuació:

- La lligació es va transformar per xoc tèrmic en la soca TOP10 i 25 dels 1000 µl disponibles es van sembrar en plaques amb l'antibiòtic de selecció del plasmídic (per pUC19 l'antibiòtic utilitzat va ser carbenicilina). La resta de la transformació es va reservar a 4°C.

- Les plaques es van incubar a 37°C durant 18h fins a obtenir-ne colònies aïllades. Es va fer una reacció de PCR de colònia (per 10 colònies) utilitzant oligonucleòtids que hibriden a banda i banda de la regió de clonatge múltiple del plasmídic. Aquesta PCR permet fer una estimació del tant per cent de colònies que efectivament han incorporat un fragment del ADN genòmic i la mida mitjana dels inserts.

- A partir del nombre de colònies contades per una alíquota de transformació, el tant per cent que incorpora insert, i la mida mitjana d'aquest es va estimar la quantitat de colònies necessàries perquè els plasmidis que incorporen representin un mínim de 3 vegades la mida total del genoma de *E.coli*. En aquest cas el nombre de colònies amb insert era del 80% i la mida mitjana d'aquestes era de 2,5-3 Kb.

- A partir de la transformació guardada a 4°C es van sembrar 20 plaques per a obtenir un nombre suficient de colònies per placa però amb espai suficient per cada una d'elles per créixer i assegurar la representació per igual de tots els clons. Es van incubar a 37°C durant 18h.

- Per recuperar el pool de plasmidis, a cada placa es van afegir 5 ml de medi LB estèril i amb una nansa de sembra es van resuspendre totes les colònies de la placa. La suspensió cel·lular es va recuperar i utilitzar com a material de partida per recuperar el conjunt de plasmidis que conformen la genoteca amb l'ajut del kit comercial de Roche (High pure plasmid isolation kit). Els diversos eluïts es van agrupar en una única mostra de 200 µl (per un total de 25 µg de ADN) que conforma la genoteca.

12.3.- Rastreig de la genoteca de E.coli.

La genoteca generada en aquest cas es va utilitzar per rastrejar una activitat enzimàtica capaç de revertir el fenotip letal d'una soca mutant de E.coli. Per poder establir el gen que en mutar era responsable de la reversió del fenotip letal es va rastrejar tot el genoma de la soca mutant generant-ne la genoteca i provant-la en una soca modificada per eliminar-li l'activitat enzimàtica endògena. Aquesta soca deficient en DXS (EcAB2-2) presenta un fenotip letal de manera que si es transforma una genoteca completa en aquesta soca només els clons que incorporin el gen que en mutar a adquirit la capacitat de substituir l'activitat endògena podran proliferar mentre tota la resta no seran viables. A partir de les colònies que si creixin la identificació del gen responsable es pot realitzar de manera senzilla recuperant el clon i analitzant-ne la seva seqüència. El rastreig de la genoteca es va dur a terme:

- Es van transformar 10 alíquotes de la soca EcAB4-2 (deficient en DXS i per tant incapaç de créixer en absència de MVA o una activitat alternativa a l'endògena) amb 500 ng, cada una, de la genoteca obtinguda de l'ADN genòmic de la soca Ex8 de E.coli.

- Es van sembrar en plaques de medi LB amb antibiòtics per seleccionar la incorporació dels clons (Carbenicilina:100 µg/ml) i per seleccionar la soca modificada (Kanamicina:50 µg/ml i Cloramfenicol:20 µg/ml)

- Després d'incubar-les a 37°C durant 24h les colònies que havien crescut es van créixer 16h en medi líquid en presència dels mateixos antibiòtics per recuperar-ne el plasmidi.

- La identificació del gen responsable es va obtenir per seqüenciació del fragment d'ADN genòmic insertat en el clon aïllat.

13.- Defosforilació d'ADN

Per a la defosforilació dels extrems 5' de les molècules d'ADN s'ha utilitzat l'enzim fosfatasa alcalina (orto-fosfórico-monoéster hidrolasa) comercial. S'han utilitzat tan l'enzim aïllat d'una gamba d'aigua freda (Shrimp alkaline phosphatase: SAP) com l'enzim aïllat d'intestí de vedella (Calf intestine alkaline phosphatase:Roche) que tot i presentar uns nivells d'activitat menors que el seu equivalent bacterià presenten l'avantatge de poder ser inactivats de manera ràpida i eficient simplement aplicant temperatura.

S'utilitzen 2U d'enzim per defosforilar 1,5 µg de DNA ,prèviament digerit, incubant la mescla de reacció a 37°C durant 60 minuts en presència del buffer que optimitza l'activitat enzimàtica (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100µM, pH 8,5). Posteriorment s'atura la reacció per inactivació de l'enzim incubant la solució a 65°C durant 10 min.

La defosforilació és un procés aplicat en la tecnologia recombinat per millorar l'eficiència de lligació entre diferents fragments d'ADN. La lligasa catalitza enllaços fosfodiester entre molècules de DNA de doble cadena entre extrems 3'-Hidroxil i 5'-fosfat. Eliminant el grup fosfat en l'extrem 5' d'un vector digerit, s'elimina la possibilitat de la recircularització afavorint la unió amb el fragment alternatiu. Aquesta acció cobra especial importància quan s'utilitza un vector digerit amb un únic enzim de restricció o quan una doble digestió genera extrems protuberants compatibles, processos en els que la reacció unimolecular de recircularització està molt afavorida. Quan es treballa amb dos extrems protuberants no compatibles la necessitat d'eliminar el grup fosfat en l'extrem 5' perd importància tot i que millora l'eficiència de lligació en eliminar els esdeveniments de recircularització derivats d'una digestió incompleta del vector. La defosforilació bàsicament s'aplica sobre fragments d'ADN digerits (típicament vectors). Es pot dur a terme com un pas independent dintre del procés de tecnologia recombinant per optimitzar-ne les condicions utilitzant ADN net i el tampó òptim però també es pot utilitzar rutinàriament afegint l'enzim en la mescla de reacció preparada per dur a terme la digestió.

14.- Klenow: Conversió d'extrems cohesius en roms.

Algunes estratègies de clonatge requereixen l'ús de la combinació d'un extrem protuberant i un extrem rom però no sempre es disposa de dianes de restricció que generin aquest últim tipus de morfologia. En aquests casos existeix la possibilitat de produir extrems roms a partir d'un extrem inicialment protuberant. Per fer-ho s'utilitza un enzim disponible comercialment, el fragment gran de la ADN polimerasa I (Klenow) resultat de la digestió de la ADN polimerasa I de E.coli amb la proteasa subtilisina. Aquest pèptid de 68 kDa manté les activitats polimerasa 5'→3', i 3'→5' exonucleasa però ha perdut la exonucleasa 5'→3'(que resideix en els fragments més petits resultants de la digestió). D'aquesta manera l'enzim es pot utilitzar per generar

extrems roms a partir de l'activitat exonucleasa en fragments 3' protuberants o a partir de l'activitat polimerasa en fragments 5' protuberants (el cas més habitual).

Per dur a terme la reacció utilitzem 1-3 µg de DNA tallat amb un enzim que generi extrems 5' protuberants i s'incuba en presència del tampó òptim (50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,1 mM DTT, 40 µM de cada un dels 4 desoxinucleotid-trifosfat, i 20 µg/ml de BSA acetilada).

S'afegeix a la mescla 1U/µg d'enzim i s'incuba a temperatura ambient durant 10 min. La reacció s'atura escalfant-la a 75°C (10').

15.- Electroforesi en gels d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa és una eina senzilla però de gran potència que permet separar fragments d'ADN de diversos mides amb un bon nivell de resolució. En aplicar un camp elèctric, les càrregues negatives de l'ADN provoquen el moviment dels diversos fragments d'una mescla a través d'una xarxa de mida de porus variable. En funció del seu mida la mobilitat serà major o menor. La xarxa es prepara a partir de la gelificació d'una solució d'agarosa.

La resolució d'aquests gels està directament relacionada amb el % d'agarosa que hi posem. Així per fragments petits s'incrementa el % fins a un 2, mentre que per fragments de gran mida el % pot decreixer fins al 0.3. En la majoria de casos però, un 1% és la solució òptima perquè permet separar fragments en el rang 0.4 - 7kb aprox. que són els més habituals en el dia a dia del laboratori.

Per preparar un gel al 1%, es prenen 30 ml de tampó TAE 1x, 0,3 g d'agarosa, i s'escalfa al microones fins a arribar gairebé a la ebullició. Un cop dissolta l'agarosa totalment es deixa atemperar una mica (fins als 50-55° C aprox.) i s'afegeix bromur d'etidi a una concentració final de 1 µg/ml (3 µl de stock 10 mg/ml). Es mescla i s'aboca a un compartiment estanc on es refredarà progressivament fins formar un gel en el qual haurem creat uns petits pous amb l'ajut d'un suport. Aquest suport té forma de pinta i es situa a la part superior i insertat en el gel però deixant un marge de 0,5 cm amb el fons. La gelificació es pot seguir pel canvi d'aparença de la solució que passa de transparent en l'estat líquid a translúcid en solidificar.

Un cop preparat el gel, només cal aplicar les mostres en els pous, i per fer-ho es fa servir un tampó de càrrega 6x (relació mostra: tampó, 5:1 µl) que inclou: glicerol com a densificador, i blau de bromofenol, una molècula de molt baix pes molecular i de color blau que serveix com a referència visible del progrés de l'electroforesi. Com a patró per comparar els mides de les mostres es fa servir un marcador de pesos comercial, 1Kb lader (Biotools), que avarca fragments desde 250 pb fins a 10 Kb.

Les mostres es separen aplicant una diferència de potencial d'entre 70-100V (cal evitar valors majors perquè la resistència associada a aquests potencials genera una quantitat excessiva de calor que pot degradar les mostres). Cal tenir en compte que l'ADN, en les condicions de pH del tampó TAE, està carregat negativament degut als grups fosfats que es troben desprotonats, i per tant migrarà cap al pol positiu.

Finalment, les bandes separades d'ADN resulten visibles gràcies al bromur d'etidi present en el gel. El bromur d'etidi és un agent intercalant que es situa entre les dues hebres de l'ADN i forma un complex que excitat amb llum ultraviolada emet llum visible blanca que es contrasta amb el fons negre del gel. Una característica del bromur és que té càrrega positiva, i per tant durant la migració de l'ADN cap al pol positiu, ell migra cap al negatiu, de manera que no s'ha de deixar avançar les mostres en excés perquè les de mobilitat major podrien quedar fora del rang d'influència, i no serien visibles. El bromur d'etidi com a agent intercalant de l'ADN resulta mutagènic. En conseqüència, cal treballar sempre amb guants i amb les màximes precaucions.

15.1.- Purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa.

La recuperació de mostres d'ADN prèviament analitzades per electroforesi en gels d'agarosa és un procés rutinari que es realitza fent servir kits comercials que donen tots ells resultats satisfactoris dintre d'un rang d'utilitat. La purificació d'un fragment d'ADN es pot abordar per dos camins: La purificació en columna, que és un procés ràpid i d'alt rendiment, o bé la recuperació de la banda separada en un gel d'agarosa. En el segon cas ens trobem davant d'un procés més laboriós i de menor rendiment però que té un punt a favor que en determinats casos pot resultar decisiu a l'hora de triar una de les dues opcions. La recuperació d'ADN a partir d'una banda, permet seleccionar fragments de mida molt concreta, evitant així la contaminació per efecte de bandes inespecífiques (en el cas de productes de PCR) o els petits fragments escindits en una restricció que, més tard, podrien interferir en el procés de lligació.

S'ha optat per purificar en columna els ADN's amplificats per PCR que donaven un patró de banda única mentre que s'ha optat per la recuperació de banda en els casos de patrons amb presència de bandes inespecífiques o la purificació de productes de restricció.

16.- Lligació de fragments d'ADN

En totes les lligacions realitzades s'ha dut a terme un pas previ consistent en la realització d'una electroforesi en gel d'agarosa per fer una estimació de la concentració de cada una de les solucions a utilitzar, tant els inserts generats com els plàsmids de destinació ja tallats. Per fer-ho, es prenen com a referència les dades que el fabricant ens aporta respecte als

marcadors d'ADN de 1Kb (Biotools), segons les quals en 3 µl de solució, estem afegint 85 ng del marcador corresponent a 3kb.

Un cop establertes les concentracions es prepara una mescla de reacció amb el plàsmid i l'insert en una relació molar de 1:2, segons la fórmula:

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng plàsmid} \times \text{mida de l'insert (pb)} \times \text{relació molar}}{\text{mida del plàsmid}}$$

A partir dels ng calculats, i coneguda la concentració de la solució d'insert, es pot trobar el volum a utilitzar. Treballem a partir d'una quantitat fixa de plàsmid que oscil·la entre els 40 i 50 ng, perquè és la quantitat que després ens donarà un nombre correcte de colònies per analitzar. De l'ordre de 20 - 80 segons l'eficiència de la lligació.

Es preparen les mescles de reacció per un volum final de 10 µl segons el resultat del càlcul anterior i les concentracions de cada solució utilitzant com a enzim, la lligasa del fag T4 purificada per la casa comercial Roche i subministrada en 50% de glicerol junt amb el tampó adequat concentrat 10 vegades:

	Mescla Reacció	Composició Tampó(10x)
Insert ADN	ng Calculats	660 mM Tris-HCl
Plàsmid	40-50 ng	50 mM MgCl ₂
Tampó 10x	1 µl	50mM DTT
LligasaT4	1µl (1 Unitat)	10 mM ATP
H ₂ O Esteril	fins a 10 µl	pH=7,5

Taula 21. Composició general per una mescla de reacció destinada a la lligació d'un fragment d'ADN en un vector tallat amb les mateixes dianes que generen extrems cohesius. Es treballa amb quantitats petites de plàsmid per obtenir un nombre final de colònies a escutar que sigui significatiu però no desmesurat (20- 40). Aquesta relació es complirà sempre i quan la digestió del plàsmid hagi estat quantitativa, reduint al màxim la possibilitat de que aquest es torni a lligar. Es detalla la composició del tampó òptim per la lligasa que inclou ATP. Aquest és un element que s'ha revelat com a clau per un bon rendiment del procés. Com que l' ATP és sensible als processos de congelació/descongelació, el tampó comercial és recomanable al·liquotar-lo en volums menors per minimitzar aquest problema.

La mescla s'homogeneïtza per agitació suau i es concentra amb un toc de centrifuga per iniciar una incubació que durarà tota la nit i que presenta diverses possibilitats. La primera és fer-ho a 4°C exclusivament. La segona seria fer-ho a 16°C tota la nit. La tercera aplicar un gradient de temperatures desde 4°C fins a 16°C submergint els tubs en H₂O refredada prèviament a 4°C i deixar que es doni un increment de temperatura progressiu.

17.- Seqüenciació

El kit consisteix en una mescla de reacció que inclou els desoxinucleòtids trifosfats, el tampó de reacció, $MgCl_2$, una versió millorada de la Taq ADN Polimerasa, i l'element clau que són un conjunt de quatre terminadors. Aquests terminadors, corresponen als 4 nucleòtids trifosfat etiquetats amb marcadors fluorescents però en una versió didesoxi, és a dir que en la posició de l'anell de desoxiribosa del nucleòtid s'ha substituït el grup hidroxil (-OH) per un àtom d'hidrogen (-H). Aquest canvi resulta transcendent des del moment que en la síntesi d'ADN, els nucleòtids s'uneixen entre ells en aquesta posició a través d'enllaços fosfodiester on hi intervé el grup -OH. L'entrada en la seqüència d'un didesoxinucleòtid impedirà les unions successives i per tant actua com a element terminador. D'aquesta manera n'hi haurà prou amb afegir a la mescla de reacció el motllo d'ADN sobre el que volem realitzar la entrada de seqüència, i l'oligonucleòtid corresponent.

El mètode a grans trets consisteix en una aplicació de la tècnica de la PCR. La idea general seria que en cada cicle de PCR, la polimerasa copia l'ADN motllo utilitzant els desoxinucleòtids del medi de reacció, però en aquest medi també hi ha presents els 4 didesoxinucleòtids en una proporció tal que ens assegura que la probabilitat de que aquests elements terminadors s'introdueixin en la cadena és exactament la mateixa per totes les possibles posicions. Com que els terminadors impedeixen que continuï la seqüència, en el conjunt dels 24 cicles de la PCR s'hauran acumulat en quantitats molt similars, cadenes d'ADN de totes les longituds possibles, acabant totes elles amb el didesoxinucleòtid complementari que emet fluorescència d'un color específic segons la base nitrogenada que arrossega. Aprofitant la diferent mobilitat electroforètica de les seqüències resultat de la seva diferent mida, es fa córrer el conjunt de cadenes generades a través d'un capil·lar, de manera que, de menor a major longitud, aniran passant ordenadament per un detector de fluorescència que a partir del color d'aquesta (generat pel didesoxi) ens resoldrà cada un dels nucleòtids de la cadena motllo inicial.

18.- Preparació de glicerinatats cel·lulars.

Per conservar una construcció, és habitual créixer un cultiu de pocs mililitres amb els antibiòtics de selecció adequats tota una nit, per després recuperar-ne el plàsmid amb l'ajut d'un kit comercial dissenyat a tal efecte i conservar-lo a $-20^{\circ}C$. Alternativament existeix la possibilitat de conservar la construcció dins de les pròpies cèl·lules creant un *stab*. El protocol a seguir seria:

- En un micro tub estèril, es posa 0,5 ml de la suspensió cel·lular.
- S'afegeixen 0,5 ml de glicerol (50%) autocloavat.
- S'homogeneïtza la mescla ràpidament amb un vòrtex
- Es congela el stab per immersió del tub en nitrogen líquid
- Es conserva indefinidament a $-80^{\circ}C$.

El glicerol actua com a agent crioconservant evitant que les cèl·lules es trenquin per efecte de la congelació/descongelació de l'aigua. Cal tenir en compte que el glicerol per les seves característiques de polaritat pot alterar l'estructura de la membrana plasmàtica de manera que un cop afegit a la suspensió cal arribar al pas de la congelació amb certa rapidesa.

La generació de stabs ens estalvia haver de transformar la construcció en cèl·lules competents cada vegada que en volem fer us, ja que les cèl·lules d'un stab es poden afegir directament congelades a un cultiu de pocs mil·lilitres perquè acabin creixent al llarg d'aquella mateixa nit.

Com a línia general de treball, en aquest cas s'han utilitzat els *stabs* per conservar les construccions que incloïen estadis intermedis del procés de clonatge per si alguna circumstància obligava a repetir algun pas posterior. Un cop obtinguda la construcció definitiva aquesta també s'ha guardat com a *stab* en la soca DH5α d'*E.coli* per si fos necessari recuperar-la. En canvi a l'hora d'expressar la proteïna recombinant, sempre s'ha partit de la construcció recuperada per transformar-la en el moment d'utilitzar-la en la soca d'expressió.

19.- Mutagénesi Dirigida

Una de les maneres d'avaluar el paper d'un o varis aminoàcids concrets dintre del conjunt de l'estructura d'una proteïna consisteix en modificar de manera controlada i específica la seqüència del gen que la codifica. Per fer-ho s'utilitza una metodologia molt senzilla coneguda com mutagenesi dirigida basada en una nova aplicació de la reacció en cadena de la polimerasa.

19.1.- Protocol Acurat:

1.- En primer lloc cal dissenyar una parella d'encebadors complementaris entre ells en els que en tots dos casos es canviï el nucleotid original, per aquell que generi el codó que codifiqui per l'aminoacid pel qual es vol substituir l'aminoàcid original.

La mida dels encebadors ha de ser d'entre 30 i 35 nucleotids
El nucleotid(s) modificat ha de quedar en la regió central de l'encebador

2.- Amplificar el motllo (típicament un gen dintre d'un plàsmid) utilitzant una polimerasa d'alta fidelitat de copia. Treballem amb un volum total de reacció de 50 µl. Per evitar la introducció de mutacions no desitjades en les còpies de ADN es treballa amb una polimerasa d'alta fidelitat i a un número de cicles més baix de l'habitual. Típicament entre 15 i 25 cicles. Durant l'amplificació s'introdueix un pas final d'extensió de 15 minuts.

3.- Comprovar en un gel d'agarosa, carregant una desena part del volum de reacció, la correcta amplificació del fragment d'una mida corresponent a la suma de les mides del gen i el plàsmid. Al treballar amb un numero de cicles d'amplificació baix la senyal que s'obté sempre es baixa.

4.- Rentar la solució amb un sistema comercial de columna o alternativament precipitant el ADN. Un cop net, digerir-lo durant **1h** a **37°C** amb l'enzim **DpnI** utilitzant un tampó òptim per a la seva activitat. Aquest enzim reconeix únicament dianes de restricció metilades de manera que permet digerir l'ADN parental (motllo de plàsmid + gen) mantenint intacte les còpies que han introduït la mutació. Perquè aquesta selecció sigui possible es imprescindible que el motllo utilitzat sigui el resultat d'una amplificació prèvia utilitzant soques que no tinguin alterada les funcions endògenes de metilació. D'aquesta manera el motllo de partida quedarà metilat mentre les còpies generades *de novo* durant l'amplificació per reacció en cadena de la polimerasa no ho estaran. En aquest punt tindrem una doble cadena d'ADN lineal.

5.- Rentar la solució utilitzant una columna columna o per precipitació de l'ADN concentran-lo fins a un volum final de 10 µl.

6.- Transformar els 10 µl en una soca de E.coli tipus DH5α o TOP10 sembrant en una placa que inclogui l'antibiòtic de selecció determinat pel vector motllo utilitzat en cada cas. Les pròpies cèl·lules són capaces de circularitzar la doble cadena lineal regenerant així el vector inicial que inclou el gen amb la mutació inserida.

7.- Recuperar la construcció i seqüenciar-la per confirmar la presència de la mutació i l'absència de noves mutacions resultat del rocés d'amplificació.

8.- (opcional): Per evitar haver de seqüenciar la totalitat del nou plasmid generat, una possibilitat és la de reclonar el gen una vegada ja confirmada la mutació del gen. Per tant es tallaria la construcció alliberant el gen mutat i reinserint-lo en les mateixes dianes d'un plasmid equivalent fresc.

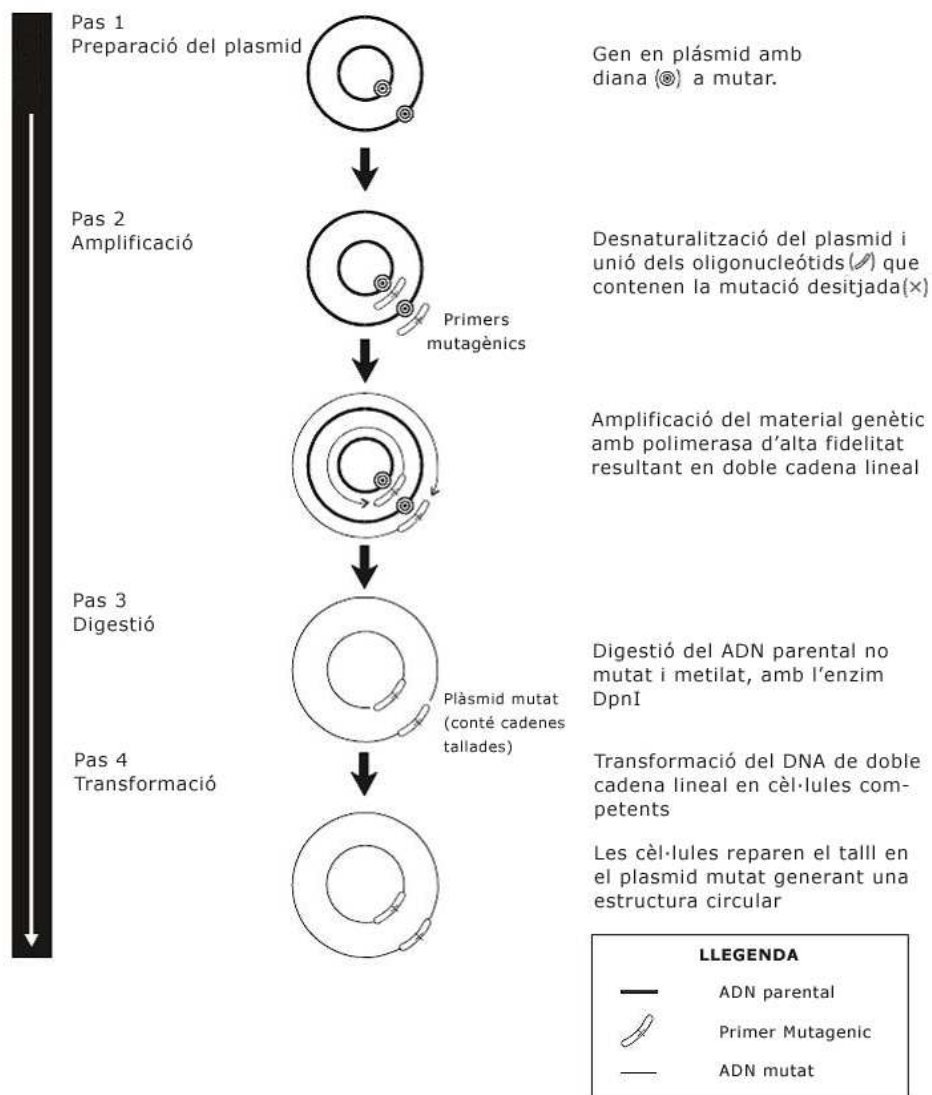


Figura 7. Esquema dels passos bàsics per a la introducció de mutacions puntuals de manera dirigida a partir d'un motllo plasmídic. S'amplifica tot el motllo amb dos primers complementaris que inclouen la modificació en la seva regió central. S'elimina l'ADN parental per digestió selectiva amb l'enzim DpnI (només reconeix dianes metilades). I es transforma en cèl·lules competents per finalment recuperar-ne el nou vector que inclou la mutació.

19.1.- Protocol Ràpid:

1.- Amplificar el motllo (típicament un gen dintre d'un plàsmid) utilitzant una polimerasa d'alta fidelitat de copia amb els encebadors dissenyats tal i com es descriu en el protocol acurat. En aquest cas treballem amb un volum total de reacció de 30 µl. Es treballa amb una polimerasa d'alta fidelitat i a un número de cicles de 22-25.

2.- A 10 dels 30 µl se'ls afegeixen 1,2 µl del tampó òptim de reacció, i 10 unitats de l'enzim DpnI. S'incuba a 37°C durant 1 hora

3.- Els 11,2 µl totals es transformen tots en una soca de *E.coli* DH5α o TOP10 i es sembren les cèl·lules en una placa que seleccioni per el plasmid amplificat en cada cas.

4.- A partir de les colonies que creixen es recupera la construcció i es confirma la presència de la mutació.

Aquest protocol rendeix un nombre de colònies crescudes sensiblement inferior que el que s'obté utilitzant el protocol més acurat però la seva eficiència és més que suficient i es retalla significativament el procés a únicament dos dies. En qualsevol cas el factor clau d'aquesta tècnica resideix en el correcte disseny dels encebadors. Un disseny erroni farà pràcticament impossible dur a terme el protocol exitosament.

20.- Procès de clonatje amb la tecnologia Gateway®

En la última dècada ha aparegut en el mercat un sistema de clonatje alternatiu basat en processos de recombinació enlloc dels tradicionals sistemes de digestió amb enzims de restricció i posterior lligació popularitzats a principis de la dècada dels 80. Aquesta nova tecnologia introdueix tres factors diferencials, la senzillesa, la rapidesa i la versatilitat. La senzillesa es fonamenta en l'ús d'una seqüència única i específica de recombinació que simplifica el disseny inicial de la estratègia de clonatje respecte les múltiples combinacions que ofereixen els enzims de restricció. La rapidesa es basa en la elevada eficiència dels fenòmens de recombinació que tenen lloc en espais de temps de l'ordre dels minuts. I la versatilitat radica en les enormes possibilitats que ofereix el sistema ja que a partir d'un vector intermediari comú permet inserir el gen d'interès en un ampli ventall de vectors receptors que cobreixen totes les aplicacions més comuns en un laboratori de biologia molecular.

La tecnologia consta bàsicament de tres passos: Amplificació, inserció en el vector donador, i transferència al vector de destinació.

Amplificació: Generació de múltiples còpies del gen d'interès (drl) a partir d'una reacció en cadena de la polimerasa (la mescla de reacció i les condicions d'amplificació són equivalents a les detallades en l'apartat Tècniques basades en l'ús d'ADN polimerases termoestables) utilitzant encebadors específics del gen que introdueixen en els extrems les seqüències de recombinació attB1 i attB2 i entre 3 i 4 nucleòtids addicionals que les protegeixin de l'activitat 3'-> 5' exonucleasa de les polimerases d'alta fidelitat.

attB1: XXXXACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT---Seq complementaria del gen d'interès(F)--

attB2: XXXX ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT---Seq complementaria del gen d'interès(R)--

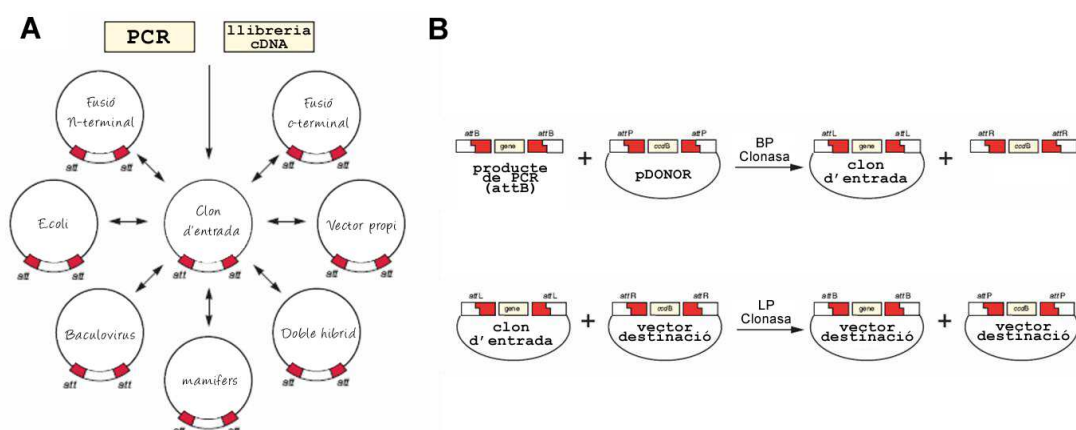


Figura 8. Esquema del sistema de clonatge Gateway. **A)** Representació de les múltiples transferències a diversos vectors de destinació amb diferents aplicacions a partir d'un únic clon d'entrada. **B)** Esquema de les dues reaccions de recombinació de les que consta la tecnologia Gateway®. Es detallen les combinacions de les seqüències de recombinació necessàries per cada reacció i les seqüències resultants de la reacció.

Inserció en el vector Donador: Inserció del gen amplificat (*drl*) a través de la reacció de recombinació entre les seqüències attB que hem incorporat al gen i les attP presents en el vector donador (pDONOR207) en una reacció catalitzada per l'enzim BP Clonasa™. La reacció s'incuba a temperatura ambient durant 5 hores i es transforma en cèl·lules TOP10 que es plaquegen en medi sòlid complementat amb gentamicina a una concentració final de 50 µg/ml. Una vegada crescudes les colònies es pot comprovar la identitat del plàsmid que incorporen per PCR de colònia i creixer-les en medi líquid tota la nit per posteriorment recuperar el vector que ha incorporat el gen amb una mini preparació.

Component	Concentració	Volum
attB-drl	20 – 50 ng/µl	1 – 6 µl
pDONOR207	150 ng/µl	1 µl
Tampó reacció BP Clonasa	5x	2 µl
Tampó TE	-	Fins a 10 µl

Taula 22. Mescla de reacció tipus per dur a terme la reacció de recombinació d'inserció del gen en el vector d'entrada catalitzada per l'enzim BP Clonasa™. El tampó de reacció comercial on esta inclòs l'enzim presenta una gran sensibilitat a la temperatura de manera que cal mantenir-lo a -80°C i reduir al màxim el temps d'exposició durant el seu ús.

Inserció en el vector de Destinació: Transferència del gen amplificat (*drl*) a través de la reacció de recombinació entre les seqüències attL (resultants de la recombinació previa de attB amb attP) del vector donador (pDONOD207-drl), i les attR presents en el vector de destinació (PH9) en una reacció catalitzada per l'enzim LP Clonasa™. La reacció s'incuba a temperatura ambient durant 5 hores i es transforma en cèl·lules TOP10 que es plaquegen en medi sòlid complementat amb Kanamicina a una concentració final de 50 µg/ml. Altre cop es pot comprovar la identitat del plàsmid que incorporen les colònies per PCR, i creixer-les en medi líquid tota la nit per acabar recuperar la construcció final (PH9-drl) amb una mini preparació.

Component	Concentració	Volum
pDONOR207-drl	300 ng/μl	1 μl
PH9	150 ng/μl	1 μl
Tampó reacció LR Clonasa	5x	2 μl
Tampó TE	-	Fins a 10 μl

Taula 23. *Mescla de reacció tipus per dur a terme la reacció de recombinació que transfereix el gen d'interès del vector d'entrada cap a l vector de destinació. La reacció està catalitzada per l'enzim LR ClonasaTM que com en el cas de la BP ClonasaTM presenta una gran sensibilitat a la temperatura de manera que cal mantenir-lo a -80°C i reduir al màxim el temps d'exposició durant el seu ús.*

21.- Obtenció dels enzims Recombinants.

21.1.- Sobreexpressió a Escherichia coli.

Per a obtenir grans quantitats de proteïna recombinant, s'han utilitzat sistemes d'expressió heteròlegs basats en la combinació de vector-soca d'expressió. Partint de la construcció d'ADN recombinant generada en cada cas, arribem a obtenir fraccions de la proteïna amb un alt nivell de puresa i concentració.

El procés comença transformant, per xoc tèrmic, cèl·lules de la soca d'expressió escollida amb la construcció obtinguda i sembrant en placa suplementada amb els antibiòtics adequats per una correcta selecció de les cèl·lules supervivents. Cal fer-ho amb una dilució suficient per tenir colònies clarament aïllades (10-40 colònies/placa), després d'incubar a 37° C durant 14 h.

Es pica una única colònia (per assegurar un fons genètic únic) sobre un pre-cultiu de medi 2xTY esterilitzat en autoclau i suplementat amb els antibiòtics de selecció. S'incuben les cèl·lules a 37° C i agitació de 200 r.p.m durant un període d'entre 12 i 16 h (que ens assegura que el cultiu arriba a la saturació).

S'utilitza aquest precultiu per inocular (entre 0,5 i 2% del volum total de cultiu, tot i que en alguns casos es pot optar per percentatges més alts) els cultius de 2xTY estèrils i altre cop suplementats amb els antibiòtics de selecció (que s'afegeixen un cop els medis s'han atemperat després de sotmetre'ls a 121° C durant 20 min.).

Els cultius es van créixer a 37° C amb agitació constant (150 - 200 r.p.m) més o menys vigorosa segons la soca utilitzada, seguint el seu creixement per determinació de la densitat òptica a 600 nm (DO600) fins a 0,3 - 0,6 altre cop en funció de la soca. En aquest punt es va recollir 1ml de suspensió. Els cultius es van atemperar 20 min. a la temperatura d'inducció, i es va provocar la sobreexpressió per addició de l'element desencadenant, l'IPTG, a una

concentració final d'entre 0,2 - 1mM. Segons les condicions òptimes establertes en cada cas, que també ens determinaran el temps necessari per aconseguir uns bons nivells d'expressió. Típicament aquest temps es mou entre les 3 - 4 h. per condicions més severes, i tota la nit per les condicions d'inducció més suaus.

La combinació dels factors de concentració d'IPTG, temperatura, i temps d'inducció pretenen arribar a un compromís entre tenir la màxima quantitat de proteïna possible i que la majoria d'ella es mantingui en forma soluble. Al final de la inducció es recull 1 ml de la suspensió i abans de continuar el procés es comprova que la sobreexpressió ha funcionat correctament analitzant, en un gel de poliacrilamida una mostra d'extracte total, abans i després d'induir.

21.2.- Obtenció dels extractes cel·lulars.

Els passos a seguir de forma general per obtenir la fracció soluble d'un extracte cel·lular es descriuen a continuació, tot i que en cada cas particular caldrà afinar les condicions per adaptar-los a les característiques de cada proteïna. Tot i així l'esquema bàsic seria:

Es centrifugen els cultius a 5.000 r.p.m durant 10 min. a 4° C per recol·lectar les cèl·lules en forma de pellet i poder-ne eliminar el medi. En aquest pas el pellet que es forma és bastant consistent, de manera que el fre de la centrifuga es pot posar al màxim per parar-lo més ràpidament sense perill de que les cèl·lules es resuspenguin.

Mantenint en gel en tot moment el pellet, aquest es resuspèn en tampó de lisi. El tampó de lisi es prepara a partir del Tampó A (Taula 21) afegint-hi EDTA a una concentració final de 0,5 mM, lisozim a 1 mg/ml, i una pastilla del cocktail de inhibidors de proteases Complete-mini EDTA free (Roche) per cada 10 ml de tampó utilitzat. Tots aquest elements s'afegeixen per tal d'inhibir les proteases cel·lulars que s'alliberaran al trencar les cèl·lules i que podrien degradar la proteïna recombinant. La inhibició, pot ser directa com és el cas de les pastilles comercials que inactiven les serin i cistein-proteasas, o de forma indirecta com l'EDTA que és un agent quelant de cations divalents com el calci el qual resulta imprescindible per l'activitat de moltes proteases. El paper del lisozim és totalment diferent ja que és capaç de trencar enllaços del peptidoglicà, i per tant s'encarrega de debilitar la paret cel·lular i facilitar el posterior trencament.

La suspensió de cèl·lules en tampó de lisi s'incuba en gel o a 4°C durant 20 min. Aquesta incubació només es realitza si, efectivament, s'ha afegit lisozim al tampó i inclús en aquests casos pot ser necessari obviar la incubació quan es treballa amb una soca de cèl·lules especialment sensibles o se sap que la proteïna recombinant es degrada amb facilitat.

Per trencar les cèl·lules i alliberar el seu contingut al medi, es sonica la suspensió. Se li apliquen 5 pulsos de 30 s. a una potencia de 30 W, mantenint en tot moment la suspensió en gel i deixant intervals d'un minut entre pulsos (traient la sonda del tampó) per evitar que la mostra s'escalfi en excés i es pugui degradar. Aquestes no són unes condicions absolutes sinó que s'hauran de variar en funció de l'aspecte de l'extracte. Típicament es parteix d'una solució blanquinosa d'aspecte lletós però fluid que s'acaba tornant més groguenc per l'alliberament d'una proteïna de *E. coli*, i més viscosos per efecte de l'ADN.

Les suspensions es centrifuguen a 12.500 r.p.m durant 30 min. a 4 °C per separar la fracció soluble de les restes cel·lulars com membrana, paret..... En aquest punt caldrà observar amb atenció el sobrenedant obtingut. Si aquest és clar i translúcid el procés haurà finalitzat aquí, però si s'observa terbolesa ens està indicant que hi ha una gran quantitat d'ADN en solució que farà la mostra viscosa i, per tant ,més difícil de purificar de manera que caldrà eliminar-lo. Per fer-ho s'afegeix solució de sulfat de protamina al 1% (p/v) en una proporció d'extracte-sulfat de 7:1, i s'incuba 20 min. a 4 °C. El sulfat de protamina s'uneix a l'ADN i força la seva precipitació. Per eliminar el precipitat i acabar d'aclarir el sobrenedant, es centrifuga a 15.000 r.p.m durant 30 min. a 4 °C. En aquest punt s'ha de tenir en compte que el pellet queda unit al tub amb poca força i podria saltar si no fem una frenada de la centrifuga suau. El sobrenedant final obtingut s'utilitza com a extracte proteic per dur a terme la purificació.

21.3.- Purificació dels enzims recombinants

El procés de purificació utilitzat està íntimament relacionat amb el procés previ de clonatge ja que en el nostre cas ens ha marcat l'elecció del vector d'expressió a utilitzar. El mètode de purificació escollit va ser la Cromatografia d'Afinitat amb Cations Metàl·lics Immobilitzats (IMAC).

El sistema es basa en la interacció forta que es dona (a través d'enllaços de coordinació) entre determinats aminoàcids de les proteïnes (principalment la histidina), i els ions metàl·lics que prèviament s'han immobilitzat en una matriu absorbent.

Aprofitant aquesta propietat, en el clonatge es va utilitzar un vector que afegeix a la seqüència de la proteïna recombinat un fragment extra d'ADN (anomenat etiqueta o tag en anglès) que codifica per 6 histidines en disposició terminal. Aquest afegit ens permet, gràcies a la seva gran afinitat pel níquel, purificar la nostra proteïna eficientment en un únic pas.

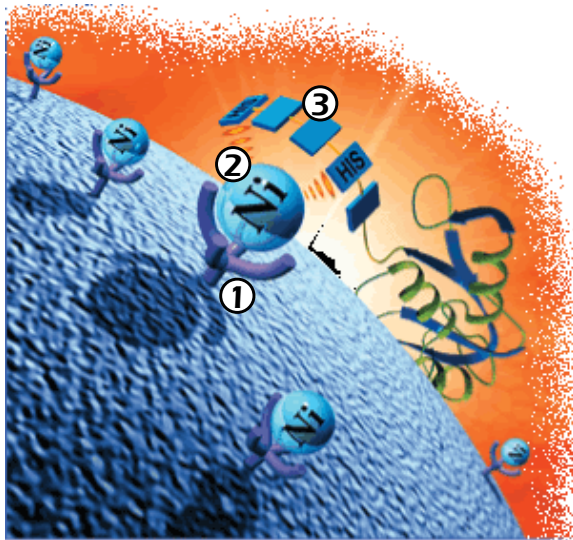


Figura 9. Visió tridimensional de la interacció que s'estableix entre els residus d'histidina de la proteïna i el catió de níquel(II). 1) Matriu de sepharose amb el braç espiador que captura el níquel. 2) Molècula de níquel que actua com a element de coordinació unint-se a la matriu i capturant la proteïna a través de les histidines. 3) Detall de la interacció establerta entre les histidines que ocupen les posicions de coordinació i el níquel. En la il·lustració es mostra com la cua d'histidines no altera significativament l'estructura nativa de la proteïna i es disposa com un fragment afegit a ella.

A nivell esquemàtic, la purificació consisteix en fer passar l'extracte cel·lular per una columna prèviament carregada amb Ni^{2+} , de manera que la nostra proteïna, per afinitat, quedarà retinguda pel metall mentre que la resta entrarà i sortirà sense alterar la seva marxa. Un cop han passat totes les proteïnes sobrants, recuperem la nostra proteïna purificada utilitzant un anàleg estructural no proteic de les histidines (Imidazol) aplicat de manera que s'estableix una competència entre les histidines i l'imidazol per ocupar les posicions de coordinació del níquel. A partir d'una determinada concentració d'imidazol, aquest desplaça la nostra proteïna provocant la seva elució. La quantitat d'imidazol necessari, varia en cada cas segons la proteïna que porta la cua d'histidines, la disposició N o C-terminal de la etiqueta, i la disposició d'aquesta en l'espai respecte l'estructura de la proteïna, però típicament ens movem en concentracions de l'ordre de 100 -150 mM.

Per dur a la pràctica aquesta tècnica existeixen dues metodologies bàsiques, el sistema FPLC en el que es treballa amb columnes de níquel pre-empaquetades i un cromatògraf de líquids que aplica els diversos tampons a un flux constant i controlable, o el sistema de *batch* en el que es treballa amb resines que contenen el níquel immobilitzat en columnes de polipropilè on el flux ve marcat per la gravetat. En el primer cas es manté un control constant sobre el procés amb el cromatògraf i permet una monitorització en temps real de la evolució de la cromatografia a través dels detectors d'absorbància i conductivitat incorporats. En el segon aquest control no és possible però permet, de manera senzilla, afegir passos de neteja addicionals i permet determinar a priori el volum d'elució amb el que es vol treballar millorant la concentració de proteïna en les fraccions recollides sobretot en els casos en que la quantitat de proteïna recombinant produïda es baixa. En aquest treball s'han utilitzat les dues tècniques amb preferència per la segona opció. Una breu descripció dels passos a seguir es detallen a continuació:

En els dos casos es comença amb un pas comú consistent en el filtrat del sobrenedant obtingut amb un filtre de mida de porus $\Phi=0,22\ \mu\text{m}$. Es du a terme per tal de facilitar el procés i d'allargar el temps de vida útil de les columnes comercials ja que cal evitar la presència de cossos estranys que la puguin obturar.

21.4.- Purificació per FPLC

Es prepara la columna Hi-Trap Chelating HP (1ml) (Amersham Biosciencies) carregant la matriu amb 3 ml de solució de sulfat de níquel 0,1 M amb una xeringa. Es neteja l'excés fent passar 5-10 volums d'aigua i s'equilibra passant-hi 5-10 volums de tampó A (veure taula de composició).

En aquest moment la columna està preparada per iniciar la cromatografia que es va realitza amb l'ajut d'un cromatògraf de la serie AKTA (Amersham Biosciencies)

- 1.- Es fa passar tampó A per la columna fins establir les lectures d'absorbància i conductivitat.
- 2.- Es fixa el zero d'absorbància a 280 nm (longitud d'ona de seguiment de proteïnes) i s'injecta l'extracte fent-lo passar a través de la columna a un flux de 1ml/min
- 3.- Es fa passar un volum gran de tampó A que arrossegi tota la proteïna no retinuda. En aquest punt en el cromatograma apareix un pic d'absorbància que va decreixent fins a recuperar-se el zero.
- 4.- Comença un gradient lineal d'imidazol desde els 10 mM inicials fins a 500 mM que s'aconsegueix variant la proporció de tampó A i B que es fa passar per la columna. En aquest instant es redirigeix la sortida de la columna cap a un col·lector de fraccions que recull volums de 1 ml. En el cromatograma es mostra el gradient i l'increment de conductivitat associat. Quan la concentració d'imidazol és suficient, té lloc la elució de la proteïna que es revela per l'aparició d'un pic d'absorbància a 280 nm. La columna es renta, se li elimina el níquel utilitzant una dissolució d'EDTA 0,5M, es fa passar etanol al 20%, i es guarda a 4°C.

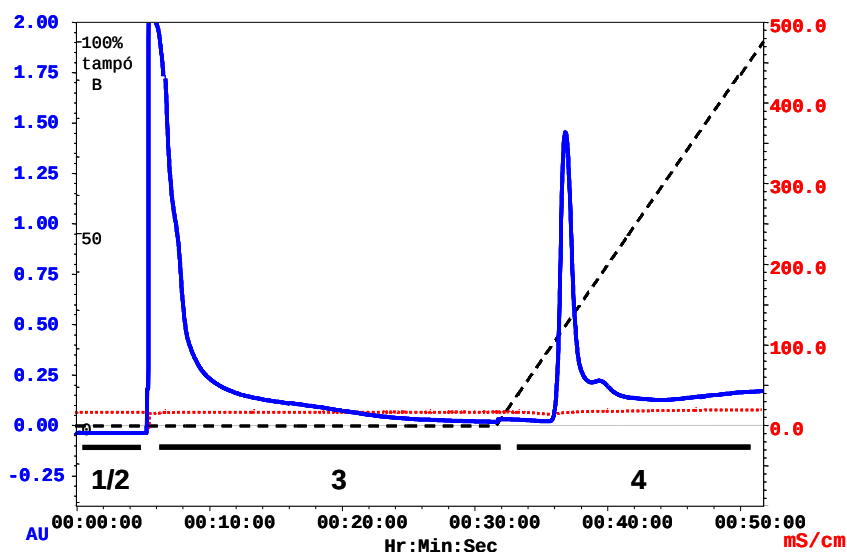


Figura 10. Diagrama model de la monitorització del procés de purificació de proteïnes recombinants per IMAC. La línia en blau mostra l'absorbància a 280 nm, la línia puntejada vermella mostra la conductivitat en mS/cm, i la línia ratllada negra el gradient d'imidazol com a % de tampó B. Els números estableixen la correlació entre les diverses regions del cromatograma i els passos descrits en el protocol.

Composició			
Tampó A		Tampó B	
Tris-HCl	40 mM	Tris-HCl	40 mM
NaCl	100 mM	NaCl	100 mM
NaN ₃	0,04%(p/v)	NaN ₃	0,04%(p/v)
2-Mercaptoetanol	4 mM	2-Mercaptoetanol	4 mM
Imidazol	10 mM	Imidazol	500 mM
pH	8.0	pH	8.0

Taula 24. Composició dels tampons utilitzats per dur a terme la purificació de les proteïnes recombinants per cromatografia d'afinitat (IMAC) en FPLC. Un cop preparats, els tampons es passaven per un filtre de mida de porus $\Phi=22\ \mu\text{m}$, i es desgasificaven per evitar la presència de bombolles a l'interior de la columna. La composició varia en funció de la proteïna purificada especialment en el pH. La quantitat de NaCl per evitar interaccions iòniques inespecífiques pot variar entre 100-500 mM. L'azida sòdica actua com a conservant de manera que no és necessari quan es fa un ús immediat dels tampons. La presència o no de l'agent reductor mercaptoetanol està intimament lligada a la naturalesa de la proteïna purificada.

21.5 Purificació en Batch

1.- Al sobrenedant (20 ml) ja filtrat se li afegeix la resina Ni-NTA (el volum es fixa tenint en compte que la capacitat de retenció de la resina es mou al voltant de 10 mgProteïna/ml) i es manté en agitació constant durant 1h treballant a 4°C. La resta del procés també és recomanable realitzar-la en una cambra freda.

2.- Es carrega la mescla en una columna de polipropilè i es deixa sedimentar la resina a l'hora que es recull la fracció corresponent a les proteïnes no unides al níquel.

3.- Es neteja la columna primer amb tampó A (5 volums de columna) i després amb 5 volums de tampó de rentat (tampó A + 20 mM Imidazol) per eluir les proteïnes unides de manera no específica.

4.- S'elueix la proteïna amb diversos volums de tampó d'elució (tampó A + 150 mM Imidazol) d'entre 0,5 i 1ml en funció de la concentració final desitjada.

21.6.- Producció de proteïnes marcades amb seleno-metionina en BL21

La soca BL21 es pot créixer en condicions d'auxotrofia per metionina utilitzant un medi que elimina la biosíntesis d'aquest aminoàcid. Aquest es un medi mínim amb concentracions incrementades per a determinats aminoàcids.

Solucions Stock:

1. Solució Salina (1L): Es pot autoclavar o alternativament filtrar per esterilitzar-la.

K_2HPO_4	28g
KH_2PO_4	8g
$(NH_4)SO_4$	4g
Na+Citrate	1g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4g

2. Solució de Glucosa:

Es preparen 100ml d'una solució 2M de glucosa

S'esterilitza per filtració a través de mida de porus de 0,22 μm . En aquest cas no es pot autoclavar la solució.

3. Solució d'aminoàcids (0.5 L)

0,1g de cada un dels següents aminoàcids. (0,2 mg/ml):

•Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteïna, Àcid Glutàmic, Glicina, Histidina, Prolina, Serina, Triptòfà, Tirosina, Glutamina, Àcid Aspartic.

0,25g de cada un dels següents aminoàcids. (0,5 mg/ml):

•Isoleucina, Leucina, Lisina, Fenilalanina, Treonina, Valina.

Els aminoàcids es dissolen agitant la solució entre 60-80°C. S'ajusta el pH final a 7,5. Esterilitzar per filtració, mai autoclavant.

4. Solució de Seleno-Metionina.

Es prepara una solució fresca de SeMet a una concentració de 10 mg/ml.

5. Solució de Tiamina (Vitamina B1)

200 mg de tiamina en 50 ml d'aigua. (4mg/ml)

Filtrar, no autoclavar.

Guardar a temperatura ambient.

A partir dels diferents stocks es prepara:

Stock	Medi Cultiu _{O/N} (1L)	Medi (10 ml)
Solució Salina	200 ml	2ml
Solució Aminoàcids	200 ml	2ml
Tiamina	8 ml	80 µl
Solució de Glucosa	16 ml	160 µl
Seleno-Metionina	5 ml	5µl
Aigua estèril	560 ml	5,6 ml

Afegir-hi els antibiòtics de selecció adequats en cada cas

Taula 25. Preparació de medis de cultiu per a la producció de proteïnes recombinants marcades amb seleno-metionina.

Procediment a utilitzar:

Per aconseguir habitar el cultiu bacterià al medi de cultiu és recomanable créixer el precultiu inicial a partir del qual es farà l'inòcul, ja en medi mínim (utilitzant metionina enlloc de seleno-metionina) durant un mínim de dotze hores. D'aquesta manera s'aconsegueix reduir el temps que el cultiu necessita per assolir la densitat òptica òptima per iniciar la inducció de l'expressió

de la proteïna recombinant, i es millora la quantitat produïda d'aquesta. En tot cas no es un requisit indispensable de manera que alternativament es podria créixer el precultiu en un medi com el LB.

Treballant en medi mínim s'incrementa el temps de creixement del cultiu fins a pràcticament duplicar-se, però la resta de paràmetres optimitzats per assolir el millor balanç entre la quantitat de proteïna i la quantitat d'aquesta que es manté soluble no es modifiquen. Per tant es treballa en les mateixes condicions de temperatura, concentració d'agent inductor (IPTG), i temps d'inducció establerts prèviament.

22.- Anàlisi de les fraccions purificades.

22.1- Electroforesi en gels de poliacrilamida SDS.

L'anàlisi de les diferents mostres, ja siguin extractes totals/parcials o fraccions purificades, es va dur a terme utilitzant la tècnica de l'electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate PoliAcrilamide Gel Electrophoresis). Aquesta tècnica permet una separació efectiva i senzilla de les proteïnes que conformen una mostra.

El fonament de la separació és la creació d'una xarxa molecular porosa que dificulti l'avenç de les proteïnes quan aquestes són atretes per la força d'un camp elèctric. En funció de la seva mida, les proteïnes tindran més o menys facilitat per superar els porus de manera que les petites es mouran ràpidament mentre que les més grans ho faran amb major dificultat resultant en un patró de separació final. Per crear aquesta xarxa utilitzem l'acrilamida i la bisacrilamida com a elements estructurals, i les molècules de APS (persulfat amònic) i TEMED (tetrametilendiamina) com a elements iniciadors de reacció. El TEMED inicia una reacció redox cedint un electró a l'APS, que genera un radical sulfat. Aquest radical interacciona amb un monòmer d'acrilamida produint un radical nou, de manera que s'inicia una reacció en cadena per la qual l'acrilamida donarà lloc a un polímer lineal. En aquest punt és on entra la bisacrilamida que en la seva estructura disposa de dos punts susceptibles de formar radicals així que s'intercala entre cadenes d'acrilamida i s'uneix entre elles generant una xarxa porosa homogènia.

Una altra característica de la tècnica de la electroforesi en presència de SDS es el fet d'utilitzar aquest detergent aniònic tant en el propi gel com en el tampó de càrrega que s'afegeix a la mostra. Una molècula de SDS s'uneix a cada dos aminoàcids de la proteïna, de manera que tota proteïna de la mostra independentment de la seva càrrega inicial acaba tenint un gran excés de càrrega negativa que és sempre la mateixa si ho establim com una relació massa/càrrega. Aquest fet permet que la càrrega, que en condicions normals seria un factor

clau per definir la mobilitat electroforètica de les proteïnes, s'anul·li com a factor i deixi únicament la mida molecular com a paràmetre de separació.

Així, modulant la porositat del gel, les propietats del tampó de separació, i els paràmetres de l'electroforesi es poden afinar al màxim les condicions per arribar a una resolució òptima.

Preparació d'un gel de PA			
Gel Separador (15%)		Gel Apilador	
H ₂ O destil·lada	2812 µl	H ₂ O destil·lada	2870 µl
Ac/Bis (40%)	2585 µl	Ac/Bis (40%)	500 µl
Tris Hcl 1'5M	1950 µl	Tris Hcl 1'5M	500 µl
SDS 5%	100 µl	SDS 5%	40 µl
APS 10% (P/V)	50 µl	APS 10% (P/V)	40 µl
TEMED	3 µl	TEMED	4 µl
TOTAL	7500 µl	TOTAL	4000 µl

Taula 26. Composició dels dos gels que conformen un gel d'electroforesi SDS-PAGE. Ac/Bis es correspon a la solució comercial que barreja Acrilamida i Bisacrilamida i APS al persulfat amònic, (Sigma) que es prepara en aigua destil·lada cada vegada de nou. L'acrilamida en la seva forma monomèrica és neurotòxica de manera que cal treballar sempre amb guants. Volums òptims per preparar dos gels en sistemes de 0,75 cm de profunditat.

Mètode:

1.- Ensamblar el sistema de preparació dels gels Mini-Protean II (Bio-Rad) per formar un compartiment totalment estanc. Afegir-hi el gel separador (veure composició) fins a una alçada aproximada de 5 cm i tot seguit amb compte, un petit volum d'isopropanol. Aquest últim element compleix una doble funció: Per una banda ens assegura que el gel separador presenti un perfil perfectament horitzontal, i per l'altre evita el contacte directe del gel amb l'oxigen atmosfèric el qual és un inhibidor del procés de polimerització de manera que ens ajuda a reduir el temps d'espera. Es deixa evolucionar la polimerització 30 - 45 min. controlant que aquest no passi d'una hora, ja que l'alcohol podria acabar provocant la deshidratació del gel.

2.- Eliminar l'isopropanol per decantació i acabar de secar bé la superfície amb un paper de filtre. S'afegeix el gel apilador fins l'extrem superior dels vidres i fins que es desbordi per assegurar que en encaixar-hi la pinta formadora dels pous, no s'introdueix cap bombolla d'aire. Aquest segon procés de polimerització és molt ràpid i en 20-25 minuts es completa, però no és fins passades un parell d'hores que es pot assegurar la homogeneïtat de la mida de porus al llarg de tot el gel. Típicament s'ha utilitzat un sistema de vidres de 8 cm d'alt per 10 cm d'ample amb profunditats de 0,75 o 1 cm.

3.- Passar el gel a la cubeta d'electroforesi generant un compartiment aïllat en la regió central. Omplir aquest compartiment superant els pous, per comprovar que el sistema no té pèrdues. En cas afirmatiu, s'omple de tampó d'electroforesi la resta de la cubeta.

4.- Es preparen les mostres i es mesclen amb el tampó de càrrega 4x en una relació de volums mostra-tampó, 3:1. El tampó consta de dos elements bàsics, el glicerol que permet donar a la mostra la densitat suficient com perquè es pugui deixar caure dins dels pous, i el blau de bromofenol que és una petita molècula de coloració blava que ens marcarà l'avenç de l'electroforesi. La mescla resultant es tracta a 95°C per assegurar la desnaturalització de les proteïnes i es centrifuga 5 minuts a 10.000 r.p.m

5.-Finalment, carregar el volum estimat de mostra per córrer una quantitat de proteïna adequada al tipus d'anàlisi, típicament entre 2 i 20 µg, omplint els pous buits amb un petit volum de tampó de càrrega 1x per aconseguir un avenç totalment uniforme. Es deixa lliure un dels pous per introduir un patró de marcador de pesos moleculars comercial.

6.- Aplicar un voltatge d'entre 100 i 175 V i deixar evolucionar fins que el front marcat pel blau de bromofenol arribi a l'extrem inferior del gel (en alguns casos pot ser convenient deixar evolucionar la electroforesi més enllà de la pèrdua del front).

Es treu el gel del seu suport, i les proteïnes ja separades es tenyeixen amb una solució de Coomassie Blue incubant entre 10 - 30 min en funció de la seva antiguitat (es pot recuperar i reutilitzar diverses vegades). Per poder veure el resultat ja només cal destenyr la coloració blava de fons amb una solució de destinció aplicada en un primer pas de 10 min., i un segon de temps variable. En cas que el temps de destinció sigui excessiu i es perdi senyal, es pot tornar a tenyir el gel per recuperar-la.

Tampó Electroforesi		Tampó Càrrega 4x	
Tris -HCl	0,25 M	Tris -HCl (6,8)	250 mM
Glicina	1,92 M	2-Mercaptoetanol	4%
SDS	1 % (p/v)	SDS	8%(p/v)
		Glicerol	40 %(v/v)
		Blau de Bromofenol	0,02% (p/v)

Taula 27. Composició dels tampons d'electroforesi i de càrrega, respectivament. El tampó de càrrega també compleix la missió de desnaturalitzar totalment la proteïna per la presència del detergent SDS i l'agent reductor 2-mercaptoetanol que trencarà els possibles ponts disulfur que puguin estar formant els residus de cisteïna de les proteïnes.

Revelat			
Solució Tinció		Solució Destinció	
Coomassie R-250	0,2 % (p/v)	Metanol	20 – 40 % (v/v)
Metanol	40 % (v/v)	Àc. Acètic	10 % (v/v)
Àc. Acètic	10 % (v/v)	Aigua	Fins 100 %
Aigua	50 % (v/v)		

Taula 28. Composició de les dues mesclures que intervenen en el revelat de les proteïnes presents en un gel de poliacrilamida. S'utilitza una variant del mateix reactiu que tenyeix en el mètode de Bradford (Bradford, 1976) per la solució de tinció. En la solució de destinció la quantitat de metanol defineix la força de decolorant. Normalment, s'utilitzen proporcions del 40% per destenyir membranes de PVDF mentre que el 20 i el 30% es reserven per destenyir els gels. La quantitat de metanol també determina la mida final del nostre gel ja que si utilitzem quantitats elevades d'alcohol, el gel patirà una lleugera deshidratació reduint parcialment la seva mida.

En general, en aquest treball s'ha utilitzat la electroforesi SDS-PAGE amb dues finalitats. La primera, l'observació de bandes de sobreexpressió de les proteïnes recombinants i la segona, la comprovació dels processos de purificació d'aquestes proteïnes tant pel que fa a la mida esperada, com a la presència d'altres proteïnes o bandes resultants de degradació de la pròpia proteïna.

22.2 Determinació del contingut en proteïna. Mètode de Bradford

La quantitat de proteïna total en una mostra, es va determinar utilitzant el mètode de Bradford (Bradford, 1976) Aquest mètode es basa en la coloració blava que adquireix el colorant Coomassie Brilliant Blue G-250, (Sigma) en unir-se a les proteïnes. El reactiu, es pot comprar a cases comercials com Bio-Rad però la seva preparació no és complicada així que s'aprofita per elaborar-lo al propi laboratori segons la metodologia que es descriu a continuació:

Per una preparació de 100 ml finals prepararem:

- Pesar 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma)
- Diluir-los en 5 ml d'etanol al 95 %.
- Afegir amb compte 10 ml d'una dissolució d'àcid fosfòric al 85 % (p/v).
- Enrasar-ho fins al volum final de 100 ml en matràs aforat.

Un cop preparada la solució, que té un temps de vida útil superior a un any a temperatura ambient, es pot utilitzar per fer les determinacions adaptant el mètode a plaques de 96 pous que ens permeten treballar amb volums petits amb alt nivell de confiança. Per interpolar els resultats de les nostres mostres utilitzem una recta patró obtinguda a partir de diverses solucions estàndard preparades a partir d'una solució mare d'albumina sèrica bovina preparada en aigua o, alternativament, en tampó PBS (aquestes solucions es poden conservar durant un llarg període de temps a -20°C°). Existeix una relació lineal entre l'absorbància determinada a

595 nm front una concentració de proteïna de fins a 750 µg/ml. En la practica utilitzem una recta patró amb concentracions de 100, 200, 400 i 600 µg/µl d'albumina.

El reactiu de Bradford "casolà" dona una coloració amb un to marró que absorbeix lleugerament a la longitud d'ona a la que estem mesurant. Per tant resulta important preparar una mostra sense proteïna per fixar el zero d'absorbància del mètode i pot ser interessant també incloure un blanc amb 200 µl d'aigua sense reactiu.

Tant la recta patró com les mesures de les diverses dilucions de la mostra a analitzar (cal fer varies dilucions per assegurar que alguna d'elles caigui en la regió central de la recta) es llegeixen per duplicat aplicant, en cada cas, 10 µl de la solució proteica, i 190 µl del reactiu colorant (aplicant el volum gran sobre el petit aconseguirem homogeneïtzar instantàniament la barreja). Es deixa evolucionar el color 10 min. fins que s'estabilitza i es llegeix l'absorbància en un lector de plaques.

És important recalcar que aquest mètode presenta una bona exactitud i precisió en l'anàlisi intra-grup però aquest decreix molt quan l'anàlisi és inter-grup. Per aquest motiu no és recomanable utilitzar les dades d'una recta anterior per interpolar les dades d'un segon assaig independent sinó que cada determinació ha de tenir associada la seva recta patró.

23.- Assaigs complementaris

23.1.- Western-blot.

El Western-blot és una tècnica molt sensible i de gran especificitat que utilitza un anticòs per detectar selectivament una proteïna concreta (antigen) en una mostra complexa resolta sobre un gel de poliacrilamida i transferida a una membrana (nitrocel·lulosa o PVDF). La seva elevada sensibilitat radica en el fet que el senyal resultant de la detecció s'amplifica en els dos passos successius en els que un segon anticòs reconeix i s'uneix al primer, i l'enzim que porta acoblat anticòs secundari catalitza una reacció d'emissió quimioluminiscent que s'acaba recollint sobre un pel·lícula fotogràfica o sistema electrònic sensible (LAS 4000. Fujifilm)

Mètode:

A partir d'un gel de poliacrilamida sense tenyir, on s'han separat les proteïnes de la mostra en funció de la seva mida, s'elimina la part del gel apilador i es renta la resta amb solució de transferència durant 10 min.

S'activa la membrana de PVDF (Hybond-p, Amersham Biosciences) de 8,5 x 5,5 cm submergint-la uns segons en metanol i després es renta amb aigua i s'equilibra en la solució de transferència.

Per fer la transferència s'han utilitzat dos sistemes diferents: **A) El sistema humit** Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad), que consta d'un cassette on es manté la membrana en contacte amb el gel de poliacrilamida, protegint el sistema a banda i banda amb 3 fulls de paper Whatmann 3MM i una esponja. El conjunt s'acoba a una cubeta amb dos elèctrodes paral·lels que deixa un espai reservat per afegir-hi un bloc de gel. El bloc s'encarregarà d'evitar un increment excessiu de la temperatura per efecte de la resistència que es genera en aplicar una diferència de potencial. **B) El sistema semi sec** Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell (BioRad) en el que el tractament previ de gel i membrana son idèntics així com també l'ús de papers Whatmann. Les esponjes i el cassette desapareixen ja que el conjunt es situa entre dues superfícies que actuen d'electrodes i que únicament són mullades amb la solució de transferència eliminant-se per tant la fase humida. En aquest punt, en qualsevol dels dos sistemes és important comprovar que la polaritat és correcta per tal d'assegurar que les proteïnes es transfereixen cap a la membrana de PVDF i no cap als fulls Whatman. En el moment d'unir gel i membrana és bàsic que ens assegurem que no es formin bombolles entre les dues capes i si fos així caldria eliminar-les mullant el conjunt i arrossegant l'aire amb l'ajut d'una pipeta. Una bombolla en el camí de la proteïna cap a la membrana farà impossible la transferència.

Per gels de 0,75 cm de gruix, s'aplica un voltatge de 110 V durant 1h amb agitació constant per mantenir la temperatura baixa i homogènia en tot moment en el sistema humit. En el cas del semi sec s'aplica un amperatge de 12-15 mA durant 45 min..

Es recupera la membrana i es fa un primer tractament amb tampó PBS (5 ml) durant 5 minuts per rentar-la i un segon tractament de 1h amb tampó PBS suplementat amb el detergent TWEEN al 0,05% (v/v) i llet en pols desnatada 5% (p/v)(Central lechera Asturiana). Amb aquest rentat en presència de llet (rica en caseïna) s'aconsegueix un bloqueig de la membrana per evitar la unió inespecífica dels anticossos amb ella en els passos successius.

S'incuba la membrana durant tota la nit a 4°C amb solució de PBS-Tween-Llet en la que se li ha afegit anticòs primari a la dilució adequada (previament establerta). Rentar la membrana tres vegades amb PBS-Tween (5 ml) durant 5 min., i incubar-la a temperatura ambient durant 30 min en presència de anticòs secundari unit a peroxidasa de rave (en PBS-Tween-Llet) en la dilució adequada.

Finalment, es renta 4 vegades amb PBS-Tween i una amb PBS durant 5 min. Un cop neta, s'inicia el procés de detecció incubant la membrana durant 5 min. en el mínim volum de la solució comercial ECL+Plus i mantenint-ho en tot moment protegit de la llum. Passat el temps

es col·loca la membrana en una funda de plàstic transparent i s'elimina excés de reactiu amb paper secant aprofitant per treure les possibles bombolles del sistema.

La obtenció del resultat es fa per contacte de la membrana amb una pel·lícula d'autoradiografia, fent varies proves a diversos temps d'exposició fins a obtenir una bona resolució. Típicament de l'ordre de segons o pocs minuts. Les noves tecnologies permeten l'ús de sistemes de detecció a través de càmeres fotogràfiques com en el cas dels detectors LAS 3000 i LAS 4000 de Fuji.

La membrana es pot reutilitzar per provar noves dilucions de l'anticòs o per exposar-la a nous anticossos. Per fer-ho cal eliminar els dos anticossos incubats en un procés anomenat *stripping* i que es descriu a continuació:

- Rentar la membrana 3 cops amb PBS 5 min.
- Incubar-la 30 min. a 50°C en Solució S (veure composició)
- Fer 2 rentats més amb volums grans de PBS durant 10 min.

A partir d'aquí es pot re-empendre l'anàlisi per Western-blot desde el pas del bloqueig de la membrana, aquest inclòs.

Tampó Transferència 10x		Solució S	
Tris	140 g	Tris -HCl 1M (6,8)	3,12 ml
Glicina	30 g	2-Mercaptoetanol	350 µl
Aigua	Fins 1L	SDS (10%)(p/v)	6,25 ml
Metanol	10%	Aigua	Fins 50 ml

Taula 29. Composició de les dues solucions necessàries per fer una assaig de Western-blot. Pel tampó de transferència podem partir d'un stock 10x que diluïm i en el moment de la dilució i incorporem un 10% de metanol, però la solució S és recomanable preparar-la en el moment de fer-la servir.

Tècniques aplicades a Plantes

24.- Extracció ràpida de DNA genòmic a partir de plàntules d'*A.thaliana*.

1. Recollir 2–4 plàntules (segons estat de creixement) de cada línia a analitzar en un microtub i congelar en N₂ líquid.
2. Homogeneïtzar el teixit amb l'ajut d'un micromorter o aparell TissueLyser mantenint en tot moment el material congelat.
3. Afegir 400 µl de tampó TENS i vortejar uns segons a baixa intensitat per homogeneïtzar la suspensió sense exercir un excés de força mecànica sobre el gDNA.
4. Centrifugar a temperatura ambient a màxima velocitat durant 5 minuts i transferir el sobrenedant a un nou tub, evitant recollir les restes de teixit.
5. Promoure la precipitació del gDNA afegint 1 volum d'isopropanol i incubant un mínim de 30 min. A temperatura ambient.
6. Centrifugar a temperatura ambient i màxima velocitat durant 15 minuts. Si la quantitat de teixit de partida es baixa el sediment que es genera no es sempre obvi a ull nu de manera que resulta de gran utilitat marcar la posició del tub en la centrifuga per evitar destruir la mostra amb la punta de pipeta durant els posteriors rentats.
7. Eliminar el sobrenedant amb compte i afegir-hi 500 µl d'Etanol al 70% per rentar el sediment.
8. Centrifugar 5 minuts a màxima velocitat i temperatura ambient, eliminar totalment el sobrenedant i assecar el sediment a l'aire. La presència d'etanol en la mostra pot interferir posteriors aplicacions del gDNA extret però un excés de secat també pot dificultar la total i homogènia resuspensió d'aquest.
9. El sediment es resuspèn en 30-50 µl de tampó EB (Tris-HCl 40 mM pH 8).

El mètode es ràpid però poc refinat de manera que en el sediment, junt amb el gDNA, queden restes cel·lulars que no es solubilitzen en el tampó però no impedeixen que si ho faci el DNA genòmic.

Tampó TENS:

200 mM Tris-HCl, pH 7,5
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5% SDS

25.- Extracció de proteïnes

Protocol: (mantenir en tot moment tant el tampó com les mostres en gel)

1. Recollir al voltant de 50 mg de teixit, pesar-lo amb exactitud i congelar-lo en un microtub en nitrogen líquid.
2. Moldre el teixit en el Tissue Lyzer sense que aquest es descongeli fins a assolir una pols uniforme el màxim de fina possible.
3. Per cada miligram de teixit afegir 3µl de tampó TKMES a la mostra i agitar suaument amb el vórtex.
4. Centrifugar durant 15 minuts a 2500g (5x103 r.p.m en centrífuga de sobretaula) i recuperar el sobrenedant en un microtub nou.

5.Repetir el pas 4.

Buffer TKMES (per a mantenir a 4°C)

100 mM Tricina-KOH pH 7,5
10 mM KCl
1mM $MgCl_2$
1mM EDTA
10% (w/v) sacarosa

En el moment d'utilitzar, cal afegir-hi els següents reactius de manera que la concentració final de cada un d'ells sigui la indicada a continuació:

0.2 % (v/v) Triton X-100
1mM DTT
100 µg/mL PMSF
3 µg/mL E64
20 µL/mL *protease inhibitor cocktail* (Sigma)

La concentració de proteïnes del sobrenedant es determinen pel mètode de Bradford. Les extraccions de proteïnes es guarden a -20°C o alternativament a -80°C en el cas d'utilització a llarg termini (previa congelació en nitrògen líquid).

25.- Preparació de Cèl·lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens*

1. Iniciar un precultiu de 10 ml de medi YEB estèril suplementat amb els antibiòtics necessaris en funció de la soca utilitzada, a partir d'una colònia aïllada d'*A.tumefaciens*. (C58C1- pGV2260:Rifampicina i Ampicilina; GV3101- pMP90:Rifampicina i Gentamicina) Incubar a 28°C i 200 r.p.m durant aproximadament 16h
2. Inocular 100 ml de medi fresc estèril suplementat amb els mateixos antibiòtics que en el primer pas, amb un 1% del volum final. Incubar a 28°C i 200 r.p.m fins a assolir una D.O600 entre 0,5 i 1. Aquesta densitat òptica s'aconsegueix típicament amb una incubació d'entre 14 i 20 hores en funció de la saturació del precultiu utilitzat per l'inòcul.
3. Centrifugar els cultiu a $4,5 \times 10^3$ r.p.m i 4°C durant 5 minuts. A partir d'aquest moment cal tenir molta cura de mantenir les cel·lules en gel en tot moment i dur a terme tots els tractaments amb compte ja que aquestes cel·lules són molt més propenses al lisat per forces mecàniques.
4. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cel·lules suaument amb 10 ml de solució de NaCl 0,15M estèril prèviament refredada en gel.
5. Centrifugar la suspensió cel·lular a 5×10^3 r.p.m i 4°C durant 5 minuts, eliminar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 1ml de solució CaCl₂ 20 mM estèril prèviament refredat en gel.
6. Distribuir les cel·lules en alíquotes de 125 µl, congelar-les en nitrogen líquid i guardar-les a -80°C.

25.1.- Transformació de cel·lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens*.

1. Deixar descongelar en gel una alíquota de cel·lules competents d'*Agrobacterium* preparades segons el protocol prèviament descrit.
2. Afegir-hi al voltant d'1µg d'ADN, homogenitzar la mescla i mantenir en gel durant 20 minuts.
3. Congelar la mescla en nitrogen líquid durant 1 minut i a continuació provocar un xoc tèrmic incubant-la a 37°C fins que es descongeli totalment. (de l'ordre del minut)
4. Afegir 1ml de medi YEB i incubar a 28°C i 200 r.p.m durant 2-4h
5. Estendre dues concentracions diferents del cultiu en una placa de Petri amb medi YEB sòlid suplementat amb els antibiòtics corresponents a la soca utilitzada, el plasmidi Ti incorporat a la soca i la resistència associada al vector introduït en les cel·lules com a resultat del procés de

transformació (en aquest treball típicament Kanamicina per la incorporació del vector binari pCAMBIA).

6. Incubar la placa a 28°C durant 2-3 dies protegida de la llum fins a creixement visible de colonies..

26.- Transformació d'*Arabidopsis thaliana*

El procés de generació de plantes transgèniques no és tècnicament complicat però en canvi sí que requereix d'una inversió en temps considerable. És per aquest motiu que resulta de vital importància extreure els controls que assegurin que cada un dels passos es desenvolupa segons la previsió inicial. Seguint aquesta premissa el primer pas a dur a terme és la comprovació per PCR de colònia de la incorporació del vector que inclou el T-DNA (típicament un promotor i un gen). Durant la durada d'aquest treball

26.1- Condicions de creixement d'*Arabidopsis thaliana*

La transformació d'*A.thaliana* utilitzant *A.tumefaciens* com a vehicle és un procés relativament agressiu per la planta ja que implica un procés invasiu de caràcter infecciós. Per aquest motiu és important utilitzar material vegetal sa i fort, és a dir amb una quantitat de biomassa suficient i un sistema d'arrels consolidat. Per aconseguir aquestes característiques es creixen les plantes a baixa densitat (4 o 5 plantes per testos de 9x9x9 cm³) ja sigui sembrant directament les llavors, o passant-les a terra un cop s'ha desenvolupat l'estat de plàntula en placa de medi MS estèril. Es creixen les plantes en condicions de 8h de llum i 16h d'obscuritat (fotoperíode de dia curt) un mínim de 16 dies per potenciar la fase vegetativa i aconseguir un increment en la biomassa de la roseta basal. Seguidament es passa a un fotoperíode de dia llarg (16h de llum i 8h d'obscuritat) per induir l'inici de la fase reproductiva i per tant la floració. Per a millorar l'eficiència de la transformació cal dur-la a terme en el moment en el que la quantitat de botons florals sigui màxim. Es pot incrementar la densitat de botons florals per planta tallant-ne la tija per la base. D'aquesta manera es redueix el fenomen natural de la dominància apical potenciant-ne així l'aparició de tiges laterals i per tant la densitat de botons florals. A l'hora, s'aconsegueix sincronitzar la floració entre els diversos individus. (Clough and Bent, 1998)

Aquesta tècnica permet generar organismes transgènics a partir de la transformació estable de cèl·lules de la línia germinal de manera que el transgen s'incorpora al genoma de la planta transformada i el nou material genètic es transmet en les successives generacions posteriors. La incorporació d'aquest material genètic exogen té lloc, però, de manera atzarosa i per tant la situació del transgen dintre del genoma és diferent en cada esdeveniment de transformació. Aquesta circumstància fa que existeixi la possibilitat de que el T-DNA s'inserti en la regió codificant per tant disruptant-lo, que ho faci suficientment a la vora per alterar el patró d'expressió d'aquest, o simplement es localitzi en una regió del genoma inactiva.

Estadísticament aquest darrer cas és el més probable però degut a que les altres opcions són també possibles, els estudis duts a terme utilitzant plantes transgèniques generades amb aquesta metodologia requereixen del treball amb diverses línies transgèniques independents per assegurar que tot efecte derivat de la presència del transgen és degut realment a aquest, i no és el resultat de l'alteració de gens endògens .

26.2.- Mètode: Immersió floral (Clough and Bent, 1998)

1. Incubar 3ml de medi YEB suplementat amb els antibiòtics adequats segons la soca d'*A.tumefaciens* (C58C1-pGV2260:Rifampicina i Ampicilina; GV3101- pMP90:Rifampicina i Gentamicina) i el vector utilitzats (pCAMBIA:Kanamicina) a partir d'una colònia transformada i comprovada per PCR.
2. Créixer el cultiu a 28°C i 200 r.p.m durant aproximadament 16h fins aconseguir un cultiu saturat.
3. Inocular 500 ml de medi YEB suplementat amb els mateixos antibiòtics que el precultiu amb un 0,5% del volum total. Abans de fer l'inòcul és recomenable comprovar el precultiu amb una PCR equivalent a la de colònia a partir de 1µl del cultiu. També es un moment idoni per preparar un glicerinat mesclant 0,5 ml de cultiu amb 0,5 ml de glicerol 50% estèril.
4. Creixer el cultiu a 28°C i 200 r.p.m durant aproximadament 14-18h
5. Centrifugar a 4000g durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el sediment amb suavitat en 300 ml d'una solució estèril de sacarosa al 5% (p/v).
7. Afegir 90 µl de l'agent surfactant Silwet-77 (0,03% (v/v)) a la suspensió cel·lular i homogeneïtzar amb compte.
8. Submergir la part aèria de la planta (per posar en contacte l'*A.tumefaciens* amb les influorescències) en la solució durant 1 minut evitant mullar les fulles de la rosseta i la terra.
9. Eliminar l'excés de solució amb paper secant, i deixar reposar les plantes, en posició horitzontal, en una bandej a amb paper secant tapada amb plàstic per mantenir una humitat elevada ja que la presència del detergent pot provocar deshidratació en les plantes.

10. Mantenir les plantes en aquestes condicions en situació lumínica de penombra durant 1 o 2 dies fins que s'observa com les inflorescències es corben en busca de la llum.

11. Destapar la safata, posar les plantes en posició vertical i mantenir en condicions ambientals controlades fins que produeixin llavors que es recullen periòdicament.

Els temps de creixement cel·lular varia lleugerament en funció de la soca utilitzada. Així la soca C58C1-pGV2260 presenta un creixement una mica més ràpid que permet arribar a les densitats òptiques desitjades en els temps especificats en el protocol. En el cas de la soca GV3101- pMP90 aquests temps s'incrementen de l'ordre de 6-10 hores.

27.- Esterilització de llavors d'*Arabidopsis thaliana*.

L'esterilització de llavors pel sembrat en placa i creixement en condicions d'esterilitat es pot fer de diverses maneres. Tradicionalment s'ha fet amb vapors de clor amb gran eficiència però un alt nivell de toxicitat. Altres mètodes menys agressius també han demostrat una correcta funcionalitat. En aquest treball s'han dut a terme dos variacions del mateix mètode basat en l'etanol.

Metode1:

1. En un microtub s'incuba una quantitat de llavors màxima equivalent a 50-100µl de volum d'un líquid, amb 500µl d'etanol absolut amb agitació durant 5 min.

2. Les llavors es deixen assecar a l'aire a l'interior de la càmera de flux laminar. Un cop seques estan preparades per ser sembrades o es poden conservar estèrils a temperatura ambient.

Metode2:

1. En un microtub s'incuba la mateixa quantitat de llavors especificada en el metode1 amb 500 µl d'una solució d'etanol 70% + el detergent tritón X-100 al 0,05% agitant vigorosament durant 5 min.

2. S'elimina la solució i s'incuba amb 500µl d'etanol absolut amb agitació durant 10 min.

3. S'assequen les llavors en la càmera de flux laminar.

28.- Anàlisi de pigments de naturalesa isoprenoide.

Per poder realitzar l'anàlisi del perfil de pigments en planta es van utilitzar dues metodologies en funció del tipus d'informació que es volia obtenir. Es va utilitzar un mètode d'extracció més acurat per dur a terme quantificacions, i una versió més senzilla i ràpida per a la determinació qualitativa.

28.1.- Extracció de pigments per a quantificació.

El mètode utilitzat consisteix en una adaptació del descrit per Fraser i col·laboradors (Fraser *et al.*, 2000). El procés es realitza mantenint en tot moment les mostres en fred i protegides de la llum per evitar el fenomen de la fotooxidació.

1. En un microtub pesar la quantitat necessària de teixit i congelar-lo immediatament en N₂ líquid.

Per teixit etiolat es treballa amb quantitats properes als 100mg de teixit fresc.

Per teixit verd es treballa amb quantitats entre els 25-50mg.

Si es vol utilitzar el *tissue lyser* per homogeneïtzar el teixit el rendiment del procés millora si es treballa amb boles de plastic de 3mm afegint-ne una abans i una després de pesar el teixit.

Quan es treballa amb teixit etiolat degut a la morfologia del teixit, l'homogenat que s'obté és més uniforme triturant la mostra congelada en un morter (en fred) o amb un èmbol Dounce.

2. Homogeneïtzar la mostra fins a obtenir una pols molt fina uniforme.

(3.) Per anàlisi en HPLC: Afegir el patró intern cantaxantina (Fluka) en proporció equivalent al 0,1 0/00 del pes fresc de cada mostra. Per aconseguir aquesta proporció afegim Xµl d'una solució de cantaxantina a 0,1 mg/ml per cada X mg de pes fresc de mostra.

4. A cada tub afegim 400µl de metanol i resuspenem la pols de teixit agitant vigorosament la mescla en un vòrtex 5-10 s.

5. Agitar el conjunt de mostres en un agitador multitubs vigorosament durant 30 min.

6. Afegir 400µl de solució: Tris-HCl 50 mM pH 7,5 NaCl 1M. Afegim una fase aquosa amb una elevada força iònica que reté el gruix de molècules polars de l'extracte.

7. Agitar el conjunt de mostres en un agitador multitubs vigorosament durant 10 min.

8. Afegir a cada mostra 400µl de cloroform. Per polaritat el cloroform extreu entre d'altres molècules d'elevada polaritat com els lípids, el conjunt de carotenoides.
9. Agitar el conjunt de mostres en un agitador multitubs vigorosament durant 3 min.
10. Centrifugar les mostres a 16x103g i 4°C durant 5 min.
11. De cada mostra en recuperem el volum de la fase orgànica, que per la densitat del clorofom (1,48 g/ml) queda en la part inferior, evitant recollir la interfase.
12. Evaporar fins a sequedat el dissolvent en un Speed Vac. En aquest punt les mostres es poden conservar a -80°C per resuspendre-les i fer les mesures en dies posteriors.
13. Resuspendre el residu sec en un volum de 50 µl d'acetat d'etil. L'acetat d'etil és un dissolvent extremadament volàtil de manera que després de resuspendre el residu sec cal mantenir els tubs tancats hermèticament i fer les mesures en el menor interval de temps possible per no alterar els valors obtinguts.

28.2.- Extracció de pigments per anàlisi qualitatiu.

1. En un microtub pesar la quantitat necessària de teixit i congelar-lo immediatament en N2 líquid.

Per teixit etiolat es treballa amb quantitats properes als 100mg de teixit fresc.

Per teixit verd es treballa amb quantitats entre els 25-50mg.

Si es vol utilitzar el tissue lyser per homogenitzar el teixit el rendiment del procés millora si es treballa amb boles de plastic de 3mm afegint-ne una abans i una després de pesar el teixit.

Quan es treballa amb teixit etiolat degut a la morfologia del teixit, l'homogenat que s'obté és més uniforme triturant la mostra congelada en un morter (en fred) o amb un èmbol Dounce.

2. Homogeneïtzar la mostra fins a obtenir una pols molt fina uniforme.
3. Afegir 300-500 µl d'acetona i mantenir en agitació vigorosa la suspensió a 4°C i en obscuritat durant 2-3h.

4. Centrifugar a $10 \times 10^3 g$ durant 10 minuts i recuperar la major part del sobrenedant. Com que l'anàlisi no es quantitatiu, en aquest cas es prioritza la claredat de la mostra tot i que es perdi una petita proporció d'analit. Per aquest motiu es recupera al voltant del 80% del sobrenedant.

Les mostres s'han d'analitzar immediatament i mantenint-les en tot moment a $4^\circ C$ i fora de l'abast de la llum ja que l'estabilitat dels pigments en acetona és limitada. Un dels casos més destacables és el del β -carotè que pateix fenòmens de degradació amb relativa facilitat.

28.3.- Quantificació de pigments per espectroscopia.

Per defecte les mostres extretes segons el mètode de Fraser et al per dur a terme quantificacions de pigments, es van resuspendre en un volum de $50 \mu l$ d'acetat d'etil. Aquestes mostres es van diluir amb acetona fins a un volum final de $800 \mu l$, i es va determinar la seva absorbància en cubeta de quartz de 1 cm de pas de llum.

Per treballar dintre de l'interval de linealitat d'absorbància dels pigments, típicament les dilucions de treball eren (per les quantitats de teixit fresc especificats en l'apartat d'extracció de pigments per l'anàlisi quantitatiu):

Per teixit verd: $25 \mu l$ de mostra i $775 \mu l$ d'acetona.

Per teixit etiolat: $40 \mu l$ de mostra i $760 \mu l$ d'acetona.

Per cada una de les mostres es va realitzar lectura de l'absorbància a diferents longituds d'ona: $470 nm$: Determinació de carotenoides totals, $505 nm$: Determinació de licopè, $661,6$ i $644,8 nm$: Determinació de Clorofil·les A i B respectivament. Aquests valors es corresponen amb les λ_{max} . O coeficients d'absorció màxim específics per cada un dels compostos quan es dissolen en acetona. Per poder arribar a un resultat final de concentració expressat com ng del compost per mg de teixit fresc, s'apliquen les fórmules següents:

$$Ca = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$$

$$Cb = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$$

$$Ca + b = 7,05 \times A_{661,6} + 18,09 \times A_{644,8}$$

$$Cx + c = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times Ca - 63,14 \times Cb) / 214$$

28.4.- Quantificació de carotenoides en *E.coli* (Licopè)

Escherichia coli és un organisme no carotenogènic. Per poder dur a terme l'anàlisi del paper dels diferents enzims de la via MEP en l'acumulació de carotenoides com a producte final cal transformar prèviament les cèl·lules amb un vector que codifiqui per una sèrie d'enzims que permeti la síntesi d'algun d'aquests compostos. En aquest cas es va utilitzar el vector pACCRT-EIB que inclou la seqüència codificant dels gens crtE, crtB i crtI que faculta *E.coli* per a la producció de licopè un pigment de coloració vermella característica. (Cunningham *et al.*, 1993)

Protocol:

1. **Dia1:** Es transforma la soca de *E.coli* escollida amb la construcció que incorpora en cada cas el gen del qual es vol analitzar el seu efecte i es creix tota la nit a 37°C.
2. **Dia2:** A partir de colònies independents s'inoculen, per quadruplicat, 3ml de precultiu líquid LB suplementat amb els antibiòtics necessaris. Es creixen a 37°C i 200 r.p.m durant tota la nit.
3. **Dia3:** Dels 4 precultius crescuts es seleccionen per densitat òptica i intensitat de coloració els tres millors. A partir d'aquests tres candidats i per duplicat s'inoculen, al 1%, 10 ml de medi LB fresc amb els mateixos antibiòtics.
4. **Dia4:** Es deixen créixer els cultius a 37°C i 200 r.p.m durant un mínim de 24h, i es recull una al·lquota de 1,5 ml de suspensió cel·lular en un microtub de 2ml.
5. D'aquests es passen 200µl en un microtub nou i hi afegim 1,8ml de medi LB estèril. Es mesura la densitat òptica a 600 nm per establir el creixement cel·lular de cada mostra.
6. Els 1,3 ml restants s'utilitzen per analitzar la quantitat de carotenoides sintetitzats. A partir d'aquest punt les mostres es mantenen protegides de la llum per evitar processos de fotooxidació.
7. Recollir les cèl·lules centrifugant a 10x103g i 4°C durant 15 min. Si fos necessari el sediment de cèl·lules es pot guardar en aquest punt a -80°C.
8. Eliminar el sobrenedant, afegir 700µl d'acetona per extreure els pigments, i vortexar ràpidament i vigorosament per homogeneïtzar al màxim la solució. (Aquest pas resulta crític en algunes soques de *E.coli* (BL21) que en presència d'acetona tendeixen a formar agregats dels quals pot resultar molt difícil dur a terme una extracció eficient).

9. S'incuba a 55°C durant 10 min.
10. Centrifugar a $10 \times 10^3 g$ a 4°C durant 15 min.
11. Recollir 600 µl del sobrenedant i afegir-ho a un microtub junt amb 400 µl d'acetona.
12. La quantificació es fa per determinació de l'absorbància a 474nm en cubeta de quartz i normalitzat al creixement relatiu de cada una de les mostres.

29.- Aïllament de cloroplasts intactes a partir de plantules o fulles de planta adulta.

Material Biològic

A) Entre 20 i 50 grams de fulles d'Arabidopsis crescudes en terra durant 4-6 setmanes en règim de dia llarg.

B) Entre 15-20 plaques de MS(0,5x-) sembrades amb 150-200 llavors cada una i crescudes en fotoperíode de dia llarg durant 10-12 dies.

Previ: La nit anterior a l'aïllament es descongela a la nevera els tampons CIB4x i HMS10x

1.- Preparació del gradient de Percoll: (en tub de 30/50ml)

13 ml de Percoll

+13 ml de tampó CIB2x

+5mg de Glutatió

- Agitar la mescla per homogeneïtzar-la i dissoldre totalment el glutatió
- Centrifugar a $43 \times 10^3 g$ durant 30min (Sense fre a la centrifuga: brake off) a 4°C
- Treure els tubs en compte i mantenir-los en gel fins el moment d'utilitzar-los.

2.- Recollida del teixit.

- En un vas de 1L afegir aprox. 100 ml de tampó CIB1x
- Recollir el teixit (plantules o fulles) en el tampó en fred.

3.- Homogenar el teixit: (treballant en cambra freda(4°C))

- En un vas de 50 ml afegir 20 ml de tampó CIB1x i una cinquena part del teixit col·lectat

- Homogeneïtzar el teixit amb l'ajut d'un politró amb polsos curts de 2-3 segons a velocitat baixa (2-3 per politrons amb 10 velocitats). Treballant en aquestes condicions una petita part del teixit no queda ben homogeneïtzat però la proporció de cloroplasts aïllats intactes és la òptima.
- Filtrar l'homogenat a través d'una xarxa de niló (miracloth) amb mida de porus de 0,22 µm recollint la suspensió líquida (de color verd intens) en un tub de centrifuga de 250ml que reposi sobre un llit de gel.
- El procés es repeteix 5 vegades per un volum total de homogenat de 100 ml.

4.- Separació dels cloroplasts intactes

- Centrifugar la solució a 1350g durant 5min. a 4°C (acceleració i desacceleració màximes). S'obté un precipitat de color verd molt intens compostat tant per cloroplasts intactes com trencats.
- Eliminar el sobrenedant per decantació i resuspendre els cloroplasts en un volum de 1-2ml de tampó CIB1x. Alternativament es pot aprofitar per fer-ho amb el tampó residual que queda en el tub després de la decantació. Degut a la fragilitat dels cloroplasts cal dur a terme la resuspensió fent rotar amb suavitat el tub sobre el gel fins a obtenir una suspensió homogènea, mai fer-ho utilitzant una pipeta ja que les forces de tracció poden trencar els cloroplasts.
- Transferir la suspensió amb molt de compte sobre el gradient de Percoll prèviament preparat. Utilitzar una punta de pipeta de volum gran amb la punta tallada per evitar el trencament.
- Centrifugar el gradient amb els cloroplasts a XXXXg durant 10min a 4°C (preferentment en un rotor oscil·lant). S'obtenen dues bandes de coloració verd intens separades en funció de la seva densitat. En la part superior la fracció corresponent als cloroplasts trencats, i en la part inferior una fracció o s'acumulen els cloroplasts intactes.
- Eliminar la banda verda superior de cloroplasts trencats per evitar contaminacions posteriors.
- Amb molt de compte i amb una nova punta tallada, recuperar la fracció corresponent als cloroplasts intactes i passar-los a un nou tub de 30/50ml en fred.
- Per rentar els cloroplasts del Percoll s'afegeixen 30ml de tampó HMS1x i s'homogeneïtza per inversió 2 o 3 vegades
- Centrifugar a 5×10^3 g durant 5 min a 4°C
- Resuspendre els cloroplasts en tampó HMS1x fred. El volum en el que es resuspenhen els cloroplasts varia segons l'eficiència del procés i la finalitat de la mostra però típicament es mou en volums entre 0,3-1,5ml.

Composició dels Tampons:

CIB1x	HMS1x
0,3M Sorbitol	50 mM HEPES/KOH
5mM MgCl ₂	3mM MgSO ₄
5mM EDTA	0,3 Sorbitol
5mM EGTA	pH=8,0
10mM NaHCO ₃	
20mM HEPES/KOH	
pH=8,0	

Taula 30. Composició de treball dels tampons utilitzats per l'aïllament de cloroplasts. Els tampons, de caràcter isotònic, es preparen com a solucions mare CIB4x i HMS5x i es mantenen a 4°C pel seu ús dintre de l'interval de dies o a -20°C durant 6 mesos.

30.- Experiments de marcatge isotòpic

L'ús de molècules marcades isotòpicament és una potent eina pel seguiment d'aquestes a través de les diverses rutes metabòliques. La combinació amb les tècniques analítiques basades en l'espectrometria de masses permet treballar amb isòtops pesants no radioactius com el ^{13}C o ^2H simplificant la metodologia de treball i millorant-ne tan la seguretat com la gestió de residus. Amb aquesta metodologia es va analitzar el procés de Bescanvi (crosstalk) existent entre les dues vies de síntesis d'IPP que coexisteixen en plantes. La via del mevalonat en el citosol i la via MEP en el cloroplasts. Per establir possibles diferències en el control d'aquest intercanvi entre les dues vies es va analitzar el flux en els dos possibles sentits, ja sigui de intermediaris sintetitzats en el citosol dirigits cap al cloroplasts i també dels intermediaris plastídics reorientats cap al citosol. En ambdós casos el seguiment es va fer a partir de l'anàlisi dels nivells d'acumulació de marcatge en els productes finals de cada una de les dues vies implicades. Pigments i clorofil·les com a productes finals en el cloroplast, o esterols com a producte final en el citosol.

En els dos experiments es va utilitzar com a material biològic de partida plantules de 18 dies crescudes en plaques de MS(0,5x-) sota règim de dia llarg suplementades amb [2- ^{13}C]-MVA a una concentració de 4,5 mM o [5,5- ^2H]-DX a 1,25 mM. Complementàriament es van preparar plaques idèntiques a les que s'havia afegit també inhibidors específics de les vies de biosíntesis d'isoprenoides amb l'objectiu d'afavorir al màxim la incorporació dels intermediaris marcats. Així, les plaques que contenien [2- ^{13}C]-MVA es van duplicar afegint-hi mevastatina 10 μM , i les que contenien [5,5- ^2H]-DX afegint clomazona també a una concentració 10 μM .

30.1.- Incorporació de 2H-DOX en esterols per GC-MS

30.1.1 Quantificació d'esterols lliures per GC-MS

Per determinar la quantitat d'esterols en *Arabidopsis thaliana* es va utilitzar un mètode adaptat a partir del descrit en la bibliografia per dur a terme aquesta mateixa mesura en plantes de cotó (Opitz *et al.*, 2008)

- Partim de 50 mg de pes fresc en plantules que es van congelar en N₂(l) i homogeneïtzar
- Afegir 1,5 ml de MeOH/CH₂Cl₂ (2:1), mesclar amb compte i incubar en un bany a 40°C durant 30 minuts (en aquest punt s'afegeix el patró intern de colesterol: 10 µg)
- Vortejar vigorosament i centrifugar per concentrar el residu sòlid i poder separar la fase líquida en un nou vial
- Repetir la extracció una segona vegada i recuperar la fase líquida junt amb la primera.
- Afegir 2 ml de NaCl al 0,8% (en aigua) als extractes, agitar-ho vigorosament i centrifugar a 3500 g durant 5 minuts.
- Amb un pipeta de vidre recuperar la fase orgànica inferior (fracció de CH₂Cl₂).
- Repetir la extracció dues vegades més afegint 2ml de CH₂Cl₂ cada vegada a la fracció aquosa de MeOH/H₂O.
- Ajuntar les fases orgàniques obtingudes i assecar-ho amb una corrent de N₂(g)
- Redissoldre l'extracte amb 0,5 ml de CH₂Cl₂ i filtrar-lo a través d'una pipeta de vidre on s'hi ha introduït una petita bola de cotó (rentada previament amb abundant hexà) per eliminar possibles partícules contaminants.
- Rentar el tub que contenia l'extracte amb 0,5 ml de CH₂Cl₂ adicional i filtrar-lo.
- Portar la fase orgànica que conté l'extracte a sequedat amb un corrent de nitrogen
- Redissoldre amb 200 µl de CH₂Cl₂ i transferir a un vial. Assecar en corrent de nitrogen i redissoldre amb 70 µl de tetrahidrofurà.
- Derivatitzar els esterols afegint 30 µl de MSTFA.

El perfil de compostos extrets es va analitzar injectant 1 µl de mostra en un cromatograf de gasos Hewlett-Packard 6890 a un flux de 2ml d'heli per minut utilitzant una columna DB5-MS (Agilent technology) 30 m x 0,25 mm x 0,25µm. Sense dividir el flux (splitless) aquest es va acoblar a un espectròmetre de masses de quadrupol senzill tipus Hewlett-Packard 5973. Els ajustaments utilitzats van ser: Temperatura de l'injector de 250°C, potencial d'ionització de 70 eV i un rang d'escaneig de 50-300 m/z. El programa de temperatura utilitzat va ser: 200°C durant 2 min, increment fins a 260°C a raó de 15°C/min, i increment fins a 300°C a raó de 2°C/min per acabar mantenint aquesta temperatura durant 5 minuts. En aquestes condicions el patró intern de colesterol apareix a un temps de retenció de *t_r* 11,95 min mentre que el sitosterol (l'esterol més abundant en *Arabidopsis thaliana*) apareix a un temps de *t_r* 14,20 min. Per determinar els nivells d'incorporació del [5,5-2H]-DX en els productes finals de caràcter isoprenoide citosòlics es va mesurar l'abundància natural del ¹³C a partir de mostres crescudes

en medi MS. La incorporació es va calcular extraient l'abundància natural mesurada dels valors crus de les mostres crescudes en presència dels intermediaris marcats per a cada ió representatiu del cluster d'incorporació [M+2] i [M+4] per la inclusió d'una o dues unitats incorporades. La presència d'un doble marcatge en la molècula fa que els increments en la massa en els productes finals es donin a raó de dues unitats per cada unitat d'isoprè ensamblada. (Phillips *et al.*, 2008)

30.2.- Incorporació ^{13}C -MVA en pigments i clorofil·les

30.2.1.- Quantificació de pigments i clorofil·les per LC-MS

- Partim de 50-100 mg de pes fresc en plantules que es van congelar en N₂(l) i homogeneïtzar
- Afegir 2ml d'acetona i mantenir en agitació constant en obscuritat a 4°C durant 3h
- Centrifugar a 3500 g durant 5 min
- Recollir una alíquota de 0,4 ml de l'extracte i afegir-hi 0,1 ml d'aigua.
- La mescla es barreja i es filtra a través d'una pipeta de vidre que contingui una bola de cotó

Les clorofiles i carotenoides de l'extracte es van separar utilitzant un cromatògraf de la sèrie 1100 (Agilent Technologies) injectant 10 µl de mostra en una columna Supelcosil LC-18 RP 75 x 4,6 mm amb una mida de partícula de 3µm. La separació es va fer utilitzant aigua com a solvent A i acetona com a solvent B a un flux de 1ml/min en les condicions següents: Després d'un flux isocràtic de 4 min al 33% de solvent A es va iniciar un gradient lineal fins al 90% de solvent B en 8 minuts, seguit d'un segon gradient fins al 95% de solvent B en 6 minuts. La columna es va rentar en un pas final al 100% de B durant 2 min per acabar tornant a les condicions inicials mantenint-les durant 5 minuts per tornar a equilibrar la columna. El flux de la columna es va dividir en proporció 4:1 (*split*) abans d'entrar a la cambra d'electrospray de l'espectròmetre de masses. La detecció dels ions generats es va dur a terme amb un espectròmetre de trampa iònica ESI Esquire 6000 (Bruker-Daltonics) treballant en mode positiu en un rang de masses 50-1000 m/z. Els ajustaments utilitzats van ser: capillary voltage -4000 V, end plate offset -500 V, skimmer 40 V, exit capillary 158 V, nebulizer gas pressure 25 psi, gas temperature 330°C, drying gas setting 8ml/min

Per determinar els nivells d'incorporació del [2- ^{13}C]-MVA en els productes finals de caràcter isoprenoide plastídics en primer lloc es va mesurar l'abundància natural del ^{13}C a partir de mostres crescudes en medi MS. La incorporació es va calcular extraient l'abundància natural mesurada dels valors crus de les mostres crescudes en presència dels intermediaris marcats per a cada ió representatiu del *cluster* d'incorporació [M+1], [M+2], [M+3]....per la inclusió de una, dues, tres o més unitats incorporades.

31.- Genotipat de línies mutants

Els individus de les línies mutants per inserció de T-DNA es van genotipar com a homozigots, heterozigots, o azigots pel T-DNA mitjançant PCR amb oligonucleòtids propis de l'element insertat, y de la regió genòmica flanquejant al lloc d'inserció d'aquest. En la figura 11 es presenta un esquema de la metodologia general a seguir a partir del cas particular del genotipat de la línia d'inserció SALK 0058 en que el T-DNA s'inserta en la regió codificant del gen *LcyE* d'*Arabidopsis thaliana*. Per la correcta elecció de l'oligonucleòtid flanquejant a la inserció és de vital importància conèixer la orientació del T-DNA.

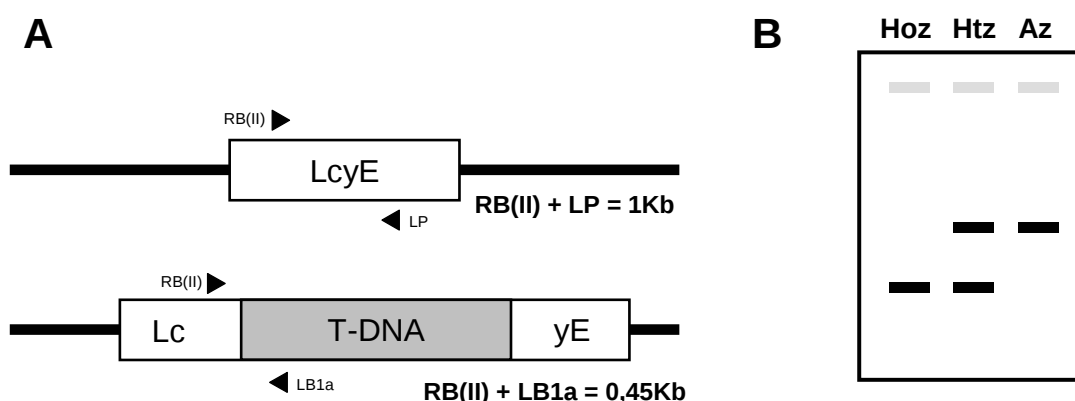


Figura 11. Genotipat de plantes mutants SALK. **Panell A.** Representació esquemàtica de les dues possibles configuracions del gen en estudi en funció de la presència o no del T-DNA. Es detallen els oligonucleòtids utilitzats, així com la seva situació, pel genotipat de la línia d'inserció Salk0058 (gen *LcyE*). S'inclou també les mides de les bandes d'amplificació esperades en cada cas. **Panell B.** Representació del resultat esperable per un genotipat dut a terme segons aquesta estratègia en funció de si el T-DNA es troba insertat en les dues còpies del gen (Homozigot pel T-DNA: **Hoz**), en una de les dues còpies (Heterozigot pel T-DNA: **Htz**) o no es troba en cap de les dues (Azigot: **Az**). Per obtenir un resultat com el mostrat en la figura es poden dur a terme dues reaccions de PCR independents (una per cada parella d'oligonucleòtids) i carregar-les en un mateix pou, o es pot dur a terme una única reacció de PCR amb els tres oligonucleòtids conjuntament. El rendiment de la PCR en el segon cas és menor però en la majoria de casos suficient.

32.- Determinació d'activitat DXS i DXR pseudo-"invivo"

Per poder establir l'efecte de possibles modificacions post-transcripcionals i/o post-traduccionals sobre els enzims DXS i DXR de la via MEP es va dur a terme la determinació de l'activitat d'aquests en un assaig "in vitro" utilitzant els enzims endògens de les plantes analitzades. Aquests enzims es van obtenir a partir de cloroplasts intactes aïllats que es trencaven en el moment de fer l'assaig "in vitro" per alliberar-los i permetre així la seva acció.

Les mesures es van fer a partir de plantules de 10 dies crescudes a dia llarg en plaques de MS(0,5x-). Així:

- A partir d'aproximadament 3g de plantules es van aïllar els cloroplasts intactes per acabar resuspenent-los en 300 µl de tampó HMS segons es detalla en l'apartat XXX
- 100 µl es van centrifugar i resuspendre en el mateix volum de tampó d'extracció mentre la mostra restant es va conservar a -80°C.
- Després d'agitar per homogeneïtzar la mostra, tres al·lotes de 30 µl es van mesclar amb 70 µl de tampó de reacció. (Tampó de reacció DXS o tampó de reacció DXR en cada cas).
- La mescla de reacció es va homogeneïtzar i incubar a 24°C durant 4h amb agitació constant (600 r.p.m)
- Passat aquest temps es van afegir 100 µl de cloroform i vortejar vigorosament per extreure'n tota la fracció liposoluble.
- Es va centrifugar a 13x103 g durant 5 minuts i es va recuperar la fase aquosa (fase superior).

Per determinar la quantitat dels compostos DXP i MEP presents en la fase aquosa resultat de les activitats DXS i DXR respectivament, es va utilitzar un sistema de LC-MS. Les mescles es van separar en un cromatògraf líquid de la sèrie 1100 (Agilent Technologies) injectant 20 µl de la mostra en una columna tipus Luna 51 C18(2) RP LC 250 3 4,6 mm (Phenomenex). La cromatografia es va dur a terme utilitzant trietilamina 2mM en aigua (pH=4,95 ajustat amb àcid acètic) com a solvent A i acetonitril com a solvent B a un flux de 1ml/min en les següents condicions: Separació isocràtica de 5 minuts al 100% de solvent A, un gradient lineal fins a 99% de solvent B durant 10 minuts, un pas final de rentat de la columna de 5 minuts al 100% de solvent B, i finalment un retorn a les condicions inicials pel re-equilibrat de la columna. El flux d'entrada a la cambra d'electrospray de l'espectròmetre de masses es va dividir en una proporció 4:1 (*split*). La detecció de les molècules sintetitzades es va dur a terme acoplant un espectròmetre de masses de trampa iònica tipus ESI Esquire 6000 (Bruker-Daltonics) treballant en mode negatiu en un rang d'escombrat entre 50-800 m/z amb els ajustaments detallats: capillary voltage 4000V, end plate offset -500V, skimmer 40 V, exit capillary -50 V, nebulizer gas pressure 35 psi, gas temperature 330°C, drying gas setting 10ml/min. Les molècules de DXP es van detectar com a ions moleculars de 213 m/z (M-H) pel seguiment de l'activitat DXS mentre les molècules de MEP es van detectar a 215 m/z (M-H).

Per poder comparar els valors d'activitat entre mostres els valors determinats es van normalitzar en base al nombre de cloroplasts utilitzats en cada reacció.

Tampó d'extracció:

Component	[stock]	[final]
Tris-Hcl (pH 8,0)	1M	100mM
Glicerol	100%	10%
Tween 20	100%	0,5%
PVP soluble	Sòlid	1%
Tiamina pirofosfat	Sòlid	100µM
Inhibidors de fosfatases	20mM Imidazol	2mM
	100mM NaF	1mM
	115 mM Molibdat	1,15mM
Ditiotreitol (DTT)	1M	10mM
Ascorbat de Sodi	1M	1mM
Cocktail inhibidors proteasas	Solució Sigma	1%

Tampons de Reacció:

Tampó reacció assaig DXS		Tampó reacció assaig DXR	
Component	[final]	Component	[final]
Tris-Hcl (pH 7,5)	50 mM	Tris-Hcl (pH 7,5)	100 mM
MgCl ₂	10 mM	MgCl ₂	1 mM
Glicerol	10%	DTT	1 mM
DTT	2,5 mM	NADPH	10 mM
TPP	1 mM	DXP	10 mM
Piruvat	10 mM	Imidazol	2 mM
GAP	10 mM	NaF	1 mM
Imidazol	2 mM	Molibdat	1,15 mM
NaF	1 mM	In. Proteasas	1%
Molibdat	1,15 mM		
In. Proteasas	1%		

Taula 31. Composició dels tampons utilitzats per realitzar les extraccions i per realitzar posteriorment els assajos d'activitat DXS i DXR.

32.1.- Determinació de l'activitat DRL per espectrofotometria

Per estudiar la possible activitat DXR de l'enzim DRL es van realitzar una sèrie d'estudis d'activitat enzimàtica "in vitro" per espectrofotometria amb l'enzim purificat mimetitzant les condicions de reacció descrites en la bibliografia per l'enzim DXR de E.coli. (REF). El seguiment de la reacció té lloc en base al decrement en l'absorbància a 340 nm derivat del consum del cofactor NADPH quan aquest s'oxida a NADP⁺ com a resultat de la reducció de DXP a MEP.

Inicialment les reaccions es van dur a terme en cubetes de 1ml per després adaptar-les a volums molt menors en plaques ELISA de 96 pous. Les condicions de reacció utilitzades van ser:

33.- Determinació de l'estat d'oligomerització de DRL per exclusió molecular.

La gel filtració o cromatografia d'exclusió molecular és una tècnica que permet separar un ampli ventall de biomolècules com proteïnes, pèptids, o àcids nucleics en funció de la seva mida molecular. La capacitat separadora resideix en la matriu del gel que consta d'esferes poroses microscòpiques típicament formades per unions entre llargs polímers d'agarosa i dextrà que formen una complexa xarxa tridimensional. El rang de fraccionament depèn directament de la mida d'aquests porus. A grans trets en una mescla complexa les molècules de mida inferior al rang de separació penetren a l'interior dels porus amb facilitat i per tant no elueixen fins que no ha passat un volum a través de columna igual al volum total d'aquesta. En canvi les molècules de mida superior al rang no poden penetrar en els porus i per tant no queden retingudes eluint així en primer lloc en el que es coneix com el volum buit de la columna. Les molècules de mides intermèdies tenen més o menys capacitat de difondre a l'interior dels porus en funció d'aquesta mida i per tant son més o menys retingudes en la columna.

La filtració en gel es una tècnica de purificació senzilla però eficaç en la resolució de mostres complexes de macromolècules que es pot utilitzar amb finalitats analítiques com la determinació de pesos moleculars.

La determinació de l'estat d'oligomerització de la proteïna es va dur a terme per exclusió molecular (gel filtració) en una columna Superdex 200 16/60 (Amersham BioSciences) amb capacitat per resoldre proteïnes en el rang de 10-600 kDa. Es treballava a un flux de 1ml/min i un volum total de 120 ml. La cromatografia es va realitzar utilitzant un tampó Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT i 2 mM MgCl₂. En aquestes condicions la proteïna DRL (de massa molecular estimada de 4,7 kDa) elueix a un temps de retenció de 76,5 min. El calibrat de la columna es va fer utilitzant una barreja de les proteïnes subministrades en els paquets comercials: Gel filtration calibration Kit LMW i HMW (GE Healthcare). Així la mescla de proteïnes utilitzada finalment, i els seus temps de retenció en les condicions de treball es detallen en la taula següent:

Proteïna	Pes Molecular (kDa)	Log PM	Te (min)
Blau de dextrà			
Ferritina	440	2,643	57,03
Aldolasa	158	2,198	67,82
Conalbúmina	75	1,875	75,21
Ovalbúmina	43	1,633	82,63
Anhidrasa carbònica	29	1,462	90,05
Ribonucleasa A	13,7	1,1367	97,85

Taula 32. Relació de proteïnes utilitzades, i els seus temps de retenció en les condicions de treball, per al calibrat de la columna d'exclusió molecular. La mescla final és el resultat de barrejar les proteïnes patró dels paquets comercials de calibrat Gel filtration calibration Kit LMW i HMW.

La estimació de la mida i per tant l'estat d'oligomerització de la proteïna DRL es va obtenir per interpolació en la regressió lineal del temps de retenció enfront del logaritme del pes molecular generat a partir dels patrons de pes conegut. Complementàriament es va dur a terme una cromatografia similar utilitzant una columna Superdex 75 10/300 GL amb capacitat per separar proteïnes en el rang de 3-70 kDa.

L'exclusió molecular es va utilitzar també de manera rutinària durant el procés de cristal·lització de DRL amb l'objectiu d'obtenir una mostra amb elevada puresa i homogeneïtat. A l'hora aquest segon pas de purificació permet eliminar l'imidazol present en la mostra resultat de la purificació prèvia per cromatografia d'afinitat amb níquel.

34.- Determinació de paràmetres cinètics

Per establir els paràmetres cinètics bàsics de l'activitat enzimàtica de DRL com la velocitat màxima i la constant d'afinitat (K_m) pel substrat, es va analitzar el comportament a diverses concentracions d'aquest en les condicions de reacció descrites, treballant en placa de 96 pous a una temperatura de 40°C. Paral·lelament es va realitzar l'assaig per la DXR de E.coli per validar el mètode comparant els valors obtinguts amb els disponibles en la literatura.

Assaig DRL		Assaig DXR	
Component	[final]	Component	[final]
Tris-Hcl (pH 7,5)	100 mM	Tris-Hcl (pH 7,5)	100 mM
MgCl ₂	2 mM	MgCl ₂	2 mM
DTT	1 mM	DTT	1 mM
DXP	variable	DXP	variable
NADPH	0,2 mM	NADPH	0,2 mM
Enzim:DRL	60 µg	Enzim:DXR	3,5 µg
Aigua	Fins 100 µl	Aigua	Fins 100 µl

Taula 33. Mescles de reacció per realitzar les cinètiques de reacció en pous de plaques de 96 pous pels enzims DRL i DXR respectivament.

Les diverses mescles utilitzades es detallen en la taula següent. Les reaccions es van iniciar per addició dels 96 µl de mix final sobre 4 µl de solució de NADPH.

Assaig DRL	Solució stock DXP diluïda 1/4				
	500 µM	100 µM	50 µM	25 µM	15 µM
Mix	28	28	28	28	28
DXP (3,9 mM)	13	2,5	5	2,5	1,5
Aigua	55	65,5	63	65,5	66,5
NADPH	4	4	4	4	4
Volum total	100	100	100	100	100

Les mesures es van realitzar per triplicat i de la mitjana es van determinar els valors dels paràmetres K_m i V_{max} a partir de la representació doble recíproca de Lineweaver-burk. Representant la variació de la inversa de la velocitat inicial envers la inversa de la concentració de substrat, la ordenada es correspon a la velocitat màxima (V_{max}) mentre que el pendent de la recta es correspon al quocient K_m/V_{max} .

35.- Anàlisi de la variació d'activitat en funció de la temperatura

Per estimar la temperatura òptima de l'enzim DRL es va determinar la seva activitat treballant a diverses temperatures en el rang de 30-50°C a intervals de 5°C. Per fer-ho es va preparar una solució Mix amb tots els components de la reacció excepte el cofactor NADPH per evitar-ne l'inici. Una vegada estabilitzada la temperatura de treball per cada mostra, en una placa ELISA de 96 pous es van dipositar 4 µl de la solució de NADPH i s'hi van afegir els 96 µl de mix. La reacció es va deixar evolucionar durant un període llarg de temps per a posteriori establir la regió de linealitat a partir de la qual dur a terme les determinacions d'activitats. L'experiment es va realitzar per triplicat amb les següents mescules de reacció:

Component	[stock]	[final]
Tris-Hcl (pH 7,5)	1 M	100 mM
MgCl ₂	50 mM	2 mM
DTT	100 mM	1 mM
DXP	3,9 mM	0,15 mM
NADPH	5 mM	0,2 mM
Enzim:DRL	3mg/ml	40 µg
Aigua	-	fins 100 µl

Taula 34. Mescles de reacció utilitzades per a la determinació de la variació de l'activitat de l'enzim DRL en funció de la temperatura

36.- Anàlisi de la variació d'activitat en funció del pH.

Per determinar el PH òptim de treball de l'enzim DRL es va mesurar la seva activitat treballant a diversos PH en el rang de 7-9 a intervals de 0,5. Per fer-ho es va preparar una solució Mix amb tots els components de la reacció excepte el tampó que fixa el PH i el cofactor NADPH. Per obtenir mescules equivalents es van mesclar 86 µ de la mix i 10 µ de solució stock de tampó a cada un dels PH a analitzar. Les mesures es van dur a terme a temperatura ambient en una placa ELISA de 96 pous dipositant 4 µl de la solució de NADPH i afegint-hi després els 96 µl de mix final. La reacció es va deixar evolucionar per posteriorment establir la regió de linealitat a partir de la qual dur a terme les determinacions d'activitat. Totes les mesures es van fer per triplicat utilitzant les condicions detallades:

Component	[stock]	[final]
Tris-Hcl	1 M	100 mM
MgCl ₂	50 mM	2 mM
DTT	100 mM	1 mM
DXP	3,9 mM	0,15 mM
NADPH	5 mM	0,2 mM
Enzim:DRL	3mg/ml	40 µg
Aigua	-	Fins 100 µl

Taula 35. *Condicions de reacció utilitzades per a la determinació de la variació de l'activitat de l'enzim DRL en funció del pH.*

37.- Determinació de IC50 de la fosmidomicina sobre l'enzim DRL

La fosmidomicina és un inhibidor competitiu específic de l'enzim DXR (catalitza la segona reacció de la via del MEP) àmpliament estudiat. Degut a les evidències que apuntaven que el mecanisme de reacció de l'enzim DRL estava estretament relacionat amb el descrit per DXR, es va testar la capacitat de la fosmidomicina d'inhibir aquest altre enzim. Es va utilitzar el mètode espectrofotomètric treballant en cubeta de 0,8 ml amb un volum final de 600 µl preparant les mescles de reacció amb tots els components a excepció de la DXP que es va afegir en últim lloc per iniciar la reacció. En un primer bloc d'assajos es va testar un rang ampli de concentracions en les següents condicions:

	DRL	No DXP	FSM 1 µM		FSM 1mM	
			50 nM	500 nM	5 µM	50 µM
Mix	41	41	41	41	41	41
DXP	15	-	15	15	15	15
FSM	-	-	30	0,3	3	30
Aigua	544	559	514	544	541	514
Total	600	600	600	600	600	600

Una vegada comprovat que la FSM era capaç d'inhibir l'activitat DRL es va quantificar aquest efecte mesurant la seva IC50. En aquest cas les mesures d'activitat es van dur a terme en plaques de 96 pous amb volums finals de 100 µl mesclant tots els components a excepció de la DXP que s'afegia per iniciar la reacció. Les mescles de reacció utilitzades en aquest cas van ser:

Component	[]i	[]f	Volum (μl)		Volum (μl)
Tris-HCl 7,5	1 M	100 mM	10	Mix	86
DTT	100 mM	1 mM	1	FSM	10
MgCl ₂	25 mM	2 mM	8	DXP	4
NADPH	5 mM	0,2 mM	4		100
DXP	3,9 mM	0,15 mM	4		
Enzim:DRL			20		
FSM	variable	variable	10		
Aigua			43		
Total			100		

Taula 36. *Condicions de reacció utilitzades per a la determinació del valor de la concentració de FSM que redueix l'activitat de 'enzim DRL a la meitat del seu valor màxim(IC₅₀)*

Per poder treballar amb mescles de reacció idèntiques en volums es va preparar la FSM en forma de banc de dilucions a una concentració deu vegades la concentració final de treball:

FSM (μM)	50	10	2	0,4	0,08	0,016	0,0032
----------	----	----	---	-----	------	-------	--------

El valor de IC₅₀ mesurat es va obtenir de la representació de la corba sigmoïdal d'activitat envers de la concentració d'inhibidor establint-se el punt de disminució de l'activitat enzimàtica a la meitat del seu valor inicial en la regió de màxim pendent de la funció.

38.- Caracterització de l'activitat DRL per UPLC-MS

La espectrometria de masses s'ha revelat com una de les eines analítiques més potents per a la detecció (gracies a la seva elevada sensibilitat) i identificació de compostos ja que en permet obtenir tant la seva massa com dades de caràcter estructural derivades del patró de fragmentació únic associat a cada compost.

Per poder determinar inequívocament la naturalesa del producte de la reacció "in vitro" catalitzada per l'enzim DRL es va incubar una mescla de reacció equivalent a les utilitzades per l'anàlisi de l'activitat de l'enzim DXR a 37°C durant 2h recollint una alíquota de la mescla abans d'afegir l'enzim (t₀) i aturant la reacció escalfant la mescla a 65°C durant 10min. La composició de la barreja preparada es detalla en la **Taula 37**.

Paral·lelament i amb l'objectiu de determinar la dependència de la reacció del cofactor NADPH es van analitzar mescles de reacció en absència del coenzim així com reaccions control per descartar les possibles reaccions no enzimàtiques derivades de la incubació. Aquestes mescles es van incubar de la mateixa manera però en absència de l'enzim recombinant o presència d'un enzim recombinant purificat amb un protocol equivalent però sense capacitat de dur a terme aquestes reaccions. Com a control positiu de l'activitat es va utilitzar l'enzim DXR d'*E.coli*.

MESCLA DE REACCIO:

Component	[stock]	[final]
Tris-Hcl (pH 7,5)	1 M	100 mM
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
DTT	100 mM	1 mM
DXP	3,9 mM	0,78 mM
NADPH	5 mM	1 mM
Enzim:DRL	3mg/ml	15 µg
Aigua	-	-

Taula 37. Mescla de reacció utilitzada pel seu posterior anàlisi per UPLC-MS. La reacció es va incubar a 37°C durant 2h recollint una al·lquota de 10 µl abans d'afegir l'enzim per establir la naturalesa dels components abans d'iniciar-se la reacció. Paral·lelament es van preparar reaccions control amb 15 µg de DXR de *E.coli* o Aigua com a controls positiu i negatiu respectivament.

Les mescles de reacció es van analitzar amb un sistema de UPLC (Acquity-Waters) acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol API3000 (Applied Biosystems). La separació en la cromatografia líquida es va dur a terme amb una columna de ciclodextrines β-OH Nucleodex (Macherey Nagel) de 200 x 4 mm treballant a un flux constant de 0,75 ml/min i una divisió post columna d'aquest (split) de 1:3. El sistema Acquity, equipat amb una bomba binària, es va utilitzar amb acetonitril com a solvent A i acetat d'amoni 10 mM pH 6,5 com a solvent B treballant en un gradient A:B desde 9:1 fins a 4:6 durant 15min. I un fluxe isocràtic de 9:1 fins al minut 20. Els anàlisis de MS i MS/MS es van realitzar en un espectròmetre de masses de triple quadrupol equipat amb una font de turboesprai treballant en mode negatiu amb els següents ajustaments: capillary voltage -3500V, nebulizer gas (N2) 8 unitats arbitràries, curtain gas (N2) 8 unitats arbitràries, collision gas (N2) 4 unitats arbitràries, declustering potential -30V, focusing potential -200V, entrance potential -10V, i collision energy -30V. L'adquisició dels cromatogrames al treballar en mode Full Scan es va dur a terme en un interval de masses (m/z) d'entre 50-800 utilitzant un temps de ciclat de 2s amb una mida de pas de m/z 0,1 i una pausa entre escanejos de 5ms. Els compostos DXP i MEP es van analitzar en el mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) seguint les transicions 213/97 per DXP i 215/97 per MEP en el primer (Q1) i tercer (Q3) quadrupols respectivament. Per aprofundir en la identificació dels compostos presents en la reacció es van realitzar anàlisis equivalents treballant aquesta vegada en el mode Product Ion Scan (PIS). Per obtenir els espectres de masses derivats del patró de fragmentació de cada una de les molècules es va filtrar la mostra seleccionant la massa parental (M-H) en el primer quadrupol (Q1), i aplicar diferents energies de col·lisió en Q2. Pel cas de la DXP es va utilitzar una rampa lineal de -20 a -30V mentre que pel MEP va ser de -20 a -35V. L'optimització de l'energia de col·lisió permet equilibrar la proporció final entre la molècula parental (no fragmentada) i els diversos fragments característics que se'n formen a partir d'ella generant un espectre de masses el màxim d'informatiu. Els fragments generats es separen en el tercer quadrupol (Q3) per finalment ser recollits en el detector.

39.- Cromatografia en capa fina (TLC)

Aquesta és una tècnica clàssica molt senzilla però que pot reportar d'informació molt valuosa a nivell qualitatiu. Esquemàticament, una cromatografia d'aquest tipus es compon d'una fase sòlida estacionària de sílice on s'apliquen les mostres a analitzar, i una fase mòbil de composició variable que avança a través de la matriu sòlida per capil·laritat. La fase estacionària és bàsicament polar, i tendeix a retenir els diferents components de la mostra amb més o menys força en funció també de la seva polaritat. El paper de la fase mòbil és el d'arrossegar aquests components com a resultat de la combinació d'interaccions per polaritats de fase mòbil - fase estacionària, i mostra - fase mòbil que altera la afinitat de la mostra per la fase estacionària. El resultat d'aquest conjunt d'interaccions es reflexa en una diferent mobilitat de cada un dels components sobre la sílice que permet separar amb més o menys resolució cada molècula. Un dels elements clau per aconseguir la millor separació, és la tria de la combinació de components de la fase mòbil.

Per analitzar la reacció catalitzada per l'enzim DRL es va incubar una mescla de reacció utilitzant un enzim acoblat (MCT) capaç de transformar el potencial MEP format per l'acció de DRL en el compost CDP-ME en presència de CTP en el medi de reacció. D'aquesta manera aconseguim desplaçar l'equilibri de masses de la reacció millorant-ne el seu rendiment a l'hora que ens permet obtenir una evidència indirecta de la formació del MEP ja que aquest compost és el substrat utilitzat per l'enzim acoblat. Aquesta estratègia ens permet superar la problemàtica de la difícil separació del substrat (DXP) i el producte de reacció (MEP) de la reacció catalitzada per DRL. Els dos compostos tenen una estructura de 5 carbonis i un grup fosfat combinat amb diversos grups hidroxil que els donen una polaritat pràcticament idèntica. En la bibliografia (s'ha descrit la prèvia defosforilació dels compostos com a única solució per aconseguir la seva separació però la resolució de la mescla no és bona. Les diferències fisicoquímiques es fan més evidents quan intentem separar DXP d'un compost com el CDP-ME a l'hora que la presència d'un sistema de dobles enllaços conjugats en la seva base nitrogenada fa que sigui capaç d'absorbir la llum UV, fet que no es dona en DXP. Aquesta darrera característica permetrà disposar d'un segon criteri diferencial per identificar la naturalesa d'aquests dos compostos si treballem amb una placa de sílice com la 60 F254 (Merck) que incorpora un indicador fluorescent amb una longitud d'ona d'excitació de 254 nm. La reacció detallada es va incubar a 37°C durant 1h i analitzar per cromatografia en capa fina utilitzant la fase mòbil detallada en la taula.

Per obtenir una millor migració dels components i accelerar al màxim el moviment de la fase mòbil, cal utilitzar una cubeta en la que l'aire estigui saturat de fase mòbil: Per aconseguir-ho es posa un paper de filtre a una de les parets de la cubeta i s'afegeix la combinació de

dissolvents esperant el temps suficient com perquè per capilaritat tot el paper quedi humit (en cubeta tapada hermèticament).

Component	[]i	[]f	
Tris-Hcl 7,5	1M	100 mM	Fase mòbil
DTT	100 mM	1 mM	1-propanol:3
MgCl ₂	100	2 mM	Acetat d'etil:6
NADPH	5 mM	1 mM	Aigua:1
DXP	5 mM	1 mM	
Enzim: DRL	-	20 µg	
CTP	50 mM	1 mM	
Enzim: MCT	-	30 µg	
Aigua		Fins 0,1 ml	

Taula 38. Solucions per separació en TLC. **A l'esquerra.** Concentracions utilitzades per la síntesi de CDP-ME a través de les reaccions consecutives catalitzades pels enzims DRL primer i ygbP a continuació. Les concentracions de treball són relativament altes degut a la limitada sensibilitat de la tècnica. **A la dreta.** Composició de la fase mòbil utilitzada en la cromatografia de capa fina.

El revelat de la placa es va fer en dues etapes:

A) Per exposició a la llum ultraviolada de 254 nm.

Les plaques utilitzades incorporen en la matriu sòlida un indicador fluorescent que genera una emissió verda molt intensa quan s'irradia amb una llum UV de 254 nm. A aquesta mateixa longitud d'ona alguns components també són capaços d'absorbir la llum, generant unes marques que es fan visibles pel contrast. Com a norma general, esperarem que absorbeixin a aquesta longitud d'ona, molècules amb dobles enllaços, sobretot en els casos en què se'n trobin varis de conjugats o formant anells aromàtics.

Així podem esperar que donin senyal molècules com l'ATP, l'ADP, el CTP, el CDP, o el CMP com a conseqüència de la base nitrogenada que tots ells incorporen. Així mateix també esperarem poder observar molècules que incloguin aquestes estructures en la seva estructura com seria el cas del CDP-ME.

B) Per tinció amb revelador general de sucres.

La segona tècnica de revelat es complementa molt bé amb l'anterior al posar de manifest la presència de totes aquelles molècules que segueixen l'estructura general d'un sucre, és a dir polihidroxialdehids o polihidroxiketones, per efecte de l'ansaldehyd combinat amb la temperatura.

Després de córrer la placa i fer l'observació a la llum UV, s'aplica en forma d'aerosol, una quantitat moderada de la solució reveladora. Utilitzem el format d'aerosol per evitar que la placa quedi mullada i la base líquida de la solució arrossegui les mostres. Un cop aplicada la solució, cal deixar assecar molt bé la placa a l'aire per, finalment, tractar-la a 100° C en una estufa fins a observar l'aparició d'una sèrie de taques colorejades. El temps estàndard d'aparició es troba al voltant del 15 min. però per un resultat òptim, és recomanable observar l'evolució de la coloració fins arribar al punt en que les mostres queden perfectament definides mentre el fons es manté encara blanc, ja que un excés d'exposició a la temperatura produeix una coloració violeta en tota la placa.

La solució reveladora de sucres es compon de:

- Àcid Sulfúric 3,6% (v/v).
 - Àcid Acètic 1,2% (v/v).
 - p-Anisaldehyd 2,4%(v/v).
- (en etanol absolut).

Cal tenir en compte que l'ordre dels revelats no resulta trivial ja que la solució reveladora de sucres crea una capa que impedeix l'observació de la resposta a la llum UV a posteriori.

40.- Identificació "in vivo" de la reacció catalitzada per la subunitat E1 de de l'enzim piruvat deshidrogenasa E636Q i DHBPS G108S.

Treballs anteriors de recerca de mutants capaços de revertir el fenotip letal associat a la pèrdua de funció de gens de la via del MEP per a l'estudi dels possibles mecanismes que poden desenvolupar els bacteris per sobreviure al bloqueig d'aquesta via van permetre identificar un ampli ventall de soques. Varies d'elles eren capaces de sobreviure tot i l'inactivació del primer enzim de la via, DXS. Entre les diverses mutacions identificades per superar el bloqueig genètic d'aquest primer enzim una d'elles es produïa en la subunitat E1 de l'enzim piruvat deshidrogenasa (aceE). Diferents aproximacions per establir el mecanisme pel qual aquest enzim mutat era capaç de revertir el fenotip letal de la pèrdua de funció de DXS van aportar resultats contradictoris. Aproximacions de tipus genètic suggerien que la forma mutada del gen aceE estava mimetitzant l'acció catalítica de DXS però els estudis bioquímics "in vitro" utilitzant la proteïna mutada recombinant purificada, no recolzaven aquests resultats. Amb l'objectiu d'aclarir aquestes discrepàncies es va dissenyar un experiment per intentar identificar el producte de la reacció catalitzada per la proteïna mutant "in vivo".

Pas1.- Es van amplificar i i clonar en el vector pCRII (que permet una doble selecció per carbenicilina i/o kanamicina) les seqüències dels gens de E.coli dxs, aceE i aceE(E636Q).Es van utilitzar els cebadors DXS-F i DXS-R en el primer cas, i els aceE-1F i aceE-4R pels altres dos.

Pas2.- Es va comprovar que les construccions generades (pel cas de dxs que s'utilitzaria com a control positiu i aceE (E636Q) com a proteïna descrita com a capaç de revertir l'absència del gen endògen dxs) efectivament eren capaces de revertir el fenotip letal. Per fer-ho es van transformar per xoc tèrmic cèl·lules competents de la soca EcAB4-2 (deficients en dxs i que incorporen l'operó MVA+ en el genoma que els permet sobreviure en presència de mevalonat en el medi de cultiu) i es van créixer en plaques de LB complementades amb carbenicilina 100 µg/ml (per seleccionar el vector incorporat) kanamicina 50 µg/ml, cloramfenicol 20 µg/ml i mevalonat 0,5 mM. Es van incubar 18h a 37°C i a partir de colònies aïllades es van fer estries en plaques amb idèntica composició d'antibiòtics però en absència de mevalonat.

Pas3.- Amb les construccions que havien complementat positivament la soca deficient en dxs i la que incorporava el gen silvestre de aceE, es van transformar per xoc tèrmic cèl·lules competents de la soca doble mutant *Escherichia coli* EcAB1-6 dxs::CAT (deficient en els gens dxs i dxr) que incorporaven el plasmidi pBAD-M3 (incorpora 4 gens que faculten a les cèl·lules per sintetitzar IPP i per tant sobreviure al bloqueig genètic de la via MEP, en presència de mevalonat administrat exògenament). Les cèl·lules es van créixer en plaques de LB complementades amb carbenicilina 100 µg/ml (per seleccionar el vector pBAD-M3), kanamicina 50 µg/ml (per seleccionar les construccions incorporades), cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar la disrupció del gen dxs) i mevalonat 0,5 mM. A partir de les colònies obtingudes es va realitzar un últim pas de comprovació del material de partida per l'experiment consistent en una reacció de PCR sobre les colònies per comprovar la presència de les construccions a analitzar utilitzant els oligonucleòtids M13F i M13R. De les mateixes colònies es va confirmar que el gen endogen dxs es trobava disruptat i substituït pel de resistència a cloramfenicol amb la parella d'oligonucleòtids DXS-2F i CAT-2R.

Pas4.- A partir de les colònies obtingudes i comprovades es van inocular 3 ml de medi LB líquid amb idèntica composició i concentració d'antibiòtics utilitzats en placa en presència o absència (com a control) de mevalonat a una concentració final de 0,5 mM. Es va incubar a 37°C i 200 r.p.m durant 14h i a partir dels cultius crescuts amb mevalonat (sense mevalonat no creixien confirmant així la disrupció del gen dxr) es van inocular al 1% 10 ml de medi fresc complementat amb carbenicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/m, cloramfenicol 20 µg/ml i mevalonat 1 mM. Els cultius es van incubar a 37°C i 200 r.p.m durant 24h. Les cèl·lules es separar del medi per centrifugació a 5x10³ r.p.m durant 10 minuts treballant a 4°C i es van guardar a -80°C per al seu posterior anàlisis. Les mostres es van sotmetre a un procés d'extracció de metabolits i posterior anàlisis per cromatografia líquida acoblada a un

espectrometre de masses de triple quadrupol en col·laboració amb el Dr. Lawrence Wright del Max-Planck institute de Jena (alemanya). A les mostres se'ls va afegir un estàndard intern de DXP marcada amb ^{13}C en els carbonis 3, 4, i 5 i es va identificar la presència de DXP en les mostres treballant en mode MRM a partir del seguiment de la transició 213/139 corresponents als pesos de la molècula parental treballant en mode negatiu $[\text{M}-1]$ i la molècula resultant de la seva fragmentació entre els carbonis 3 i 4 (en el cas de l'estàndard intern la transició corresponent seria 216/141 corresponents a la massa amb tres unitats addicionals dels tres carbonis marcats i la molècula fragmentada que només s'incrementa en dues unitats perquè una de les marques isotòpiques, la del carboni 3, es perd durant la fragmentació).

1. Estudi dels factors limitants per a la producció de carotenoides

1.1 L'aport de precursors a través de la via del MEP

1.1.1 DXS i en menor mesura DXR i HDR són enzims clau en la regulació del flux metabòlic de la via del MEP en bacteris.

La síntesi de carotenoides es pot simplificar dividint el procés en dos grans blocs biosintètics (Figura 3). El primer el formaria la via MEP per a la síntesi dels precursors universals IPP i DMAPP a partir de piruvat i gliceraldehid 3-fosfat. El segon el constituïria la ruta pròpiament carotenogènica que a partir d'aquestes precursors produeix el conjunt de compostos que conformen els carotenoides (carotens i xantòfils). L'IPP i el DMAPP són els precursors a partir dels quals es produeixen els carotenoides però també ho són de la resta de compostos de naturalesa isoprenoide com els esterols, tocoferols, monoterpens, o grups prenil entre molts d'altres (Figura 1).

L'aport de precursors pot ser un dels punts limitants per l'acumulació de carotenoides finals (Harker and Bramley, 1999; Lee and Schmidt-Dannert, 2002). Aquests precursors poden ser sintetitzats a través de dues vies alternatives, la via del mevalonat o la via del MEP. La immensa majoria d'organismes utilitzen únicament una d'aquestes vies per a la síntesi dels seus isoprenoides tot i que es coneixen un grup reduït d'ells que disposen de les dues. La via del mevalonat ha estat àmpliament estudiada i es coneix amb detall la seva regulació bàsica. Per la seva banda la via del MEP tot i estar totalment caracteritzada a nivell estructural encara no es coneix en profunditat a nivell de regulació.

Per analitzar quina és la importància relativa de cada un dels set enzims que conformen la via MEP a l'hora de regular-ne el flux cap als productes finals (carotenoides) es va utilitzar un sistema model bacterià basat en *E.coli*. Aquest microorganisme no és carotenogènic, és a dir que no sintetitza carotenoides de manera natural. Per poder utilitzar-lo com a model d'aquest procés es va incorporar un plasmidi (pACCRT-EBI, que també anomenem pLyc) que incorpora les seqüències codificants dels enzims de *Erwinia eudevora* (o *Pantonea ananas*) CrtE, CrtB, i CrtI en forma de cassette sota el control d'un promotor constitutiu fort *Lac* (**Taula7**). La inclusió d'aquests tres gens habilita al microorganisme per a la producció del pigment vermellós licopè a partir de l'IPP endogen (Cunningham et al., 1993). Les cèl·lules de *E.coli* transformades amb aquest vector generen colònies amb un fenotip vermell pàl·lid com a conseqüència de l'acumulació del licopè. Paral·lelament es va clonar la seqüència de cada un dels set gens de *E.coli* que formen la via MEP en un plasmidi d'expressió sota el control d'un promotor induïble per IPTG. La correcta expressió i activitat de les proteïnes produïdes de cada una de les construccions generades es va comprovar per complementació. Es va transformar cada una de les construccions en una soca de *E.coli* deficient en el gen endogen corresponent de la sèrie de soques EcAB4-X descrites en la **Taula4** (on la numeració en X indica en cada cas el gen

disruptat). Aquest grup de soques presenten un fenotip letal com a conseqüència de la disrupció de la via MEP en substituir individualment cada un dels seus set passos per un gen de resistència (mitjançant recombinació homòloga). Per permetre la viabilitat de les soques totes elles tenen integrat en el genoma un operó sintètic (operó MVA) que expressa un grup d'enzims que els possibilita la síntesi de l'IPP que necessiten a partir de MVA subministrat exògenament en el medi de cultiu (Figura 4).

Les soques mutants transformades amb la construcció corresponent es van plaquejar en medi amb ampicilina 100 µg/ml (per seleccionar la incorporació de la construcció), kanamicina 50 µg/ml (per seleccionar la presència de l'operó MVA) i cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar el gen endogen disruptat) en absència de MVA. La capacitat de totes les soques transformades de créixer en absència de MVA demostrava l'existència d'una activitat capaç de complementar la funció perduda com a resultat de la disrupció del gen endogen i per tant el correcte funcionament de les construccions generades.

Una vegada comprovada la funcionalitat de totes les construccions generades, es van utilitzar per determinar la influència de la sobreexpressió de cada un dels enzims sobre la quantitat de producte final (licopè) sintetitzat. Cèl·lules de *E.coli*, amb el plasmidi pLyc incorporat, es van transformar amb cada una de les construccions generades i es van seleccionar en medi sòlid en presència de ampicilina 100 µg/ml (per seleccionar la construcció) i cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar el plasmidi auxiliar pLyc). Cinc colònies independents de cada construcció es van créixer en 5 ml de medi líquid LB suplementat amb els mateixos antibiòtics i les tres de màxim creixement es van utilitzar per inocular medis frescs de 20 ml. Els mateixos precultius es van utilitzar per inocular medis frescs equivalents als anteriors però en els que s'havia afegit IPTG a una concentració final de 0,5 mM per a induir la sobreexpressió dels enzims en estudi. Es van incubar els cultius a 37°C durant 16h i passat aquest temps es va recollir una al·iquota de 1,5 ml. 200 µl d'aquesta al·iquota es van utilitzar per mesurar el creixement cel·lular de cada cultiu en base a la densitat òptica a 600 nm, diluint-los amb medi LB estèril per aconseguir mesures dintre del rang de linealitat del mètode espectrofotomètric. Els 1,3 ml restants es van utilitzar per fer una extracció de carotenoides i quantificar-ne els nivells de licopè acumulats amb un mètode espectrofotomètric mesurant la absorbància dels extractes a 474 nm. Per poder comparar els valors de licopè les mesures obtingudes es van normalitzar en funció del creixement mesurat per a cada mostra i es van relativitzar als valors mesurats per la soca control transformada amb el vector d'expressió buit en absència de l'agent inductor. Per compensar la relativament alta variabilitat biològica observada en el comportament de les soques es van realitzar tres experiments independents fent totes les mesures per duplicat en cada un d'ells per totes les mostres i totes les condicions. Els valors obtinguts dels tres experiments independents es van utilitzar per a un anàlisi estadístic dels resultats segons el test T (Figura 12).

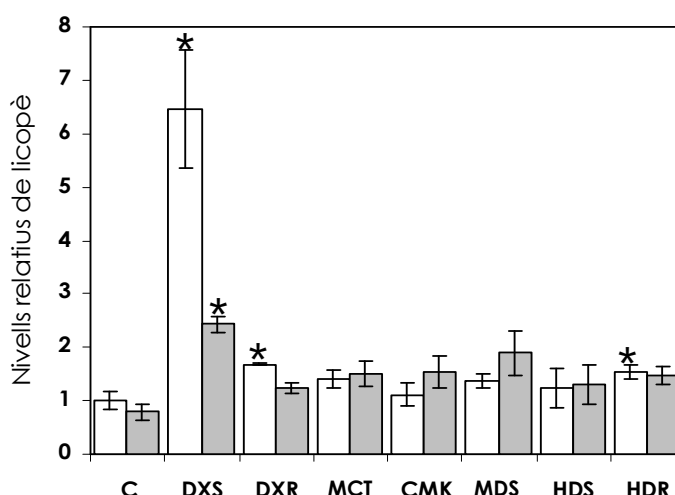


Figura 12. Nivells relatius de licopè acumulats en soques de *E.coli* contenint el plasmidi auxiliar pLyc per facultar les cèl·lules per a la producció de licopè, transformades amb vectors d'expressió per a cada un dels gens que conformen la via del MEP. C: soca control transformada amb el vector buit. Els asteriscs marquen diferències significatives ($p < 0,05$) en relació al control.

A partir dels resultats obtinguts (Figura 12) es pot observar com la sobreexpressió de l'enzim DXS (el primer de la via) genera un increment de més de sis vegades en l'acumulació de licopè respecte l'obtingut per la soca control. També mostraven increments estadísticament significatius tot i que molt menors, les soques sobreexpressores de DXR (el segon enzim de la via) i HDR (l'últim enzim) mentre que no hi havia diferències degudes a la sobreexpressió en la resta dels enzims que conformen la via. L'anàlisi dels resultats també revela el rol negatiu que juga l'IPTG. Les mostres incubades en presència de l'inductor pateixen totes elles un decrement en els nivells de licopè mesurats respecte les mostres equivalents incubades sense IPTG. Especialment destacat es el cas de DXS en que la acumulació es redueix de sis a poc més de dues vegades la mesurada per la soca control. En el cas dels altres dos enzims que havien mostrat increments significatius en absència de l'inductor, DXR i HDR, l'addició de l'IPTG al medi de cultiu va reduir la producció de licopè fins a igualar-la a la de la soca control (Figura 12). Aquest mateix efecte també s'observa en el creixement cel·lular que es veu reduït de manera important en presència d'IPTG en el medi de cultiu. En conjunt aquests resultats posen de manifest el paper limitant que juguen els precursors IPP i DMAPP a l'hora d'afrontar la producció de carotenoides, a la vegada que destaquen el paper predominant de l'enzim DXS en la regulació de la via tot i que aquesta estaria també limitada en dos altres punts DXR i HDR. La rellevància de DXS per al control de la síntesi de precursors i de carotenoides en bacteris es va desenvolupar en una publicació inclosa al final d'aquesta tesi (Rodríguez-Villalón et al., 2008). En la publicació també es reflexa el paper important que poden tenir altres factors com el fons genètic de la soca utilitzada o la capacitat d'emmagatzematge, per tal d'obtenir el màxim rendiment en la producció d'aquests tipus de compostos com són els carotenoides.

1.1.2 HDS no juga un paper limitant en la regulació de la via del MEP ni en bacteris ni en plantes.

Diversos estudis previs realitzats en plantes han demostrat la importància dels enzims DXS, DXR i HDR (Estévez *et al.*, 2001; Carretero-Paulet *et al.*, 2006; Botella-Pavía *et al.*, 2004) sobre la regulació de la via del MEP com a punts de control del seu flux. En els tres casos la seva sobreexpressió condueix a un increment significatiu en els nivells de carotenoides i clorofil·les. Aquests resultats reportats en *Arabidopsis* mostraven un estret paral·lelisme amb els resultats obtinguts amb el sistema bacterià model basat en *E.coli* (Figura12). No obstant, no hi havia publicats estudis per a la resta dels 4 enzims de la ruta en plantes en aquest sentit. Amb el doble objectiu d'aprofundir en l'estudi de la regulació de la via MEP en plantes, i refermar la bona correlació que sembla que es pot establir entre aquest sistema i el bacterià, es va estudiar el paper de l'enzim HDS (penúltim enzim de la via). Un anàlisi comparatiu de seqüència entre les proteïnes HDS de plantes i bacteris havia posat de manifest l'existència d'una regió addicional en l'extrem N-terminal en la seqüència d'*Arabidopsis* (independent del pèptid de trànsit a cloroplast) que no existia en *E.coli* la qual s'havia proposat com una possible regió de regulació diferencial (Querol *et al.*, 2002). Altres estudis en plantes descrivint la participació de HDS en mecanismes de defensa (Gil *et al.*, 2005), de la seva regulació post-transcripcional (Seemann *et al.*, 2005), i del control de la seva activitat enzimàtica associat a la fotosíntesi (Seemann *et al.*, 2006) el convertien en un bon candidat a tenir un paper rellevant per regular la síntesi de precursors dels isoprenoides d'entre els enzims de la via pendents d'anàlisi.

D'aquesta manera es va decidir analitzar l'efecte de la sobreexpressió de l'enzim HDS (també anomenat GcpE o IspG en bacteris) tant sobre el sistema model de *E.coli* com sobre la planta model *Arabidopsis thaliana*, respecte a la acumulació de carotenoides. En primer lloc es va dur a terme la mesura de l'efecte de la sobreexpressió de HDS en l'acumulació de licopè en *E.coli*. Per fer l'anàlisi es va utilitzar la construcció pQE32-GcpE en la que la seqüència codificant pel propi gen *gcpE* s'havia clonat en un vector d'expressió que li afegia un epítip RGS-His en l'extrem amino terminal i que dirigia la seva expressió sota el control d'un promotor T5 induïble per IPTG. En primer lloc es va comprovar que la construcció era capaç d'expressar una proteïna totalment funcional en la que la inclusió de la etiqueta no alterava la seva activitat. Per fer-ho es va fer un test de complementació transformant cèl·lules competents de la soca EcAB4-4 (**Taula4**). Aquesta soca presenta un fenotip letal derivat de la disrupció del gen *gcpE* endogen però integra l'operó MVA sintètic que li permet sintetitzar IPP a partir de MVA administrat en el medi de cultiu. Les cèl·lules es van sembrar en medi LB suplementat amb carbenicilina 100 µg/ml (per seleccionar la incorporació de la construcció), kanamicina 50 µg/ml (per seleccionar la presència de l'operó MVA) i cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar el gen *gcpE* disruptat) en absència o presència de MVA 0,5 mM. En les plaques amb MVA creixien tant els transformants amb la construcció que expressa GcpE, com amb el plasmidi buit ja que en els dos casos la soca reverteix el fenotip letal sintetitzant l'IPP a partir del MVA subministrat

exògenament. En les plaques sense MVA la construcció control no es capaç de permetre el creixement cel·lular mentre que la construcció que expressa GcpE de *E.coli* sí que ho fa (Figura 13A). Aquest resultat demostra la capacitat de la construcció per complementar la deficiència de la soca i per tant confirma que la proteïna expressada per la construcció és totalment funcional i per tant que la inserció de la etiqueta en l'extrem amino terminal no inactiva la seva activitat.

En segon lloc es va mesurar l'efecte de la sobreexpressió del gen sobre l'acumulació de licopè. Per fer-ho, cèl·lules de *E.coli* amb el plasmidi pLyc incorporat, es van transformar amb la construcció pQE32-GcpE i es van seleccionar en medi sòlid LB suplementat amb carbenicilina 100 µg/ml i cloramfenicol 20 µg/ml. Cinc colònies independents de cada construcció es van créixer en 5 ml de medi líquid LB suplementat amb els mateixos antibiòtics i les tres millors es van utilitzar per inocular medis frescs de 20 ml. Els mateixos precultius es van utilitzar per inocular medis frescs en els que s'havia afegit o no IPTG a una concentració final de 0,5 mM. Es van incubar els cultius a 37°C durant 16h i es va recollir una al·iquota de 1,5 ml. 200 µl d'aquesta al·iquota es van utilitzar per mesurar el creixement cel·lular de cada cultiu en base a la densitat òptica a 600 nm. Els 1,3 ml restants es van utilitzar per fer una extracció de carotenoides amb acetona i quantificar-ne els nivells de licopè produïts mesurant la absorbància dels extractes a 505 nm. La quantitat de licopè es va mesurar com a mg de compost produït per litre de cultiu interpolant els valors d'absorbància obtinguts en una recta de calibració obtinguda a partir de quantitats conegudes de licopè comercial com a patró. L'anàlisi estadístic (test-T) de les mesures realitzades per duplicat i de tres experiments independents mostren com la quantitat de licopè acumulat en les cèl·lules transformades tant amb el vector buit com amb el plasmidi pQE32-GcpE no presenten diferències significatives independentment de la presència o no de IPTG (Figura 13C). Aquest resultat confirmaria les observacions fetes amb el mateix gen sense epítot (Figura 12).

Paral·lelament es va utilitzar una segona al·iquota de cada un dels cultius amb i sense IPTG per fer un anàlisi dels nivells de proteïna generats per efecte de la inducció d'expressió. 1 ml del cultiu es va centrifugar i es van utilitzar 7,5 mg de cèl·lules per obtenir-ne un extracte total que es va analitzar per western-blot utilitzant un anticòs primari comercial contra epítot RGS-His (Qiagen) a una dilució 1:2000, i un anticòs secundari anti-conill a dilució 1:5000 unit a la peroxidasa de rave. La quimioluminiscència generada en utilitzar el reactiu comercial de Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents es va enregistrar amb el sistema LAS3000 de Fujifilm a un temps d'exposició de 3 minuts. La immunodetecció mostra com la soca que incorpora el plasmidi control buit no produeix proteïna recombinant RGS-His-GcpE tant en presència o absència de l'inductor (l'anticòs reconeix exclusivament epítot RGS-His de manera que no es genera senyal associat a la proteïna GcpE endògena). En canvi la soca que incorpora la construcció pQE32-GcpE presenta senyal a un pes d'aproximadament 40 kDa que coincideix amb l'esperat per a la proteïna RGS-His-GcpE (Figura 13B). S'observa un senyal

més dèbil en absència d'IPTG que indica una expressió basal, mentre que en presència de l'inductor el senyal s'incrementa molt significativament demostrant l'efecte de la sobreexpressió en la síntesis de la proteïna recombinant.

Estudi previ havien demostrat que la substitució del promotor endogen del gen *gcpE* per un promotor fort provenint del bacteriòfag T5 en soques productores de carotenoides no alterava els nivells d'acumulació d'aquests productes tot i que no es disposava de dades de la repercussió real d'aquest nou sistema en la quantitat de proteïna (Yuan *et al.*, 2006). El nou conjunt de resultats obtinguts demostren que un increment en els nivells de proteïna HDS activa (segons es dedueix dels assaigs de complementació) no tenen repercussió en el nivells finals de licopè. Tot i l'absència d'inductor s'observa un petit increment en la quantitat de proteïna però aquest no provoca canvis en l'acumulació de licopè. La inclusió de 0,5 mM IPTG efectivament genera un increment important en la quantitat de proteïna RGS-His-GcpE i per tant és d'esperar que també en el global d'activitat HDS en la cèl·lula.

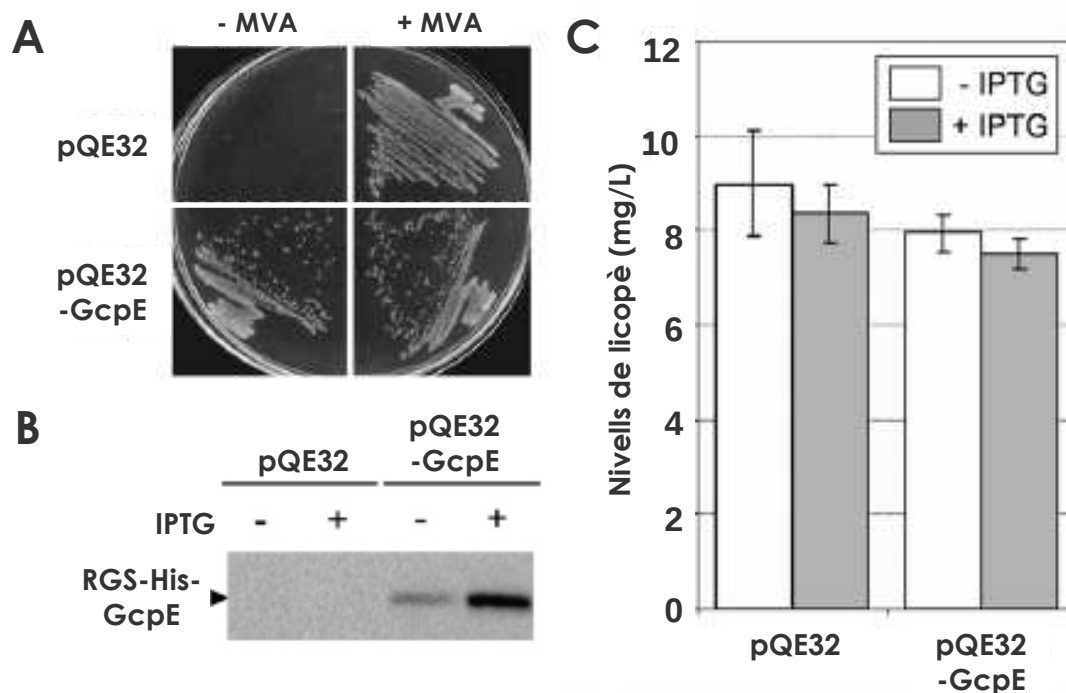


Figura 13. Sobreexpressió de HDS en bacteris. **A.** Complementació de cèl·lules de *E.coli* deficientes en HDS (soca:EcAB4-4) transformades amb la construcció pQE32-GcpE o pQE32 buit. **B.** Anàlisi d'immunodetecció dels nivells de proteïna recombinant RGS-His-GcpE, de cèl·lules BL21(DE3) transformades amb els vectors indicats junt amb el plasmidi auxiliar pLYC per a la síntesi de licopè. Els transformants es van créixer en medi líquid suplementat (+) o no (-) amb 0,5 mM d'IPTG durant 16h. Els cultius es van analitzar per western-blot amb un anticòs contra l'epítot RGS-His. **C.** Nivells de licopè produïts en els cultius descrits en B amb (+) o sense (-) IPTG.

Tot i això, tampoc no es reflecteix en un increment de productes finals comparat amb els obtinguts per la soca control transformada amb el vector pQE32. Els nostres resultats confirmen que la sobreproducció de proteïna HDS activa en cèl·lules de *E.coli* no dona lloc a un increment significatiu en els nivells de carotenoides, el que estaria en consonància amb un paper no limitant d'aquesta activitat per a la biosíntesi d'isoprenoides en bacteris.

Els resultats descrits es van publicar com a part d'un treball adjuntat al final d'aquesta tesi (Flores-Pérez et al. 2010). La segona part d'aquest treball va consistir en estudiar si la sobreacumulació de proteïna HDS d'*Arabidopsis* podria alterar els nivells de carotenoides. Es van utilitzar plantes d'*Arabidopsis* tant silvestres com mutants *clb4-3*, que sintetitzen una proteïna HDS amb pèrdua parcial de funció (Gil et al., 2005). Línies transgèniques amb nivells incrementats de HDS no van mostrar una variació significativa en els nivells de carotenoides totals respecte els mesurats en la planta silvestre. En el cas de les plantes amb fons mutant la pèrdua parcial d'activitat de la proteïna endògena provoca un descens d'aproximadament el 20% en els nivells de carotenoides. La sobreexpressió del gen *HDS* silvestre en les plantes transgèniques de fons *clb4-3* permet recuperar la producció fins als nivells de les plantes silvestres però en cap cas dona lloc a increments per sobre d'aquests nivells (Flores-Perez et al., 2008).

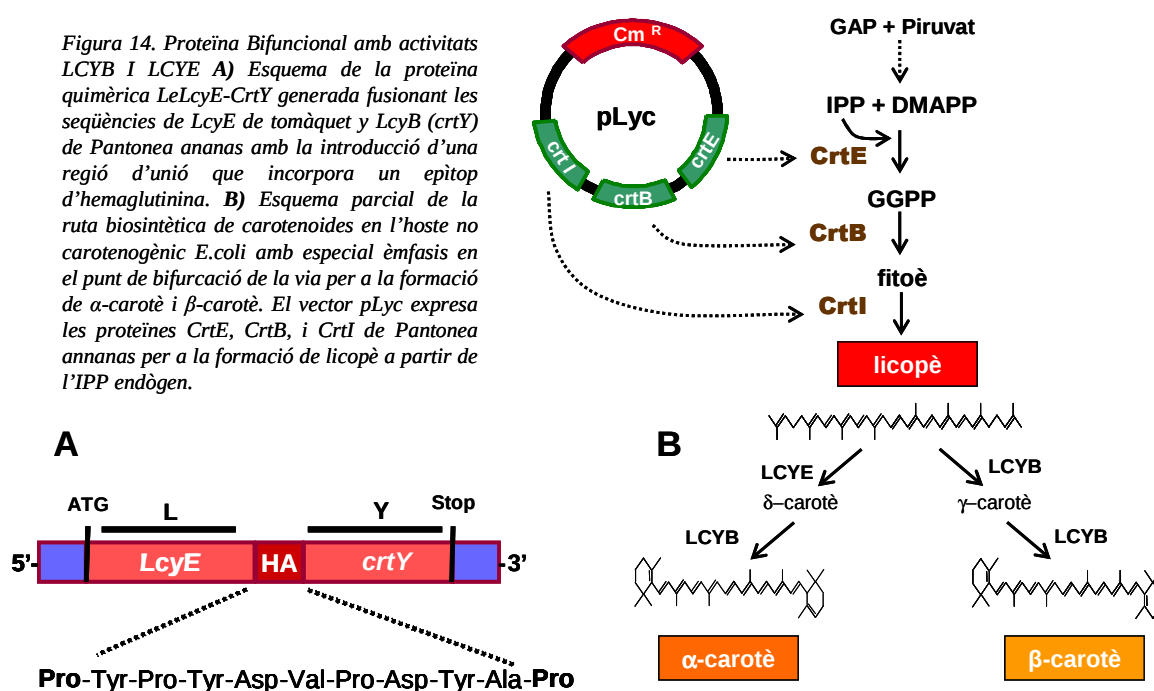
Aquests resultats suggereixen que el coeficient de control de l'enzim HDS en el flux de la via del MEP tant en plantes com en bacteris és massa baix per alterar-lo amb la sobre activació d'aquest pas.

2. Estratègies per a la millora tècnica de l'enginyeria metabòlica

2.1 La utilització d'enzims bifuncionals quimèrics per a l'estudi de la bifurcació de la via carotenogènica i la biotecnologia de carotenoides.

La via carotenogènica en plantes implica un elevat nombre de passos de caràcter enzimàtic fins a la producció dels compostos finals de major interès per a la seva aplicació industrial (Figura 3). Una de les possibles estratègies biotecnològiques que permeti abordar la millora en la seva producció de la manera més senzilla possible podria ser la creació de transgens bifuncionals que en un únic transcrit codifiquin per dues activitats enzimàtiques. Com a prova de concepte hem intentat explorar aquesta possibilitat actuant sobre un punt de gran interès de la via com és la bifurcació biosintètica que es produeix a partir del licopè. Aquesta bifurcació implica la ciclació dels extrems de la molècula de licopè per produir β -carotè per una banda (amb dos anells tipus β) i α -carotè (amb un anell β i un altre ϵ) per l'altre a través de les activitats LCYB i LCYE (Figura 14B).

Figura 14. Proteïna Bifuncional amb activitats LCYB i LCYE A) Esquema de la proteïna quimèrica LeLcyE-CrtY generada fusionant les seqüències de LcyE de tomàquet y LcyB (crtY) de *Pantonea ananas* amb la introducció d'una regió d'unió que incorpora un epitop d'hemaglutinina. B) Esquema parcial de la ruta biosintètica de carotenoides en l'hoste no carotenogènic *E.coli* amb especial èmfasis en el punt de bifurcació de la via per a la formació de α -carotè i β -carotè. El vector pLyc expressa les proteïnes CrtE, CrtB, i CrtI de *Pantonea annanas* per a la formació de licopè a partir de l'IPP endògen.



2.1.1 L'enzim quimèric LCYE-CrtY produeix alfa i beta carotè en E.coli.

Per dur a terme aquesta prova de concepte es va generar una proteïna quimèrica de fusió que reunia en un únic transcrit les activitats LCYE de tomàquet i LCYB (CrtY) de la bactèria *Pantoea ananas*. La construcció LCYE-CrtY (Figura 14A) es va generar seguint l'estratègia descrita (Figura 15).

Per una banda es va amplificar la seqüència de *LCYE* a partir d'una genoteca d'ADNc de tomàquet amb els oligonucleòtids LeLcyE_BamHI(F) i LeLcyE_NoStop(R). El producte de la reacció es va sotmetre a dos cicles addicionals d'amplificació mantenint l'encebador directe i utilitzant els reversos LeLcyE_HA_(R) i HA_NcoI(R) respectivament. El producte resultant es correspon a la seqüència completa del gen *LcyE* a la que s'ha eliminat el codó de parada i se li ha afegit una diana de restricció *Bam*HI en l'extrem 5', i la seqüència corresponent al epítot HA i una diana *Nco*I consecutivament en l'extrem 3'.

Paral·lelament es va amplificar el gen *crtY* de *Pantoea ananas* utilitzant el plasmidi pACCAR16ΔcrtX (Misawa *et al.*, 1995) (Taula7) com a motllo amb els oligonucleòtids ErwCrtY_NcoI(F) i ErwCrtY_RGS_His. El producte es va reamplificar amb el mateix encebador directe i ErwCrtY_His_Sall(R) com a revers per acabar obtenint la seqüència completa del gen sense el codó de parada però amb una cua de 6 histidines i flanquejada per les dianes *Nco*I i *Sall*. En els dos casos es van introduir els gens en dos vectors pBluescript(SK) en la diana roma *Eco*RV amb el sistema de lligació-restricció i per PCR de colònia es va seleccionar la orientació adequada. Seguidament es va tallar la construcció PBSK-CrtY per les dianes *Nco*I/*Spe*I i es va lligar sobre la construcció PBSK-LeLcyE prèviament digerida amb els mateixos enzims generant la construcció PBSK-LY que contenia la seqüència completa que havia de produir la proteïna quimèrica. Finalment es va subclonar en el vector d'expressió induïble per IPTG pQE-30, en les dianes *Bam*HI i *Sall* (Figura 15).

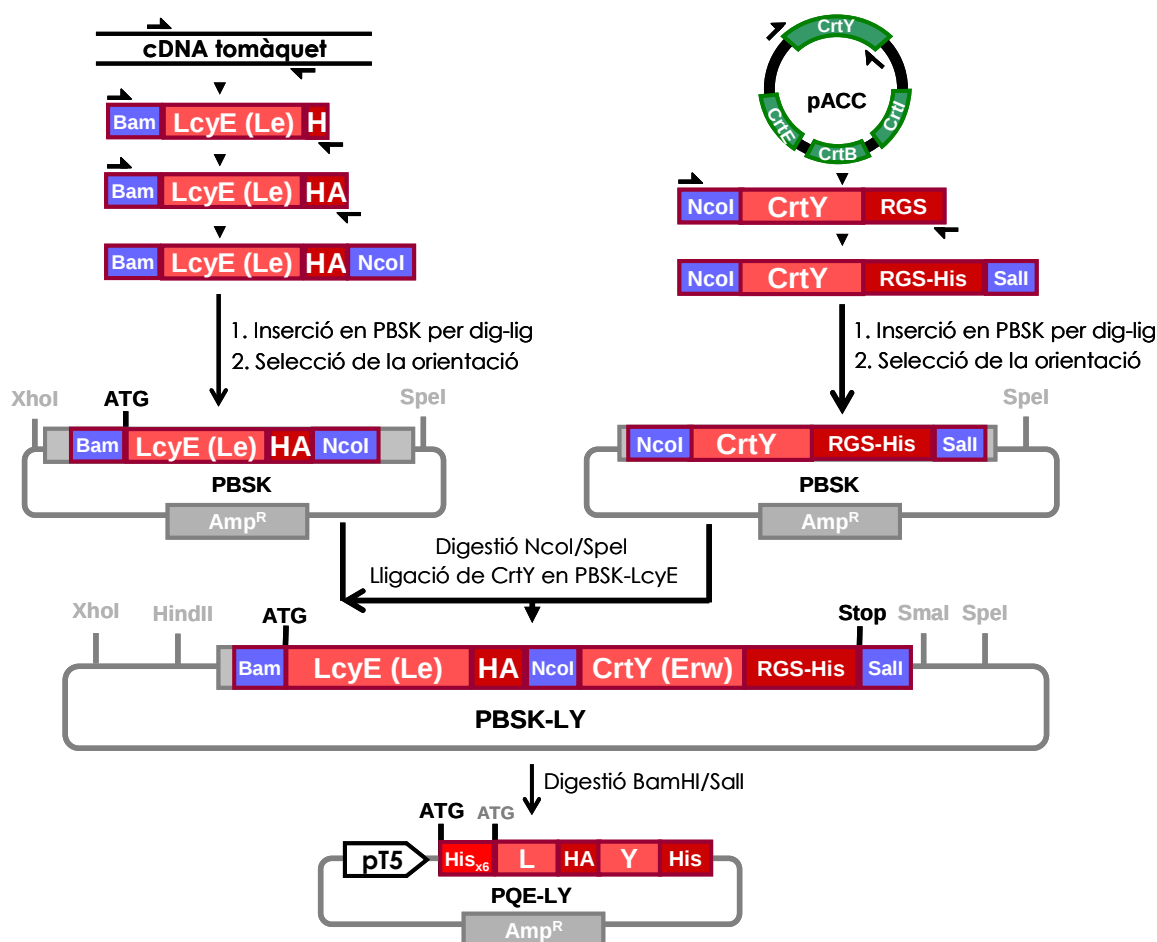


Figura 15. Esquema de la estratègia de clonatge utilitzada per a la generació de l'enzim quimèric LeLcyB-CrtY. En fons blau les dianes de restricció introduïdes durant la PCR. En vermell fosc els epitops per a la purificació (RGS-His) i detecció per western-blott (HA: HemAgglutina). PBSK: pBluescript.

En primer lloc es va comprovar l'expressió de la proteïna quimèrica transformant la construcció **pQE30-LY** (Amp^R) en cèl·lules competents de la soca **M15 pRep4** de *E. coli* (Km^R) i creixent-ne colònies individuals en medi líquid LB fins a $D.O_{600}=0,5$. Es va induir l'expressió de la proteïna afegint IPTG a una concentració final de 0,5 mM i es va incubar a diverses condicions. Les cèl·lules de 1 ml del cultiu es van recuperar i utilitzar en l'anàlisi de l'extracte total per Western-blot utilitzant l'anticòs primari anti-RGS-His (ratolí) a una dilució 1/500 i l'anticòs secundari anti-ratolí a una dilució 1/5000 (Figura 16A). La quimioluminiscència detectada a partir de la peroxidasa de rave conjugada a l'enzim secundari amb el LAS3000 (Fuji) va revelar la presència d'una banda tènue pròxima als 100 kDa que seria el pes esperat per la proteïna quimèrica tot i que suggereix uns nivells d'expressió baixos.

La forta coloració que imprimeixen els carotenoides a les colònies de bacteris en acumular-se permet una immediata identificació a vista dels compostos que es produeixen. Aprofitant aquesta característica es va dur a terme una prova que confirmés l'expressió i a l'hora l'activitat enzimàtica de la proteïna quimèrica. Es va transformar la soca EcAB4 (Taula 4) amb els vectors pLyc, pLyc(-) que porta l'enzim CrtI no funcional, pQE30 buit, o pQE30-LY i es van incubar a 37°C en medi sòlid durant 18 hores fins a la obtenció de colònies aïllades. A partir d'una única colònia es van preparar estries i cultius líquids per observar-ne la coloració després de 24 hores de creixement cel·lular a 37°C. Les cèl·lules transformades amb pQE30-LY mostraven una forta coloració taronja possiblement com a conseqüència de la acumulació de carotens (carotenoides de color taronja) en contrast amb la coloració vermella de les soques control transformades amb el vector pQE30 buit, i la falta de coloració de les transformades amb pLyc(-) (Figura 16B-C). Aquest resultat suggereix la correcta expressió i l'activitat de la proteïna quimèrica LCYE-CrtY per transformar el licopè en carotens, però la coloració no permet discernir entre els dos productes finals esperats, el α -carotè i el β -carotè.

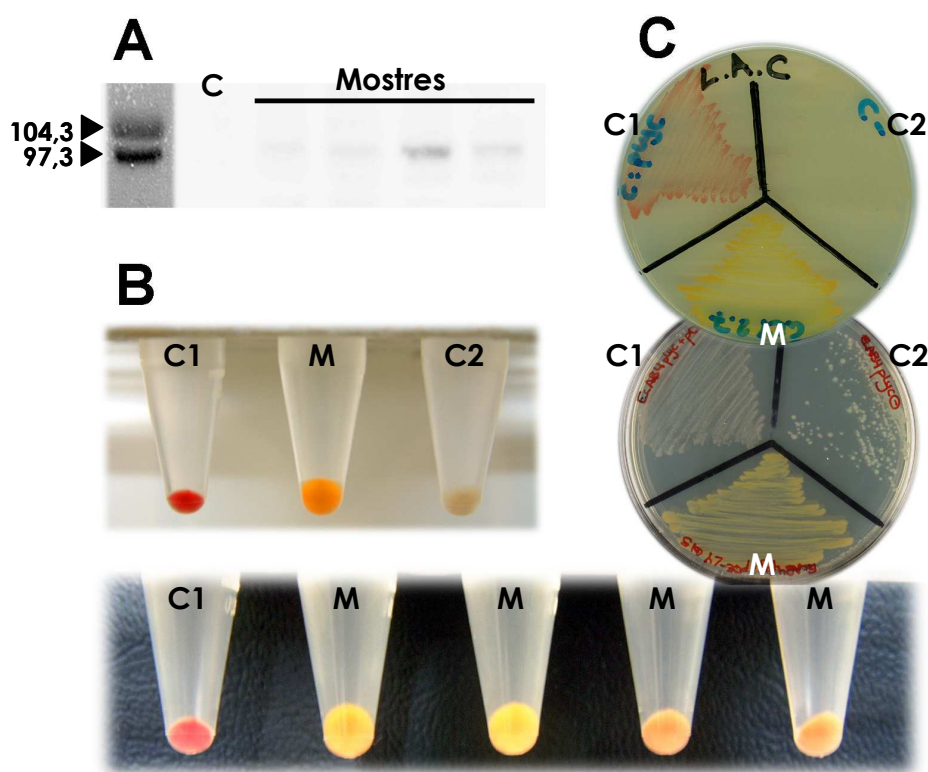


Figura 16. Caracterització de l'expressió i funcionalitat de l'enzim bifuncional LCYE-CrtY en bacteris. **A)** Immunodetecció (α -RGS-His) de la proteïna bifuncional en extractes totals de la soca M15 transformada amb la construcció pQE30-LY. **B)** Identificació per coloració de pellets de cultius de la soca EcAB4 transformada amb les construccions control i pQE30-LY. **C)** Estries de colònies transformades amb les mateixes construccions. **C1:** transformat amb els vectors pLyc i pQE30 buit, **C2:** transformat amb els vectors pLyc(-) i pQE30 buit. **M:** transformat amb pLyc i pQE30-LY.

Per confirmar que la proteïna bifuncional era capaç de dur a terme les dues activitats enzimàtiques esperades (formació d'anells β i ϵ) es van extreure els carotenoides d'un mil·lilitre d'un cultiu líquid procedent de la incubació a 37°C i 200 r.p.m durant 24h iniciat a partir d'una colònia de la soca transformada amb les construcció pLyc i pQE-LY. El perfil de carotenoides es va analitzar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). La soca control sense la construcció pQE-LY mostra un únic pic amb un temps de retenció de 30 min equivalent al obtingut per la mostra patró del licopè (Figura 17A). En la soca co-transformada amb pLyc i la construcció pQE-LY el pic a 30min desapareix mentre que apareixen dos pics a 22.1 i 23.3 min. corresponents al α -carotè i al β -carotè (Figura 17B). Els dos temps de retenció coincideixen amb els obtinguts en l'anàlisi d'una mescla comercial patró d'aquests dos carotenoides, així com també coincideixen els espectres d'absorció de cada un dels pics. Per tant en un sistema bacterià la proteïna quimèrica bifuncional mostra una correcta expressió i la capacitat de dur a terme les dues activitats ciclasa per consumir eficientment el licopè i a partir d'aquest sintetitzar a l'hora els compostos α -carotè i β -carotè.

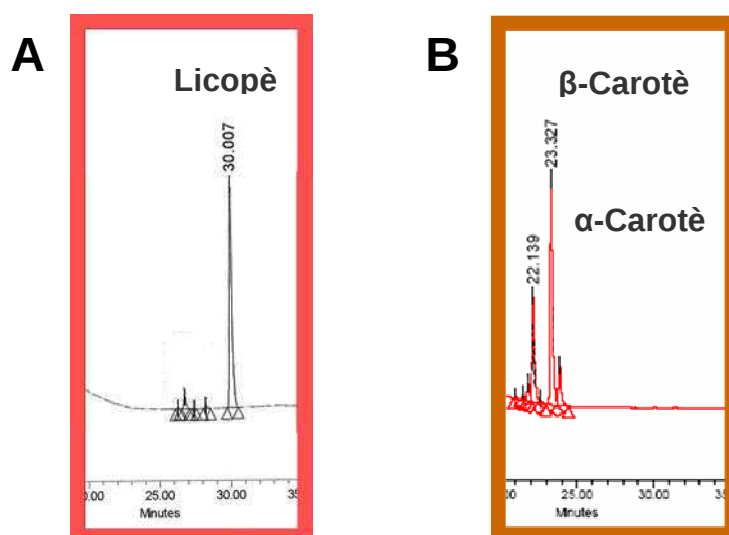


Figura 17. Cromatograma obtingut per anàlisi HPLC dels carotenoides sintetitzats en el model carotenogènic de *E.coli*. **A)** Soca de *E.coli* transformada amb el plasmidi pLyc i pQE30 buit. **B)** Soca transformada amb pLyc i pQE-30-LY.

2.1.2 Anàlisi de la proteïna quimèrica com a eina biotecnològica en plantes.

2.1.2.1 El mutant *lut2-3* d'*Arabidopsis thaliana* mostra un fenotip d'absència de luteïna.

Una de les maneres de comprovar la funcionalitat de la proteïna bifuncional *in planta* és confirmar la capacitat d'aquesta per complementar l'absència dels gens endògens equivalents en plantes mutants. Per aplicar aquesta estratègia es va dur a terme una recerca exhaustiva en la bibliografia i en les diverses col·leccions de mutants disponibles per aconseguir plantes d'*Arabidopsis* deficientes en les activitats LCYB i LCYE. Per el cas del gen que codifica per la LCYE es van trobar mutants naturals (Pogson *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996) i mutants per inserció de T-DNA de la col·lecció SALK mentre que del gen LCYB no es va poder identificar cap mutant disponible.

Es van obtenir les llavors d'*Arabidopsis thaliana* de plantes deficientes en el gen codificant per LCYE, també anomenat LUT2 (At5g57030), per inserció de T-DNA, de la col·lecció SALK (SALK_005018). Les plantes d'aquesta línia segregant es van genotipar per identificar heterozigots i homozigots. El diversos genotipats es van fer per doble PCR sobre els ADN genòmics aïllats de cada una de les plantes utilitzant dues combinacions oligonucleòtids (Figura 18A). La combinació LP-005018 i RP-005018 anella específicament en la regió codificant del gen generant una banda d'amplificació de 1Kb que identifica la versió silvestre del gen. En canvi en la parella RP-005018 i LB1a el primer hibrida específicament sobre la seqüència del gen mentre el segon ho fa amb la seqüència del T-DNA generant una banda d'amplificació de 0,45 Kb que identifica la presència de la inserció disruptant el gen.

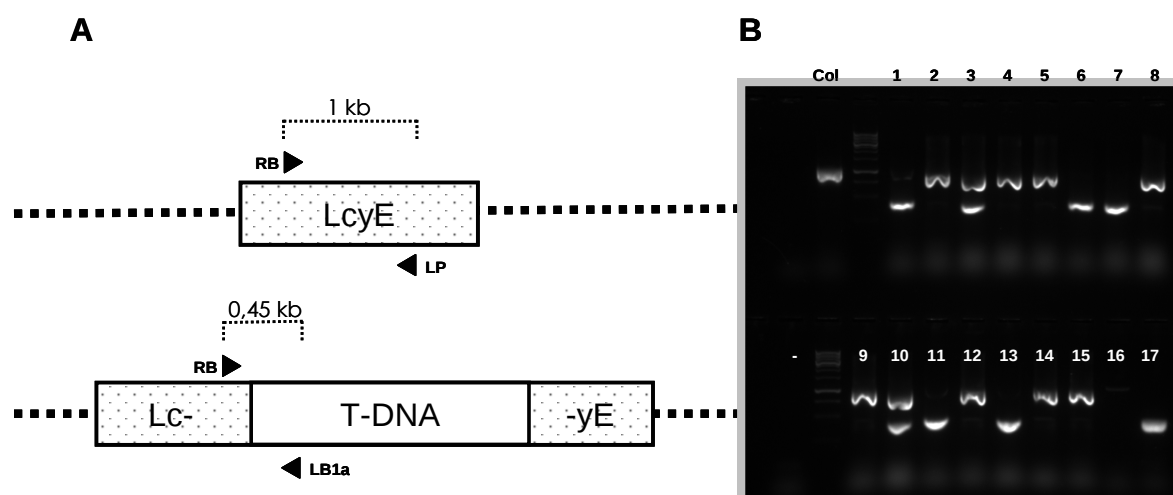


Figura 18. Genotipat del mutant *lut2-3*. A) Esquema de les regions d'hibridació dels encebadors en el gen silvestre i en el gen amb la inserció. B) Gel d'agarosa al 1% per a la identificació del genotip de 16 individus utilitzant plantes silvestres (Col) com a control. Les mostres 1,6,7,11,13,y 16 son homozigots.

La combinació de les dues PCR sobre un mateix ADN_g permet diferenciar les plantes silvestres o azigotes (una única banda de 1Kb) de les heterozigotes (una banda de 1KB i una de 0,45 Kb), i de les homozigotes (una única banda de 0,45Kb) per la inserció. (Figura 18B) La línia SALK_005018 homozigota es va re-anomenar com a mutant *lut2-3*.

Les línies d'inserció tant en estat d'heterozigosi com d'homozigosi no presenten cap alteració fenotípica evident respecte les plantes silvestres ja sigui en estat de plàntula com en estat adult. La germinació, desenvolupament, creixement i floració no es mostren alterades de forma aparent. Per determinar els efectes de la mutació sobre la bioquímica dels carotenoides es va analitzar el perfil d'aquests en les diverses plantes. Es va fer una extracció de carotenoides sobre plantes de 4 setmanes i l'extracte es va analitzar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). El cromatograma de la mostra silvestre estableix el perfil típic de carotenoides i clorofil·les amb un pic a 18.5 min corresponent a la luteïna (el carotenoid majoritari). El perfil es manté pràcticament inalterat en les mostres de les línies d'inserció en estat d'heterozigosi però pateix canvis molt importants quan la inserció es troba en homozigosi (Figura 19). En aquest cas, el pic corresponent a la luteïna desapareix totalment com s'espera de eliminar completament l'activitat LCYE, mentre el pic amb un temps de retenció de 11.9 min corresponent a la violaxantina s'incrementa significativament. La caracterització d'altres mutants *lut2*, deficientes en activitat LCYE, va mostrar resultats molt similars (Pogson *et al.*, 1996). Per tant el mutant *lut2-3* presenta un fenotip bioquímic d'absència de luteïna que el converteix en un candidat idoni per testar l'activitat LCYE de la proteïna quimèrica bifuncional.

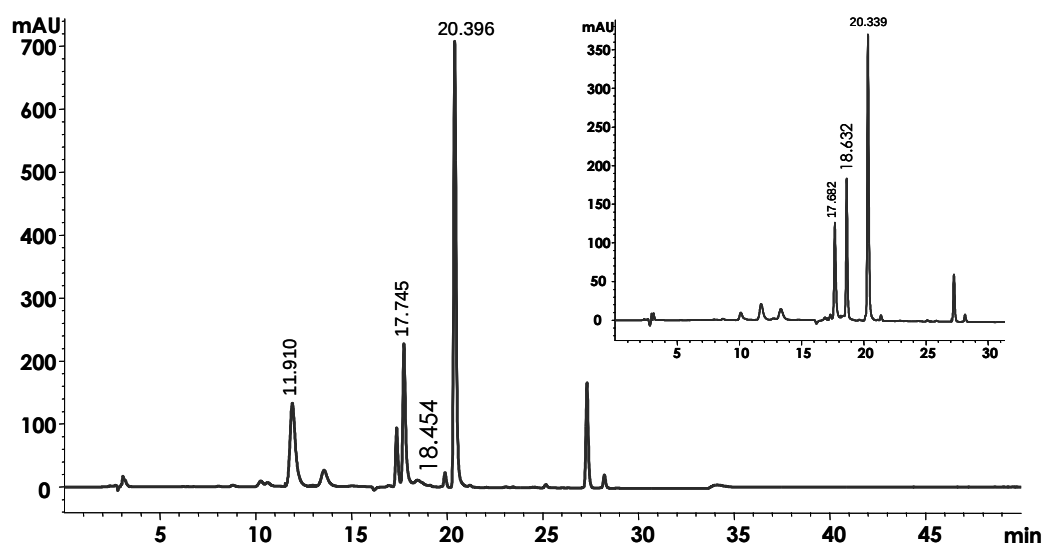


Figura 19 Perfil cromatogràfic de carotenoides monitoritzat a 440 nm de plantes mutants *lut2-3* homozigotes per la inserció de T-DNA. Presenta un fenotip bioquímic d'absència de luteïna. Els pics majoritaris corresponen a violaxantina (11.9), Clorofil·la b (17.7), LUTEÏNA (18.4), i clorofil·la a (20.3). A l'interior, cromatograma corresponent al perfil de carotenoides d'una planta silvestre.

2.1.2.3 L'enzim quimèric LCYE-CrtY no produeix alfa carotè en Arabidopsis

Per a la seva aplicació en plantes, es va clonar la seqüència quimèrica LCYE-CrtY en un vector d'integració genòmica mediada per *Agrobacterium tumefaciens* sota el control d'un promotor constitutiu fort (35S). A partir de la construcció PBSK-LY es va alliberar la seqüència d'interès per digestió amb els enzims *Bam*HI i *Sma*I i es va inserir en un vector binari de tipus pCAMBIA prèviament digerit amb els enzims *Bgl*II i *Pml*I. Els enzims *Bam*HI i *Bgl*II tallen dianes de restricció diferents però generen extrems cohesius compatibles mentre els enzims *Sma*I i *Pml*I generen tots dos extrems roms i per tant compatibles. La construcció resultant es va anomenar pCAM-LY (Figura 20A).

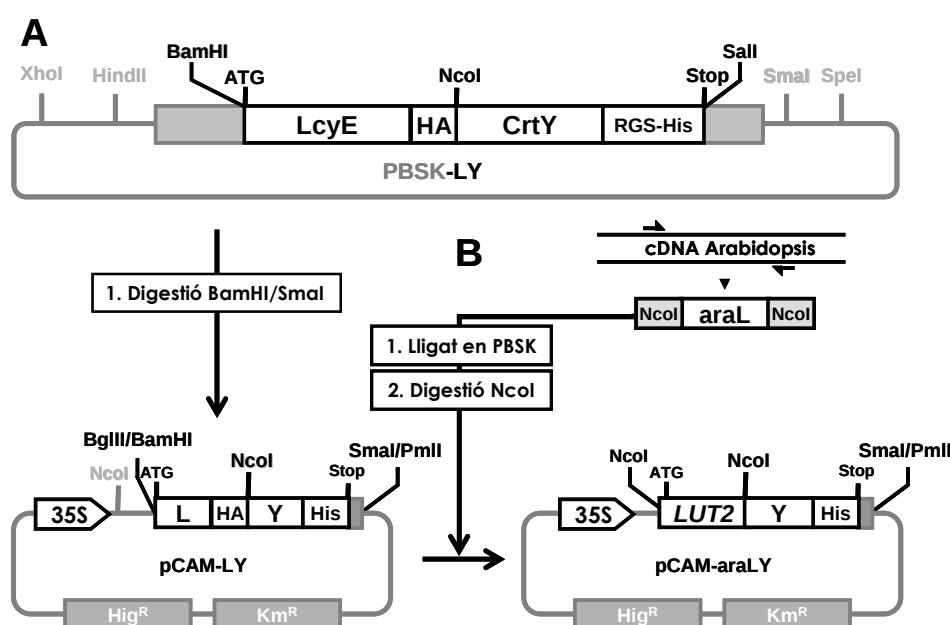


Figura 20. Estratègies de clonatge per a la inserció de les seqüències de fusió en el vector binari pCAMBIA. **A)** inserció de la proteïna de fusió LCYE-CrtY en el vector binari. **B)** substitució de la seqüència LCYE de tomàquet per la seqüència LUT2 (*Arabidopsis*). PBSK: pBluescript

Aquesta construcció es va transformar en la soca C58C1-pGV2260 d'*Agrobacterium tumefaciens* per generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* (Columbia-0) pel mètode d'immersió floral. Els individus transformants de la T1 (al voltant del 1,5%) es van identificar per selecció en base a la resistència a higromicina (50 µg/ml) incorporada en el seu genoma juntament amb el transgen d'interès. La presència del transgen es va comprovar per PCR sobre l'ADN genòmic utilitzant encebadors que anellaven en el promotor 35S i en el propi transgen que no produeixen banda d'amplificació en la mostra control silvestre però sí ho fan en les plantes transformades. De les diverses línies obtingudes es van mantenir aquelles que havien incorporat una única còpia del transgen. Per fer-ho es van sembrar 100 llavors resultat de la autofecundació de la T1 en presència d'higromicina descartant totes aquelles línies amb

percentatges de resistència per sobre del 75% esperat segons un model de segregació mendeliana. De cada línia seleccionada es van créixer sis de les plantes resistents de la T2 fins a edat reproductiva per recollir-ne les llavors de la T3 resultants de la autofecundació. La identificació d'individus homozigots respecte dels heterozigots pel transgen es va establir per la diferent resistència de la descendència en presència d'higromicina (100% en el cas dels homozigots, i 75% en el cas dels heterozigots).

Un cop obtinguts els individus amb fons genètic *lut2-3* i homozigots pel transgen *LeLcyE-CrtY* es va analitzar el seu perfil de carotenoides per cromatografia líquida. A partir de plantes crescudes en placa de MS 0,5x- durant 10 dies i passades a terra durant 3 setmanes sotmeses a un fotoperíode de dia curt, es va recollir teixit de les fulles per dur a terme una extracció de carotenoides. Paral·lelament, i d'aquestes mateixes plantes, es va recollir una segona mostra de teixit per extreure'n l'ADN genòmic i confirmar que les plantes sotmeses a anàlisi mantenien el fons genètic *lut2-3* segons el protocol descrit en l'apartat anterior. L'anàlisi del perfil de carotenoides de diverses línies transgèniques independents per HPLC va demostrar que únicament tres d'elles recuperaven la capacitat de produir luteïna. En comprovar el fons genètic de les diverses línies es va observar que aquestes tres presentaven un genotip d'heterozigosi per la mutació mentre que la resta de línies que no produïen luteïna presentaven un genotip d'homozigosi. Per tant i a diferència dels resultats observats en el sistema bacterià, la presència del transgen *LCYE-CrtY* no era capaç de restablir l'activitat ϵ -ciclase perduda en el fons genètic *lut2-3*.

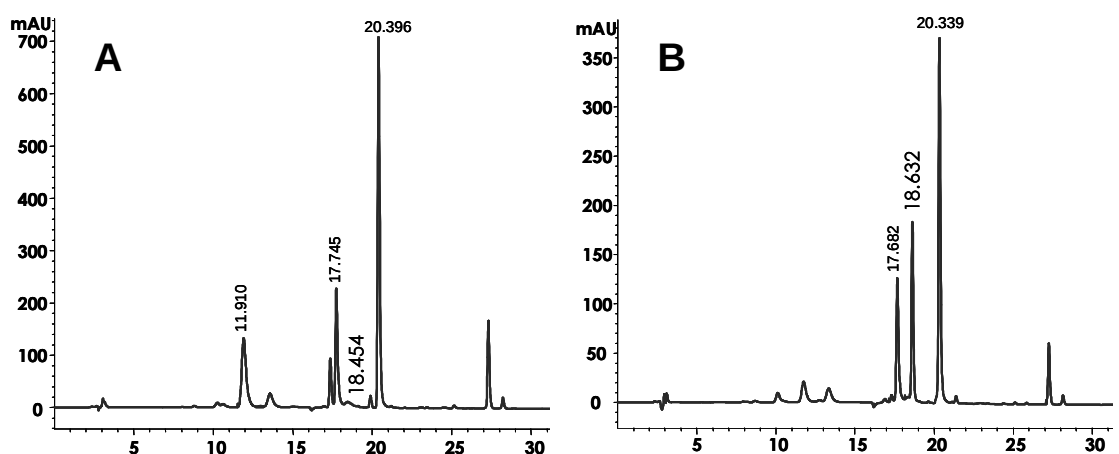


Figura 21. Perfil qualitatiu de carotenoides obtingut per cromatografia HPLC monitoritzat a 440nm. A) Plantes transgèniques sobreexpressores de la proteïna bifuncional *LCYE-CrtY* sota el control d'un promotor constitutiu fort en fons *lut2-3* homozigot. B) Cromatograma control de plantes silvestres que acumulen luteïna normalment. Els pics majoritaris corresponen a violaxantina (11.9), Clorofil·la b (17.7), LUTEÏNA (18.4), i clorofil·la a (20.3) i β -carotè.

Una de les possibilitats de la falta d'activitat de la proteïna quimèrica en *Arabidopsis* considerant que aquesta si es mostrava activa en el sistema bacterià, radica en la major complexitat del sistema vegetal. En *Arabidopsis* la síntesi de carotenoides es localitza en els cloroplasts de manera que la proteïna una vegada sintetitzada s'ha de dirigir fins a aquest orgànel on realitzarà la seva activitat. Els gens corresponents als enzims que conformen la via carotenogènica es localitzen en el nucli i els enzims son redirigits cap al cloroplast a través del sistema de pèptid senyal situat en el seu extrem amino terminal. Amb aquesta premissa es va dissenyar inicialment la proteïna quimèrica ubicant en l'extrem carboxi terminal la seqüència provinent del gen bacterià, i en l'extrem amino terminal la seqüència completa del gen original de tomàquet que inclou un pèptid de trànsit a plastids. Tot i la equivalència en la direcció de proteïnes cap a orgànols entre tomàquet i *Arabidopsis* existeix la possibilitat que no es mantingui l'eficiència en passar d'un sistema a l'altre. Així es va generar una nova construcció per generar una proteïna quimèrica fusionant en aquesta ocasió la seqüència del propi gen *LUT2* d'*Arabidopsis* a la seqüència CrtY de *Pantoea ananas* (Figura 20). Per fer-ho es va amplificar la seqüència del gen a partir d'una llibreria de cDNAs introduint una diana de restricció *NcoI* en cada un dels extrems. Es va introduir en la construcció pCAM-LY prèviament digerida amb aquest mateix enzim per alliberar-ne la seqüència corresponent al gen de tomàquet. En utilitzar una mateixa diana en els dos extrems existeix un 50% de probabilitats de que s'inserti en la orientació desitjada i un 50% de que ho faci en la contrària. Amb una reacció de PCR direccional, utilitzant un encebador del promotor i un altre del propi gen, es van seleccionar únicament els clons de la orientació correcta per generar la construcció que es va anomenar pCAM-araLY. (Figura 20B) Seguint la mateixa metodologia prèviament descrita es van generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis* amb fons genètic *lut2-3*, sobreexpressores de la nova versió de la proteïna quimèrica. El transgen es va portar a homozigosi i com en el cas anterior d'aquestes plantes se'n va fer en paral·lel un genotipat i una anàlisi del perfil de carotenoides sintetitzats. En aquest cas totes les plantes mantenien la mutació en el gen endogen *LUT2*, però com en el cas anterior cap dels cromatogrames mostrava el pic corresponent a la luteïna.

3. La via del MEP està sotmesa a mecanismes post-transcripcionals de regulació en plantes.

Els resultats descrits en els apartats anteriors indiquen que es pot establir un comportament coincident de la via MEP en els sistemes d'*E.coli* i d'*Arabidopsis* en que diversos enzims comparteixen el control sobre el flux metabòlic exhibint diferents graus de control. Les plantes però, com a sistemes de major complexitat biològica respecte als sistemes bacterians, disposen d'elements de regulació més sofisticats. Si es pretén utilitzar les plantes com a suport biotecnològic cal tenir en compte aquestes possibles diferències. Per millorar la acumulació de productes finals d'interès, típicament s'han utilitzat estratègies de sobreexpressió dels gens claus en la regulació de les corresponents rutes biosintètiques. No obstant els mecanismes de regulació en els sistemes biològics s'estableixen a diversos nivells i no únicament en el de l'expressió gènica. Així aquests sistemes són capaços d'establir mecanismes post-transcripcionals que permeten actuar sobre l'eficiència dels enzims en les reaccions que catalitzen en funció dels requeriments imposats per les condicions en cada moment. Per tant és possible modular l'activitat d'un enzim sense actuar necessàriament sobre els mecanismes d'expressió del gen associat. Aquests mecanismes, com poden ser la fosforilació, la prenilació, la glucosilació, etc., poden actuar per tant com a coixí sobre l'efecte pretès a través de les estratègies biotecnològiques clàssiques. El coneixement de l'acció d'aquests mecanismes en cada ruta biosintètica permetrà un disseny més racional i optimitzat de la millor estratègia per a cada cas.

3.1 Caracterització basada en l'estudi de mutants d'*Arabidopsis*

Per aprofundir en l'estudi dels mecanismes que regulen la producció dels precursors dels carotenoides a través de la via del MEP en plantes, al laboratori es disposava d'un grup de mutants d'*Arabidopsis* resistents a la inhibició amb fosmidomicina (línies *rif*). La fosmidomicina és un inhibidor competitiu de l'enzim DXR que genera un fenotip albi letal a concentracions elevades. Aquest fenotip letal pot ser rescatat augmentant els nivells de activitat DXR o del seu substrat (DXP), com demostra el fet que línies transgèniques que sobreexpressen els gens codificants per DXR o DXS mostren resistència a FSM (Carretero-Paulet *et al.*, 2006). Consistentment, la caracterització d'alguns dels mutants *rif* duta a terme en el grup havia demostrat que la resistència observada es relacionava en la majoria dels casos amb un increment en els nivells post-transcripcionals de DXR o de DXS o de tots dos enzims. Però també s'espera que una activació del flux metabòlic de la via MEP sense canvis en els nivells d'aquests enzims pugui generar el fenotip de resistència a FSM observat en les línies *rif*.

3.2 El mutant *rif18* un possible model per a l'estudi dels mecanismes post-transcripcionals.

Un dels mutants disponibles, *rif18* (anomenat posteriorment *prl1-8*), acumulava més carotenoides que les plantes silvestres (de l'ordre d'un 20%) i a més de ser resistent a FSM també ho era a clomazona (CLM, inhibidor específic de DXS), norflurazon (inhibidor de PDS, el segon enzim de la carotenogènesis), i mevinolina (inhibidor de HMGR, el principal enzim de la ruta del MVA). Estudis previs en el grup havien demostrat que tant els nivells de transcrit, com els de proteïna per HMGR, DXS i DXR en el mutant no es trobaven alterats respecte els de la planta silvestre. Amb aquestes dades inicials el mutant es convertia en un possible model per a l'estudi dels mecanismes de regulació post-transcripcional.

3.2.1 Les activitats de DXS i DXR no estan alterades en el mutant *rif18* (*prl1-8*).

Una primera hipòtesis que podria explicar la combinació de la resistència a FSM i CLM i la major acumulació de carotenoides amb el fet de mantenir inalterats els nivells d'expressió de DXS i DXR seria un increment de l'activitat d'aquests enzims. En primer lloc es va voler descartar que la ampla varietat d'inhibidors als que el mutant es mostra resistent fos deguda a un efecte inespecífic (per exemple, la mutació podria alterar la capacitat d'absorció d'aquests compostos del medi de cultiu o activar algun tipus de mecanisme general de detoxificació). Es va quantificar en paral·lel la resistència del mutant a inhibidors de la ruta MEP (FSM i CLM) i a una sèrie d'inhibidors no relacionats amb les vies de síntesi d'isoprenoides: kanamicina (KAN), higromicina (HYG) i cloramfenicol (CAP). Es van sembrar al voltant de 50 llavors esterilitzades del mutant *rif18* i de plantes silvestres amb fons Columbia en medi MS 0,5x-, i es van estratificar a 4°C en absència de llum durant 48 h. Les plantes es van créixer a 22°C en condicions d'esterilitat i fotoperíode de dia llarg (8 h de fosc i 16 h de llum) durant 15 dies en presència dels inhibidors: FSM (30 µM), CLM (10 µM), KAN (50 µM), HYG (50 µM), i CAP (15 µM), en cada cas (Figura 22). La resistència es va establir en base a la capacitat de desenvolupar fulles vertaderes verdes. La comparació de les resistències del mutant respecte a les de les plantes silvestres va mostrar un índex de supervivència de entre 7 i 8 vegades més alt en el mutant en el cas dels inhibidors de la via MEP (Figura 22). En canvi el mutant no va presentar increments significatius de resistència als tres inhibidors no relacionat amb la síntesi d'isoprenoides, demostrant que la mutació té una repercussió directa i específica sobre la via del MEP.

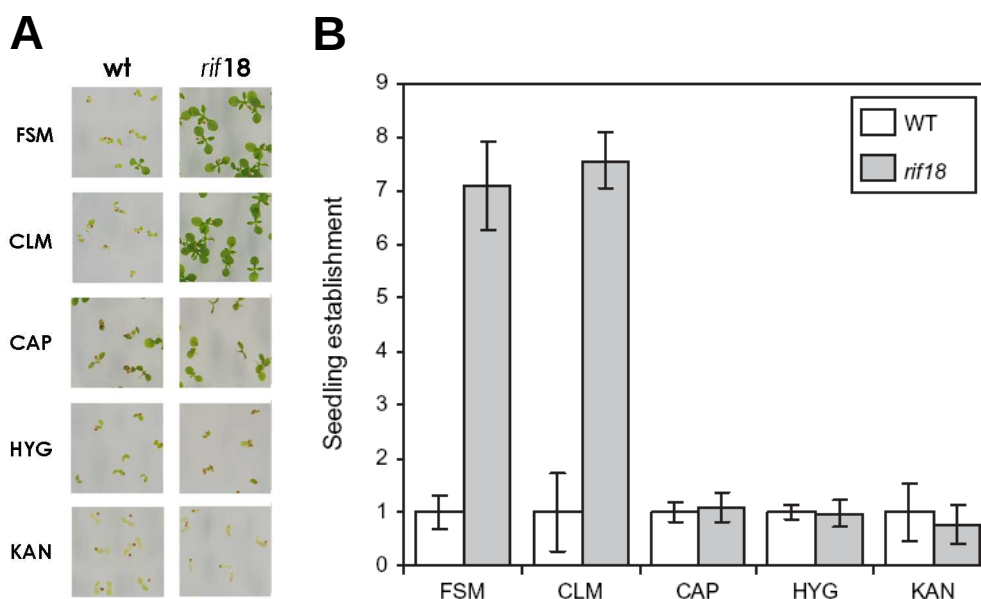


Figura 22. Comparativa de la resistència poblacional del mutant *rif18* envers a la de la planta silvestre a diversos inhibidors. (A) Imatges representatives de la resistència de les plantes crescudes en placa durant 15 dies a dia llarg. (B) Quantificació de la resistència en base a la capacitat de generar fulles vertaderes. Es va treballar amb inhibidors de la via MEP, la fosmidomicina (FSM) a 30 μ M, i clomazona (CLM) a 10 μ M, i inhibidors no relacionats amb la via com el cloramfenicol (CAP) a 15 μ M, la higromicina (HYG) a 50 μ M, i la kanamicina (KAN) a 50 μ M.

Seguidament es va decidir analitzar l'activitat dels enzims DXS i DXR en el mutant i en la planta silvestre. Com que aquests enzims són plastídics, es va optar per determinar l'activitat enzimàtica utilitzant cloroplasts aïllats en assaigs *in vitro*. En cada cas es va quantificar el producte de reacció (DXP o MEP) per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) normalitzant els valors amb el nombre de cloroplasts utilitzats.

Abans de dur a terme aquests anàlisis es va fer un test previ per validar la metodologia. Es van aïllar els cloroplasts de plantules de 15 dies crescudes a dia llarg de plantes silvestres i diverses línies independents de plantes transgèniques sobreexpressores de DXS (35S:DXS) generades en el laboratori (Carretero-Paulet *et al.*, 2006). Es van quantificar el nombre de cloroplasts en els extractes obtinguts i després de trencar els orgànols per alliberar-ne les proteïnes, es van utilitzar per fer-ne incubacions *in vitro* en presència de GAP i piruvat com a substrats de l'enzim DXS. La DXP generada com a producte de reacció es va quantificar i els valors es van normalitzar al nombre de cloroplasts. La comparació de les diverses línies transgèniques sobreexpressores amb la mostra control demostrava una major producció de DXP variable en funció dels diversos nivells d'expressió del transgen en cada una de les línies testades que es situava de l'ordre de vuit vegades per sobre en el millor dels casos (Figura 23). Aquests resultats junt amb la consistència dels valors obtinguts en les diverses rèpliques validava el mètode per a la determinació d'activitats i la detecció de variacions en aquesta gràcies a la robustesa i reproduïbilitat de la tècnica.

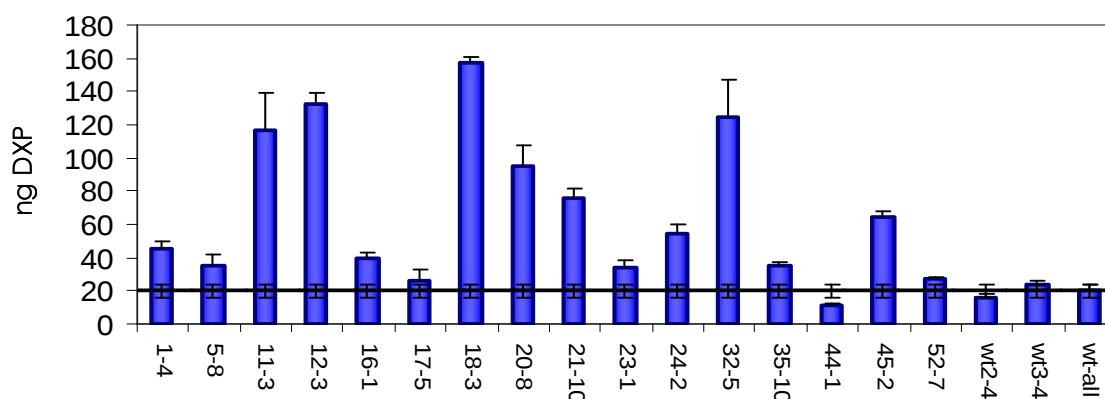


Figura 23. Quantificació de la activitat DXS en línies 35S:DXS. La gràfica representa els nivells del producte DXP mesurats per LC-MS en cloroplasts intactes aïllats de plantes transgèniques (numeració de les diverses línies) i plantes silvestres (Wt). La línia negra sòlida marca el valor mitjà de síntesi de DXP de les línies silvestres analitzades.

Per tant es va procedir a fer les mesures d'activitat DXS i DXR del mutant *rif18* i de les mostres control silvestres. En els dos casos es van créixer 15 plaques de 90 mm amb aproximadament 150-200 llavors per placa durant 10 dies en règim de dia llarg per acabar rendint al voltant de 3 g de teixit fresc en forma de plantules. A partir d'aquest teixit es van aïllar cloroplasts intactes (Figura 24). El teixit submergit en tampó isotònic es va homogeneïtzar i filtrar amb Miracloth de 0,22 μ m per eliminar-ne les restes. El filtrat es va centrifugar en fred a baixes revolucions per concentrar tots els cloroplasts i altres fraccions suborganulars i resuspendre'ls després en un volum mínim del mateix tampó isotònic. Aquest volum es va carregar sobre un gradient lineal de Percoll i es va centrifugar per separar-ne els diversos components. La identificació de les fraccions plàstídiques és immediata per la coloració verda de dues franges deguda a la clorofil·la (Figura 24A). A la franja de baixa densitat s'acumulen els cloroplasts trencats mentre que a la de major densitat es localitzen els cloroplasts íntegres. Aquesta darrera es va recuperar i es va rentar varies vegades amb tampó per eliminar el percoll. La quantitat i integritat dels cloroplasts es van analitzar en una cambra de Mössbauer per microscopia de camp clar i fluorescència. Una tercera part del volum es va centrifugar i resuspendre per generar tres al·iquotes de 30 μ l a les que se'ls van afegir 70 μ l de tampó de reacció amb els substrats necessaris en cada cas (tampó DXS per a determinar les activitats DXS i tampó DXR per a determinar les activitats DXR). Les mesclures es van incubar a 24°C amb agitació constant (600 r.p.m) durant 4 h (temps d'incubació determinat en un estudi previ com l'òptim per a generar la màxima quantitat de producte de reacció dintre del rang de temps de linealitat de la reacció), i es va aturar la reacció afegint 100 μ l de cloroform. Es va recuperar la fase aquosa (superior) i els productes de reacció es van separar per cromatografia líquida i posteriorment es van detectar/quantificar amb espectrometria de masses seguint els ions moleculars $m/z=213$ i $m/z=215$ pels compostos DXP i MEP respectivament. Mesurades d'aquesta manera i normalitzades les activitats al nombre de cloroplasts utilitzats en cada mostra, no es van

observar diferències significatives en les activitats tan de DXS com de DXR de la planta mutant *rif18* respecte a les mesures en les plantes silvestres (Figura 24B). Per tant la resistència als inhibidors específics dels dos enzims de la via MEP i la major acumulació de carotenoids i clorofil·les que presenta el mutant *rif18* no són conseqüència d'una alteració en la quantitat ni en el nivell d'activitat d'aquests enzims.

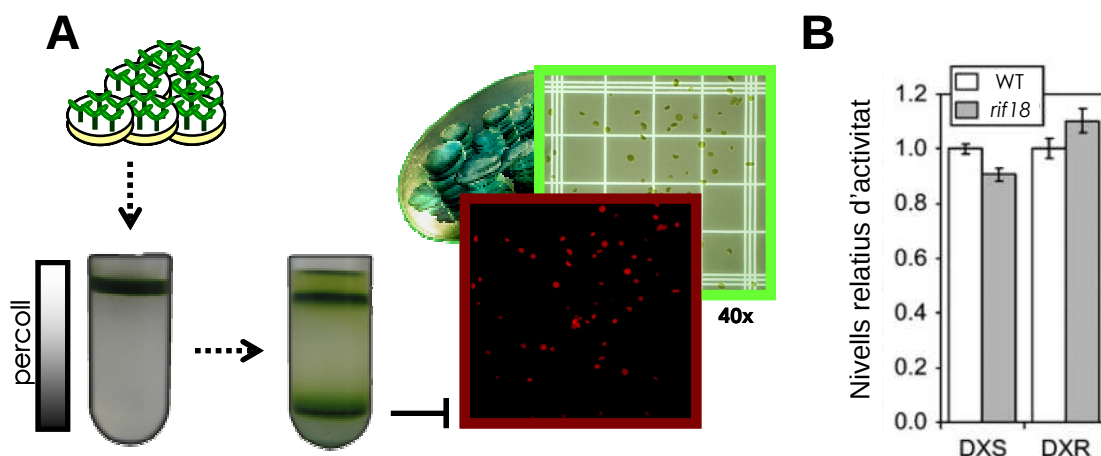


Figura 24. Determinació *in vitro* de les activitats dels enzims DXS i DXR. **(A)** Esquema simplificat del procés d'obtenció de cloroplasts intactes. Imatge emmarcada en vermell: auto fluorescència de la clorofil·la. Imatge emmarcada en verd: Visió en el microscopi de camp clar dels cloroplasts en la cambra de Mosbauer. Les dues imatges estan obtingudes a 40 augmentos. **(B)** Nivells d'activitat dels enzims DXS i DXR. Les mitjanes i desviacions estàndard es representen relatives als nivells de les plàntules silvestres. Els valors corresponen a tres experiments independents ($n=3$).

3.2.2 L'intercanvi d'IPP citosòlic i plastídic no està alterat en el mutant *rif18*.

Una segona possibilitat per explicar la resistència del mutant podria radicar en un augment de l'intercanvi d'IPP que es produeix entre els cloroplasts i el citosol. Diversos estudis (Schuhr *et al.*, 2003; Hemmerlin *et al.*, 2003; Dudareva *et al.*, 2005) han demostrat l'existència d'aquest intercanvi tot i que encara no se'n coneixen els mecanismes moleculars que el dirigeixen. Per comprovar si aquest intercanvi estava alterat en les plantes *rif18*, es va seguir i quantificar el flux d'intercanvi en els dos sentits mitjançant experiments d'incorporació de marcatge descrits a continuació.

3.2.2 .1 Incorporació d'IPP sintetitzat en el citosol per la via MVA en isoprenoides plastídics.

Amb l'objectiu d'analitzar si els nivells de bescanvi d'IPP citosòlic cap al cloroplast estaven alterats en el mutant, es van créixer en placa plantules silvestres i *rif18* en medi MS 0,5x-suplementat amb $[2-^{13}\text{C}]$ -mevalolactona ($[2-^{13}\text{C}]$ -MV) a una concentració final de 4,5 mM (Phillips *et al.*, 2008). La mevalolactona s'hidrolitza ràpidament i genera $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA, el qual passa a incorporar-se a la via biosintètica del MVA facilitant la traçabilitat de la distribució final

del IPP produït en isoprenoids plastídics i citosòlics. Paral·lelament es van créixer plantules en medi MS 0,5x- en presència de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$ i del inhibidor mevinolina (que inhibeix la síntesi de MVA endogen) per intentar així maximitzar la incorporació de l'intermediari marcat. A l'hora, per poder observar fenotípicament els efectes de l'inhibidor i la capacitat de rescatar aquest efecte com a conseqüència de la incorporació dels intermediaris afegits exògenament, es van créixer plantules en medi MS 0,5x- amb presència o absència de la mateixa concentració de mevinolina ($10\ \mu\text{M}$). Les plantes es van créixer durant 17 dies en condicions de dia llarg abans de congelar-les en nitrogen líquid. Les plantes, tant mutants com silvestres, no van mostrar cap alteració fenotípica en presència de l'intermediari marcat isotòpicament en el medi de creixement (Figura 25) de manera que aparentment la presència de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$ no produeix un efecte nociu sobre elles. En canvi les plantes control en presència de mevinolina presenten el fenotip típic d'aquest l'inhibidor, és a dir capacitat d'obrir els cotilèdons però absència de fulles vertaderes i coloració fosca (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). En idèntiques condicions de creixement amb l'inhibidor però amb $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$ en el medi, les plantes presenten un fenotip amb fulles vertaderes i coloració verda pràcticament idèntic al de les plantes crescudes sense mevinolina (Figura 25). Per tant la presència de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$ és capaç de rescatar el fenotip letal produït per la mevinolina indicant que el compost és absorbit per la planta des del medi i correctament incorporat a la ruta biosintètica del MVA.

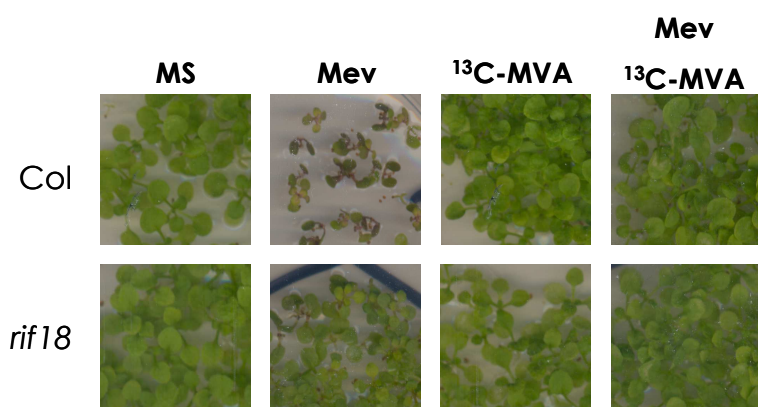


Figura 25. Efecte dels diversos suplementes afegits al medi sobre el creixement en plàntules de 17 dies mutants o silvestres. L'inhibidor mevinolina (Mev) a una concentració $10\ \mu\text{M}$, el substrat marcat amb carboni-13 mevalonat ($^{13}\text{C}\text{-MVA}$) a $4,5\text{mM}$, o la combinació de tots dos.

A partir del teixit recollit es van fer dos anàlisis paral·lels tant amb les plantes mutants com amb les silvestres. En primer lloc es van utilitzar 50 mg per dur a terme una extracció d'esterols com a control del procés. Els esterols es sintetitzen en el citosol a partir de l'IPP produït en la via del MVA (Figura 1) de manera que caldria esperar una incorporació majoritària de la marca isotòpica en el sitosterol (l'esterol majoritari a *Arabidopsis*) si la absorció i metabolització de l'intermediari marcat es produeix correctament.

Els esterols es van derivatitzar amb trimetilsilà (TMS) per optimitzar-ne la seva detecció i $1\ \mu\text{l}$ de l'extracte derivatitzat es va analitzar per cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre

de gasos (GC-MS) de quadrupol senzill utilitzant colesterol (10 µg) com a patró intern. El patró de marcatge isotòpic del sitosterol es va obtenir a partir del temps de retenció del pic corresponent a aquest compost en les condicions de treball ($t_r=14\text{min}$) i del seu espectre de masses comparat amb el prèviament descrit en la llibreria de fragmentacions. Els resultats, tot i no tenir valor quantitatiu, demostren un percentatge d'incorporació del marcatge isotòpic molt per sobre del marcatge esperat per l'abundància natural del carboni13 confirmant que l'intermediari afegit exògenament al medi s'ha incorporat al metabolisme de la planta (Figura 25).

En segon lloc es van utilitzar 50 mg més de teixit fresc per determinar la incorporació d'IPP citosòlic produït a partir de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$ en isoprenoides plastídics (carotenoides i grup fitol de les clorofil·les), és a dir quantificar la proporció d'aquest IPP que es transporta cap al cloroplast (Figura 26). Es va fer una extracció de pigments del teixit amb acetona i es van utilitzar 10 µl de l'extracte per fer una separació mitjançant cromatografia líquida i posterior detecció en un espectròmetre de masses de trampa iònica acoblat de les diverses espècies moleculars corresponents al β -carotè i el grup fitol de la clorofil·la a resultat de la addició de una, dos o tres unitats de marcatge. Per fer les mesures d'incorporació es va treballar amb quintuplicats per a cada mostra. Es va determinar la abundància natural de marcatge a partir de les mostres crescudes únicament en MS 0,5x- i aquest fons es va restar al valor d'incorporació total mesurada en les mostres crescudes en presència de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MV}$, pels ions $[M+1]$, $[M+2]$, $[M+3]$ etc... Els resultats s'expressen com el percentatge de l'abundància mesurada una vegada eliminat el fons natural de marcatge respecte l'abundància total de cada cluster iònic (Figura 26)

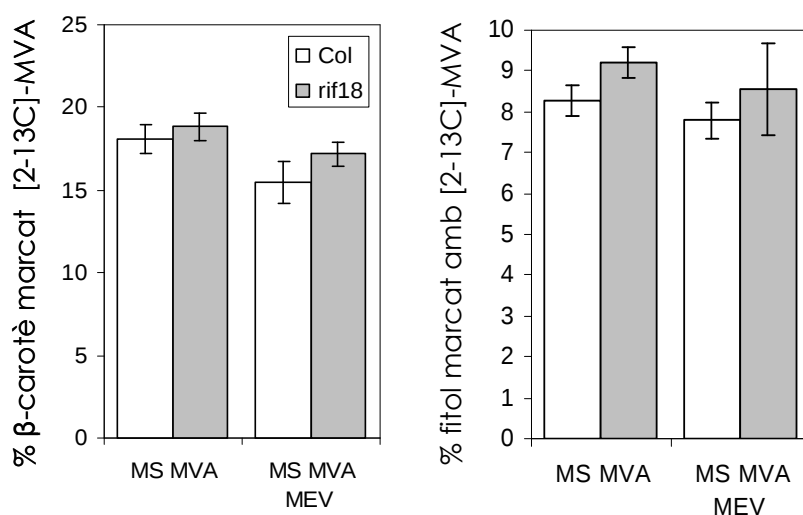


Figura 26. Incorporació del MVA marcat en carotenoides i clorofil·les de plantules Wt i rif18 crescudes durant 18 dies a dia llarg en plaques de MS amb 4,5 mM de $[2-^{13}\text{C}]\text{-MVA}$ en presència o absència de MEV. La incorporació està representada com el percentatge del compost amb una o més marques una vegada eliminada l'abundància natural de l'isòtop. Les mitjanes i desviacions estàndard corresponen a 5 mostres independents ($n=5$).

Els nivells d'incorporació de marcatge en β -carotè i fitol basats en l'enriquiment de les espècies moleculars de m/z 537, 538, 539 i 540 (corresponents a 1 fins a 4 incorporacions) i m/z 872, 873, 874, i 875 respectivament, se situen al voltant del 18% i el 9% tant en les plantes silvestres com en el mutant. Uns valors que són molt similars als prèviament descrits en la bibliografia (Kasahara *et al.*, 2002) i que no es veuen alterats significativament quan s'utilitza mevinolina, tal i com ja havia estat observat en experiments anteriors (Hemmerlin *et al.*, 2003). Molt probablement aquest resultat un tant inesperat sigui degut a la combinació de dos factors. En primer lloc les condicions de creixement de les plantules en dia llarg implica un flux metabòlic baix a través de la via del MVA, més activa en condicions de foscor, i per tant una aportació d'intermediari no marcat endogen reduïda. En segon lloc la concentració molt elevada de l'intermediari marcat provocaria una major disponibilitat d'aquest compostos respecte el MVA no marcat sintetitzat endògenament provocant que fins i tot en absència de l'inhibidor la seva utilització com a substrat en la via metabòlica fos preferent. Aquest comportament queda reflexat en l'experiment control d'incorporació de marcatge en esterols en el qual la incorporació és molt elevada (per sobre del 80%) tant si la síntesi endògena estava bloquejada amb mevinolina com si no ho estava. Per tant es podria concloure que no hi ha diferències en els nivells d'incorporació en presència o absència de l'inhibidor perquè en els dos casos els valors assolits es corresponen als més alts possibles en les condicions de llum i concentració del compost marcat.

En qualsevol cas els resultats d'incorporació tan similars entre les plantes silvestres i les *rif18* suggereixen que el bescanvi de precursors del citosol cap al cloroplast no està alterat en el mutant.

3.2.2.2 Incorporació d'IPP sintetitzat en el cloroplast per la via MEP en isoprenoides citosòlics.

Per analitzar els nivells de bescanvi d'IPP plastídic cap al citosol i veure si aquests estaven alterats en el mutant respecte les plantes silvestres, es va dur a terme un segon experiment de marcatge isotòpic. En aquest cas es van créixer en placa plantules silvestres i *rif18* en medi MS 0,5x- suplementat amb [5,5-²H]-desoxixilulosa (1,25 mM). La desoxixilulosa (DX) a elevades concentracions pot ser tòxica (Kasahara *et al.*, 2002) de manera que es va escollir la concentració més elevada possible per afavorir la seva absorció però sense superar els valors de toxicitat. La DX s'absorbeix a través de les arrels i és fosforilada per acció de l'enzim xilulosa quinasa (Wungsintaweekul *et al.*, 2001) produint DXP, intermediari de la via del MEP que passa a incorporar-se a la producció d'isoprenoides plastídics. Es van créixer plantules en medi MS 0,5x- en presència de [5,5-²H]-DX o de [5,5-²H]-DX i CLM (inhibidor específic de l'enzim DXS que bloqueja la síntesi de DXP endògena) . Per establir la concentració de treball de l'inhibidor

es va fer una cinètica tal i com s' il·lustra en la Figura 27 i es va escollir una concentració de CLM de 10 μ M.

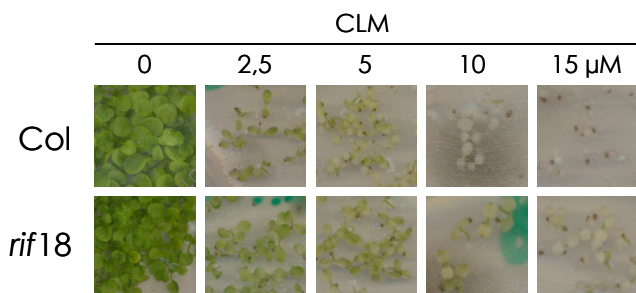


Figura 27. Cinètica de concentracions (μ M) de clomazona (CLM). Plàntules de 15 dies d'*Arabidopsis* crescudes a 16h llum/8h fosc en presència de l'inhibidor. Es va establir 10 μ M com la concentració mínima per generar un fenotip letal albi.

Les plantes, tant mutants com silvestres, crescudes en condicions de dia llarg durant 18 dies no van mostrar cap alteració fenotípica en presència de [5,5- 2 H]-DX (Figura 28), de manera que aparentment la concentració d'aquest intermediari utilitzada en l'experiment (1,25 mM) no produeix un efecte nociu sobre elles. En presència de 1,25 mM [5,5- 2 H]-DX i 10 μ M CLM, les plantes presentaven un fenotip amb fulles vertaderes i una coloració verda que no tenien les plantes crescudes només amb CLM (Figura 28). Per tant la presència de [5,5- 2 H]-DX és capaç de rescatar el fenotip letal produït per la CLM tot i que la recuperació no és completa probablement perquè la concentració a la que cal treballar per evitar la toxicitat resulta insuficient per a una recuperació total. Tot i així els resultats permeten deduir que el compost és absorbit per la planta i incorporat a la ruta biosintètica del MEP per sintetitzar IPP plastídic amb la suficient eficiència per permetre la viabilitat de la planta.

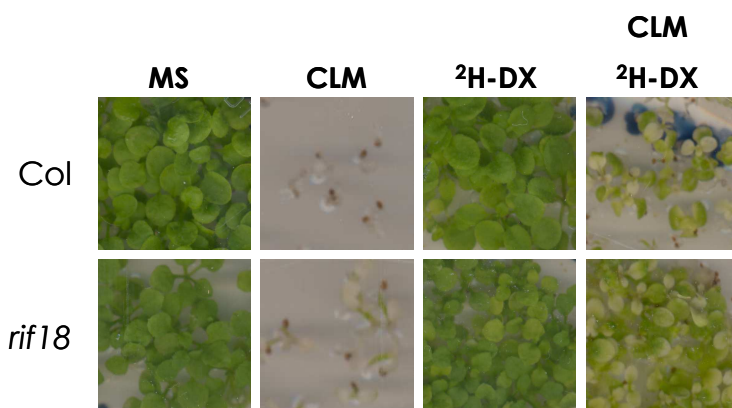


Figura 28. Efecte dels diversos suplementes afegits al medi sobre el creixement en plàntules de 18 dies. L'inhibidor clomazona (CLM) a una concentració 10 μ M, el substrat marcat amb deuteri 2 H-DX a 1,25mM, o la combinació de tots dos.

De forma equivalent a la descrita en l'apartat anterior es va dur a terme un doble anàlisi del teixit col·lectat. Per una banda es van utilitzar 50 mg de teixit fresc per fer un anàlisi control sense valor estadístic de la incorporació del marcatge isotòpic en els isoprenoides plastídics (carotenoides i cadenes laterals de la clorofil·la). L'extracció i anàlisi es va dur a terme de la mateixa manera descrita en l'apartat anterior i detallat en la secció de materials i mètodes.

Els resultats van demostrar una bona incorporació del marcatge isotòpic procedent de [5,5-²H]-DX en els isoprenoides estudiats, confirmant que l'intermediari afegit exògenament al medi s'ha incorporat a la ruta del MEP (resultats no mostrats).

En segon lloc es van utilitzar 50 mg de teixit per dur a terme una extracció d'esterols per avaluar la incorporació d'IPP o algun altre prenil fosfat derivat de la ruta del MEP a isoprenoides citosòlics (Figura 29). Per fer les mesures d'incorporació es va treballar amb quintuplicats per a cada mostra. Es va determinar la abundància natural de marcatge a partir de les mostres crescudes únicament en MS 0,5x- i aquest fons es va restar al valor d'incorporació total mesurada en les mostres crescudes en presència de [5,5-²H]-DX, pels ions [M+2] i [M+4] ja que la molècula de desoxixilulosa incorpora dos marcatges de deuteri. Els resultats s'expressen com el percentatge de l'abundància mesurada una vegada eliminat el fons natural de marcatge respecte l'abundància total de cada cluster iònic (Figura 29).

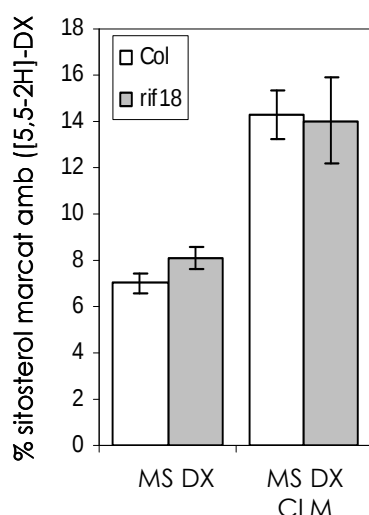


Figura 29. Incorporació del precursor de la via del MEP marcat en esterols de plantules Wt i rif18 crescudes durant 18 dies a dia llarg en plaques de MS en presència o absència de CLM. La incorporació està representada com el percentatge del compost amb una o més marques una vegada eliminada l'abundància natural de l'isòtop. Les mitjanes i desviacions estàndard corresponen a 5 mostres independents (n=5).

Els nivells d'incorporació de marcatge en sitosterol mesurats com l'enriquiment de les espècies moleculars de m/z 488, 490, i 492 (corresponents a 1 fins a 3 incorporacions de DX) coincideixen amb els valors anteriorment descrits en la bibliografia per plantes silvestres d'*Arabidopsis* (Kasahara *et al.*, 2002). Aquests valors se situen al voltant del 7% però s'incrementen significativament fins al 14% quan s'utilitza CLM per bloquejar la síntesi endògena de DXP. A diferència del cas anterior si que es produeix en efecte important de l'inhibidor en la incorporació, potser perquè en aquest cas les condicions de creixement de les plantules en dia llarg afavoreix el flux metabòlic a través de la via del MEP, més activa en condicions de llum, i per tant una aportació d'intermediari no marcat endogen elevada. En segon lloc la concentració més baixa de l'intermediari marcat provocaria una menor disponibilitat d'aquest compost tal i com suggereix la capacitat només parcial que mostra de recuperació del fenotip letal albi a aquesta concentració. Per tant al bloquejar la síntesi

endògena s'enriqueix de forma efectiva la proporció d'intermediari marcat cosa que no passa en absència de l'inhibidor on la proporció es manté més equilibrada. Aquesta diferència es reflexa en l'experiment control d'incorporació de marcatge en els propis carotenoids del cloroplast, en el qual la incorporació és elevada però significativament diferent segons si la síntesi endògena estava bloquejada amb clomazona (>65%) o no (~25%).

Tanmateix, els resultats d'incorporació entre les plantes silvestres i les *rif18* són molt similars indicant que el bescanvi de precursors del cloroplast cap al citosol tampoc està alterat en el mutant.

En conjunt els resultats demostren que tal i com esta descrit existeix un intercanvi entre les vies del MVA i la del MEP però en cap dels dos sentits s'observen alteracions significatives en el mutant respecte al comportament de la planta silvestre. Aquests resultats van formar part d'un article d'investigació adjuntat al final d'aquesta tesi (Flores-Perez et al. 2010).

3.2.3 El mutant *rif18* mostra un fenotip de fulles serrades i arrels curtes.

Durant el seu desenvolupament, el mutant *rif18* mostra algunes alteracions fenotípiques que no estan directament relacionades amb el metabolisme isoprenoide i que posen de manifest l'ampli ventall d'efectes de la mutació. Treballs anteriors en el grup ja havien demostrat que el mutant presentava una coloració verda més intensa i una floració anticipada. Un seguiment del procés de creixement va revelar que la mutació també provocava la forma serrada de les fulles en estadis adults de creixement així com també un retràs en el desenvolupament. (Figura 30).

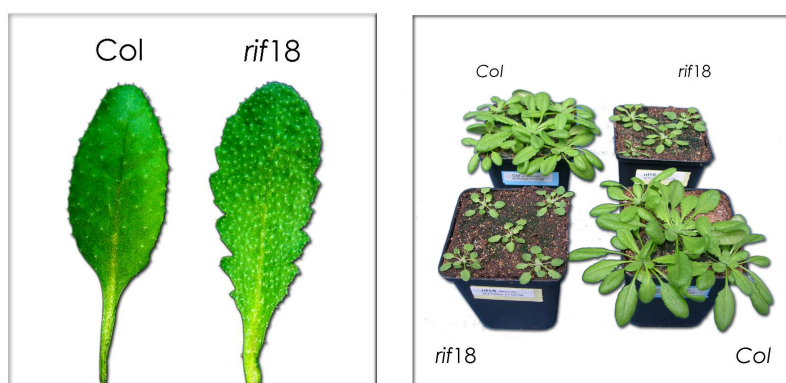


Figura 30. Trets fenotípics del mutant *rif18*. **Pannell esquerre:** Fulles de la rosetta de perfil serrat i totalment planes. **Pannell dret:** Plantes mutants i silvestres crescudes a dia curt durant 6 setmanes.

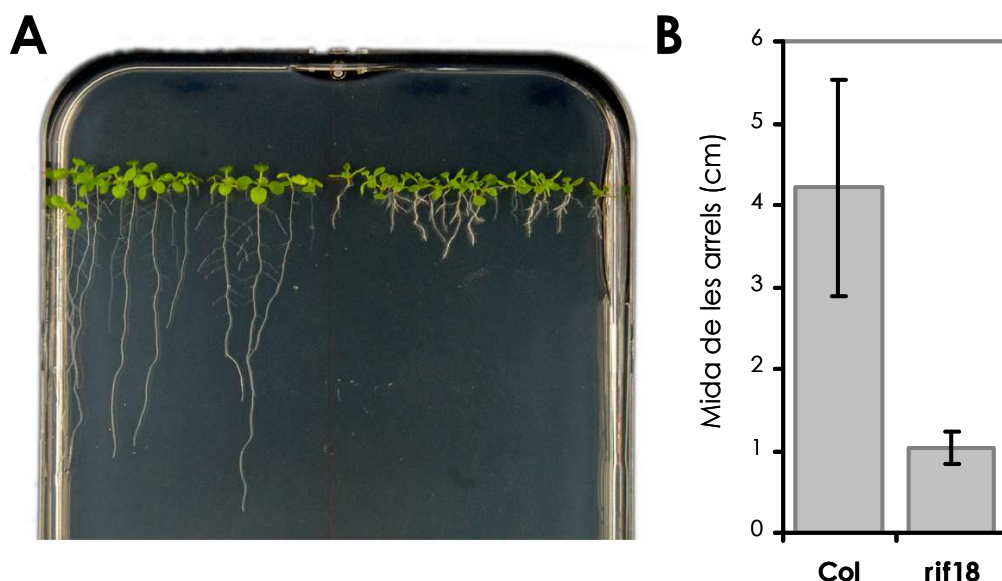


Figura 31. Comparativa de creixement de les arrels. (A) Imatge representativa del fenotip de les arrels de plàntules silvestres (col) i plàntules mutants (rif18). (B) Quantificació de la longitud de les arrels de plantules de 10 dies crescudes a dia llarg. Els resultats es corresponen als valors mitjans i les desviacions estàndard de 45 individus crescuts en grups de 15 en tres plaques independents.

Un segon tret característic del mutant era una clara inhibició del creixement de les arrels des dels primers estadis de desenvolupament en forma de plàntula i que es mantenia durant la fase adulta (Figura 31A). Per quantificar les diferències observades en el creixement de les arrels es van créixer tres plaques de MS0,5x- amb 15 llavors silvestres i 15 llavors del mutant en cada una d'elles. Després d'estratificar-les durant 48h a 4°C i en foscor, es van créixer en condicions de dia llarg durant 10 dies mantenint les plaques en posició vertical. La longitud de les arrels es va mesurar amb el suport del programa informàtic ImageJ (National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Els resultats demostren que existeixen diferències significatives en el creixement de les arrels del mutant que són aproximadament 4 vegades inferiors als de les plantes silvestres (Figura 31B).

En conjunt els resultats mostrats junt amb els prèviament descrits per a aquest mutant suggereixen la importància de processos post-transcripcionals i post-traduccional en el control de la via del MEP i per tant en la producció dels precursors universals que s'utilitzen per a la biosíntesi dels carotenoides en plastis, però també posen de manifest la gran complexitat d'un metabolisme com el de les plantes i la importància de la coordinació dinàmica dels diversos processos que el conformen.

4. Alternatives a les activitats limitants de l'aport de precursors.

4.1 Activitats alternatives als enzims claus de la ruta del MEP per a la millora de la producció de carotenoides.

Un camp de coneixement a explorar per a la seva posterior implantació en estratègies biotecnològiques enfocades a la millora de la producció de carotenoides en sistemes bacterians o vegetals és la identificació de noves activitats enzimàtiques alternatives a les ja conegudes de la ruta del MEP. Tant una derivació de la ruta original, com una proteïna capaç de dur a terme una de les reaccions de manera més eficient o una desvinculació dels mecanismes endògens de regulació podrien optimitzar el rendiment del procés.

Considerant els resultats previs obtinguts durant l'estudi dels passos limitants de la via del MEP per a la producció dels precursors universals en bacteris, i la seva correlació amb els estudis publicats en sistemes vegetals, es va focalitzar la recerca d'activitats alternatives en els dos primers passos de la ruta del MEP, els catalitzats pels enzims DXS i DXR (Figura 2). Per dur a terme aquest projecte es van utilitzar dues estratègies complementaries. La **primera** era la detecció de proteïnes endògenes d'*E.coli* que en mutar adquirissin la capacitat de catalitzar reaccions normalment catalitzades per DXS o DXR, o alternativament que generessin els productes de reacció d'alguna d'elles a partir de substrats diferents. La **segona** era la identificació de proteïnes en microorganismes on la proteïna canònica de la via MEP que hauria de dur a terme la catàlisi de la reacció és absent. Tan en un cas com en l'altre existeixen tres possibilitats *a priori* que permetrien superar la deficiència d'un gen essencial per a la supervivència. La primera consistiria en una proteïna que inicialment catalitzava una altra reacció que ha adquirit la capacitat de mimetitzar exactament la mateixa conversió. Una segona possibilitat seria que aquesta proteïna mutada generés el mateix producte de reacció però utilitzant uns substrats alternatius. I finalment un canvi que no suplís directament el pas de la ruta alterat sinó que produeixi de manera alternativa o mimètica a la ja existent algun dels intermediaris que es troben per sota del pas disruptat.

4.1.1 Activitats alternatives a DXS.

Treballs previs en el laboratori (Sauret-Güeto, 2005; Uros, 2009; Sauret-Güeto *et al.*, 2006) utilitzant la primera de les estratègies havien permès identificar un conjunt de mutacions capaces de revertir el fenotip letal de la soca de *E.coli* EcAB4_2 (**Taula2**) a la que se li havia disruptat el gen endogen codificant per DXS i substituït per un marcador de resistència a cloramfenicol. La soca també havia estat modificada integrant-li en el genoma l'operó MVA per a permetre la supervivència de les cèl·lules sense DXS a partir de la metabolització de MVA (afegit exògenament al medi) en IPP i DMAPP.

Aquesta soca s'havia sotmès a processos de mutació química i mutació espontània per posteriorment créixer les cèl·lules en absència de MVA de manera que només aquelles cèl·lules que haguessin adquirit una activitat alternativa a DXS durant el procés de mutació serien capaces de superar la disrupció del gen endogen i proliferar. En analitzar les mutacions en els genomes de les colònies s'havien detectat dos grups de mutacions. El primer grup suposava aproximadament el 70% del total i estava format per soques que presentaven totes elles alguna mutació puntual en el gen *aceE* que codifica per la subunitat E1 del complex de la piruvat deshidrogenasa (PDH) (Sauret-Güeto *et al.*, 2006). Fins a quatre mutacions diferents en aquest enzim (E636G, E636Q, L633R, i Q408R) permetien recuperar la viabilitat de les cèl·lules. El segon grup més reduït el conformaven soques en les que els gens responsables no havien pogut ser identificats (Uros, 2009).

4.1.1.1 La mutació E636G en la subunitat E1 de la PDH la facultava per a la síntesi de DXP *in vivo* en *E.coli*.

L'estudi de l'efecte de les diverses mutacions en el gen *aceE* havia aportat inicialment evidències genètiques que apuntaven en la direcció de que les mutacions dotaven a l'enzim de la capacitat de mimetitzar la reacció catalitzada per DXS (Sauret-Güeto, 2005). No obstant, experiments d'activitat duts a terme *in vitro* amb les proteïnes E1-PDH mutades no donaven suport a aquesta hipòtesis. Assajos d'activitat DXS realitzats amb les proteïnes PDH recombinants purificades no mostraven activitat en presència dels substrats de DXS o de potencials substrats alternatius (Uros, 2009). Tot i tractar-se de resultats aparentment contradictoris cap d'ells era suficientment concloent com per establir la validesa d'un sobre l'altre. En el cas dels experiments de complementació la evidència obtinguda era indirecte mentre que en el cas dels experiments *in vitro* s'estaven obviant les condicions de l'interior cel·lular.

En aquest punt es va optar per intentar identificar els productes de reacció generats per la proteïna E1-PDH mutada *in vivo*. Les concentracions dels intermediaris de la via MEP en la cèl·lula són molt baixes i intents anteriors de detecció i quantificació havien posat de manifest

que les quantitats es troben massa properes als límits de detecció de les tècniques analítiques actuals per generar resultats amb una reproducibilitat suficient. Per superar aquest problema tècnic es va dissenyar un experiment utilitzant una soca de *E. coli* doble mutant que permetés la acumulació de DXP fins a nivells detectables de manera robusta. La soca EcAB1-6 (**Taula4**) presenta la doble disrupció dels gens *dxs* i *dxr* que per recombinació homòloga han estat substituïts per gens de resistència a cloramfenicol i tetraciclina respectivament. L'absència d'aquests dos gens impossibilita la síntesi de IPP i per tant d'isoprenoides generant un fenotip de letalitat. Aquest efecte es pot revertir, i per tant mantenir les cèl·lules vives, creixent-les en un medi suplementat amb metileritritol (ME). El ME és fosforilat a l'interior cel·lular i en forma de MEP es pot incorporar a la via. Treballar amb el doble mutant eliminava per una banda l'activitat DXS i permetia per tant testar si la proteïna E1-PDH mutada era capaç de catalitzar *in vivo* la mateixa reacció. Per l'altre banda l'absència d'activitat DXR evitava que aquesta consumís el producte de reacció esperat (la DXP) com a substrat per a la següent transformació permetent així incrementar els nivells de DXP intracel·lulars i per tant millorar les possibilitats per a la seva detecció i quantificació.

Per dur a terme l'experiment en primer lloc es van clonar les seqüències codificants de les proteïnes de *E. coli* DXS (com a control positiu), E1-PDH (com a control negatiu), i E1-PDH(E636G) en el vector pCRII (Km^R) utilitzant els encebadors DXS-F i DXS-R en el primer cas, i AceE-1F i AceE-4R en els altres dos. La correcta expressió i activitat de les construccions per DXS i E1-PDH(E636G) es va comprovar per complementació de la soca de *E. coli* deficient en DXS (EcAB4-2). En segon lloc es van generar cèl·lules competents de la soca EcAB1-6 (doble mutant per DXS i DXR) creixent-les en tot moment en presència de ME per garantir la seva viabilitat. Degut a la dificultat d'obtenir quantitats suficients de ME per poder dur a terme l'experiment es va optar per un sistema alternatiu per mantenir les cèl·lules del doble mutant. La soca es va co-transformar amb el plasmidi pBAD-M3 (Amp^R) (Campos *et al.*, 2001). Aquest vector conté l'operó MVA i permet la síntesi de IPP i DMAPP a partir de MVA addicionat al medi de cultiu.

Així, cèl·lules competents de la soca EcAB1-6 amb el plasmidi pBAD-M3 incorporat es van transformar amb les construccions pCRII-DXS, pCRII-AceE, o pCRII-AceE(E636G) i es van plaquejar en medi LB suplementat amb ampicilina 100 µg/ml (per seleccionar el plasmidi pBAD-M3), kanamicina 50 µg/ml (per seleccionar les construccions en pCRII), cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar la soca) i MVA 1mM. La resistència a tetraciclina de la soca, associada a la disrupció del gen *dxr* no es va utilitzar en la selecció per no dificultar encara més el creixement amb un antibiòtic addicional que no era estrictament necessari ja que les disrupcions de *dxs* i *dxr* són genòmiques i per tant van sempre associades. A partir de colònies aïllades es van inocular, per duplicat, 10 ml de medi LB líquid amb les mateixes quantitats d'antibiòtics i MVA, i es van créixer a 37°C durant 24h. En aquestes condicions experimentals el MVA permet la supervivència de les cèl·lules durant la incubació, temps en el que les proteïnes expressades

de les diverses construccions poden generar DXP la qual s'acumula en no poder ser consumida degut a la absència de l'enzim DXR que catalitza la seva transformació. La relativament elevada taxa de mutació espontània que reverteix el fenotip letal de deficiència en DXS i DXR (Sauret-Güeto *et al.*, 2006) recomanava evitar la inoculació de cultius frescos a partir de precultius saturats, i treballar amb temps d'incubació moderats. Per altra banda també requeria la necessitat de controlar en tot moment el manteniment de les característiques de la soca doble mutant. Per fer-ho paral·lelament es van créixer cultius control a partir de les mateixes colònies utilitzades per l'experiment però en absència de MVA per controlar que es mantenia la auxotrofia i indicant per tant que tot i la possible complementació de la pèrdua de DXS per efecte de les construccions inserides, la falta de DXR continuava sent letal. Per altra banda es va analitzar mitjançant PCR la disrupció del gen *dxs* i la presència de les construccions en pCRII. A partir d'un microlitre del cultiu incubat es van amplificar per PCR els gens *dxs*, *aceE*, i *aceE*(E636G) en pCRII amb els encebadors M13F i M13R, i la substitució de *dxs* per cloramfenicol acetil transferasa (*cat*) en el genoma de la soca amb els encebadors DXS-2F i CAT-2R. (Figura 32)

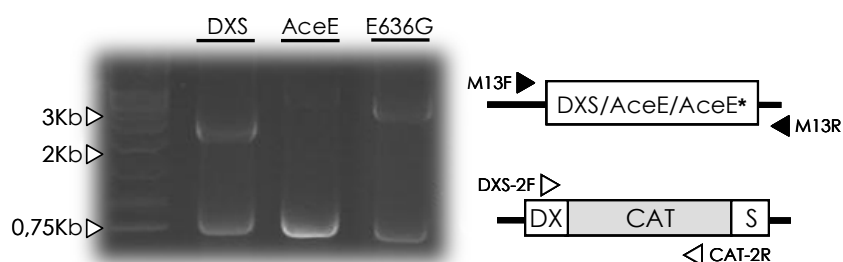


Figura 32. PCR de comprovació dels plasmidis transformats i de la disrupció del gen *dxs* de la soca EcAB1-6. Bandes superiors: Amplificació dels gens *dxs* (2,2 Kb), *aceE* (3Kb) i *aceE*[E636G] (3Kb). Bandes inferiors: Amplificació de la inserció del gen *cat* dintre de la seqüència del gen *dxs* endògen per recombinació homòloga.

Una vegada comprovades les correctes condicions de l'experiment i el genotip de les soques es van recuperar els pellets i es va utilitzar cada un dels duplicats per provar dues metodologies d'extracció dels metabolits intracel·lulars.

Metode1: En un dels casos es van afegir dues mostres corresponents a un blanc addicionat (es a dir aigua amb 10µg de patró de DXP) i una mostra addicionada (un cultiu cel·lular amb 10µg de patró de DXP) que es van sotmetre al mateix protocol d'extracció. Per obtenir una identificació inequívoca de les molècules de DXP i realitzar una quantificació acurada es va afegir un patró intern de DXP marcada isotòpicament amb ^{13}C : [3,4,5- ^{13}C]-DXP. Els extractes es van analitzar amb una tècnica d'elevada sensibilitat com és la cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses de triple quadrupol treballant en mode MRM. Aquest mètode consisteix en la selecció de la massa parental de la molècula analitzada en el primer quadrupol, una fragmentació de la molècula en el segon, i una segona selecció d'un ió fill

característic del trencament en el tercer. El seguiment de DXP es va fer treballant en mode negatiu seleccionant la massa $[M-H]=213$ i detectant el fragment característic de $m/z=139$. El patró intern, amb tres marques isotòpiques es va detectar seleccionant $[M-H]=216$ i detectant el fragment de $m/z=141$ ja que durant la fragmentació perd una de les tres marques (Figura 33A).

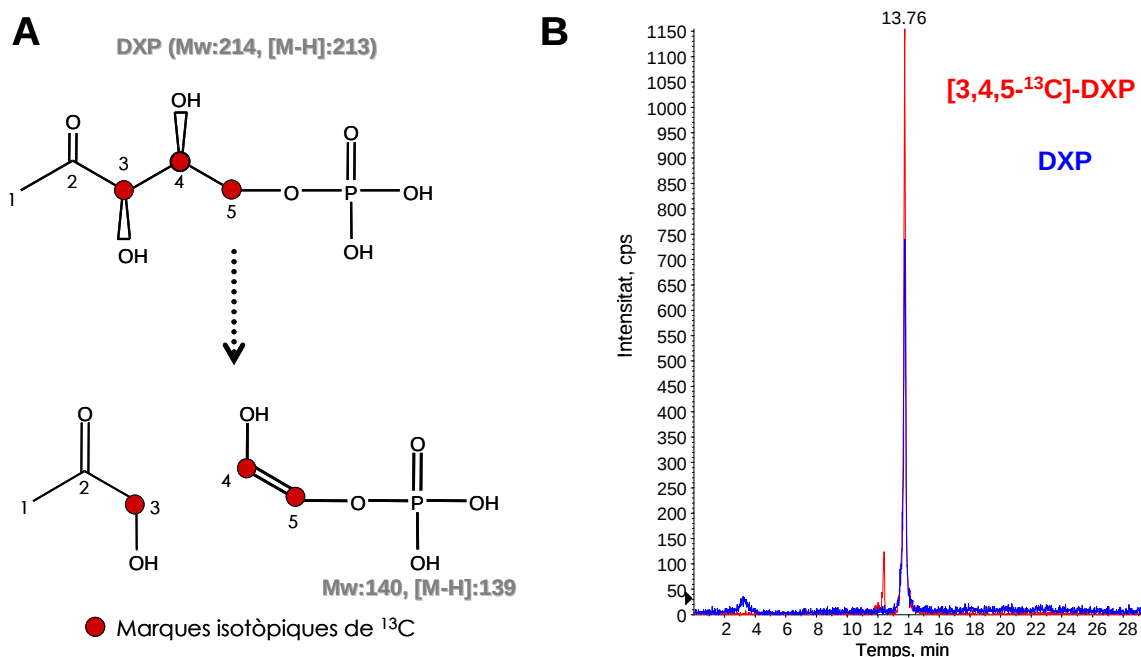


Figura 33. Detecció i identificació del producte de reacció final de la reacció catalitzada per la subunitat E1 de la PDH mutada (*aceE* [E636G]) per HPLC-MS/MS. **(A)** Esquema del patró de fragmentació característic de la molècula de DXP utilitzat pel seguiment de l'ió parental $[M-H]:213$ i de l'ió fill resultant de la seva fragmentació. En vermell es destaquen les posicions de les marques isotòpiques amb ^{13}C de la molècula $[3,4,5-^{13}C]$ -DXP afegida a les mostres com a patró intern.. **(B)** Cromatograma representatiu dels anàlisis d'extractes realitzats per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses de triple quadrupol treballant en mode MRM. Es mostra la superposició dels senyals obtinguts per la transició $m/z:213 \rightarrow 139$ associada a la molècula de DXP (blau) i la $m/z:216 \rightarrow 141$ corresponent a la molècula patró $[3,4,5-^{13}C]$ -DXP (vermell).

En les condicions cromatogràfiques utilitzades s'observa com les mostres dels cultius transformats amb la construcció pCRII-AceE(E636G) presenten un pic molt clar a un temps de retenció de 13,7 minuts que coincideix exactament amb el temps de retenció del patró intern corresponent a la molècula de DXP marcada isotòpicament (Figura 33B). Aquest pic també apareix en analitzar les mostres control transformades amb la construcció pCRII-DXS però no ho fa en canvi en les mostres control transformades amb la construcció pCRII-AceE que expressen la proteïna E1-PDH silvestre. La quantificació dels valors absoluts de DXP en les mostres extretes amb el mètode de sonicació mostra una acumulació d'aproximadament 30 ng/10ml pel control positiu de DXS, una absència total en el control negatiu de E1-PDH i uns valors al voltant dels 100 ng/10ml per la proteïna mutant E1-PDH(E636G) (Figura 34A). Els valors de les mostres utilitzades com a control del procés d'extracció i detecció se situen al

voltant del 6µg/10ml pel blanc addicionat i de 4,7µg/10ml per la mostra addicionada (Figura 34A). El primer dels valors tenint en compte que es partia de 10 µg/10ml de patró afegit, ens indica una pèrdua d'aproximadament el 40% de l'analit durant l'extracció. El valor de la mostra addicionada encara mostra una pèrdua major de fins al 53%. La diferència entre les dues mostres ens indica la incidència de l'efecte matriu durant la detecció és a dir la pèrdua de detecció associada a la matriu complexa de la mostra que dificulta el procés d'ionització de les molècules d'analit.

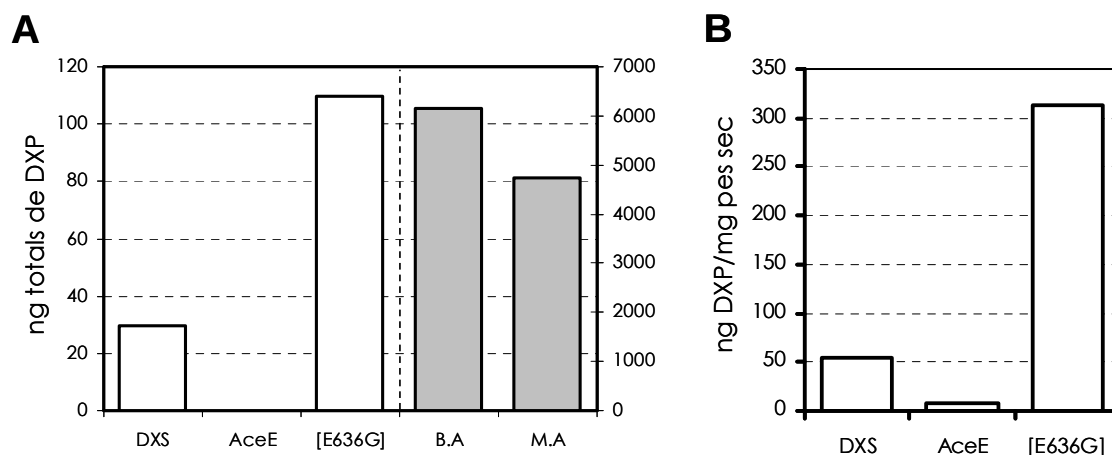


Figura 34. Quantificació dels nivells de DXP mesurats en els extractes de la soca doble mutant *EcAB1-6* transformada amb el plasmidi auxiliar *pBAD-M3* i els plasmidis que expressen *DXS* (control +), *AceE*, o *AceE[E636G]*. (A) Nanograms totals de DXP de les mostres extretes amb el mètode de sonicació. Barres blanques dimensionades a l'eix principal per la producció de DXP associada a les proteïnes *DXS*, *AceE* i *AceE[E636G]*. Barres grises dimensionades a l'eix secundari corresponents a les mostres control del mètode d'extracció i detecció a partir de concentracions conegudes (10µg) de DXP addicionades. B.A: Blanc addicionat (aigua), M.A: Mostra addicionada (cultiu bacterià). (B) Nanograms de DXP per mil·ligram de pes sec de les mostres extretes amb el mètode Wright.

Mètode2: La quantificació de DXP detectada en les mostres extretes amb el segon protocol (mètode Wright, no publicat) normalitzant els valors per mg de pes sec demostra que aquest mètode d'extracció dona una eficiència superior al mètode de la sonicació. S'observa com el control positiu de la proteïna *DXS* produeix aproximadament 50 ng de DXP per mg de pes sec (PS). Per la seva part els cultius que expressen la proteïna *PDH* mutada acumulen quantitats superiors als 300 ng/mg PS. Aquest valors, no obstant, no es poden extrapolar com a una indicació de la eficiència de transformació d'una proteïna respecte l'altre ja que no es coneixen els nivells d'expressió de cada una d'elles. De les quantificacions destaca el fet que la proteïna *PDH* silvestre utilitzada com a control negatiu rendeix un petita quantitat de DXP. Aquest resultat però no es sorprenent considerant que s'ha detectat un 1% d'activitat de la proteïna silvestre en assajos d'activitat *DXS in vitro* (comunicació personal, Phillips. M).

El triple criteri format per el temps de retenció, la selecció de la massa de la molècula, i la formació d'un ió de fragmentació característic de DXP són evidències suficients per concloure

que *in vivo* la presència de la proteïna mutada E1-PDH(E636G) és la responsable de la acumulació de DXP a l'interior de les cèl·lules de *E. coli* sense DXS. Aquests resultats però no descarten que el producte generat per la proteïna E1-PDH mutant sigui DX que posteriorment sigui fosforilada a l'interior cel·lular, ni tampoc que els substrats a partir dels quals l'enzim produeixi la DX(P) siguin diferents als que utilitza DXS. En tot cas si que ens porta a deduir que la capacitat de la proteïna per complementar la deficiència de DXS es fonamenta en la producció directe o indirecte de DXP refent la via del MEP en la seva forma original i per tant sense que es produeixin vies alternatives que incorporin altres intermediaris en diferents passos de la ruta. Part dels resultats descrits es van publicar com a part d'un treball adjuntat al final d'aquesta tesi (Perez-Gil et al. 2012).

4.1.1.2 Identificació de noves activitats alternatives

Paral·lelament a l'estudi del primer grup de mutants que presentaven un conjunt de mutacions puntuals totes elles localitzades en el gen *aceE*, es va iniciar la cerca de noves mutacions en altres proteïnes de *E. coli* que també fossin capaces de revertir el fenotip letal resultat de la disrupció del gen *dxs*. Es va utilitzar com a material de partida el segon grup de mutants, seleccionats en treballs previs del laboratori (Uros, 2009), dels quals es desconeixia el gen responsable del rescat de la pèrdua de funció de DXS. Específicament, es varen estudiar els mutants SX6, SX7, EX8 (també anomenat SX18), i EXE1 (també anomenat SX12E).

Tal i com s'ha descrit anteriorment els mutants havien estat identificats després de sotmetre la soca EcAB4-2, deficient en *dxs*, a diversos processos de mutagènesis. Així, en primer lloc es va comprovar la capacitat d'aquests quatre mutants de proliferar en absència de MVA. Es van estriar en plaques de medi sòlid LB suplementat amb kanamicina 50 µg/ml (per seleccionar la integració de l'operó MVA) i cloramfenicol 20 µg/ml (per seleccionar la disrupció del gen *dxs* endogen) en presència o absència de MVA 1 mM. Les cèl·lules es van incubar a 37°C durant 24 h utilitzant com a controls les soques EcAB4 i EcAB4-2 original (**Taula4**).

Les quatre soques mutants creixen correctament tant en presència com absència de MVA a diferència de la soca control que només pot fer-ho quan utilitza el MVA del medi per suplir la deficiència de IPP derivada de la falta del gen *dxs*. El creixement dels mutants, però, mostra en alguns casos diferències (Figura 35A). Seguidament es va confirmar que efectivament presentaven la disrupció del gen *dxs* amplificant per PCR de colònia un fragment de la seqüència del gen de la cloramfenicol acetil transferasa (*cat*) que disrupta el gen *dxs* amb els encebadors DXS-2F i CAT-2R (Figura 35B).

Finalment, per confirmar que la capacitat de sobreviure sense activitat DXS ni mevalonat no era deguda a mutacions en el gen *aceE* es va seqüenciar íntegrament el gen en cada una de les soques estudiades. En tots els casos la seqüència de nucleòtids de *aceE* no presentava cap mutació mantenint la seva forma silvestre. Per tant havia de ser un altre gen (o gens) no identificat el responsable del rescat.

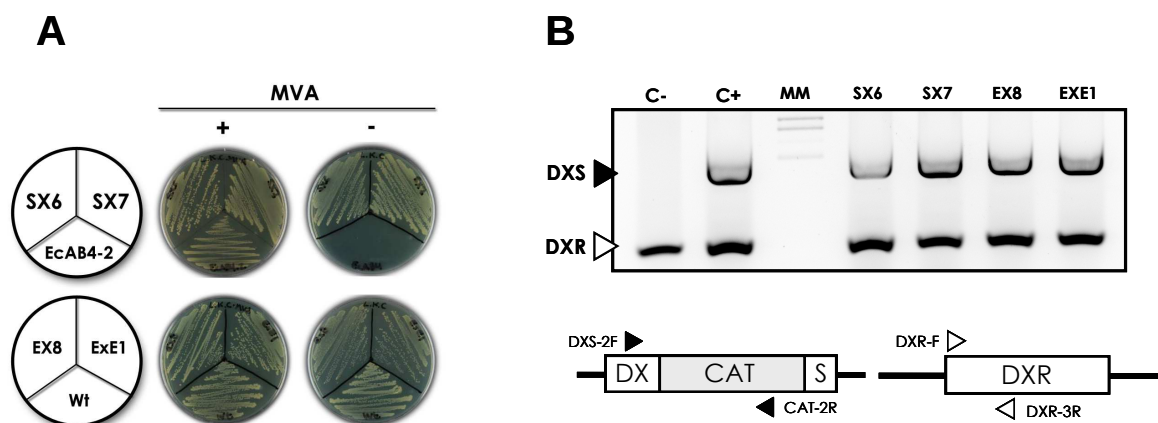


Figura 35. Caracterització inicial bàsica de les soques mutants. **(A)** Creixement de les soques mutants (SX6, SX7, EX8, ExE1) i dels controls EcAB4 (Wt) i EcAB4-2 en presència (+) o absència (-) de MVA. **(B)** Comprovació de la disrupció del gen *dxs* en les soques mutants per PCR. **Superior:** Bandes d'amplificació per inserció de *cat* en *dxs* (superior) i *dxr* (inferior). Tant els mutants SX6, SX7, EX8, ExE1 com el control positiu (Soca EcAB4-2) donen la banda d'amplificació esperada de 1Kb. No hi ha amplificació per la soca control que manté el gen *dxs* intacte. **Inferior:** Esquema del gen *dxs* amb la inserció del gen *cat* i els encebadors utilitzats per detectar-ne la seva presència. El gen DXR es va utilitzar com a control de la reacció d'amplificació produint una banda de 500pb amb els encebadors indicats.

La identificació de gens individuals mutats encara que es tracti d'organismes senzills com és el cas d'*E.coli* requereix un temps i un esforç importants. Tenint en compte que els estudis preliminars de creixement dels mutants en placa semblaven indicar que no tots ho feien amb la mateixa facilitat i que l'objectiu últim de l'estudi era la seva potencial aplicació com a eina biotecnològica es va decidir fer una avaluació prèvia per seleccionar els més interessants. Assumint que es podia establir una correlació entre la velocitat de creixement i la eficiència amb que les mutacions de cada soca supleen la pèrdua d'activitat DXS es va fer un seguiment d'aquest creixement al llarg del temps. Per obtenir corbes de creixement comparables es van utilitzar inòculs normalitzats per assegurar una densitat cel·lular inicial equivalent. Es van inocular 5 precultius de medi LB amb kanamicina (50 µg/ml) i cloramfenicol (20 µg/ml) per cada soca a partir de cinc colònies aïllades i es van incubar a 37°C i 200 r.p.m durant tota una nit. Es va determinar la densitat dels cultius a partir de la D.O₆₀₀ i es va seleccionar el de màxim creixement en cada cas per inocular 4 cultius de 20 ml de medi fresc amb els volums necessaris de cada cultiu per igualar la quantitat de cèl·lules de partida. Els cultius es van incubar a 37°C recollint mostres a diversos temps durant un període de 18 h. En el mateix moment de recollir les mostres per cada interval de temps es va determinar la seva D.O₆₀₀ diluint amb medi LB quan els valors de la mesura superaven el líndar de 1 per mantenir-nos en tot moment dintre de l'interval de linealitat de la tècnica espectrofotomètrica. (Figura 36)

La corba de creixement comparada dels mutants respecte la mostra control revela que efectivament existeixen diferències significatives de comportament. Un dels mutants, el SX7 manté una evolució pràcticament idèntica a la de la mostra control amb la proteïna DXS funcional. Els mutants EX8 i SX6 també mostren una taxa de creixement bastant bona però s'observa un cert retard respecte el control, que és més accentuat en el cas del mutant SX6. En canvi el mutant ExE1 tot i ser capaç de proliferar, com ja apuntaven els resultats en placa, ho fa a un ritme molt més lent i amb un perfil de creixement sostingut que no mostra les típiques fases exponencial i estacionària suggerint que la mutació adquirida li permet superar amb menor eficiència la letalitat que implica la deficiència en DXS.

En base a aquest resultat es va decidir centrar el treball en la identificació dels gens mutats responsables de la supressió de la auxotrofia per mevalonat de les soques SX7 i EX8.

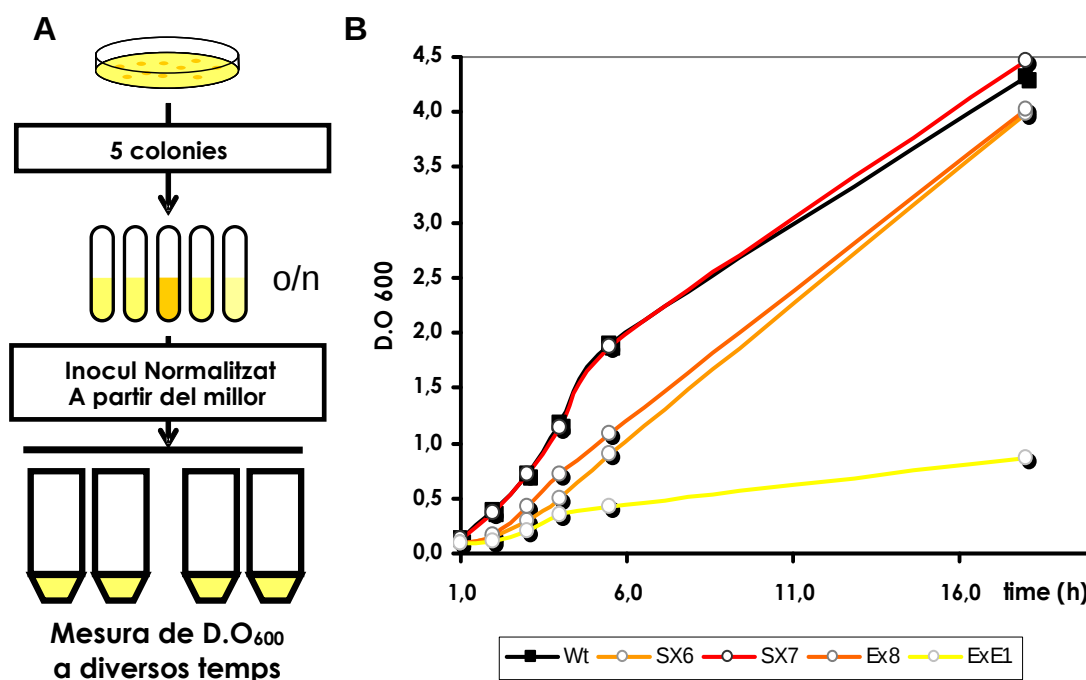


Figura 36. Anàlisi de creixement de les soques de *E.coli*. A) Esquema del disseny experimental realitzat per cada una de les soques. B) Corba de creixement dels cultius de la soca silvestre (Wt) i de les soques mutants (SX6, SX7, EX8 i ExE1) a 1h, 2h, 3h, 4h, 5h i 18h després de l'inòcul normalitzat..

4.1.1.2.1 La mutació G108S en l'enzim 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfat sintasa (DHBPS) reverteix el fenotip letal per pèrdua de l'activitat DXS en la soca EX8.

Per intentar identificar el gen i la mutació o mutacions responsables de originar una alternativa enzimàtica a la pèrdua de DXS es va triar una estratègia genètica. Es va optar per generar una

genoteca completa dels genomes de les soques SX7 i EX8 per acte seguit complementar soca EcAB4-2 deficient en *dxs* per identificar el clon que ha incorporat el fragment del genoma on resideix el gen que permet superar aquesta deficiència. La falta de la proteïna DXS resulta letal en absència de MVA, de manera que totes aquelles cèl·lules que incorporin clons que expressin proteïnes que no supleixin l'activitat d'aquest enzim no sobreviuran mentre que si ho faran i seran capaces de proliferar fins a generar colònies les cèl·lules que incorporin el clon que conté el gen responsable de suplir l'activitat.

Aquesta estratègia es va desenvolupar en diversos passos. En primer lloc es van créixer 10 ml de cultiu líquid inoculat amb les soques mutants SX7 i EX8 a 37°C durant 24 h per fer-los arribar a fase estacionaria. Es va recollir el sediment de cèl·lules i es va realitzar una extracció d'ADN genòmic amb el mètode del tiocianat de guanidina que rendeix grans quantitats de material genètic amb un elevat nivell de puresa.

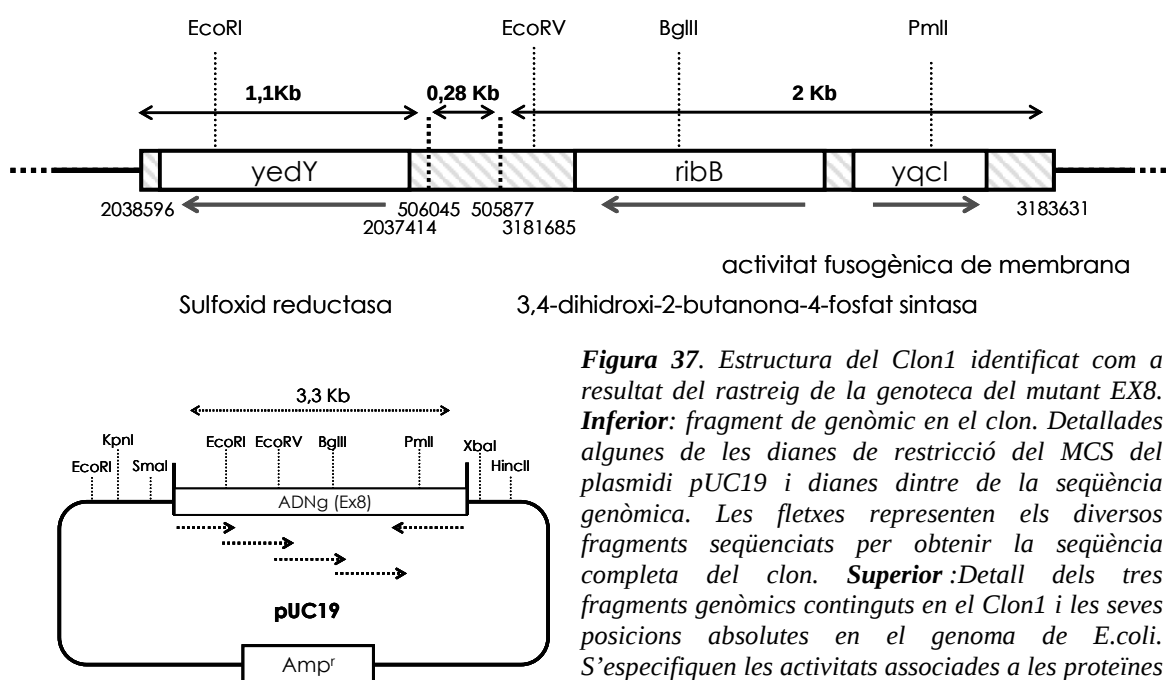
L'ADN genòmic es va sotmetre a digestió parcial amb l'enzim de restricció *Sau3A* utilitzant una metodologia de 5 dilucions seriades de l'enzim mantenint constant la quantitat d'ADN i fixant en 10 min el temps d'incubació a 37°C abans d'inactivar tèrmicament l'enzim per aturar la reacció. Les digestions es van separar en un gel d'agarosa i es va retallar la regió que comprenia l'interval de mides d'entre 2 i 4Kb per recuperar-ne el conjunt de fragments representatius el qual es va avaluar en un nou gel d'agarosa.

L'enzim *Sau3A* produeix extrems protuberants compatibles amb els extrems protuberants resultat de la digestió amb *Bam*HI. Per aquest motiu es va insertar tot el grup de fragments d'ADN genòmic en 1 µg del vector comercial pUC19 (Amp^R) digerit amb *Bam*HI i defosforilat a través d'una reacció de lligació amb l'enzim T4 lligasa per generar la genoteca. Aquesta genoteca es va amplificar transformant la lligació en la soca TOP10 i creixent les cèl·lules en 10 plaques de LB amb ampicilina (100 µg/ml) per assolir una densitat aproximada de 500 colònies/placa. La eficiència de lligació dels fragments i el valor promig de la mida d'aquests fragments es va estimar analitzant els productes d'amplificació de la PCR sobre 10 colònies escollides a l'atzar amb els encebadors M13-F i M13-R que hibriden a banda i banda del punt d'inserció dels fragments en el plasmidi. Amb aquest sistema es va determinar una eficiència de lligació del 80% i una mida promig dels fragments inserits d'aproximadament 3 Kb. Considerant aquests valors es pot estimar que per un total de 5×10^3 colònies el 80% de les quals incorporen un fragment de 3×10^3 nucleòtids cada una, disposem d'una genoteca del voltant de 13×10^6 parells de bases. Si el genoma complet de *E. coli* està format per $4,2 \times 10^6$ parells de bases la genoteca representa tres vegades el genoma complet del microorganisme, una proporció prou bona per dur a terme un rastreig de la genoteca amb garanties.

La genoteca amplificada en les colònies de les plaques es va recuperar resuspenent les cèl·lules en LB líquid i se'n van extreure el conjunt de clons que la conformen per dur a terme el

rastreig. Es van transformar 10 al·lotes (per cada genoteca) de cèl·lules competents d'elevada eficiència de transformació (electrocompetents) de la soca EcAB4-2 amb 500 ng de la barreja de clons cada una. Després d'incubar durant 24h a 37°C les plaques de la transformació en presència dels antibiòtics ampicilina, kanamicina i cloramfenicol, no va aparèixer cap colònia de la genoteca de SX7 però si en van aparèixer 4 del rastreig de la genoteca generada a partir del mutant EX8.

Els plasmidis de les quatre colònies es van extreure i es van seqüenciar els extrems del fragment insertat confirmant que tots ells representaven a un mateix clon (**Clon1**, Figura 37). L'estructura del clon identificat incloïa tres fragments genòmics no consecutius: 2038596-2037414, 506045-505877, i 3181685-3183631 per una mida total de 3,3 Kb. L'estudi dels tres fragments va revelar la presència de tres possibles gens candidats. El primer d'ells es corresponia amb el gen *yedY* (ID:946484) que codifica per una proteïna amb activitat sulfòxid reductasa identificada *in vitro*. El segon es corresponia al gen *yqiC* (ID:947524) que codifica per una proteïna de funció desconeguda però predita per similitat amb activitat fusogènica de membrana. Per últim, el tercer gen candidat, *ribB* (ID:947526), codifica per l'enzim 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfat sintasa (Figura 37).



Per establir quin dels 3 possibles gens candidats era el que estava complementant la pèrdua de funció de DXS es van fer una sèrie de digestions del clon per eliminar fragments creixents de la seqüència i mapar la regió on residia l'activitat enzimàtica (Figura 38). En primer lloc es van fer digestions amb *EcoRI* i *EcoRV* que eliminaven de manera parcial i de manera completa el gen *yedY*. Les dues construccions resultants eren perfectament hàbils de complementar la

soca deficient en DXS. La següent digestió es va fer amb *Pml*I, que trunca el gen *yqcI*, i es va comprovar que també era capaç de complementar. Finalment la construcció resultant de la digestió amb *Bgl*II per eliminar la regió 5' del gen *ribB* no va ser capaç de complementar el mutant (Figura 38).

El mapat apuntava directament cap al gen *ribB* com al responsable únic i directe de la complementació del mutant. Per confirmar-ho es va amplificar aquest gen utilitzant el Clon1 com a motllo, amb els encebadors RibB-NdeI-F i RibB-XhoI-R, i es va introduir en un vector pCRII per poder analitzar la capacitat de complementació del gen individual. El creixement en absència de MVA de la soca mutant transformada amb la construcció pCRII-RibB(EX8) demostrava la capacitat del gen *ribB* clonat de compensar la falta de l'enzim DXS. Una vegada identificat el gen es va fer una seqüenciació exhaustiva per detectar la presència de mutacions en el gen *ribB* clonat (aïllat de la soca EX8). Es van fer seqüenciacions del gen a partir del Clon1, a partir de la seva amplificació utilitzant l'ADN genòmic com a motllo, i a partir de la construcció pCRII-RibB(EX8). Els resultats es van comparar amb la seqüència teòrica dipositada en la base de dades GenBank (ID:947526) i amb la seqüència del mateix gen amplificat de la soca parental EcAB4-2 (Figura 39). La comparació va revelar la existència d'una mutació en la guanosina 323 que havia estat substituïda per una adenina. Aquesta substitució suposa un canvi d'aminoàcid de glicina a serina (G108S).

Digestió	EcAB4-2	
	+ MVA	-MVA
Complet	+	+
EcoRI	+	+
<i>Sma</i> I/ EcoRV	+	+
<i>Sma</i> I/ Bgl II	+	-
Pml I/ <i>Hinc</i> II	+	+

Figura 38. Mapa de les fragmentacions generades a partir del Clon1 i la seva capacitat de complementar la soca EcAB4-2. Digestió: Enzims utilitzats per fragmentar el Clon1. En negreta les dianes localitzades dintre de la inserció i en lletra regular les dianes presents en el MCS del vector. Columna dreta: Capacitat de creixement (+) o no (-) de la soca EcAB4-2 transformada amb les diverses variants generades del Clon1.

El gen *ribB* en *E.coli* codifica per l'enzim 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfat (DHBP) sintasa (DHBPS) el qual catalitza la reacció de trencament de la molècula de ribulosa-5-fostat (C5) formant una molècula de 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfat (C4) i una de formiat (C1) (Figura 39).

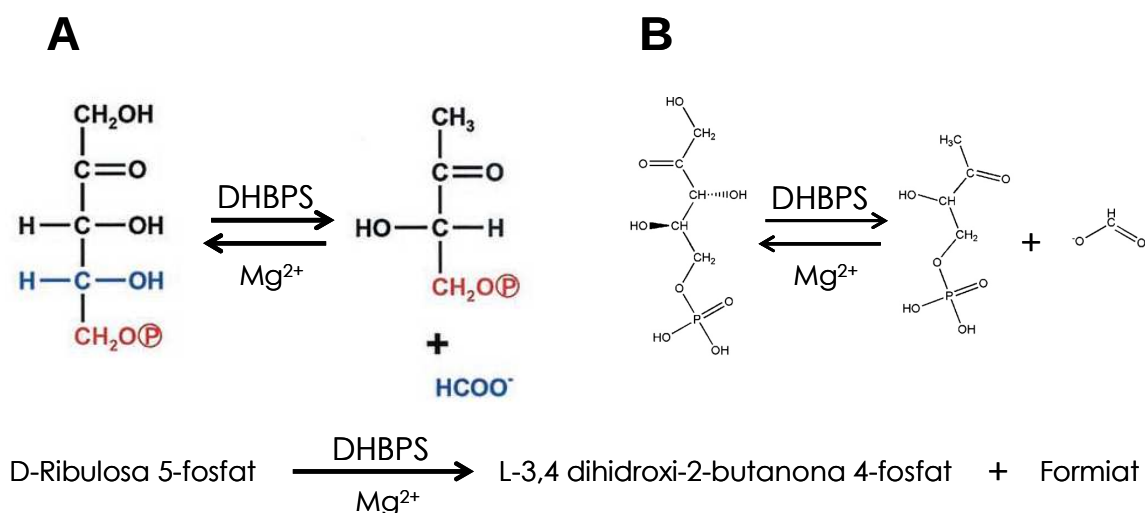


Figura 39. Reacció catalitzada per l'enzim DHBPS. A) Perspectiva plana de les molècules involucrades en la conversió de ribulosa-P en dihidroxi butanona-P i formiat. En vermell el carboni que uneix el grup fosfat. En blau el carboni que s'allibera per donar lloc a la molècula de formiat. B) Detall molecular dels substrats i productes de la reacció.

4.1.1.2.2 El gen *ribB* també presenta mutacions en les soques SX6, SX7 i ExE1.

Tot i que s'havia identificat la mutació de *ribB* en la soca EX8 de *E. coli* com a responsable directe de la compensació de la pèrdua de funció de DXS, es disposava encara de tres soques mutants per a les quals no es coneixia el gen mutat: SX6, SX7, i ExE1.

Es va decidir analitzar, per tant, la seqüència de *ribB* en aquestes tres soques mutants per determinar si el mateix gen podia ser o no també el responsable de facultar-les a créixer sense MVA. Com en el cas de EX8 es va fer una seqüenciació exhaustiva del gen per a cada una de les soques tan directament de l'amplificació a partir de l'ADN genòmic com de les construccions generades en el vector pCR11 per totes elles (Figura 40).

L'anàlisi mostra com en els tres casos el gen *ribB* presenta mutacions puntuals quan es comparen les seqüències amb la disponible en les bases de dades o la de la soca parental

EcAB4-2. La soca ExE1 presenta exactament la mateixa substitució de glicina per serina en la posició 108 que la soca EX8. En canvi tant en la soca SX6 com la SX7 es produeix una altra substitució (adenina 329 per una guanosina) que provoca el canvi de l'aspàrtic 113 per una glicina (D113G).

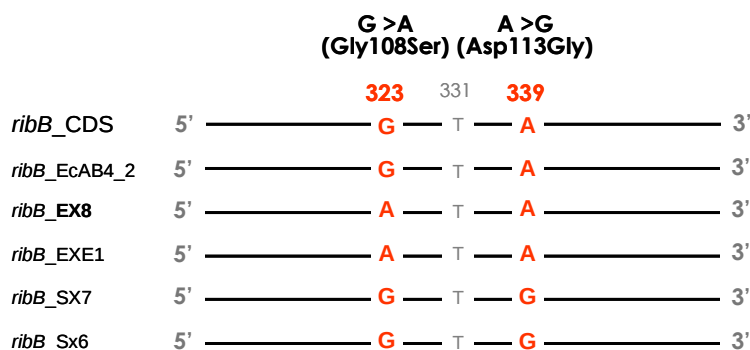


Figura 40. Esquema de les mutacions identificades en el gen *ribB* (654 pb) de les diverses soques mutants analitzades. La seqüència de la soca *EcAB4-2* es correspon amb la depositada en la base de dades GeneBank (ID:947526). Els mutants *EX8* i *EXE1* presenten la substitució *G108S*, mentre els mutants *SX7* i *SX6* mostren la *D113G*.

4.1.1.2.3 La mutació G108S en la DHBPS la faculta per a la síntesi de DXP in vivo en *E.coli*.

Seguint una metodologia anàloga a la descrita en l'apartat anterior per la proteïna E1-PDH (E636Q) es va afrontar la detecció de DXP in vivo de cultius expressant la proteïna DHBPS (G108S).

Per dur a terme l'experiment en primer lloc es van clonar les seqüències codificants de les proteïnes de *E.coli* DXS (com a control positiu), DHBPS, i DHBPS(G108S) en el vector pCRII (Km^R). La correcta expressió i activitat de les construccions per DXS i DHBPS(G108S) es va comprovar per complementació de la soca de *E. coli* deficient en DXS (*EcAB4-2*). Després, cèl·lules competents de la soca *EcAB1-6* amb el plasmidi pBAD-M3 incorporat es van transformar amb les construccions pCRII-Ø, pCRII-ribB, o pCRII-ribB(G108S) i se'n va analitzar extractes per cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses (LC-MS). En la mostra control transformada amb el vector buit (pCRII-Ø) s'observa la producció de molt baixes però detectables quantitats de DXP, el que indica que tot i la absència d'activitat DXS *E.coli* és capaç de produir quantitats mínimes d'aquest metabolit tot i que no suficients per garantir la supervivència de l'organisme. Aquest resultat suggereix l'existència d'activitats residuals associades a altres enzims que són capaces de dur a terme aquesta síntesi tot i que amb una eficiència insuficient.

La mostra control transformada amb el vector pCRII-ribB també acumula nivells baixos de DXP tot i que aparentment no significativament superiors als determinats per les soques transformades amb el vector buit, suggerint per tant que la forma silvestre de DHBPS no és capaç de formar aquest compost. En canvi, en les condicions utilitzades s'observa com les mostres dels cultius transformats amb la construcció pCRII-ribB(G108S) acumulen nivells detectables de DXP fins a 20 vegades per sobre de les mesures pels controls demostrant la capacitat de la proteïna en la seva forma mutada de sintetitzar aquest metabolit (Figura 41). Part dels resultats descrits es van publicar com a part d'un treball adjuntat al final d'aquesta tesi (Perez-Gil *et al.*, 2012)a.

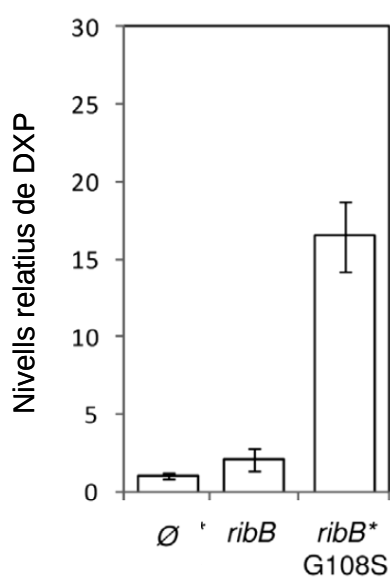


Figura 41. Quantificació de DXP en cultius de la soca EcAB1-6 transformada amb el vector pCRII buit (Ø), la seqüència silvestre (ribB) o la seqüència mutada. Les cèl·lules de *E. coli* deficientes en DXS i DXR i transformades, es van créixer per triplicar ($n=3$) durant 5h amb MVA. Els nivells de DXP es van quantificar per LC-MS. Els resultats es mostren en termes relatius respecte els valors determinats per la soca transformada amb el vector buit.

4.1.2 Activitats alternatives a DXR.

DXR és el segon enzim de la via MEP i catalitza una complexa reacció de reorganització intramolecular i reducció de la DXP per acabar formant MEP en la que representa la primera reacció específica de la ruta.

Seguint la mateixa metodologia basada en la mutagènesis que havia permès arribar a identificar activitats alternatives a DXS, treballs previs en el laboratori (Sauret-Güeto, 2005; Uros, 2009) havien aïllat 26 soques que per mutació espontània havien adquirit la capacitat de revertir el fenotip letal de la soca EcAB4-10 deficient en el gen *dxr* (**Taula 4**). En tots casos s'havia pogut determinar que el gen en forma mutada responsable del fenotip de supressió de la auxotrofia per MVA en les soques deficientes en activitat DXR era *gatC*. Aquest gen forma part de l'operó galacticol i concretament està implicat en el transport i fosforilació fosfoenolpiruvat-dependent del galacticol a l'interior cel·lular. Evidències genètiques obtingudes amb el treball amb mutants apuntaven a que la reversió es produïa per la entrada de MEP a la ruta. No obstant, no es van poder identificar els potencials substrats alternatius a partir dels quals l'enzim sintetitzaria aquest intermediari de la via MEP (Uros, 2009). De tota manera, el marcat retràs en el creixement que aquests mutants mostraven respecte les soques silvestres insinuaven que el mecanisme de aportació de MEP no era molt eficaç i suggerien la necessitat d'utilitzar una estratègia alternativa per a la identificació de noves activitats amb capacitat de substituir l'activitat DXR.

4.1.2 .1 DRL: un substitut de DXR.

La nova estratègia es va enfocar cap a la recerca de activitats alternatives en genomes en els quals no existeix un gen codificant per DXR però es troben la resta de gens de la ruta MEP.

Un anàlisi exhaustiu dels genomes seqüenciats de bacteris disponibles en les bases de dades va posar de manifest l'existència d'un grup de microorganismes en el genoma dels quals era possible identificar gens homòlegs per a tots els enzims que conformen la via del MEP excepte per DXR (**Taula 39**). Es van identificar més d'una vintena d'organismes dels grups d'alphaproteobacteries i firmicutes entre els quals es troben alguns patògens emergents d'humans i animals com *Bartonella* (responsable d'infeccions associades al VIH) o *Brucella* (de gran incidència econòmica en ramaderia i que també es pot transmetre a humans). Cap d'aquests organismes contenia gens de la via del MVA en el seu genoma.

Organisme	Grup	Numero de seqüències						
		Enzims de la via MEP						
		DXS	DXR	MCT	CMK	MDS	HDS	HDR
<i>Bartonella bacilliformis</i> (strain ATCC 35685 / KC583)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Bartonella henselae</i> (Rochalimaea henselae)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Bartonella quintana</i> (Rochalimaea quintana)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Bartonella tribocorum</i> (strain CIP 105476 / IBS 506)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella abortus</i>	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella abortus</i> (strain 2308)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella abortus</i> (strain S19)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella canis</i> (strain ATCC 23365 / NCTC 10854)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella melitensis</i>	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella ovis</i> (strain ATCC 25840 / 63/290 / NCTC 10512)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella suis</i>	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Brucella suis</i> (strain ATCC 23445 / NCTC 10510)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Fulvimarina pelagi</i> HTCC2506	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Manganese-oxidizing bacterium</i> (strain SI85-9A1) (<i>Aurantimonas</i>)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Mesorhizobium</i> sp. (strain BNC1)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (strain ATCC 49188)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 238	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Rhizobium loti</i> (<i>Mesorhizobium loti</i>)	Alphaproteobacteria	1	0	1b	1	1b	1	1
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i> DSM 7454	Firmicutes	1	0	1	1	1	1	1
<i>Anaerofustis stercorihominis</i> DSM 17244	Firmicutes	1	0	2	1	1	1	1
<i>Finegoldia magna</i> (strain ATCC 29328)	Firmicutes	0	0	1	1	1	1	1
<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	Firmicutes	1	0	2	1	1	1	1

Taula 39. Relació de microorganismes que presenten gens homòlegs per tots els enzims de la via MEP a excepció de DXR. S'especifica el numero de seqüències identificades per cada un dels diversos gens homòlegs. Dades extretes a partir dels genomes complets seqüenciats disponibles en las bases de dades públiques. La anotació b fa referència a l'existència dels gens com a part d'enzims bifuncionals MCT/MDS (*ispD/ispF*)

La biosíntesi d'isoprenoides és un procés essencial per a la supervivència de tots els organismes. El bloqueig ja sigui genètic o químic tan de la via del MVA com la del MEP en qualsevol dels seus passos, resulta letal. El fet que tots els microorganismes llistats en la **Taula 39** disposin de gens homòlegs per construir la via del MEP junt amb l'absència de la via del MVA per a la síntesi alternativa d'IPP, suggeriria l'existència d'una proteïna capaç d'omplir el buit produït per la falta d'un gen homòleg de DXR. Per poder identificar aquest gen, en col·laboració amb el Dr Fèlix Sangari (Universitat de Cantàbria) es va construir una genoteca representativa del genoma complet d'un d'aquests microorganismes, *Brucella abortus*. La genoteca es va rastrejar transformant-la en la soca EcAB4-10 de *E. coli* (deficient en activitat DXR per la substitució del gen endogen *dxr* amb el gen marcador *CAT*) i seguint el protocol esquematitzat en la Figura 42. Fins a 4 plasmidis diferents es van poder aïllar a partir de les colònies crescudes en medi sense MVA. Els diversos fragments de genòmic inserits incloïen 8 gens però la regió compartida per tots ells reduïa els gens candidats a 2 dels quals només un d'ells era capaç de reproduir el rescat de la soca deficient quan s'expressava de manera individual (Figura 42). La seqüència identificada correspon a un gen de 1317 pb (ID:3827542) que codifica per una proteïna de 438 aminoàcids amb funció desconeguda però anotada com a oxidoreductasa putativa (família on està inclosa la DXR) amb el numero d'accés Q2YIM3 en la base de dades Uniprot. Aquesta proteïna nova es va batejar com DRL (DxR-Like).

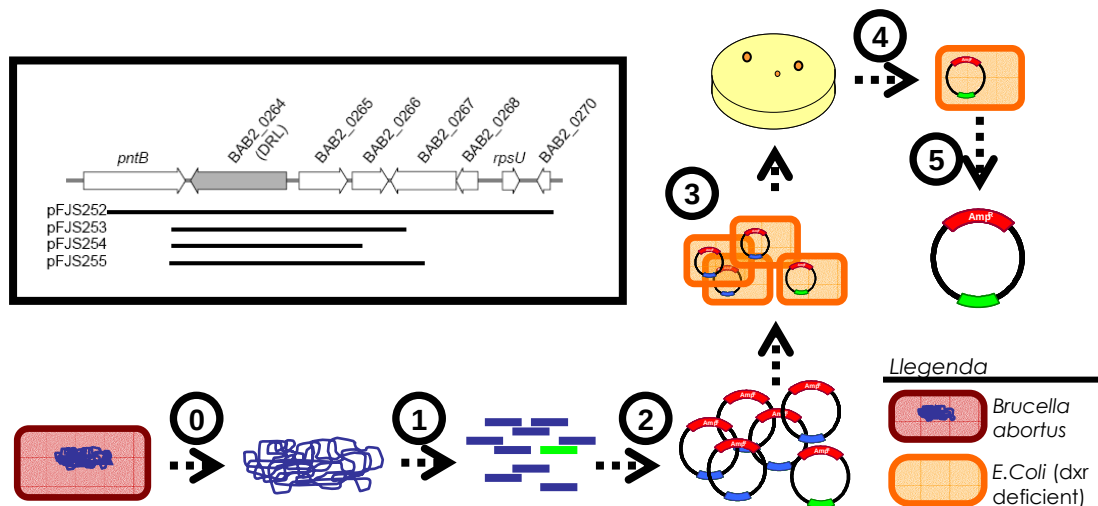


Figura 42. Esquema de la estratègia utilitzada per a la identificació de DRL de *Brucella abortus*. A partir d'un cultiu de cèl·lules de *Brucella* (soca 2308) es va obtenir el seu ADNg i es va generar una genoteca del genoma complet. La genoteca es va rastrejar transformant una soca de *E. coli* deficient en el gen *dxr* (*EcAB4-10*) de manera que només creixen les cèl·lules que incorporen els clons amb el gen que produeix la proteïna capaç de revertir el seu fenotip letal. A partir de les colònies obtingudes es poden recuperar els clons i identificar la regió genòmica inserida en cada un d'ells.

4.1.2 .1.1 DRL no presenta homologia amb DXR.

Un anàlisi centrat en les diferències i similituds entre la proteïna DXR de *E. coli* i la proteïna DRL de *B. abortus* va confirmar una absència total d'homologia a nivell de seqüència. L'alineament de les dues proteïnes posa de manifest que la única homologia entre les dues proteïnes es dona en l'extrem amino terminal. La recerca de dominis funcionals dintre de la seqüència de DRL va revelar l'existència en aquesta regió de la proteïna d'un domini d'unió a NAD(P) disposat formant un plegament de tipus Rossman lleugerament alterat. La presència d'aquest domini associat normalment a la unió i ús de NADH/NADPH en processos de reducció apropa a DRL a la família de les homoserin deshidrogenases (HD) a nivell de dominis funcionals.

4.1.2 .1.2 DRL complementa el mutant deficient en DXR però no els mutants deficients en DXS ni MCT.

Els resultats descrits mostraven que proteïna DRL es capaç de rescatar el fenotip letal de les soques *EcAB4-10* deficients en DXR de manera que permet re-establir la síntesi de d'isoprenoides. Però els mecanismes pels quals podria estar-ho fent podien ser molt diversos: mimetitzar el mateix mecanisme de reacció de DXR, produir MEP amb un mecanisme totalment nou, o sintetitzar qualsevol dels intermediaris posteriors de la via a través d'un mecanisme o substrat alternatiu. Per poder discernir entre aquestes possibilitats es va utilitzar una aproximació genètica utilitzant les soques mutants de la via MEP disponibles al laboratori

(**Taula 4**). La construcció pJET-BaDRL (Amp^R), que contenia únicament la seqüència codificant de DRL (Q2YIM3) es va transformar en les soques EcAB4-10 (*dxr::CAT*), EcAB4-2 (*dxs::CAT*) i EcAB4-7 (*ispD/ygbP::CAT*). Les cèl·lules es van sembrar en plaques suplementades amb ampicilina, kanamicina i cloramfenicol i es van incubar a 37°C durant 16 h. Tal i com il·lustra la Figura 43, DRL només es capaç de rescatar la auxotrofia per MVA en la soca deficient en DXR (EcAB4-10) però no ho fa per les soques deficientes en DXS (EcAB4-2) ni MCT (EcAB4-7). Aquest resultats *in vivo* suposaven una forta evidència de que DRL es tractava d'un enzim que requereix DXP o algun altre metabolit sintetitzat per DXS (tal i com demostra el fet que no complementi el mutant deficient en aquest enzim) per produir MEP o algun altre precursor que pogués ser transformat posteriorment per la activitat MCT. El fet de que tampoc sigui capaç de complementar el mutant deficient en MCT a l'hora suggeria que DRL no estaria utilitzant una via o mecanisme alternatiu per generar cap dels compostos que es pogués incorporar a la via del MEP per sota del segon pas d'aquesta sinó que la seva activitat seguiria un mecanisme com a mínim proper al de DXR.

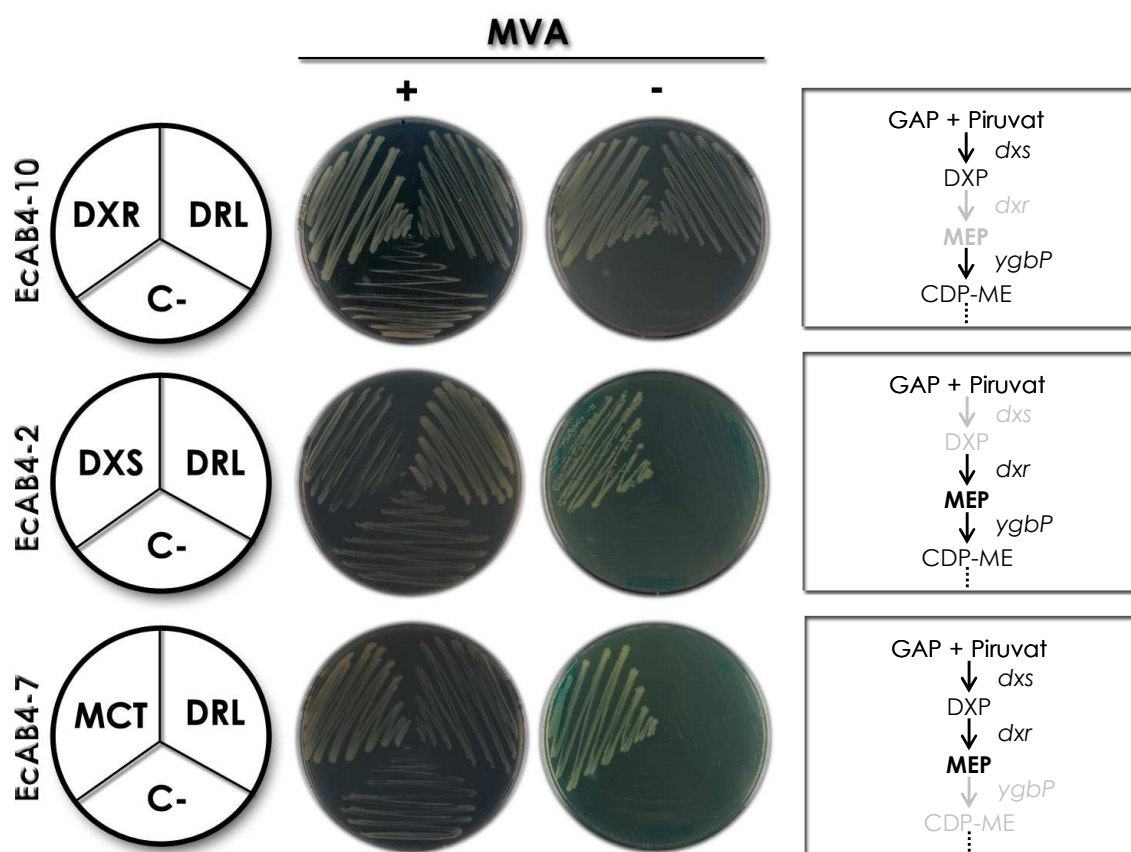


Figura 43. Complementació de cèl·lules de *E.coli* deficientes en *dxr*, *dxs* o *ygbP* amb la proteïna DRL. La seqüència de DRL de *Brucella abortus* es va clonar en un vector d'expressió. La construcció junt amb els controls negatius del vector buit (C-) i positius per les proteïnes DXS, DXR o MCT de *E.coli* es van transformar en les soques EcAB4-10, EcAB4-2 i EcAB4-7 respectivament. La capacitat de les proteïnes de rescatar el fenotip letal de la soca mutant es va monitoritzar seguint el creixement en plaques suplementades (+) o no (-) amb MVA a una concentració de 1mM.

4.1.2 .1.3 DRL catalitza la mateixa reacció bioquímica que DXR *in vitro*.

Les evidències genètiques *in vivo* junt amb l'existència d'un domini funcional d'unió de NAD(P) conduïen a pensar en una reacció catalitzada per DRL de conversió de DXP a MEP dependent de NADPH molt similar a la catalitzada per DXR, però les aproximacions genètiques no permetien identificar de forma directa la naturalesa del substrat i el producte de reacció.

Per poder establir inequívocament la reacció que estava tenint lloc es va amplificar la seqüència de DRL amb els encebadors BruceDRL_NdeI(F) i BruceDRL_XhoI(R) i es va clonar en el vector d'expressió pET23, induïble per IPTG, fusionant-la a una cua d'histidines. La construcció resultant es va anomenar pET23-BaDRL. Es va produir la proteïna recombinant en la soca BL21 pLysS de *E.coli* i es va purificar en una columna de níquel per realitzar assaigs d'activitat DXR *in vitro*. Després de 2 h d'incubació a 37°C es van analitzar els productes de reacció per UPLC-MS/MS treballant en mode MRM amb un espectròmetre de masses de triple quadrupol. Per la detecció de substrat i producte es van seguir les transicions m/z 213/97 per DXP i 215/97 pel MEP resultat de la pèrdua d'un hidrogen durant la ionització dels compostos i el posterior trencament de les molècules en el segon dels quadrupols. Les mostres que contenien tant DRL com DXR produïen MEP a partir del DXP agregat a la mescla de reacció (Figura 44) amb un comportament molt similar. Utilitzant una corba patró construïda amb concentracions creixents de patrons comercials de DXP i MEP es van quantificar les proporcions de substrats i productes abans i després de la reacció i es va establir una taxa de conversió del 98% per DRL (Figura 44). La identitat del producte de reacció es va confirmar comparant el seu perfil de fragmentació (fragmentograma) amb l'obtingut amb l'estàndard comercial de MEP i el de la reacció control catalitzada per DXR (Figura 44). Les reaccions control preparades sense enzim, o amb enzim però sense NADPH, mostraven únicament el pic corresponent a la transició 213/97 (DXP) descartant per tant cap tipus de reacció no enzimàtica i subratllant la dependència del poder reductor del cofactor NADPH.

En resum, els resultats mostraven com en condicions de reacció *in vitro* anàlogues a les establertes en la bibliografia per l'enzim DXR, DRL també generava MEP a partir de DXP.

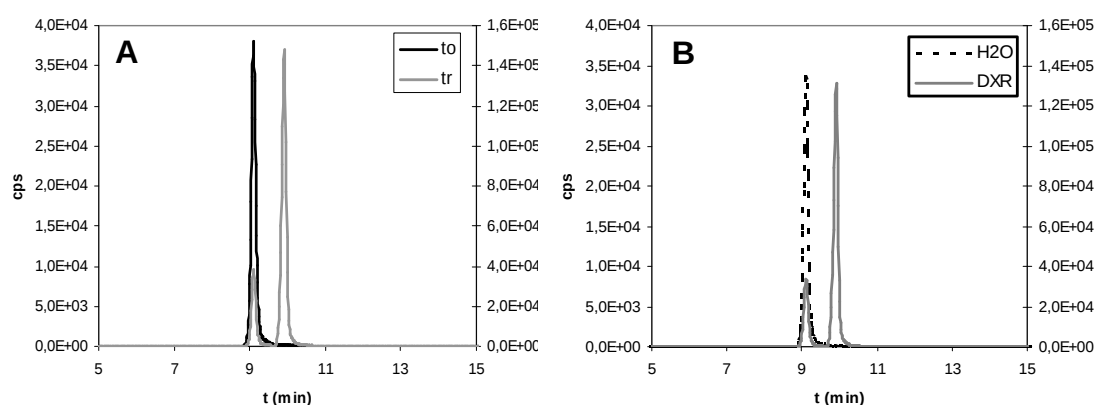


Figura 44. Detecció i identificació del MEP produït per la proteïna DRL a partir de DXP. **A)** Cromatograma corresponent a la reacció catalitzada per BaDRL abans d'afegir l'enzim (t_0) i dues hores d'incubació després (t_r). **B)** Cromatograma control de les reaccions passades dues hores d'incubació en absència d'enzim (H_2O) o utilitzant DXR de *E.coli* recombinant (DXR). Les escales de la esquerra corresponen al seguiment de la transició 213/97 (DXP:primer pic) i les escales de la dreta a la transició 215/97 (MEP:segon pic)

4.1.2.2 La caracterització de DRL revela moltes similituds però també importants diferències amb DXR.

4.1.2.2.1 DRL en la seva forma activa és un dímer.

Es va dur a terme una cromatografia d'exclusió molecular per determinar la forma oligomèrica de la proteïna a partir de les mostres purificades. Es va carregar la DRL recombinant purificada (pes molecular estimat: 46,7 kDa) en una columna d'exclusió molecular Superdex 200 HL 16/60 i es va eluir amb un tampó Tris-HCl 100 mM (pH:7.5) amb 300 mM NaCl, 1 mM DTT i 2mM $MgCl_2$ treballant a un flux de 1 ml/min. En aquestes condicions el pic corresponent a DRL eluïa a un temps de 76,5 minuts tal i com il·lustra el cromatograma (Figura 45A). Per establir el pes al que correspon aquest temps de retenció es va calibrar la columna amb una barreja de patrons comercials de pes conegut a partir dels quals es va establir la recta de calibració de temps de retenció vs el logaritme del pes molecular (Figura 45B). La interpolació del temps de retenció mesurat pel pic de DRL en la regressió lineal dels patrons retornava un valor de 80 kDa (aproximadament el doble del pes deduït a partir de la seqüència de la proteïna) suggerint que la forma activa de DRL és un dímer tal i com també està descrit en la bibliografia per la proteïna DXR de *E. coli* (Mac Sweeney *et al.*, 2005)

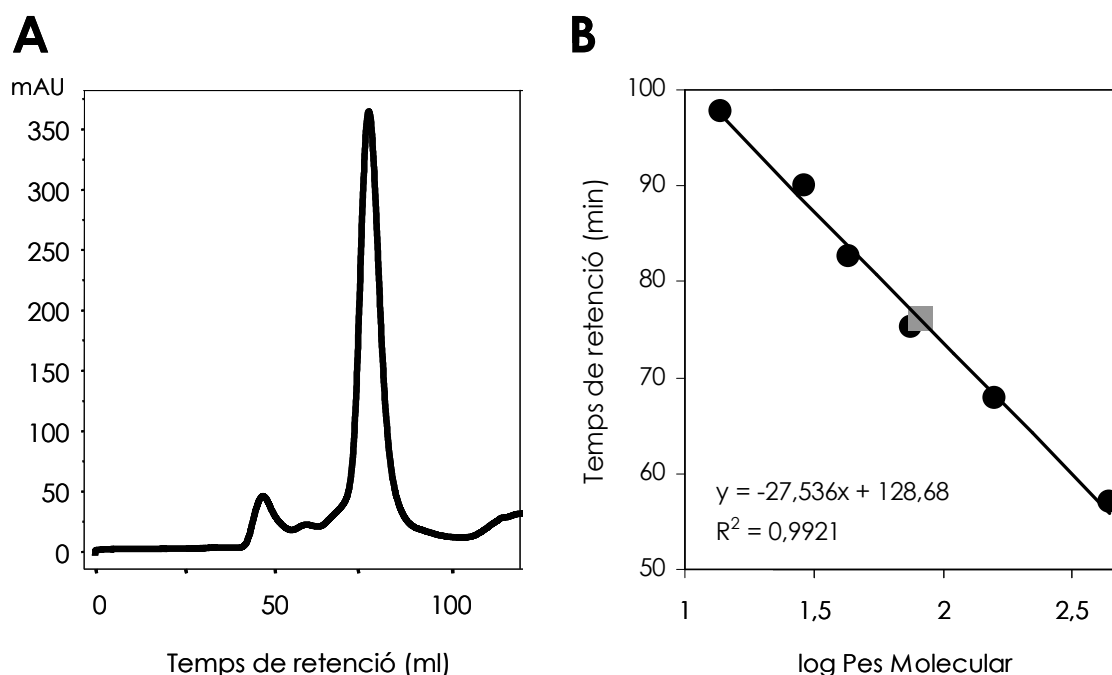


Figura 45. Determinació de l'estat d'oligomerització de la proteïna BaDRL. (A) Cromatograma de la exclusió molecular de DRL recombinant purificada (pes estimat 46,7 kDa) en una columna Superdex 200 HL 16/60. El pic d'elució apareix a 76,5 min. (B) Recta de calibració de la columna utilitzant els patrons comercials: ribonucleasa (13,7 kDa), anhidrasa carbònica (29 kDa), ovalbumina (44 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolasa (158 kDa), ferritina (440 kDa). El pes molecular de DRL es va estimar en 80 kDa (quadrat gris).

Aquest resultat es va confirmar per dues vies alternatives. Primer d'ent a terme una segona exclusió molecular amb una columna Superdex 75 que separa proteïnes de fins a 75 kDa. En aquesta columna la proteïna eluïa en el volum d'exclusió confirmant per tant que el pes de DRL es troba per sobre d'aquest valor. En segon lloc un anàlisi dinàmic de dispersió de llum (dynamic light scattering) realitzat en col·laboració amb la Dra Bàrbara Calisto del grup de Biologia estructural i computacional del PRBB va confirmar que la proteïna DRL de *B. abortus* és un dímer.

4.1.2.2.2 DRL mostra un pH de 7,5-8 i una temperatura de 40°C òptims per a la seva activitat.

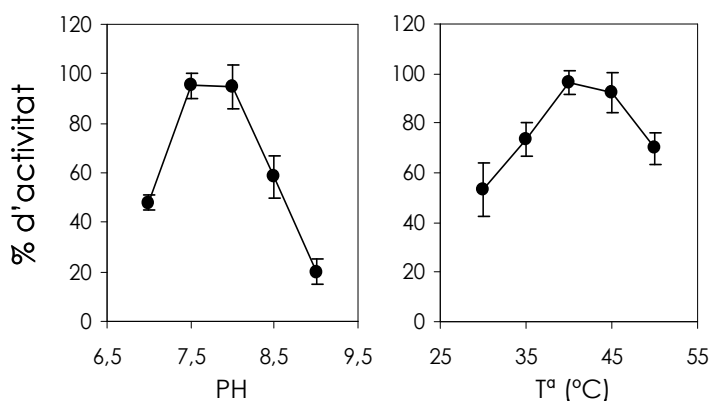
A continuació es va realitzar una determinació d'alguns dels paràmetres bàsics de DRL com a enzim. En primer lloc es van determinar el pH i la temperatura òptims de treball utilitzant un mètode espectrofotomètric. L'avenç de les reaccions es va monitoritzar en base al decrement de l'absorbància a 340 nm derivat de la oxidació de la molècula de NADPH.

Per determinar el pH òptim es va seguir la cinètica de les mescles de reacció detallades en la taula 39 treballant en un rang de pH entre 7 i 9 a intervals de 0,5 unitats en condicions de temperatura ambient. Per la determinació de la temperatura òptima es va mesurar l'activitat de DRL entre 30 i 50°C en intervals de 5°C a un pH fix de 7,5. En els dos casos la activitat de tres rèpliques independents es representa en valors relatius a la activitat màxima mesurada (Figura 46).

	[]i	[]f	Volum
Tris-HCl	1M	100 mM	10
DTT	100 mM	1 mM	1
MgCl ₂	25 mM	2mM	8
NADPH	5 mM	0,2 mM	4
DXP		0,15 mM	4
Enzim	4 mg/ml	-	15
Aigua			58
			100

Taula 40. Mescla de reacció per a la determinació de l'activitat de BaDRL a diferents pH i temperatures. L'activitat es va determinar monitoritzant el descens d'absorbància a 340nm associat al consum de NADPH. Els pH es van determinar a temperatura ambient i les temperatures a pH 7,5.

Figura 46. Determinació del pH i temperatura òptims per a l'activitat de la proteïna BaDRL. Les condicions de reacció es detallen en la taula 40. Els valors es representen com el percentatge d'activitat respecte el valor màxim estimat. Les mitjanes i desviacions estàndard corresponen a tres rèpliques independents (n=3)



Tal i com il·lustren els gràfics (Figura 46) el pH òptim per DRL es situa entre 7,5 i 8 mentre que la temperatura òptima s'estableix en els 40°C. Tots dos valors es troben molt propers als descrits per la DXR de *E.coli*.

4.1.2.2.3 La determinació dels paràmetres cinètics (K_m , V_{max} i K_{cat}) de DRL mostren les primeres diferències importants respecte la DXR de *E.coli*.

La gran similitud respecte DXR en la majoria de les característiques mesurades per DRL apropava cada vegada més les dues proteïnes que tot i no presentar homologia entre elles si que mostraven comportaments paral·lels. Per profunditzar més en la caracterització de l'activitat enzimàtica de DRL i comparar-la amb la de DXR es van determinar els paràmetres

cinètics bàsics, la constant d'afinitat pel substrat DXP (K_m), la seva eficiència màxima de transformació (V_{max}) i la constant catalítica (K_{cat}).

El càlcul dels paràmetres cinètics es va dur a terme seguint la evolució de les mesclures de reacció espectrofotomètricament en plaques ELISA per un volum total de 100 μ l i treballant a una temperatura constant de 40°C. Es van determinar les velocitats inicials de les reaccions (mesurades com la quantitat de NADPH oxidat (μ mol) per minut dintre del rang de linealitat) variant la concentració de substrat (DXP) en el rang 25-500 μ M en presència de 60 μ g de proteïna DRL recombinant purificada. En representar els valors de velocitat inicial respecte la concentració de DXP s'obté una típica corba de saturació de Michaelis-Menten (Figura 47A). Els valors de la constant d'afinitat i velocitat màxima es van determinar a partir de la representació doble recíproca (Lineweaver-Burk) de la inversa de les velocitats inicials en front de la inversa de la concentració de DXP (Figura 47B). Calculats d'aquesta manera es van obtenir uns valors de $K_m(\text{DXP}) = 109 \mu\text{M}$, i $V_{max} = 0,083 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a partir dels quals es pot determinar el valor de la constant catalítica, situant-se aquesta en $K_{cat} = 0,065 \text{ s}^{-1}$.

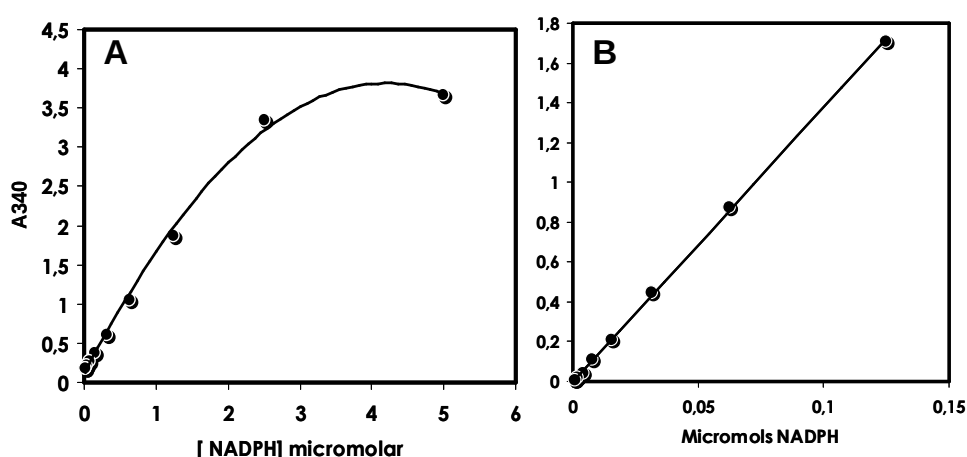


Figura 47. Determinació dels paràmetres cinètics bàsics de la proteïna BaDRL. A) representació de la corba de Michaelis-Menten pel NADPH. B) representació doble recíproca de Lineweaver-Burk dels valors inversos de velocitat en front l'invers de concentració de NADPH per a la determinació dels valors cinètics K_m , V_{max} i K_{cat} .

La metodologia i els resultats obtinguts es van validar aprofitant la disponibilitat de la proteïna DXR de *E. coli* recombinant purificada. Es van repetir els experiments de DRL en idèntiques condicions per determinar els paràmetres de DXR. Els valors obtinguts eren de $K_m(\text{DXP}) = 211 \mu\text{M}$, i V_{max} molt similars als publicats en la bibliografia per a diverses DXR (Proteau, 2004).

Aquests resultats indiquen que si bé es cert que DRL mostra una afinitat pel substrat DXP molt semblant a la de DXR segons es dedueix dels seus valors de K_m respectius, la eficiència amb la que té lloc la transformació d'aquest substrat en el producte és en el cas de DRL clarament inferior. Els valors de velocitat màxima estan bastant per sota dels de DXR i més clarament

encara s'observa en comparar els valors de les constants catalítiques que son d'entre 2 i tres ordres de magnitud inferiors en DRL respecte DXR suggerint que l'enzim tot i ser capaç d'acomodar el substrat en el centre actiu a l'hora de facilitar la reacció ho fa de manera menys eficient reflectint-se en una taxa de conversió menor.

4.1.2.2.4 La activitat de DRL és inhibida per efecte de la fosmidomicina *in vitro* i *in vivo*.

La fosmidomicina (FSM) és un inhibidor específic de DXR (Kuzuyama *et al.*, 1998). El fet que cultius bacterians que resulten inviables en presència de l'inhibidor, siguin capaços de créixer quan el medi es suplementa amb ME (que després és fosforilat a l'interior de la cèl·lula per produir el MEP) així ho demostra (Wungsintaweekul *et al.*, 2001). El seu mecanisme d'inhibició ha estat descrit com de tipus competitiu a partir d'assaigs cinètics (Steinbacher *et al.*, 2003) i s'ha proposat que la seva estructura estaria mimetitzant l'estructura de l'estat de transició en la reacció de conversió de DXP a MEP (actuaria com a anàleg estructural). Ja sigui per analogia amb l'estat de transició o directament amb el substrat DXP amb el qual guarda una evident proximitat, la FSM actua sobre DXR unint-se al centre actiu de l'enzim de manera equivalent a com ho fa el substrat..

Tenint en compte la similitud dels valors de la constant d'afinitat per DXP de DRL i DXR semblava raonable esperar que la FSM pogués tenir un efecte d'inhibició també sobre la proteïna de *B. abortus*. Per comprovar-ho es van fer assaigs espectrofotomètrics d'activitat *in vitro* amb la proteïna DRL recombinant purificada en presència de FSM en un rang molt ampli de concentracions. A mesura que s'incrementava la concentració de FSM en la mescla de reacció es reduïa progressivament el descens d'absorbància associat a la oxidació del NADPH fins a produir-se una inhibició total a partir de concentracions de l'ordre de 50 μ M (Figura 48).

Per confirmar aquest resultat *in vivo* en el laboratori del Dr. Fèlix Sangari es van créixer cultius líquids de *B. abortus* en presència de concentracions creixents de FSM. Inesperadament no va tenir cap efecte sobre el creixement dels cultius. Un anàlisi del genoma d'aquest bacteri va posar de manifest la absència d'un gen homòleg al *glpT* de *E. coli*, que codifica per un transportador que ha estat descrit com el responsable de l'import de l'inhibidor a l'interior cel·lular (Sakamoto *et al.*, 2003). En repetir l'experiment utilitzant cultius de *B. abortus* transformats amb un plasmidi que expressava el gen *glpT* es va observar com s'inhibia el creixement en tots aquells cultius amb una concentració de FSM igual o superior a 4 μ g/ml.

El conjunt de resultats demostren que l'inhibidor específic de DXR, FSM, també té un efecte d'inhibició sobre la proteïna DRL de *B. abortus* tan *in vitro* com *in vivo*.

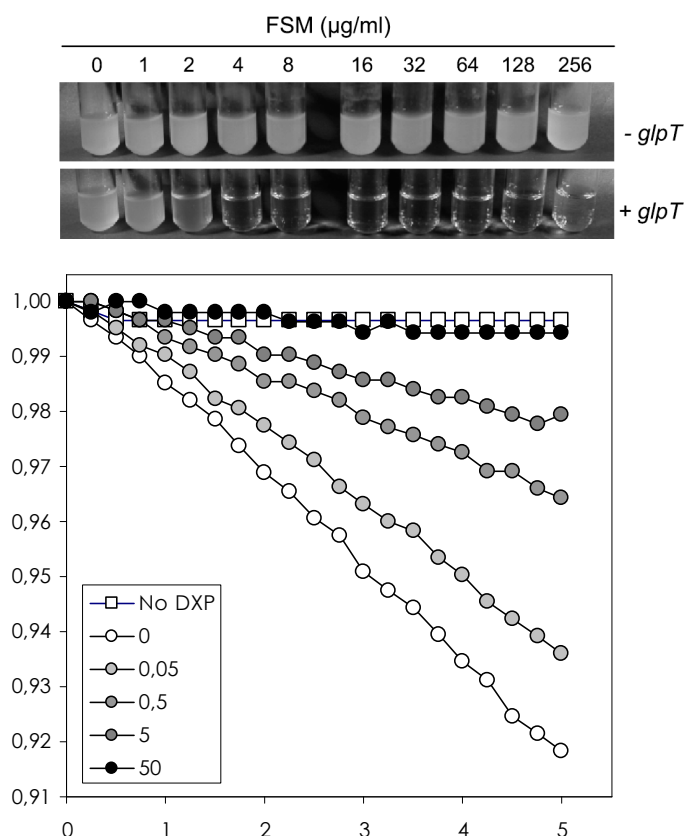


Figura 48. Efecte de l'inhibidor FSM sobre el creixement cel·lular de cultius de *Brucella abortus* i l'activitat de l'enzim DRL recombinant purificat. Pannell superior: Cultius de *Brucella abortus* expressant (+) o no (-) el gen *glpT* en medis contenint dilucions seriades de FSM. Pannell inferior: Inhibició de la activitat de la proteïna DRL recombinant en assajos *in vitro* seguint la reacció monitoritzant el descens d'absorbància a 340nm a diverses concentracions de FSM (μM).

4.1.2.2.5 DRL defineix una nova família de proteïnes que poden catalitzar el primer pas específic de la via del MEP en bacteris.

La recerca d'homòlegs a DRL (Q2YIM3) utilitzant l'eina BLAST en la base de dades Universal Protein Resource (UNIPROT) va permetre identificar fins a 185 candidats tots ells de bacteris. La identitat de les seqüències respecte a la proteïna de *B. abortus* (BaDRL) es movia entre el 100% en el millor dels casos i el 26% en el pitjor. La immensa majoria tenien una única DRL putativa però en 17 dels candidats n'apareixien dues, i en tres casos se'n podien arribar a identificar fins a tres.

4.1.2.2.6 La distribució de DRL i DXR no és mútuament excloent en tots els organismes.

En comparar la distribució de les seqüències de les DRL putatives obtingudes amb la dels set enzims de la via MEP es va observar que la presència de DRL i DXR no era excloent (**Taula 41**). Així es van establir tres classes diferents. La classe A esta formada per bacteris que tenen la seqüència de DRL però no tenen la de DXR en els seus genomes tot i que si tenen homòlegs per la resta dels enzims de la via MEP (**Taula 41**). La classe B (la més abundant) esta formada per bacteris amb seqüències codificants tant per DRL com DXR (**Taula 41**). I la classe C esta formada per bacteris amb DRL però sense cap dels enzims de la via MEP (**Taula 41**). Aquesta darrera classe està formada per arqueas i bacteris que no utilitzen la via MEP per a la biosíntesi d'isoprenoids.

La majoria de les seqüències de DRL de la classe A formen part d'alfa proteobacteris tot i que algunes es van trobar també en firmicutes. Aquelles de les que es disposava del ADN_g, com en el cas de l'alfa proteobacteri *Bartonella henselae* (Q6G2D9) o del firmicute *Fingoldia magna* (B0S038), es van testar en assaigs de complementació amb la soca deficient en *dxr*, EcAB4-10 (**Taula 41**). En els dos casos les proteïnes van mostrar ser actives rescatant el fenotip letal de la soca. De la mateixa manera es va confirmar també la activitat de les seqüències duplicades de DRL en *Ochrobactrum anthropi* (A6WYQ0 i A6X6G6) i en *Mesorhizobium loti* (Q98FT2 and Q989B6).

Per la seva part la distribució de les seqüències de la classe B és bastant més amplia i inclou alfa, beta, gamma i delta proteobacteris així com també firmicutes, actinobacteris, i cianobacteris (**Taula 41**). D'aquest grup es va testar la activitat de DRL d'uns quants representats amb assaigs de complementació. En els casos d'alfa-proteobacteris com *Agrobacterium tumefaciens* (A9CES2) i *Candidatus Pelagibacter ubique* (Q1V2P9), de beta-proteobacteris com *Burkholderia cepacia* (B4EB12), de actinobacteris com *Mycobacterium smegmatis* (A0QQV9), o de cianobacteris com *Nostoc punctiforme* (B2IVC2) i *Anabaenavariabilis* (Q3ME48), cap d'ells va mostrar complementació. En canvi les seqüències de l'alfaproteobacteri *Roseobacter litoralis* (A9HDV1) i els firmicutes *Listeria monocytogenes* (Q723A4) i *Bacillus halodurans* (Q9KES5) si que van mostrar activitat (**Taula 41**).

	Id	Organisme (soca)	Grup	DXS	DXR	MCT	CMK	MDS	HDS	HDR	DRL	Classe	CDM
1	100	<i>Brucella abortus</i> 2308	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
2	90	<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG3331	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
3	75	<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG3331	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
4	73	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
5	67	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
6	65	<i>Bartonella henselae</i> str Houston	Alphaproteobacteria	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
7	33	<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328	Firmicutes	1	0	1	1	1	1	1	+	A	+
8	62	<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	Alphaproteobacteria	2	1	1	1	1	1	1	+	B	+
9	43	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Firmicutes	1	1	1	1	1	1	1	+	B	+
10	40	<i>Listeria monocytogenes</i> P14	Firmicutes	1	1	1	1	0	1	1	+	B	+
11	36	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Cyanobacteria	1	1	1	1	1	1	1	+	B	-
12	35	<i>Anabaena variabilis</i> PCC 7937	Cyanobacteria	1	1	1	1	1	1	1	+	B	-
13	35	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Alphaproteobacteria	1	1	1	1	1	1	1	+	B	-
14	29	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> HTCC1002	Alphaproteobacteria	1	1	1	1	1	1	1	+	B	-
15	32	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155	Actinobacteria	1	1	1	1	1	1	1	+	B	-
16	27	<i>Burkholderia cepacia</i> J2315	Betaproteobacteria	1	1	1	0	1	1	1	+	B	-
17	37	<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	Chloroflexi	0	0	0	0	0	0	0	+	C	n.p
18	37	<i>Methylobacillus glycogenes</i>	Betaproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0	+	C	n.p
19	32	<i>Paracoccus methylutens</i>	Alphaproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0	+	C	n.p
20	32	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 334	Gammaproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0	+	C	n.p
21	28	<i>Candidatus Methanosphaerula</i> E1-9c	Archaea	0	0	0	0	0	0	0	+	C	n.p

Taula 41. Establiment de les diverses classes d'organismes que tenen DRL en el seu genoma. Id: percentatge d'identitat respecte la seqüència de la proteïna de *B.abortus*. S'especifica el grup al que pertany cada organisme i el nombre de seqüències que codifiquen per cada un dels 7 enzims de la via del MEP. La presència de DRL (+), la classe de la que formarien part (A, B o C) i **CDM**: la capacitat de complementar (+) o no (-) la soca EcAB4-10 deficient en *dxr*. **n.p**: no provades.

4.1.2.2.7 L'anàlisi filogenètic desvela l'existència de DRL autèntiques i falses.

L'anàlisi de les relacions filogenètiques que s'establien entre les 185 seqüències aminoacídiques obtingudes per homologia amb *BaDRL* utilitzant la eina bioinformàtica BLAST va posar de manifest una sèrie de fets molt interessants. A través d'un anàlisi filogenètic de tipus ML (Maximum Likelihood) es va obtenir un arbre (Figura 49) en el que totes les DRL que havien demostrar ser actives en experiments de complementació s'agrupaven en un mateix grup monofilètic que denominem "DRL-cluster". La identitat a nivell de seqüència d'aquest grup de DRLs respecte *BaDRL* es mou entre el 33 i el 100%.

Molt significatiu resulta també, el fet que tots els organismes de la classe A (aquells que tenen DRL i totes els enzims de la via MEP a excepció de DXR) tenen com a mínim una seqüència DRL dintre del DRL-cluster. Els bacteris que només tenen una DRL, aquesta es troba sempre dintre del DRL-cluster i en tots els casos en que s'han analitzat per complementació han resultat ser actives. En canvi els que en tenen més d'una presenten dues casuístiques. Una en que totes les seqüències es troben dintre del DRL-cluster com es el cas de *Ochrobactrum anthropi*, *Mesorhizobium loti* i *Anaerofustis stercorihominis* i l'altre en que una seqüència es troba en dintre del DRL-cluster mentre la resta en queden fora com passa en *Fulvimarina pelagi* i *Aurantimonas*. De manera coherent quan coexisteixen varies DRL en un mateix organisme aquella/es amb un major grau d'homologia amb *BaDRL* s'ubiquen en el DRL-cluster.

Únicament una proteïna, la B5J045 de la soca 307 d'*Octadecabacter antarcticus* escapa a aquesta tendència general ja que tot i tractar-se d'un organisme de classe A la seva DRL es localitza fora del DRL-cluster. No obstant la proteïna B5K941 de la soca 238 d'aquest mateix organisme si que forma part del DRL-cluster (Figura 49).

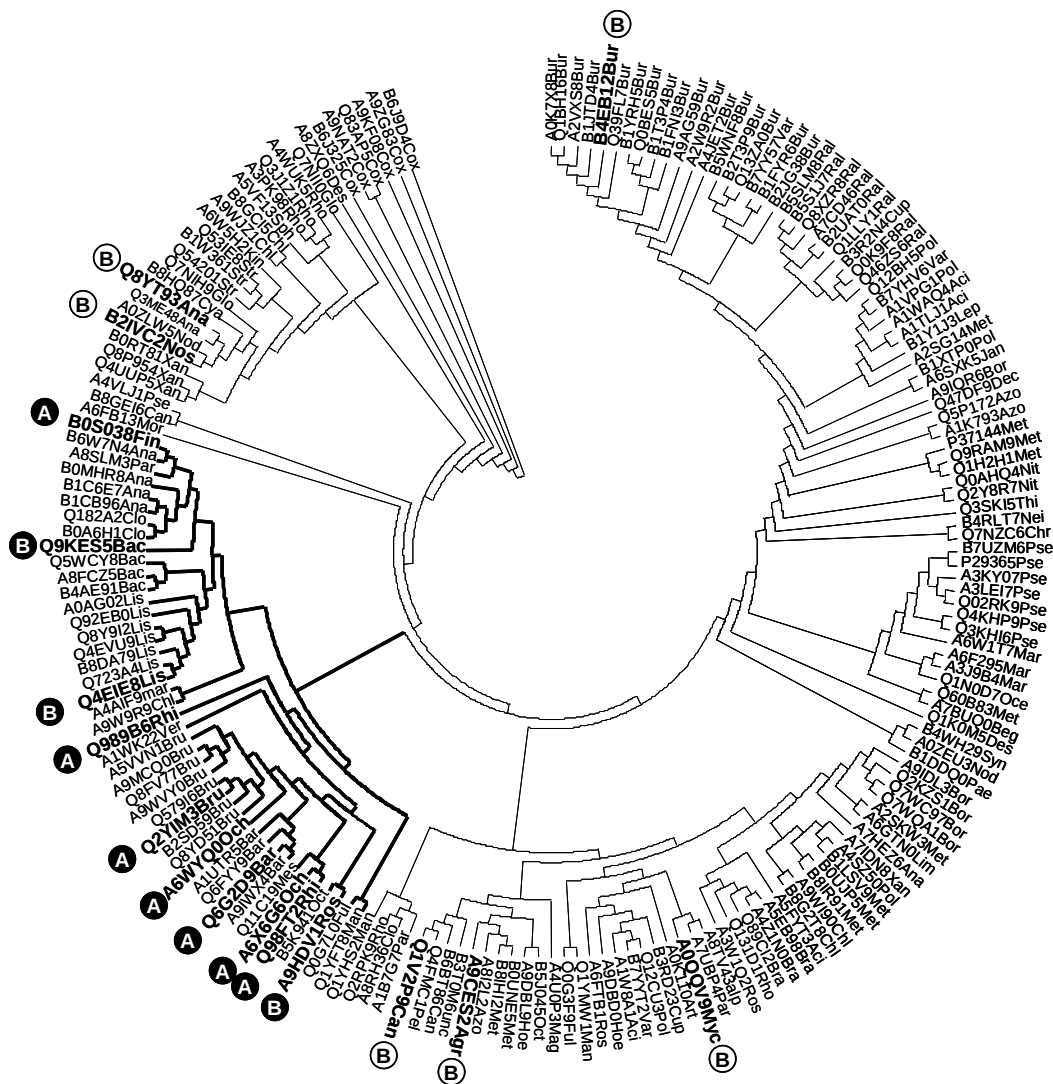


Figura 49. Anàlisi filogenètic de les seqüències amb homologia a DRL. Arbre filogenètic que mostra les relacions evolutives entre les DRL obtingudes per una recerca d'homologia tipus BLAST utilitzant BaDRL com a seqüència fonamental. Les DRL que complementen la soca de *E.coli* EcAB4-10 es marquen amb un cercle negre mentre que les que no la complementen es marquen amb un cercle blanc.. Les lletres a l'interior dels cercles indiquen si la seqüència pertany a organismes de la classe A (no tenen DXR) o classe B (si tenen DXR). El Cluster DRL es representa amb línies gruixudes.

Dintre del DRL-cluster només hi ha un únic representant dels organismes de classe C, *Chloroflexus aurantiacus*. La resta de seqüències pertanyen a organismes de classe A i de classe B (els que tenen DRL però a l'hora tenen DXR), majoritàriament firmicutes tot i que altres grups com l'alfa proteobacteri *Roseobacter litoralis*, el beta proteobacteri *Verminephrobacter eiseniae* o l'*Actinobacterium* també hi son representats. Totes les proteïnes de la classe B que havien estat analitzades (3) en assaigs de complementació i que mostraven activitat també queden incloses dintre del grup monofilètic. En canvi en fer aquest mateix anàlisi per alguns dels representants (6) de les proteïnes DRL de la classe B que no en formen part, es va observar que cap d'elles era capaç de complementar la soca EcAB4-10 indicant que no eren DRL autèntiques (Figura 49).

Considerant el conjunt de resultats en el que totes les DRL de la classe A queden dintre del DRL-cluster i totes les testades presenten activitat, i totes les DRL de classe B assajades amb activitat queden dintre del DRL-cluster mentre que totes les que se'n troben fora son inactives, es suggereix que aquest grup monofilètic defineix les seqüències autèntiques d'enzims DRL. Com a conseqüència es pot deduir que les seqüències que mostren homologia amb *BaDRL* però no formen part del DRL-cluster no serien enzims DRL funcionals.

Aquesta distribució filogenètica conduïa a pensar en la possibilitat d'establir trets identificatius de les DRL que definissin la seva activitat o falta d'activitat. Es va fer un anàlisi de seqüència en base a l'alineament de les diverses DRL actives i enfrontant-les amb les DRL inactives segons els resultats experimentals de complementació realitzats (Figura 50).

Però tot i que alguns residus i petits motius es troben conservats només en les DRL actives no es van poder establir uns criteris funcionals suficientment robustos com per relacionar-los inequívocament amb l'activitat enzimàtica de l'enzim.

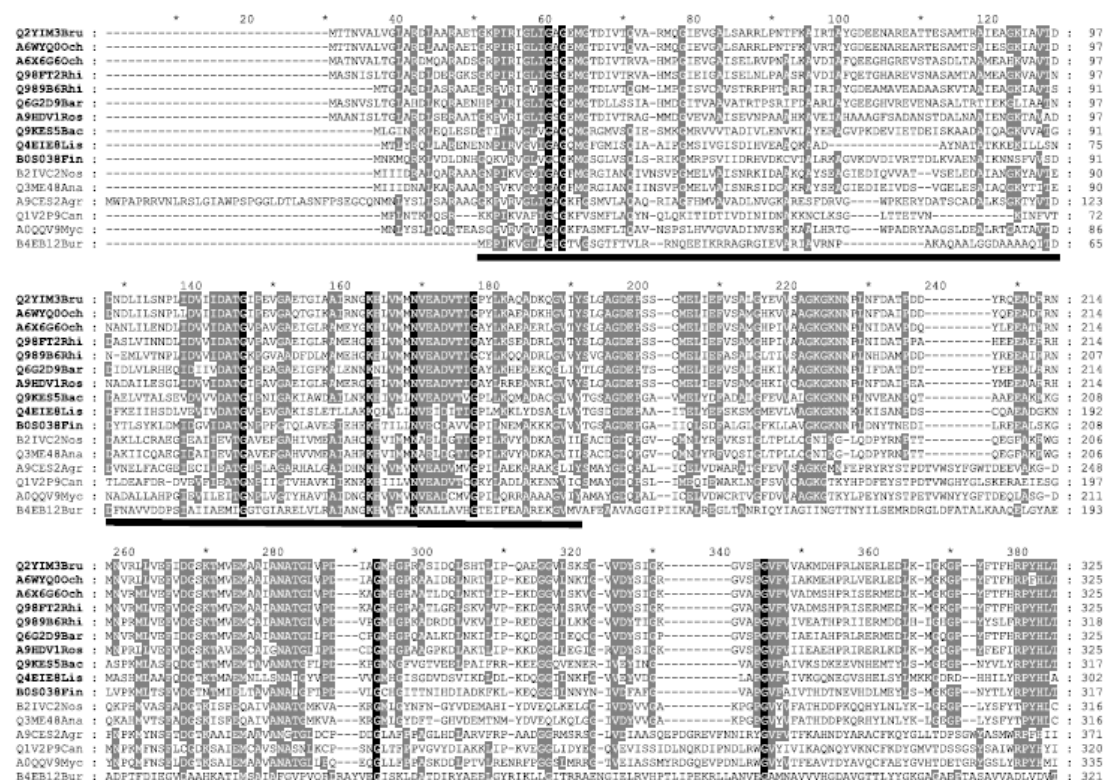


Figura 50. Alineament múltiple de seqüències DRL. Els números d'identificació de la proteïna en negreta indica que codifiquen per proteïnes capaces de complementar la soca mutant de *E.coli* EcAB4-10. Els residus marcats en fons negre representen aquells conservats en totes les seqüències. El fons gris indica residus conservats en un mínim de 10 seqüències. La barra negra indica el domini d'unió a NADPH.

4.1.2.2.8 La activitat de DRL no implica la pèrdua d'activitat de DXR en organismes de classe B.

L'anàlisi comparatiu de la distribució de DRL i els enzims de la via del MEP havia revelat l'existència d'un ampli ventall d'organismes en que DRL i DXR coexistien (organismes de classe B). Per la seva banda l'estudi filogenètic junt amb els assajos de complementació mostraven que entre aquests organismes hi havia un conjunt en els que la DRL era activa (queden dintre del DRL-cluster) i un altre en els que no ho era. Degut al caràcter essencial de la biosíntesi d'isoprenoids, en el cas en el que la DRL no mostrava activitat forçosament la conversió de DXP a MEP havia de ser conseqüència de l'activitat de DXR. En el cas però d'organismes amb DRL activa, el paper de DXR podria perdre el seu caràcter fonamental. Existia per tant la possibilitat que aquests organismes disposessin d'enzims redundants per catalitzar la mateixa reacció o no en funció de si DXR també conservava la seva activitat.

Per explorar si un mateix organisme podria conservar dos enzims diferents (DRL i DXR) per catalitzar la mateixa reacció (la síntesi de MEP a partir de DXP) es van escollir com a representants tres organismes de classe B amb seqüències DRL dintre del DRL-cluster: *Roseobacter litoralis*, *Listeria monocytogenes*, i *Bacillus halodurans*. A partir dels ADN_g es van amplificar les seqüències codificants per les proteïnes DRL i DXR de cada un dels organismes. Es va inserir cada una d'elles en un vector pCRII-TOPO i es van subclonar digerint les construccions resultants amb els enzims NdeI/XhoI o NcoI/XhoI. Les bandes corresponents a cada gen es van recuperar del gel d'agarosa i es van lligar en cada cas en un vector d'expressió de la família pET23 prèviament digerit en les mateixes dianes. La conformitat de les seqüències dels gens en les construccions generades (anomenades: pET23-Ros/Lis/Bac-DRL i pET23-Ros/Lis/Bac-DXR) es va comprovar per seqüenciació.

L'activitat de les sis proteïnes es va testar transformant les construccions en la soca EcAB4-10 (deficient en activitat DXR) i sembrant-les en plaques de LB suplementades amb ampicilina, kanamicina, cloramfenicol i MVA. Colònies individuals crescudes en 16 h a 37°C es van estriar en plaques de LB amb els tres antibiòtics suplementades o no amb MVA. Els resultats (Figura 51) il·lustren com en els tres casos les proteïnes DRL complementen la auxotrofia per MVA de la soca EcAB4-10 indicant que totes tres són actives. En canvi només les cèl·lules transformades amb les construccions que expressen les DXR de *Listeria monocytogenes* (Q720A5) i *Bacillus halodurans* (Q9KA69) són capaces de créixer mentre que no ho fan les transformades amb la construcció de *Roseobacter litoralis* (A9GU34). Per tant les proteïnes DXR de Bacillus i Listeria si que són actives però no ho és la de Roseobacter. Aquest resultat indica que alguns dels organismes de classe B són funcionalment equivalents en termes de la via del MEP als organismes de classe A ja que, tot i tenir seqüències homòlogues a DXR en el seu genoma, l'enzim no es actiu i sintetitzen MEP mitjançant l'activitat DRL.

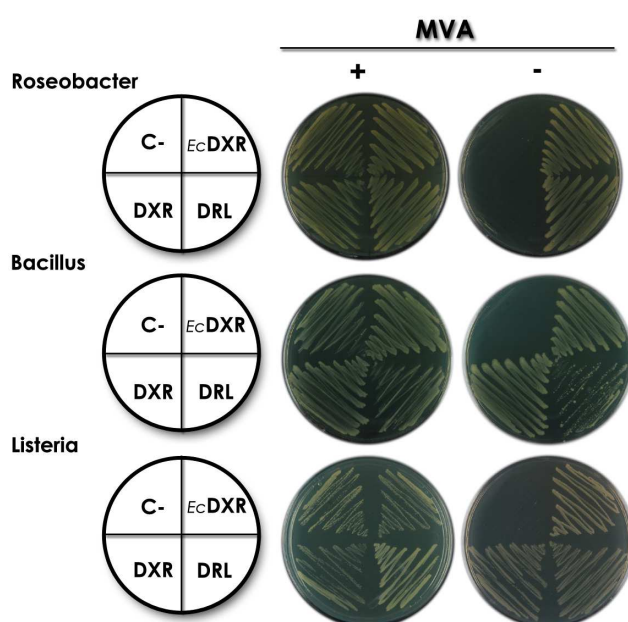


Figura 51. Complementació de cèl·lules de *E. coli* deficientes en *dxr* amb les proteïnes DXR i DRL de bacteris de classe B. Les seqüències de DXR i DRL de *Roseobacter litoralis* Och 149, *Bacillus halodurans* C-125 i *Listeria monocytogenes* F2365 es van amplificar per PCR a partir dels ADN_g i clonar en vectors d'expressió. Les construccions junt amb els controls negatius del vector buit (C-) i positius amb la proteïna DXR de *E. coli* (EcDXR) es van transformar en la soca EcAB4-10. La capacitat de les proteïnes de rescatar el fenotip letal de la soca mutant es va monitoritzar seguint el creixement en plaques suplementades (+) o no (-) amb MVA a una concentració de 1mM.

Per intentar identificar els canvis aminoacídics responsables de l'absència d'activitat de la DXR de *Roseobacter litoralis* es va fer un anàlisi de seqüència a partir de l'alineament de diverses DXR funcionals (Figura 52). En base a les dades estructurals i funcionals de DXR disponibles en la literatura es va poder constatar que la DXR de *Roseobacter* acumula un elevat nombre de canvis aminoacídics en posicions altament conservades en els enzims DXR funcionals. Tot i que resulta difícil establir una relació directe entre una o varies mutacions concretes i la pèrdua d'activitat, l'elevada quantitat detectada, incloent-ne de íntimament relacionades amb el mecanisme de reacció, permet explicar la pèrdua de funció. Els resultats descrits es van publicar en un article adjuntat al final d'aquesta tesi (Sangari et al. 2010).

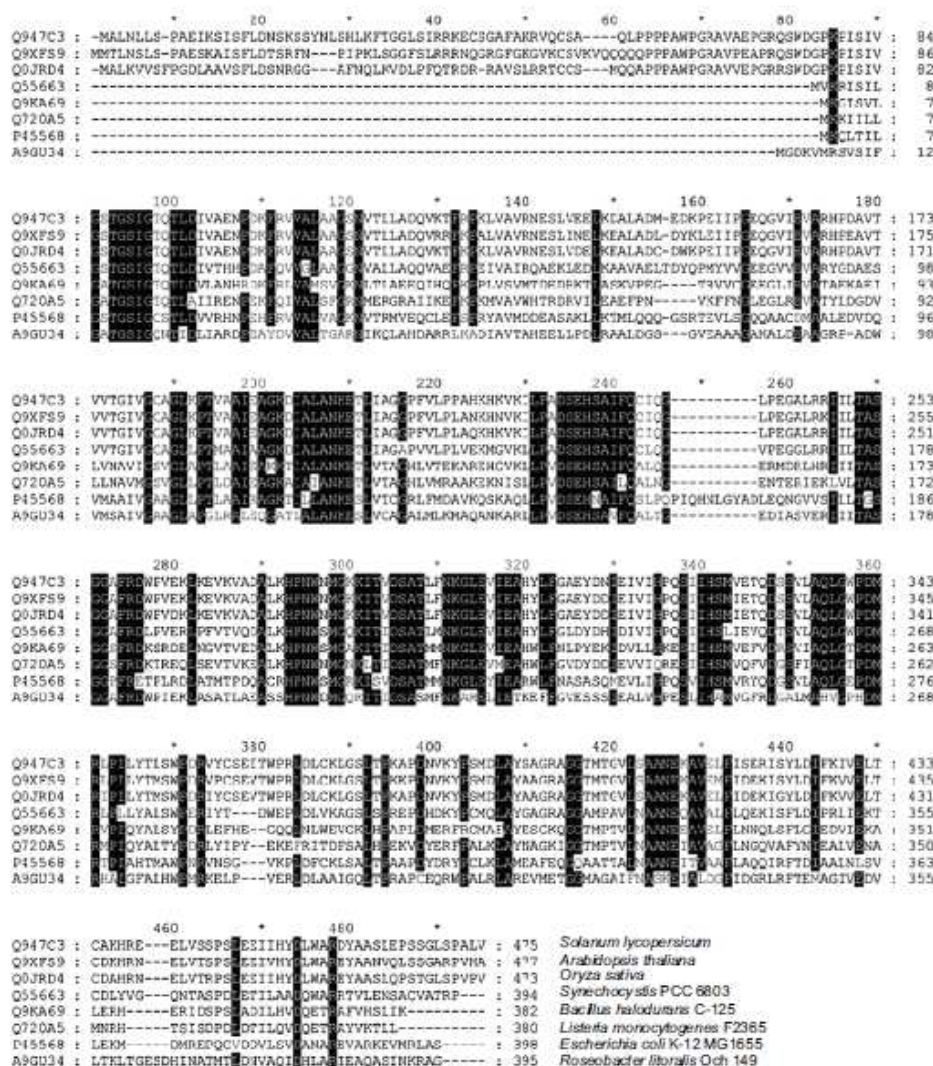


Figura 52 . Alineament múltiple de diverses proteïnes DXR representatives. Els residus conservat en mínim de 7 de les 8 seqüències es senyalen amb fons negre. La seqüència de *Roseobacter* no conserva un elevat nombre de residus que es mantenen en la resta de seqüències.

4.1.2.3 Determinació de l'estructura de DRL

Els resultats de la caracterització de DRL mostren estretes similituds amb DXR però també diferències importants. Si per una banda l'estat d'oligomerització i l'afinitat per DXP els apropen, els valors de la constant catalítica i les diferències en la inhibició per FSM marquen punts de divergència. Si a l'hora es considera l'absència total d'homologia entre les seqüències de les dues proteïnes les dades porten a pensar en un mecanisme de reacció que seria molt similar o idèntic però que podria no estar correlacionat amb una similitud estructural. Amb la intenció de comparar les possibles similituds o diferències de DRL amb DXR a nivell d'estructura terciària i identificar els aminoàcids del centre actiu de DRL es va afrontar el procés de cristal·lització de la proteïna de *B.abortus* (BaDRL) per resoldre la seva estructura per difracció de raigs X.

4.1.2.3.1 DRL s'expressa correctament però tendeix a agregar-se a molt altes concentracions.

Per afrontar el procés d'obtenció de cristalls es requereixen grans quantitats de proteïna amb una elevada puresa. Per aconseguir-ho cal dur a terme la sobreexpressió de la proteïna recombinant en les condicions òptimes. Per determinar aquestes condicions pel cas de la producció de la proteïna BaDRL es va utilitzar la construcció pET23-BaDRL. Aquesta construcció conté la seqüència codificant del gen a la que se li ha eliminat el codó de parada per afegir una cua de sis histidines en l'extrem carboxi terminal de la proteïna que faciliti la posterior purificació. L'expressió està dirigida per un promotor fort de tipus T7 induïble per IPTG. Amb aquesta construcció es va realitzar una bateria de proves d'expressió a petita escala (50 ml) utilitzant diverses soques de *E. coli*, diverses temperatures d'inducció i diverses concentracions d'agent inductor. Es va observar que els nivells d'expressió en tots els casos eren molt bons però la acumulació de grans quantitats de proteïna produïen una pèrdua de solubilitat significativa.

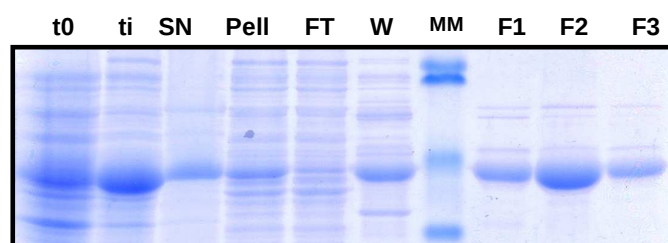


Figura 53. Gel de poliacrilamida de l'expressió i purificació de DRL. **t₀**: extracte total abans de la inducció. **t_i**: extracte total després de la inducció amb IPTG 0,4 mM durant 12h a 28°C. **SN**: fracció corresponent al sobrenedant. **Pell**: fracció del sediment insoluble. **FT**: fracció de proteïnes no retingudes en la columna de níquel. **W**: fracció recollida en rentar la columna, carregada amb l'extracte soluble, amb imidazol 20 mM. **F1-F3**: fraccions eluides amb imidazol 150 mM.

Una vegada establertes les condicions de màxima expressió es va realitzar un segon grup de proves amb diferents tampons d'extracció per millorar en la mesura del possible la solubilitat de la proteïna. Com a resultat del conjunt de totes aquestes proves es van determinar les següents condicions com les òptimes per obtenir un bon equilibri entre la quantitat de proteïna produïda i la proporció d'aquesta en la fracció soluble: soca BL21pLysS, temperatura d'inducció 28°C, temps d'inducció 12 h i concentració de IPTG 0,4 mM. (Figura 53). Aquestes condicions es van repetir en les diverses purificacions realitzades per anar superant cada un dels passos necessaris fins a obtenir cristalls de la proteïna.

L'expressió i la solubilitat de la proteïna s'havien optimitzat per la producció de DRL però la primera producció i purificació a gran escala de la proteïna va posar de manifest la tendència de la proteïna a anar precipitant progressivament una vegada ja purificada quan es trobava a elevades concentracions. Per evitar la pèrdua majoritària de la proteïna purificada es va dur a terme una prova utilitzant glicerol per mantenir la proteïna en solució. Es va fer una nova purificació de proteïna i a partir de la fracció més concentrada es van fer al·lotes a les que es van afegir concentracions creixents de glicerol en el rang 5-50%.

Les mostres es van mantenir a 4°C i es va realitzar un seguiment diari de la precipitació de la proteïna en cada condició durant 8 dies. La proteïna es mantenia soluble durant els 8 dies a concentracions de glicerol a partir del 40%. A concentracions menors la proteïna precipitava en un marge de dies variable. Al 30% ho feia passats set dies de la purificació mentre que al 20% i 10% ho feia al cap de 2 i un dia respectivament. El glicerol per la seva elevada viscositat pot dificultar els posteriors passos de purificació de manera que tenint en compte que aquests com a molt tard es realitzaven amb 12 h de diferència es va optar per utilitzar una concentració del 15%. (Figura 54)

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 8
5%	O.K	↓	↓	↓	↓	↓
10%	O.K	O.K	↓	↓	↓	↓
20%	O.K	O.K	O.K	↓	↓	↓
30%	O.K	O.K	O.K	O.K	O.K	+/-
40%	O.K	O.K	O.K	O.K	O.K	O.K
50%	O.K	O.K	O.K	O.K	O.K	O.K

Figura 54. Proves d'estabilitat de la proteïna DRL purificada. Aliquotes de la proteïna purificada es van mantenir a 4°C en presència de concentracions creixents de glicerol. La concentració final de proteïna utilitzada en tots els casos era de (5mg/ml).

4.1.2.3.2 DRL forma cristalls en forma de llargues agulles en cinc dies.

Un cop fixades totes les condicions de treball òptimes es va iniciar el camí d'obtenció de cristalls. Es va transformar la construcció pET23-*BaDRL* (Amp^R) en cèl·lules BL21pLysS (Cm^R) i a partir d'una colònia aïllada es va completar el procés d'expressió en les condicions descrites a l'apartat anterior per 1 litre de cultiu. Una vegada comprovat el correcte funcionament en un gel de poliàcrilamida es va obtenir la fracció soluble i es va sotmetre a purificació amb resina de níquel en columna eluint la proteïna quimèrica amb 150 mM imidazol. Les fraccions que contenien la proteïna *BaDRL* purificada es van analitzar en un gel de poliàcrilamida i quantificar pel mètode de Bradford. Típicament un litre de cultiu rendia al voltant de 20-25 mg de proteïna purificada. Les fraccions es van agrupar i concentrar per sotmetre-les a una segona ronda de purificació per exclusió molecular en una columna HiLoad Superdex 200 16/60 equilibrada en una solució tampó Tris-HCl (pH 7,5) 200mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM i 5% de glicerol.

Les fraccions que contenien la forma dimèrica de la proteïna es van agrupar i concentrar fins a 7,5-10 mg/ml per dur a terme un rastreig automatitzat ampli de condicions de cristallització que donés una orientació dels additius necessaris perquè es generessin els cristalls. Es va utilitzar el mètode sparse matrix treballant a 20°C.

Amb la proteïna d'una segona ronda de purificació es van afinar les condicions de cristallització al voltant de les determinades inicialment. Es va treballar a volums majors amb el mètode de difusió de vapor en gotes penjades a 20°C. El mètode consisteix en barrejar 1 µl de la solució de proteïna amb 1 µl de la solució de reservori sobre un porta objectes que s'utilitza per segellar un recipient on hi ha 1 ml de la mateixa solució del reservori de manera que la gota generada quedi penjant i exposada als vapors del reservori que saturen el volum del recipient. L'equilibrat de la proteïna en front d'una solució HEPES (pH 7,0) 100 mM, PEG4000 14-20% (w/v), MgCl₂ 200 mM induïa el creixement de cristalls amb una morfologia de bastó en 5 dies i amb unes mides màximes d'aproximadament 0,03 x 0,03 x 0,15 mm (Figura 55).

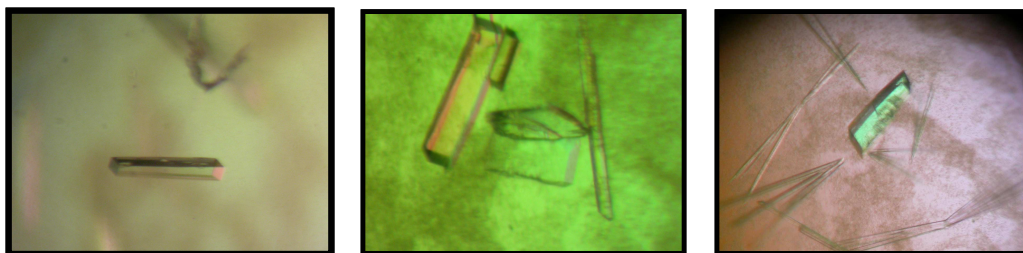


Figura 55. Imatges representatives dels cristalls de la proteïna *BaDRL*.

4.1.2.3.3 Estructura Global: DRL s'organitza en tres dominis estructurals.

En cristal·lografia existeixen diverses aproximacions per poder resoldre estructures. Segurament la més assequible és la basada en el mètode de reemplaçament molecular (*molecular replacement*). Aquest mètode permet construir l'estructura d'una proteïna a partir d'encaixar les dades experimentals obtingudes sobre l'estructura coneguda d'una proteïna homologa, simplificant d'aquesta manera el procés. Per poder fer-ho s'estima que el nivell mínim d'identitat entre les dues proteïnes ha de ser superior al 25%. La baixa homologia de DRL amb DXR, i l'absència d'altres possibles estructures homòlogues en les bases de dades d'estructures (PDB: Protein Data Bank) feia inviable l'utilització d'aquest mètode per a la resolució de la estructura tridimensional de BaDRL a partir de les dades de difracció de raigs X.

Per poder generar les dades per a un esquelet bàsic sobre el que vestir les dades experimentals es va optar pel mètode del marcatge amb seleno-metionina (Se-Met). Aquest mètode consisteix en sintetitzar la proteïna recombinant forçant-la a incorporar Se-Met en la qual l'àtom de sofre s'ha substituït per un àtom de seleni. El seleni és un element equivalent al sofre però amb una densitat electrònica superior de manera que provoca una alteració en la difracció dels raigs X i per tant permet la seva ubicació en l'espai tridimensional i per extensió la ubicació dels aminoàcids metionina. Per fer-ho es va dur a terme una nova purificació de BaDRL en les mateixes condicions d'expressió i purificació descrites per la proteïna silvestre però aplicant el mètode d'inhibició de la via de síntesi de metionina de *E.coli*. Es creix el cultiu en un medi mínim suplementat amb una mescla dels 20 aminoàcids necessaris per sintetitzar proteïnes però utilitzant Se-Met enlloc de metionina. Es van obtenir cristalls de Se-Met-BaDRL a partir de fraccions purificades concentrades fins a 5 mg/ml de la mateixa manera que amb la proteïna no marcada.

La presència del marcatge amb seleni havia de permetre generar un model preliminar però la quantitat elevada de metionines en la proteïna feia que la capacitat computacional necessària per resoldre totes les variables fos inabastable amb els mitjans actuals. Per reduir el nombre de variables calia introduir noves dades al sistema. Per fer-ho es va optar per generar complexos de la proteïna amb àtoms pesats com l'osmi. El fonament és molt similar al del seleni però amb l'avantatge que els àtoms pesats no s'han d'incorporar a la proteïna sinó que hi formen complexos en posicions preferents. Per aconseguir-ho, cristalls de la proteïna es van submergir en una solució de OsCl_6 . Paral·lelament també es va plantejar la possibilitat de resoldre la estructura del complex de la BaDRL amb l'inhibidor FSM. Com en el cas anterior cristalls de la proteïna es van submergir en una solució de FSM 0,5 mM durant 10 minuts abans de congelar-los en nitrogen líquid.

El conjunt de cristalls formats per la apo-proteïna *BaDRL*, el complex *BaDRL*-FSM, el complex *BaDRL*-Os i la SeMet-*BaDRL* es van exposar als raigs X i les dades de difracció es van recollir en diverses línies de raigs X a les instal·lacions del sincrotró europeu (European Synchrotron Radiation; Grenoble, França). Les dades obtingudes van ser processades per la Dra Bàrbara Calisto del grup de Biologia estructural i computacional del PRBB dirigit pel Dr. Ignasi Fita per acabar resolent l'estructura de la proteïna. Varies aplicacions informàtiques van permetre arribar al refinat final. Entre elles es van utilitzar DENZO i SCALEPACK pel processat de les dades de difracció, el paquet HKL2MAP per la localització de l'osmi i el càlcul de les fases inicials fins a una resolució de 2,8 Å, DMM pel protocol de modificació de la densitat del cristall, i Refmac5 per la optimització del mapa electrònic de densitats a través de diversos cicles d'iteració. Finalment la qualitat estereoquímica dels models generats es va valorar amb el programa MolProbity demostrant que no hi havia cap residu en les regions d'exclusió del diagrama de Ramachandran.

L'estructura cristal·lina de l'enzim *BaDRL* complet (des de Thr2 fins Gly437) fusionat a una cua d'histidines en l'extrem C-terminal es va resoldre pel mètode de SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion) sobre el derivat osmiat conjuntament amb la mitjana de les densitats electròniques dels cristalls de la apo-proteïna, *BaDRL*-FSM i SeMet-*BaDRL*. Les estructures de la apo-proteïna i el complex binari amb l'inhibidor FSM es van refinar fins a una resolució de 1,5 i 1,8 Å respectivament. En la unitat asimètrica dels cristalls apareixen dues subunitats que es relacionen a través d'un eix molecular binari confirmant una vegada més que *BaDRL* actua en forma de dímer (Figura 56).

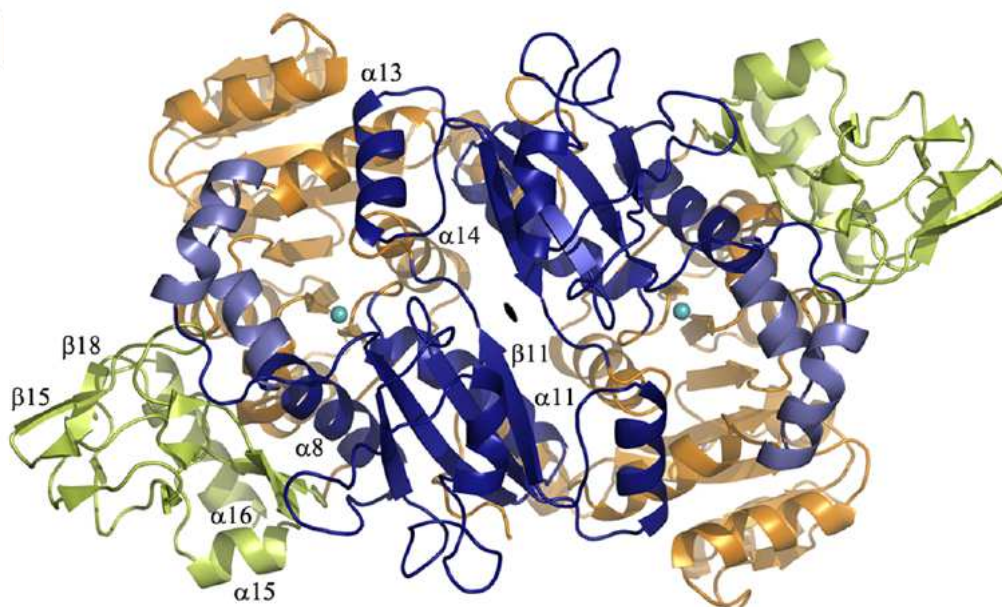


Figura 56. Estructura del dímer format per DRL en torn de l'eix binari molecular. Representació de les estructures secundàries: Tirabuixons per representar les hèlix alfa i fletxes per representar les làmines beta. Per cada un dels monòmers: En taronja el domini amino terminal. En blau el domin central i en verd el domini carboxi terminal. Les esferes blaves representen els ions magnesi coordinats als aminoàcids dels centres actius.

Cada una de les subunitats s'organitza en tres dominis estructurals: amino terminal, central i carboxi terminal. (Figura 57). El domini N-terminal, format pels residus 1 a 166 i 328 a 339, correspon al domini d'unió del NADPH tal i com ja s'havia predit a partir de la similitud a nivell de seqüència amb DXR en aquesta regió. La estructura d'aquest domini comença amb una hèlix ($\alpha 1$) seguida d'un motiu de tipus Rossmann format per set làmines β envoltades per 7 hèlix α (Figura 58). El domini central o catalític, que avarca des dels residus 167 fins 327, mostra un plegament de fulla α/β amb 4 làmines β en el centre. Dues llargues hèlix α ($\alpha 8$ i $\alpha 11$) s'orienten cap al domini N-terminal en un costat del la fulla mentre la hèlix $\alpha 12$ ho fa en el costat oposat. Un protuberància en aquest domini, formada per dues hèlix antiparal·leles ($\alpha 9$ i $\alpha 10$) connectades per un *loop* curt, formen la tapa del centre actiu. El domini C-terminal, el menor de tots, s'inicia en el residu 340 i adopta una topologia tipus β -sandwich lleugerament distorsionada que inclou dos làmines β antiparal·leles de tres segments cada una d'elles. El domini es completa amb les hèlix $\alpha 15$ i $\alpha 16$ amb aquesta darrera orientant-se perpendicularment a les hèlix $\alpha 6$ i $\alpha 7$ (Figura 58).

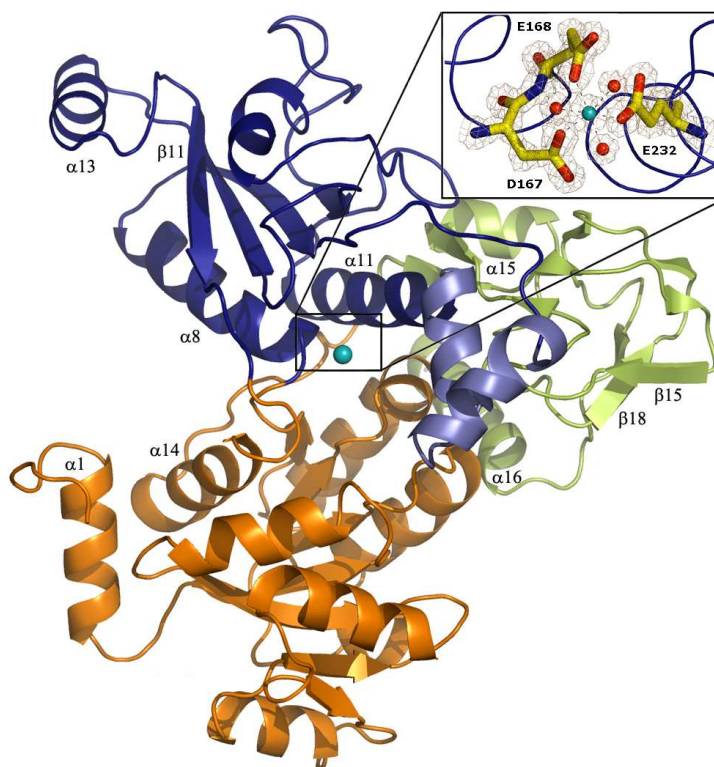


Figura 57. Estructura del monòmer de la proteïna DRL en forma de representació de les estructures secundaries. En taronja el domini amino terminal. En blau el domini central i en verd el domini carboxi terminal. En el recuadre es detalla la coordinació de l'ió magnesi amb tres dels residus del centre catalític.

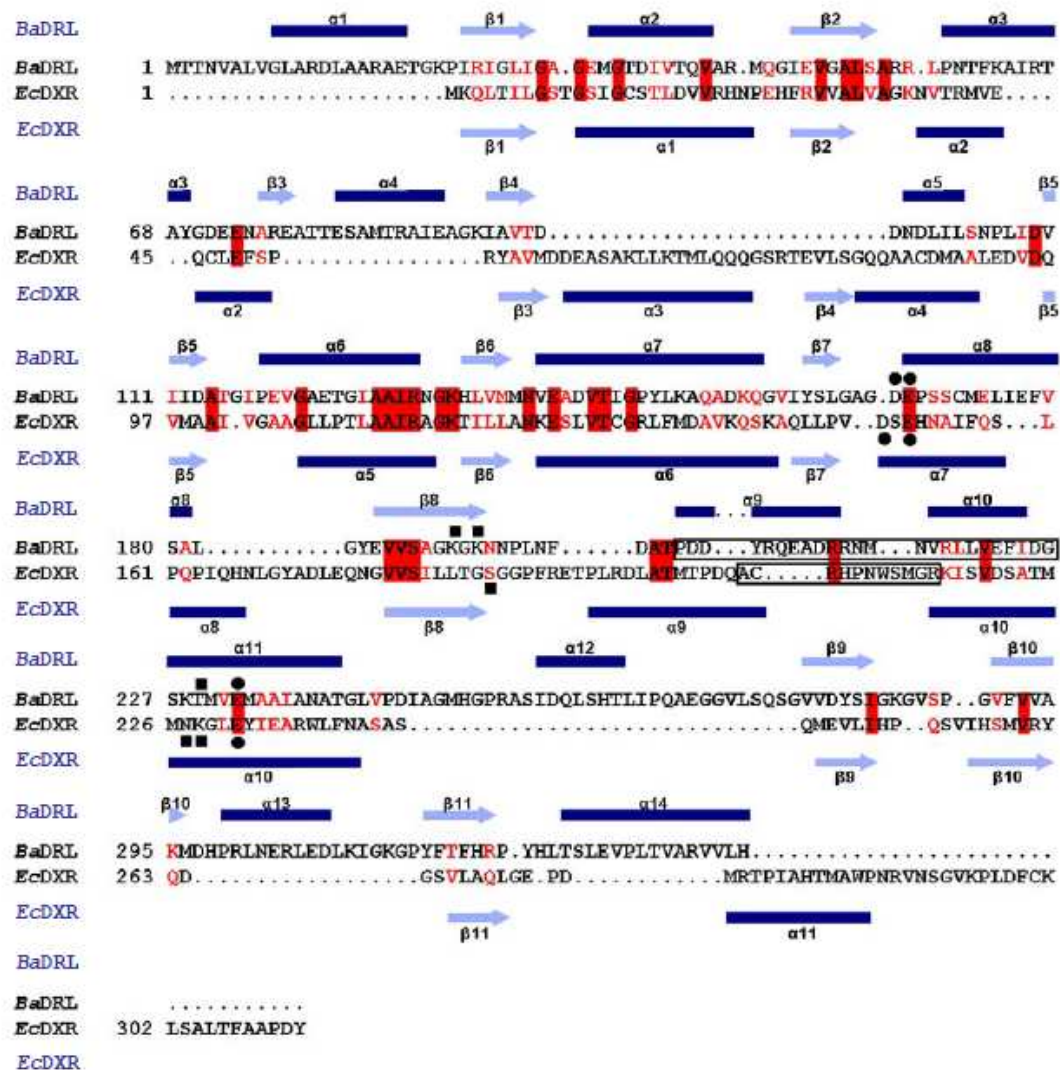
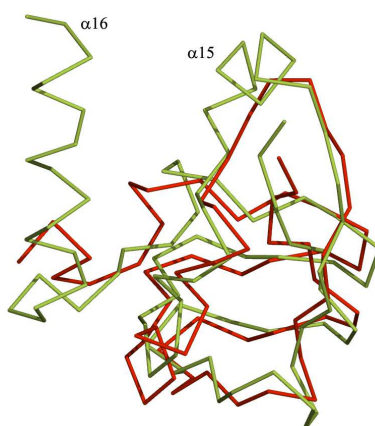


Figura 58. Alineament de seqüència en base a la estructura de les proteïnes DRL de *B. abortus* (BaDRL)DXR de *E. coli* (EcDXR). En vermell els residus conservats. Les rodones negres indiquen els residus que intervien en la coordinació del magnesi. Els motius estructurals es representen a sobre i a sota de l'alineament. Les barres en blau fosc representen hèlix alfa, i les barres en blau clar làmines beta.

Les interaccions entre les dues subunitats es produeixen en els dominis N-terminal i central però no n'apareix cap en el C-terminal. Una anàlisi d'homologia estructural centrat en el domini C-terminal en la base de dades DALI va revelar una elevada similitud amb el domini ice-binding de les proteïnes anticongelants de tipus III de l'organisme *Macrozoarces americanus* (54). En canvi no presenta cap similitud amb el domini C-terminal de DXR que s'estructura a partir d'una arquitectura totalment diferent. No obstant resulta molt interessant constatar que els dominis de DRL i DXR mostren volums totals molt similars i ocupen pràcticament la mateixa posició en relació al domini N-terminal (Figura 59) suggerint un possible paper equivalent restringit al manteniment de la arquitectura global de les proteïnes.

Figura 59. Comparació de la estructura del domini C-terminal de BaDRL (verd) i del domini d'unió de gel de la proteïna anticongelant de tipus III de l'organisme *Macrozoarces americanus* (vermell)



4.1.2.3.4 El centre actiu de DRL mostra diferències significatives respecte DXR.

El centre actiu de BaDRL es localitza en la cavitat formada entre els dominis N-terminal i central. Conté un ió Mg^{2+} unit a través d'una coordinació octaèdrica amb **Asp167**, **Glu168** i dues molècules d'aigua en les posicions equatorials. Les posicions axials les ocupen el residu **Glu232** i una tercera molècula d'aigua (Figura 60A). Aquests tres residus estan totalment conservats entre les DRL que formen part del DRL-clade que defineix les autèntiques DRL amb activitat enzimàtica (Figura 50). La presència de l'ió Mg^{2+} així com la geometria de coordinació guarden una estreta similitud amb les de les estructures descrites per DXR. De fet, els tres aminoàcids tenen equivalència en els residus Asp150, Glu152 i Glu231 de la proteïna DXR d'*E. coli* (*EcDXR*) (Figura 60B). En *EcDXR* al voltant de l'esfera de coordinació es troben tres residus amb càrrega altament conservats (Lys125, Glu126, i Asp221) proposats com a fermes candidats a desenvolupar un rol important en la catàlisi. De manera similar, en BaDRL també es pot identificar una tríade de residus amb càrrega que podria dur a terme el mateix paper. No obstant aquests tres residus (**Glu141**, **Glu222** i **Lys228**) no serien equivalents als de *EcDXR* des de un punt de vista estructural. El mateix passa per altres residus catalítics de *EcDXR* com la Met214, His257 i Met276 pels quals no hi ha una equivalència estructural en BaDRL tot i que es mantenen en la seqüència en les posicions **Met215**, **His323** i **Met34**.

En els enzims DXR, el centre actiu requereix del tancament de la tapa formada pels residus d'un loop flexible que s'apropa cap al substrat (Yajima *et al.*, 2007). Aquest loop generalment no està ben definit en les estructures disponibles en les bases de dades, molt probablement com a conseqüència d'aquesta mobilitat. En BaDRL la protuberància formada per les hèlix $\alpha 9$ i $\alpha 10$ del domini central podria jugar un rol similar. En les estructures de la apoproteïna aquesta regió queda perfectament resolta suggerint que en tot cas la mobilitat de la tapa seria més limitada però en el mapa de densitats del complex binari BaDRL-FSM es pot observar que en aquesta regió existeix una conformació alternativa (de baixa ocupació respecte la conformació predominant) en la que la protuberància està desplaçada cap al centre actiu (Figura 60A).

Aquesta circumstància suggereix que la unió de l'inhibidor al centre actiu promouria el tancament de la tapa emulant el que passaria envers al substrat (FSM és un inhibidor competitiu amb analogia estructural per DXP).

El residu His209 de *EcDXR* situat en la tapa ha estat descrit com rellevant en la activitat catalítica de l'enzim (Holm and Rosenstrom, 2010; Kuzuyama, 2000). Aquest residu no està conservat en *BaDRL* però a través de l'anàlisi de l'estructura es pot deduir que els residus Glu209 i Arg213 de la tapa podrien substituir-lo funcionalment. Els dos residus es troben molt conservats, tot i que no totalment, entre les seqüències de les DRL actives del DRL-clade (Figura 50).

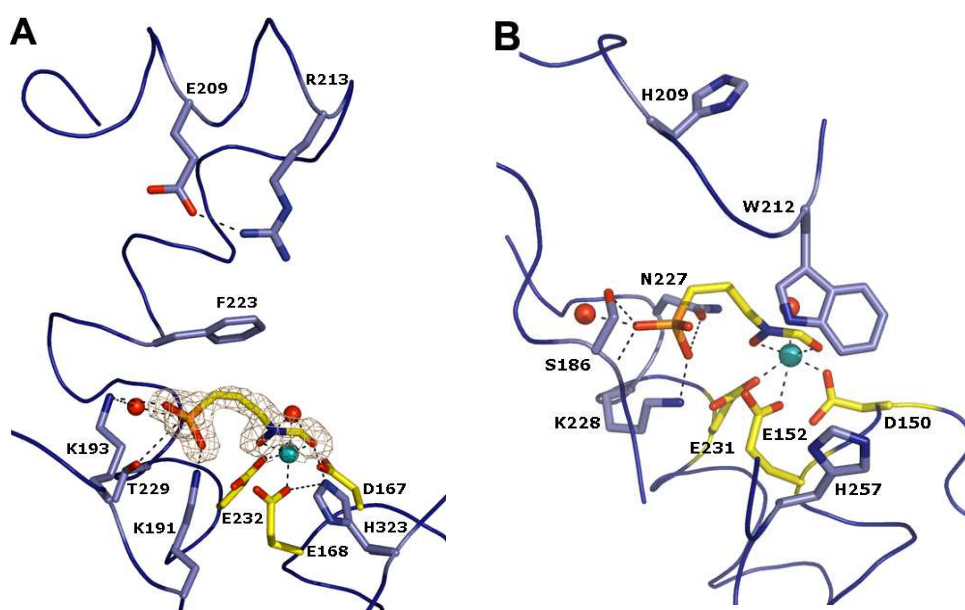


Figura 60. Configuració dels centres actius de DRL i DXR amb unió de FSM. **A)** centre actiu de *BaDRL* i **B)** centre actiu de *EcDXR*. Els residus més rellevants es representen en forma de bastons. Les esferes vermelles representen les molècules d'aigua i la blava l'ió de magnesi.

Des de un punt de vista més global els centres actius de *BaDRL* i *EcDXR* mostren similituds evidents en els punts més bàsics relacionats amb el tipus de reacció que catalitzen com la necessitat d'un ió divalent i la geometria i posició que aquest a d'ocupar. En canvi aquestes similituds es difuminen pel tipus de residus i la manera en la que aquests interaccionarien amb el substrat fins al punt que estructuralment s'organitzarien de manera totalment diferent. Una altra diferència significativa entre els dos centres actiu són les cavitats on es localitzen. Aquesta cavitat es molt més restringida en volum buit en el cas de *BaDRL* que no pas en *EcDXR*.

4.1.2.3.5 Unió de FSM al centre actiu de DRL.

A partir de la densitat electrònica corresponent a la FSM en la estructura del complex binari BaDRL-FSM es va poder establir la manera com l'inhibidor s'uneix al centre actiu. La semblança de la estructura de la FSM amb la del substrat de la reacció catalitzada, DXP, permet fer una interpretació aproximada de la manera com aquest compost s'uniria.

Dos àtoms d'oxigen (O1 i O2) de l'àcid hidroxàmic en un dels extrems de la FSM, es coordinen amb l'ió Mg^{2+} desplaçant les dues molècules d'aigua de les posicions equatorials identificades en la estructura de la apoproteïna (Figura 60A). La regió de l'àcid hidroxàmic també forma un pont d'hidrogen amb **His323** de BaDRL a l'hora que estableix una interacció per apilament amb la cadena lateral aromàtica de **Phe223**. Per l'altre extrem, el grup fosfat de la FSM queda ancorat a través de dos ponts iònics establerts amb **Lys191** i **Lys193** i dos ponts d'hidrogen amb la cadena lateral de **Thr229** (Figura 60A). Aquests cinc residus implicats en la unió de la FSM estan totalment conservats en les seqüències del DRL-clade (Figura 50), amb la única excepció de la proteïna B1CB96 d'*Anaerofustis stercorihominis* en la qual la **Thr229** és substituïda per Asn en un canvi conservatiu. En conjunt les dades semblen indicar que aquests residus jugarien un paper important en la activitat de DRL ja sigui a través de la unió del substrat o participant activament en la catàlisi.

Quan es compara la unió de la FSM amb la descrita per EcDXR s'observa que tot i que globalment la unió sembla similar, cap dels residus implicats manté una equivalència estructural. En la majoria dels casos les identitats d'aquests residus difereixen sensiblement entre les dues famílies d'enzims.

L'anàlisi de l'estructura de BaDRL i concretament del centre actiu i la manera com la FSM s'hi uneix havien postulat tota una sèrie de residus candidats a estar estretament relacionats amb el procés de transformació de la DXP a MEP. De tots aquests residus els més evidents es poden distribuir en tres grups segons el paper que podrien estar jugant. Un primer grup serien els relacionats amb la coordinació de l'ió Mg^{2+} (**Asp167**, **Glu168** i **Glu232**). Un segon grup aglutinaria els residus implicats en l'ancoratge del substrat per unió del grup fosfat (**Lys191**, **Lys 193**, i **Thr229**), i un tercer grup relacionat amb el tancament de la tapa del centre actiu (**Glu209**) (Figura 60A).

Per confirmar la rellevància d'algun d'aquests residus per l'activitat de BaDRL es van generar quatre mutants per mutagenesis dirigida: dos simples (K193N i T229I), i dos dobles (K193N/T229I i E209S/R213A). Els tres primers afectarien a la unió de FSM a través del grup fosfat i per extensió a la unió de DXP, i l'últim podria afectar al tancament de la tapa. En aquest darrer cas el residu candidat segons l'estructura era el **Glu209** però es va decidir generar el doble mutant davant de la possibilitat que la **Arg213**, molt pròxima en l'espai i amb unes característiques similars, pogués assumir aquest mateix paper i emascarar l'efecte de la

mutació. No es va plantejar la mutació dels residus associats a la coordinació del magnesi degut a la gran similitud amb els del centre actiu de EcDXR dels que ja existien resultats basats en mutació que indicaven el seu caràcter essencial (Kuzuyama, 2000). Per altra banda la comparació de seqüències de DRL actives envers les no actives ja assenyalava la seva transcendència doncs es dona el cas que en totes les actives es manté conservat el **Glu168** mentre que no ho està en cap de les no actives.

A partir de la construcció pET29-BaDRL es va amplificar el vector amb la seqüència codificant de BaDRL amb encebadors complementaris que introduïen les mutacions desitjades en forma de substitucions. Els encebadors utilitzats van ser: DRL-K193N(F)/ DRL-K193N(R), DRL-T229I(F)/ DRL-T229I(R) i DRL-E209S/R213A(F)/ DRL-E209S/R213A(R). El doble mutant K193N/T229I es va obtenir sotmetent el mutant K193N a una segona etapa de mutagènesi amb els encebadors de T229I. Els plasmidis parentals es van eliminar per digestió amb l'enzim de restricció *DpnI* i els mutats es van transformar i recuperar en cèl·lules TOP10. Les quatre construccions mutants i la silvestre en pET29 es van utilitzar com a motllo per introduir-les en vectors d'expressió utilitzant la tecnologia Gateway. Totes les construccions es van amplificar amb els mateixos encebadors: DRL-attB1 i DRL-attB2 i es van insertar en el vector pDONOR207 (amb resistència a gentamicina). Posteriorment es van transferir per una banda a un vector d'expressió pET28 (Km^R) adaptat per poder ser utilitzat amb el sistema Gateway (anomenat pH9) que introdueix una cua de 9 histidines en l'extrem amino terminal i per l'altre a un segon vector d'expressió pET32 (Amp^R) que afegeix una cua de tiorredoxina també en l'extrem amino terminal.

A partir de les construccions de DRL silvestre i les quatre versions mutades en el vector pET32 es van dur a terme assaigs d'activitat *in vivo* basats en la complementació de la soca EcAB4-10. La soca transformada amb cada una de les construccions es va créixer en plaques de LB en presència d'ampicilina, kanamicina, i cloramfenicol. Únicament la construcció que expressava la proteïna BaDRL en la seva forma silvestre va ser capaç de superar la auxotrofia per MVA. Les proteïnes que incorporaven les diverses mutacions no varen complementar l'auxotrofia per MVA de la soca EcAB4-10, suggerint que les corresponents residus son essencials per a la activitat enzimàtica *in vivo*.

Paral·lelament es van dur a terme assaigs d'activitat *in vitro* a partir de les proteïnes recombinants purificades. Les construccions en pET28 es van transformar en la soca de *E. coli* BL21pLysS i una vegada comprovada l'expressió de la proteïna en extractes totals (Figura 61) es van obtenir les diverses proteïnes silvestre i mutants purificades. Les proteïnes es van utilitzar en assaigs d'activitat espectrofotomètrics monitoritzant el consum de NADPH a través del decrement d'absorbància a 340 nm. De manera consistent amb els resultats obtinguts *in vivo*, tan sols la proteïna BaDRL silvestre convertia DXP en MEP consumint NADPH durant la reacció.

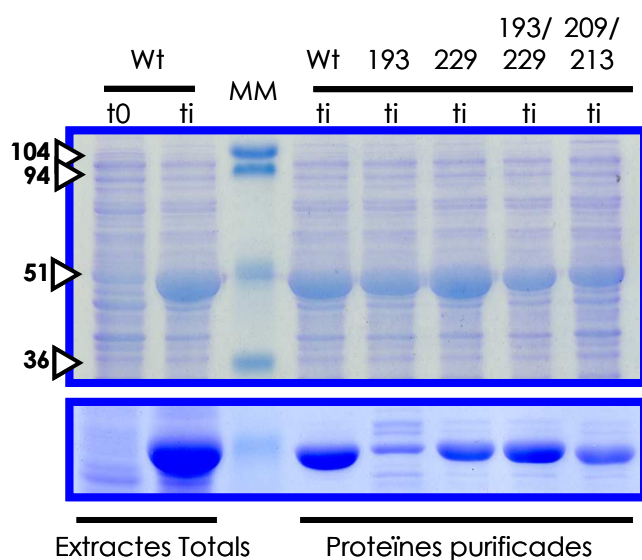


Figura 61. Expressió i purificació de les proteïnes DRL silvestres i mutants puntuals. El pannel superior mostra els nivells d'expressió de les diverses construccions generades a partir de mutagènesis dirigida de la seqüència que codifica per la DRL silvestre en extractes totals. *T₀*: Abans de la inducció. *Ti*: després de 12h d'inducció amb IPTG (0,4mM) a 28°C. *MM*: Marcador molecular. En el pannel inferior les fraccions de proteïna purificades a partir de les construccions generades en el vector *pET28*.

Aquests resultats donen suport a la conclusió de que els residus Lys193 i Thr229 serien essencials per l'activitat de l'enzim molt probablement en fixar el substrat en el centre catalític i que els residus de la tapa Glu209 i Arg213 també ho serien tot i que en aquest cas seria difícil establir si tots dos ho són o només seria Glu209 el responsable final de permetre l'activitat mentre la mutació de Arg213, afegida per evitar l'emascarat del resultat, no tindria una repercussió real.

4.1.2.3.6 Estudis d'inhibició.

L'anàlisi del centre catalític i de com la FSM s'hi uneix, indiquen que tot i que DRL i DXR catalitzen la mateixa reacció, l'organització i funcionament del centre actiu mostra grans diferències. Aquestes marcades diferències obrien la porta a la possibilitat d'identificar nous compostos que inhibeixin de manera selectiva els enzims DRL o DXR. Com a primer pas en aquesta direcció es va decidir utilitzar la informació estructural generada per dur a terme una primera aproximació racional a aquesta possibilitat. Es va intentar utilitzar la diferència en els volums i conformació de les cavitats dels centres actius. Tal i com s'ha comentat anteriorment aquesta cavitat presenta un volum menor i una conformació més tancada en el cas del centre actiu de *BaDRL* respecte a *EcDXR*. Es van escollir una sèrie de derivats de la FSM descrits com a inhibidors de DXR en diversos estudis *in vitro* i es van posicionar en la estructura del complex binari *BaDRL*-FSM aprofitant que el grup fosfat i l'esquelet de l'àcid hidroxàmic, comú en tots ells, coincidí amb la posició establerta experimentalment per la FSM (Figura 62).

En el cas de l'inhibidor FR900098 (Uh *et al.*, 2011) el formil hidrogen de la FSM és substituït per un grup metil (Figura 62A). En la estructura resolta per la DXR de *Plasmodium falciparum* aquest grup estableix una interacció positiva amb el residu Trp296 de la tapa del centre catalític (que equival al residu Trp212 en *EcDXR*). Aquesta interacció resulta en un increment en la afinitat de l'inhibidor envers el centre actiu que es reflexa en un descens en la IC_{50} respecte el determinat per FSM. Quan es substitueix l'hidrogen per un grup metil en la FSM en l'estructura experimental del complex BaDRL-FSM, s'observa que aquest grup metil de la FR900098 podria establir noves interaccions hidrofòbiques amb les cadenes laterals de Thr325 i Leu308 predient una millora en la capacitat d'inhibició de la activitat DRL del derivat metilat respecte el de la FSM. Per altra banda els derivats de la FSM CBK1 i CBK2 (Figura 62A), amb una substitució de l'hidrogen per un grup fenil en posició alfa, havien estat descrits com a bons inhibidors de la *EcDXR* i encaixen perfectament en el seu centre actiu (Behrendt *et al.*, 2010). En canvi en analitzar el posicionament en el centre actiu de BaDRL afegint el grup fenil a la estructura del complex BaDRL-FSM apareixen impediments estèrics molt importants. Aquests compostos són resultat de síntesi química i per tant el compost es troba com una mescla isomèrica amb el grup fenil en les dues possibles configuracions. En una de les configuracions el grup fenil xocaria contra la cadena lateral de Phe223 mentre que en l'altre quedaria totalment exposat al solvent de manera que el seu caràcter hidrofòbic generaria una interacció negativa.

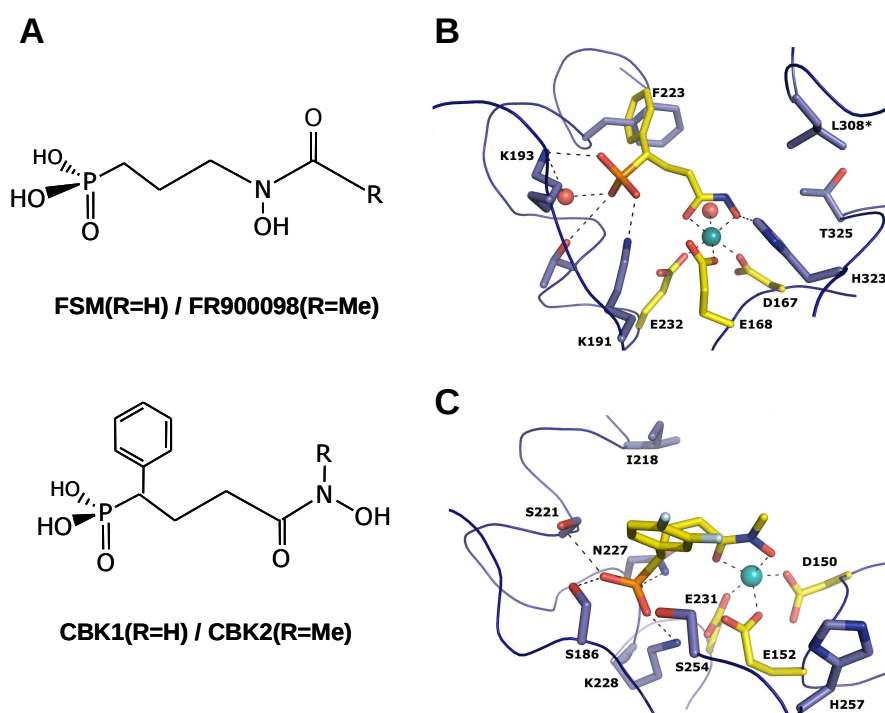


Figura 62. Estudis teòrics de posicionament de diverses estructures en el centre actiu de BaDRL i *EcDXR*. **A)** Estructura dels dos inhibidors de DXR (superior) més coneguts i de dos derivats alfa substituïts (inferior). Posicionament teòric del compost CBK1 en els centre actiu de BaDRL (**B**) i el de *EcDXR* (**C**).

Per tant pel cas dels fenil derivats la predicció era que aquest grup voluminós addicional impediria, o si més no desestabilitzaria, la unió al centre actiu de *BaDRL* i per tant suggeriria que aquests dos compostos no serien bons inhibidors de *BaDRL*.

Per comprovar la validesa de totes aquestes prediccions es van dur a terme assaigs d'activitat *in vitro* amb les proteïnes recombinants purificades *EcDXR* i *BaDRL* en presència de diverses concentracions de FSM, FR900098, CBK1 i CBK2. (Figura 62). Es van mesurar les velocitats inicials de les cinètiques a cada una de les set concentracions d'inhibidor en el rang 0,016-100 μM i es van determinar els valors de IC_{50} a partir de tres rèpliques utilitzant una regressió no lineal amb el programa GraphPad Prism5. Els resultats obtinguts una vegada més marcaven algun punt de coincidència entre *EcDXR* i *BaDRL* però a l'hora unes grans diferències entre tots dos.

El compost FR900098 inhibia l'activitat de *BaDRL* de manera més eficient que no pas la FSM ($\text{IC}_{50[\text{FR900098}]}=1,09 \pm 0,19 \mu\text{M}$ envers $\text{IC}_{50[\text{FSM}]}=2,39 \pm 0,62 \mu\text{M}$) suggerint que les interaccions favorables predites pel grup metil de FR900098 amb el residu 223 de *BaDRL* efectivament estaven millorant l'afinitat per l'enzim. Aquesta diferència es mantenia tal i com també havia estat descrit per *EcDXR* però els valors obtinguts eren de l'ordre de deu vegades majors que els publicats per l'enzim de *E.coli* (Behrendt *et al.*, 2010). FSM i FR900098 inhibeixen l'activitat de l'enzim de *B. abortus* però ho fan amb una eficiència clarament menor molt probablement com a resultat de la diferència en la distància dels punts d'ancoratge dels grups fosfat i àcid hidroxàmic que provoquen un encaix menys idoni en el cas de *BaDRL* repercutint en una unió més dèbil.

El comportament dels compostos CBK1 i CBK2 també va seguir la línia marcada per les prediccions estructurals. Aquests compostos inhibien l'activitat *EcDXR* a concentracions molt similars a les que ho feien FSM i FR900098 però en canvi no inhibien de manera significativa la activitat de *BaDRL* a concentracions de fins a 1 mM (Figura 63). Aquest resultat demostra que el desenvolupament d'antibiòtics específics contra un dels dos enzims és una possibilitat real a explorar detingudament. Els treballs d'obtenció i anàlisi dels cristalls de *BaDRL* i de assaig d'inhibidors van ser reunits en una publicació adjuntada al final d'aquesta tesi.

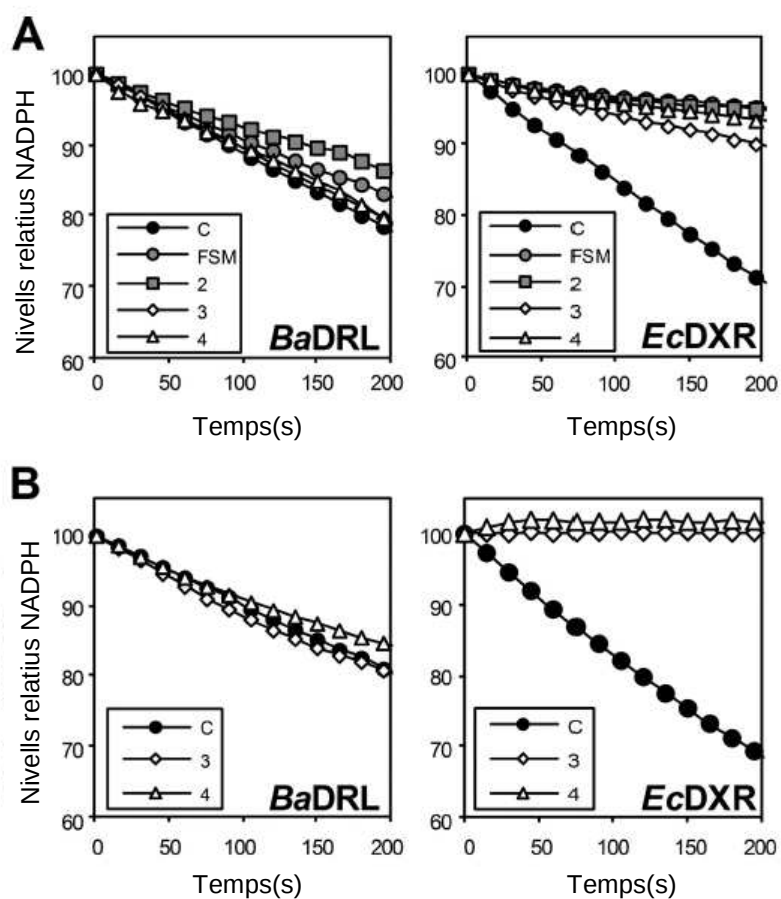


Figura 63. Assajos d'inhibició de DXR i DRL. Assajos d'activitat DXR realitzats en presència d'una concentració 0,5 μ M (A) i 500 μ M (B) de FSM, 2 (FR900098), 3(CBK1) o 4 (CBK2). C: mostra control sense inhibidor

4.2 Estudi de l'efecte de la sobreexpressió dels enzims identificats amb activitats alternatives a DXS i DXR

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels enzims que configuren la via del MEP havien posat de manifest l'efecte positiu d'una sobreexpressió moderada de DXS i en menor mesura de DXR sobre l'acumulació de licopè en el model de *E.coli* (Figura 12). Sota aquesta premissa es va intentar determinar el potencial com a possibles futures eines biotecnològiques de les noves activitats alternatives identificades per aquests dos enzims mesurant l'efecte de la seva sobreexpressió sobre l'acumulació final de carotenoides en aquest mateix sistema model.

4.2.1 La proteïna mutant E1-PDH(E636Q) no augmenta la producció però el mutant DHBPS(G108S) millora l'acumulació de carotenoides en *E. coli*

S'havien identificat dues proteïnes que, en la seva forma mutada, E1-PDH(E636Q) i DHBPS(G108S), adquirien la capacitat de compensar l'absència de DXS sintetitzant DXP (Figures 34 i 40). Com a primera aproximació per avaluar l'efecte de la seva sobreexpressió sobre l'acumulació de licopè en el sistema model d'*E. coli* es van utilitzar les diverses construccions generades de les proteïnes silvestres i mutants en el vector de clonatge pCR11. Es van determinar els nivells de licopè acumulats en cèl·lules transformades amb les versions silvestres i mutants de cada una de les proteïnes i, com a control positiu, amb un vector d'expressió de DXS del que es coneixia prèviament la seva repercussió positiva sobre els nivells del pigment (Figura 12). La representació dels nivells de licopè relativa als valors obtinguts per la soca control transformada amb el vector buit mostren que, en el cas de les proteïnes E1-PDH i DHBPS en la seva forma silvestre, no es va millorar la producció de licopè. Per la seva banda les formes mutants mostren comportaments desiguals. La proteïna mutant E1-PDH(E636Q) no produeix un increment significatiu en els nivells de licopè respecte a les mostres control (Figura 64). En canvi la soca que conté la construcció que codifica per la proteïna mutant DHBPS(G108S) sí que mostra nivells significativament majors (de l'ordre d'un 40%) als obtinguts amb la soca control, el que significa aproximadament la meitat de l'increment que s'obté en la soca que incorpora la construcció que codifica per DXS. No obstant, aquests resultats no són comparables ja que els vectors utilitzats pel control de DXS i les diverses mostres analitzades són diferents i per tant la comparació només pot ser orientativa. El resultat del control però sí que permet confirmar, tal i com s'ha vist en anteriors ocasions, la repercussió que té el fons genètic en la producció de carotenoides en el sistema de *E.coli*. La mateixa construcció que codifica l'enzim DXS en un fons EcAB4 produeix un increment de l'acumulació de licopè de fins a 6 vegades la mesurada pel control mentre que aquest increment es situa al voltant de dues vegades quan es treballa, com en aquest cas, amb un fons genètic DH5α. (figures 64 i 65).

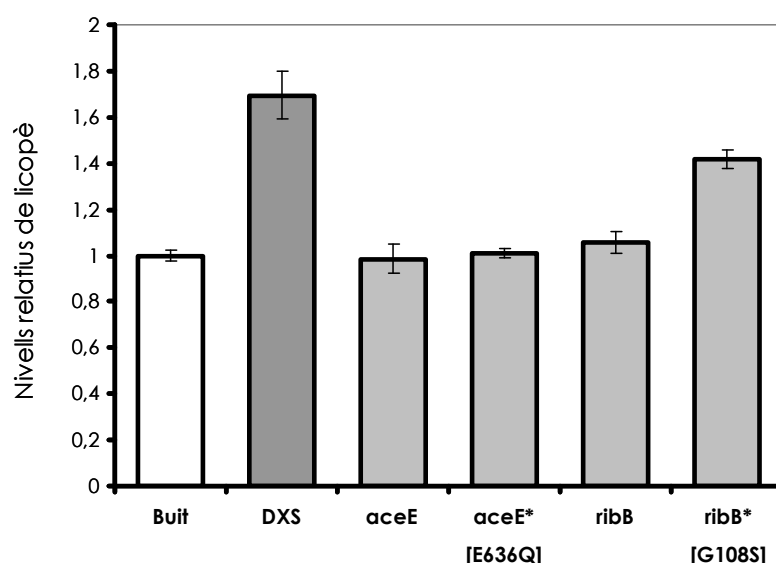


Figura 64. Anàlisi dels nivells de licopè acumulats en soques transformades amb construccions amb els gens *aceE* i *ribB* en la forma silvestre i les formes mutades. La soca DH5α de *E.coli* va ser co-transformada amb el vector auxiliar *pLyc* i amb els vectors de clonatge *pCRII* que contenen la forma silvestre o mutada dels gens indicats. Com a control positiu s'utilitza un vector d'expressió (*pTAC*) que expressa la proteïna *DXS* de *E.coli*. Buit: soca control transformada amb el vector *pCRII* buit. (n=5)

4.2.2 La sobreexpressió de DRL no augmenta la producció de carotenoides en *E. coli*.

Establerta la reacció catalitzada per DRL com equivalent a la de DXR es va fer una primera prova per avaluar l'efecte de la seva sobreexpressió sobre l'acumulació de licopè en *E. coli*. Es van determinar els nivells relatius (respecte a la soca control transformada amb el vector buit) de licopè acumulats en cèl·lules EcAB4 transformades amb el vector auxiliar *pLYC* i la construcció *pET23-DRL* que codifica l'enzim DRL de *B.abortus* en presència o absència d' IPTG com a agent inductor. Els resultats es van comparar amb el de mostres control sobreexpressores de DXS i DXR que anteriorment havien demostrat produir un increment significatiu en l'acumulació del pigment vermell (Figura 12). Les mesures realitzades (Figura 65) mostren que tal i com s'esperava tan DXS com DXR produeixen increments estadísticament significatius molt similars als mesurats en experiments anteriors per l'acumulació de licopè (Figura 12). En canvi la sobreexpressió de DRL no augmenta els nivells de manera significativa respecte als mesurats per la soca control (Figura 65). Una diferència que s'observa en el comportament de l'enzim de *B. abortus* es la incidència de l'inductor. Així com la inducció de la producció de DXS i DXR amb IPTG repercuteix negativament en l'acumulació de productes finals (licopè), aquest fet no s'observa en les mostres de *BaDRL* les quals no només no pateixen un decrement en els nivells de licopè sinó que semblen mostrar una tendència a augmentar-ne l'acumulació tot i que els resultats no són estadísticament significatius.

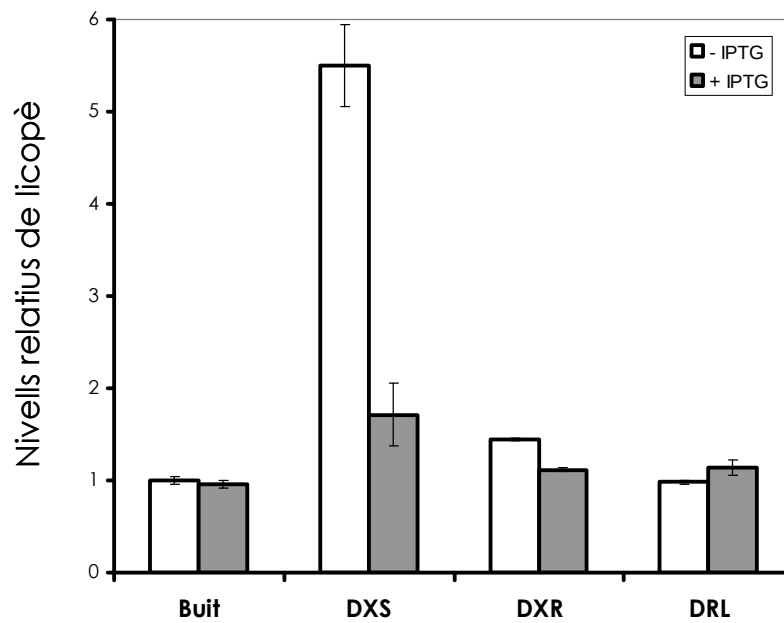


Figura 65. Anàlisi dels nivells de licopè acumulats en soques sobreexpressores de BaDRL. Soca EcAB4 de *E.coli* contenint el plasmidi auxiliar pLyc i transformada amb el vector (pET23) que expressa la proteïna BaDRL. Com a control positiu del sistema s'utilitzen vectors (pTAC) que expressen les proteïnes DXS i DXR. Buit: soca control transformada amb el vector buit.(n=5)

1. Consideracions generals

Tant el plantejament inicial com el desenvolupament del treball presentat pretenia des de bon inici conjuminar dos aspectes de la investigació que generalment es perceben com a compartiments separats, la ciència bàsica i la ciència aplicada (amb la biotecnologia com un dels seus representants més emergents). En una visió simplista d'aquests dos camps es podria dir que la ciència bàsica s'enfoca a la recerca del coneixement més elemental, del com funcionen les coses, a intentar respondre les preguntes que sorgeixen d'observar el món que ens envolta i que és dirigida pel motor de la curiositat. Per la seva banda la ciència aplicada seria una branca sustentada en el pragmatisme i l'afany de donar sortida i aprofitar les noves possibilitats que els continus descobriments ofereixen. No obstant aquestes dues branques de la ciència avancen juntes de la mà. Tot nou coneixement implica una potencial aplicació, i tota aplicació és el resultat de l'ensamblat racional de petits blocs de coneixement que junts poden formar una sòlida base sobre la que construir el futur.

Seguint la premissa imposada per aquesta idea, el treball aquí presentat s'ha orientat sota uns paràmetres d'aprofundir en l'estudi d'aspectes bàsics de la síntesi de carotenoids (amb una ampla dedicació a la via del MEP i les diverses implicacions que té en altres àmbits com el desenvolupament de nous antibiòtics) amb la vista fixada en la posterior aplicació en possibles estratègies biotecnològiques. Els diferents resultats obtinguts, com també s'ha anat observant en la evolució de la bibliografia en els darrers anys, ha posat de manifest la importància de la connexió que s'estableix entre les dues àrees. Determinar quins són els punts clau i els mecanismes que dirigeixen el control sobre la ruta biosintètica permeten dissenyar estratègies més racionals en aplicacions com la sobreproducció de carotenoids d'interès industrial ja sigui en plantes o en microorganismes. Però per altre banda el fet d'intentar utilitzar aquest coneixement pot ser la clau que mostri l'existència de noves incògnites no identificades prèviament que cal resoldre per seguir millorant els processos. Un clar exemple són les estratègies de sobreexpressió d'enzims clau la ruta per incrementar el flux metabòlic amb l'objectiu de forçar una major acumulació dels productes d'interès.

La biotecnologia és un àrea de la ciència amb un present molt important i un futur de la qual resulta difícil veure'n els límits. Les possibilitats que ofereix són pràcticament il·limitades però no s'ha d'oblidar que la seva eina bàsica de treball són organismes vius, el més senzill dels quals presenta una complexitat difícil d'abastar en la seva totalitat. La quantitat de factors en joc que s'han modelat durant mil·lenis d'evolució per

crear les diverses maquinaries biològiques fa que el control total sobre aquests sistemes sigui d'una gran complexitat i requereixi d'un coneixement molt profund del seu funcionament que se situï més enllà de la ruta d'interès en la que es vol treballar. Cada vegada és més clara la necessitat d'entendre amb el màxim detall els mecanismes de cada una de les rutes amb potencial aplicació biotecnològica però també el fet d'entendre que aquestes no són un subgrup de reaccions aïllades sinó que formen part d'un conjunt integral en el que la connexió i la coordinació de totes les parts pot tenir un paper molt important. Aquest factor s'accentua a mesura que la complexitat dels organismes s'incrementa com és el cas del pas de microorganismes a plantes superiors.

En el cas de la biosíntesi d'isoprenoids i més concretament de carotenoids les plantes superiors en són els principals productors naturals, tant en quantitat com diversitat funcional i estructural, fet que fa indispensable abordar-ne l'estudi en aquest sistema. No obstant, l'ús de bacteris com a eina biotecnològica per a la producció d'isoprenoides en sistemes heteròlegs suposa un camp amb enorme potencial que comença a donar resultats prometedors en compostos de gran valor com és el cas de l'artemisina, el taxol o els propis carotenoides (Ajikumar *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2007). A mig camí entre aquests dos grups d'organismes es situen els microorganismes fotosintètics com les algues unicel·lulars que han estat motiu d'estudi en els darrers anys després d'haver quedat en un segon pla durant un llarg període (Kleinegris *et al.*, 2011; Lamers *et al.*, 2008). La seva major simplicitat els fan més versàtils que les plantes però el fet de sintetitzar clorofil·les i carotenoids de manera natural fa que tinguin la clau que pugui obrir les portes cap al descobriment de mecanismes ja existents per afrontar problemàtiques com l'emmagatzematge dels carotenoids produïts massivament. També són una potencial font de gens que codifiquen per activitats relacionades amb la síntesi d'isoprenoides que es puguin transferir fàcilment a microorganismes no carotenogènics com *E.coli*. En contra, a dia d'avui, hi juguen el limitat coneixement de que es disposa i la encara limitada disponibilitat d'eines genètiques. Tots dos obstacles seran superats en els propers anys.

Un dels elements de major interès biotecnològic es l'aport dels precursors universals de tots els isoprenoids, l'IPP i el DMAPP. Calibrar correctament l'aport d'aquests precursors s'ha demostrat com un factor clau a l'hora d'optimitzar les estratègies biotecnològiques i per fer-ho cal conèixer en profunditat la seva regulació i com depèn de la coordinació amb les altres rutes de l'organisme ja sigui en bacteris o plantes. Però a l'hora, les vies que aporten els precursors dels isoprenoids (via del MVA i via

del MEP) tenen un atractiu addicional molt interessant i de gran transcendència en la situació actual. Tal i com s'ha introduït anteriorment la distribució de la via del MEP entre els diversos grups taxonòmics la converteix en una potencial diana per al desenvolupament d'antibiòtics basats en estructures totalment diferents a les clàssiques utilitzades en l'actualitat. En un època en la que les taxes de resistències de molts dels patògens als antibiòtics disponibles s'han disparat, la possibilitat d'innovar en aquest camp s'ha convertit en una necessitat. Si les aplicacions del coneixement de la via MEP en biotecnologia poden aportar millores importants en els sistemes productius, l'avenç en aquesta via pot ser molt més rellevant en el camp del control dels microorganismes patògens, una lluita en la que aquests minúsculs organismes semblen recuperar terreny cada dia que passa. L'estudi dels enzims de la via és important per poder entendre la seva importància dintre de la via, i conèixer la seva estructura i mecanisme de reacció són informacions molt valuoses de cara al disseny racional d'estructures amb capacitat d'inhibició de les seves activitats. Però un factor important en aquest camp és la gran plasticitat que mostren els microorganismes. L'estudi d'aquesta plasticitat té una doble vessant. Per una banda pot permetre identificar els punts dèbils de la aplicació de noves estructures amb efecte antibiòtic. I per altra, pot ser font d'activitats alternatives que siguin un punt de partida sobre el que generar eines d'aplicació biotecnològica. La identificació de proteïnes amb activitats enzimàtiques que potencialment puguin escapar dels mecanismes de regulació consolidats en els diversos organismes poden permetre la millora de processos en noves estratègies biotecnològiques.

2. Aproximacions a la millora dels recursos biotecnològics.

2.1 Estratègies biotecnològiques senzilles. Enzims bifuncionals.

La biotecnologia es pot aplicar per assolir objectius molt variats, des de processos més senzills com la millora relativa de compostos que ja es sintetitzen en l'organisme escollit fins a processos de gran complexitat com reconstruir parcial o completament tota una ruta biosintètica en un organisme que no disposa d'ella i actua con a hoste. Un dels inconvenients a l'hora de dur a terme modificacions sobretot de rutes complexes és la necessitat d'incorporar múltiples transgens de forma estable. Malgrat que existeixen mètodes eficients per superar aquest problema, una possible alternativa que vàrem voler aplicar al nostre laboratori va ser la utilització d'enzims bifuncionals

(és a dir la generació d'un únic transgen quimèric que codifiqui l'activitat de dos enzims fusionant les seves seqüències).

Els enzims bifuncionals ofereixen avantatges el més important dels quals seria la canalització de reaccions consecutives que millori el rendiment d'una via biosintètica o que prioritzi l'ús de determinats intermediaris metabòlics que siguin comuns en més d'una via. En el cas dels carotenoides, que són compostos altament hidrofòbics, la utilització d'enzims bifuncionals podria repercutir favorablement en el procés biosintètic en transferir-se els productes de reacció directament d'un centre actiu a l'altre minimitzant la exposició al medi aquós. En els darrers anys, estratègies similars han estat utilitzades en diversos estudis realitzats en bacteris (James and Viola, 2002a; Bulow, 1987) i llevats (Tian and Dixon, 2006), produint enzims quimèrics bifuncionals capaços de dur a terme dues transformacions (en alguns casos amb una eficiència superior a la demostrada pels enzims separats).

De fet, en la naturalesa, els enzims bifuncionals no són estranys i son considerats com un pas endavant en el refinat evolutiu (James and Viola, 2002a). En podem trobar diversos exemples en la síntesi de tirosina (Christopherson *et al.*, 1983), fenilalanina (Zhang *et al.*, 1998), o la degradació d'histidina (Kohls *et al.*, 2000).

En la via del MEP podem trobar enzims bifuncionals en alguns bacteris. Entre diverses alfa i beta proteobactèries (Perez-Gil *et al.*, 2010; Gabrielsen *et al.*, 2004; Testa *et al.*, 2006) de les que es disposa del genoma seqüenciat s'ha detectat l'existència d'un únic gen resultat de la fusió dels gens *ispD* i *ispF*, que codifiquen per les proteïnes MCT i MDS i que catalitzen el tercer i cinquè pas de la ruta del MEP respectivament. Aquest gen, *ispDF*, introdueix una novetat respecte tots els prèviament anomenats ja que catalitza dos passos que no són consecutius. No obstant tot i ser molt menys freqüent, els enzims bifuncionals naturals que catalitzen passos no consecutius no és un cas únic (James and Viola, 2002b). S'ha suggerit que aquest tipus d'enzims formarien complexes amb l'enzim intermedi amb l'objectiu de canalitzar el flux de les vies. Tot i que en alguns casos s'ha pogut demostrar interacció entre l'enzim bifuncional i l'intermedi no sempre els resultats mostren que aquesta interacció repercuteixi en una millora del flux (Lherbet *et al.*, 2006). També es coneixen exemples d'enzims bifuncionals de la ruta de síntesi de carotenoids en fongs (Mohamed and Vermaas, 2006; Verwaal *et al.*, 2007).

2.1.1 L'enzim bifuncional L-Y en sistemes bacterians

La via carotenogènica és una via d'elevada complexitat formada per un nombre elevat d'enzims que catalitzen la formació d'un ampli ventall de productes d'interès industrial. Les plantes sintetitzen aquests compostos de manera natural en els plastidis, de manera que potenciar la seva acumulació pot ser una bona opció per fer aquesta font d'extracció més rendible. Una manera senzilla de promoure la biosíntesi és sobreexpressant els enzims que la formen. La sobreexpressió pot ser enfocada directament a la quantitat final produïda o a la alteració del perfil de carotenoids. En el primer cas s'hauria d'incrementar els nivells de DXS i/o PSY que han estat descrits en plantes com els enzims clau de la regulació de la via del MEP i carotenogènica respectivament. En el segon, els enzims a modificar dependrien del producte final desitjat.

Es va dur a terme una prova de concepte per establir la funcionalitat d'aquesta estratègia fusionant la seqüència del gen *LcyE* de tomàquet seguit del gen bacterià *CrtY* de *Pantonea ananas* que codifiquen pels enzims licopè ϵ -ciclasa i licopè β -ciclasa, respectivament (figura 10). Aquest és un punt important en el que la ruta es bifurca a partir del licopè per produir per una banda el α -carotè i per l'altre el β -carotè (figura 3). La prova de funcionalitat sobre un sistema bacterià no carotenogènic com *E.coli* transformat amb el vector pLYC que li permet sintetitzar licopè, demostrava que en bacteris la proteïna bifuncional que es generava mantenia les dues activitats correctament i era capaç de produir aquests dos carotens (figura 13). La construcció no es va dissenyar per una activitat òptima en bacteris sinó pensant en la seva possible aplicació en plantes i validació de la prova de concepte. Així la seqüència de tomàquet s'havia situat en la part 5' prima del transcrit per aprofitar el pèptid de trànsit a plastids mentre que a continuació hi havia fusionat el gen bacterià que no el contenia (figura 10). Per altra banda l'ús d'un gen de plantes combinat amb un de bacteris a priori pot generar una diferència important en la eficiència de cada activitat segons s'incorpori a un sistema bacterià o a una planta ja que les temperatures òptimes dels dos enzims poden ser sensiblement diferents. Aquesta diferència es pot reflectir en el fet que el cromatograma d'HPLC per analitzar el perfil de carotenoids mostra la formació dels dos compostos però en canvi no apareix un pic corresponent als compostos intermediaris (figura 13). El β -carotè es produeix per la ciclació consecutiva dels seus dos extrems per efecte de la β -ciclasa produint un intermediari monociclat (γ -carotè). El α -carotè és el resultat d'introduir un anell δ per efecte de la ϵ -ciclasa (formant el compost δ -carotè) i un anell β per efecte de l'activitat β -ciclasa. El fet que no es detecti

el pic corresponent a δ -carotè podria indicar que la proteïna bifuncional presenta una activitat predominant β -ciclasa per sobre de la ϵ -ciclasa que no permet l'acumulació d'aquest compost. Aquest factor de cara a una aplicació biotecnològica més acurada es pot utilitzar per modular les activitats relatives dels dos enzims i dirigir així la bifurcació potenciant en major o menor mesura cada una de les branques. Per altra banda la presència del pèptid de trànsit en la regió N-terminal de LCYE pot actuar limitant la seva activitat ja que en plantes la forma activa de l'enzim és la forma madura que es forma quan en el procés de translocació al cloroplast aquest fragment és escindit. La prova demostra que la estratègia es factible en bacteris i per tant que seria una possibilitat la utilització d'un enzim bifuncional per utilitzar-lo en sistemes heteròlegs amb *E.coli* com a hoste per a la síntesi de α -carotè i β -carotè. En l'actualitat el β -carotè s'obté directament de l'extracció a partir d'organismes que l'acumulen en grans quantitats de manera natural com són les espècies de *Dunadella salina* però no hi ha gaires fonts per α -carotè. Un enzim bifuncional com el proposat ajustant bé les activitats per evitar en la mesura del possible l'acció de la β -ciclasa directament sobre el licopè, podria ser una manera de sintetitzar α -carotè. Alternativament es podria generar un sistema d'inducció diferencial treballant amb els enzims per separat en el que durant la fase exponencial s'indueix la ϵ -ciclasa promovent l'acumulació del δ -carotè i en la fase estacionaria la β -ciclasa per dur a terme la segona ciclació.

2.1.2 L'enzim bifuncional L-Y en plantes

Una vegada establerta la viabilitat de la proteïna bifuncional en un sistema bacterià de *E.coli* el següent pas era comprovar si aquesta mateixa estratègia podia funcionar en plantes. L'aplicació d'aquest tipus d'estratègies en plantes presenta diversos atractius com la possibilitat de coordinar l'expressió dels components introduïts, simplificar els processos de generació dels transgènics i potencialment de reduir el risc de fenòmens de silenciament (De Wilde *et al.*, 2000). Diverses aproximacions en plantes de tabac (Tian and Dixon, 2006), *Arabidopsis* (Kourtz *et al.*, 2005), patata (Beaujean *et al.*, 2000), o arròs (Jang *et al.*, 2003), havien demostrat prèviament la possibilitat de generar quimeres funcionals en plantes tot i que no sempre amb un rendiment superior al de la sobreexpressió dels enzims individuals. Així doncs, dues versions de la proteïna bifuncional (la primera amb la seqüència codificant del gen LcyE de tomàquet i la segona amb el mateix gen d'*Arabidopsis*) es van integrar de manera estable en el genoma del sistema model *Arabidopsis thaliana* sota el control d'un promotor constitutiu fort (35S).

Per poder avaluar de manera senzilla la funcionalitat de l'enzim bifuncional les construccions es van transformar en el mutant *lut2-3* d'*Arabidopsis* (caracteritzat en aquest treball). Aquest mutant no mostra alteracions fenotípiques evidents però la disrupció del gen *LUT2* (que codifica per LCYE en *Arabidopsis*) endogen genera un fenotip bioquímic d'absència de luteïna equivalent al descrit pel mutant *lut2-1* (Pogson *et al.*, 1996). Aquests dos mutants són al·lells diferents de la mutació en *LUT2*. En tots dos casos la pèrdua de funció de l'enzim LCYE suposa una ruptura en la bifurcació biosintètica de carotenoids que es produeix a partir de licopè. L'absència del gen ha d'impedir la progressió de la branca ϵ,β . Els dos al·lells efectivament mostren una absència total de luteïna acompanyada d'un increment en l'acumulació dels β,β carotens sintetitzats en la ramificació β,β especialment significativa per la violaxantina. Els nivells totals de carotenoides però no estan alterats sinó que els canvis en la relació dels compostos majoritaris segueix un patró estequiomètric

Molt interessant resulta el fet que la pèrdua de la branca ϵ,β i per tant de luteïna no produeixi cap tipus d'alteració fenotípica així com tampoc en el contingut de clorofil·les considerant que la luteïna suposa pràcticament el 50% del total dels carotenoides presents en el cloroplast. Les característiques dels mutants *lut2* confirmen l'existència d'un únic gen que codifica per l'activitat LCYE a l'hora que descarta l'existència d'alguna activitat alternativa capaç de ser reclutada per dur a terme aquest tipus de ciclació en *Arabidopsis*. Aquest fet no resulta sorprenent tenint en compte que la introducció d'anells ϵ segueix un procés diferent al que es dona per la generació d'anells β i que ha estat descrit com un dels punts que diferencien la biosíntesi de carotenoides en plantes respecte a cianobacteris, fongs i bacteris. Aquesta diferència suggereix que la funció de la luteïna pot ser substituïda per la presència d'altres carotens o xantòfiles de tipus β,β . Encara més evident resulta el fet que si bé tots els organismes fotosintètics contenen derivats de β -carotens, els organismes que sintetitzen derivats de α -carotens (ϵ,β -carotens) queden restringits pràcticament a plantes superiors i algues verdes suggerint que la ramificació de la síntesi de carotenoides es va produir i fixar evolutivament per la superior eficiència del nou compost que la branca genera, la luteïna. Estudis del paper de les diverses xantòfiles proposen la conservació d'aquest compost en base a la seva major eficiència a l'hora d'optimitzar l'estructura de l'antena, la seva estabilitat i la organització d'aquesta per obtenir una regulació més eficient de la recol·lecció de la llum en condicions ambientals naturals (Lokstein *et al.*, 2002). Aquests dos resultats estarien en consonància amb un paper de major eficiència o especialització però no essencial de la luteïna que justifiqui la seva gran acumulació en teixits fotosintètics però en canvi la

seva menor distribució entre organismes que realitzen la fotosíntesi i absència de fenotip en els mutants deficients per la seva síntesi.

Per poder completar l'estudi de la funcionalitat de la proteïna bifuncional per complementació de mutants deficients en activitat β -ciclasa (LCYB) no es va poder utilitzar el mutant corresponent ja que aquest no estava disponible en les col·leccions de mutants. La pèrdua de derivats de β -carotè (β,β -carotens i xantòfiles) ha estat descrita com letal en *Arabidopsis* (Pogson and Rissler, 2000). La pèrdua d'activitat LCYB provoca una acumulació de carotenoides monocíclics (ϵ,ψ -carotè) degut a la especificitat de substrat que es dona en LCYB i LCYE (presenten una homologia de només el 36%) indicant la necessitat de disposar de carotens bicíclics per a la viabilitat de la planta. L'acumulació d'aquest compost confirma el comportament diferencial de les dues ciclasas apuntat en estudis previs (Cunningham *et al.*, 1996). LCYB és capaç d'introduir dos anells de tipus β en els dos extrems de manera que utilitza com a substrat tan el licopè lineal com monociclat. En canvi LCYE només es capaç d'introduir un únic anell de tipus ϵ , és a dir que el seu únic substrat és el licopè però no els anells monocíclics ja tinguin un anell ϵ o β , en el que s'ha postulat com causa d'un possible mecanisme de regulació de la producció i proporcions de β,β -carotens i ϵ,β -carotens (Cunningham *et al.*, 1996). Entre les plantes els ϵ,ϵ -carotens són extremadament inhabituals però estan descrits enzims com en el cas de l'enciam que disposen d'enzims LCYE amb la capacitat de generar el carotè bicíclic (Cunningham and Gantt, 2001). Aquest enzim mostra una elevada homologia amb la LCYE d'*Arabidopsis* (77%) y ha permès identificar residus responsables d'aquesta especificitat de substrat. El mutant H457L de l'enzim d'enciam només pot introduir un cicle mentre el mutant L448H d'*Arabidopsis* passa a poder-ne introduir dos (Cunningham and Gantt, 2001).

Aquest comportament diferencial implica una necessària regulació per poder acabar generant les proporcions de carotenoides que s'observen en cloroplasts de pràcticament totes les plantes. Considerant la limitació que suposa per a la producció de luteïna que la LCYE només accepti com a substrat el licopè i no pugui introduir un segon cicle, per assolir la elevada proporció de luteïna present en cloroplasts caldrà que les activitats de LCYE i LCYB s'equilibrin adequadament per permetre aquesta acumulació. Un excés de β -ciclasa introduiria un anell en una gran proporció de les molècules de licopè inhabilitant-ne la transformació per efecte de la ϵ -ciclasa. Reduint la funció dels β,β -carotens a fotoprotecció i els ϵ,β -carotens a recol·lecció de llum, el mecanisme de reacció i especificitat de substrat podria estar jugant un paper modulador entre un branca de la via i l'altre en funció dels requeriments de cada

moment. En condicions de llum molt intensa s'ha descrit que la quantitat de zeaxantina s'incrementa respecte altres β,β -xantòfil·les com la violaxantina per la seva major eficiència prevenint el dany foto-oxidatiu (Cunningham and Gantt, 1998). A l'hora també s'ha descrit que la luteïna adopta un paper de protecció (NPQ) durant aproximadament els primers 30 segons posteriors al increment lumínic previ a l'acumulació de zeaxantina (Pogson and Rissler, 2000) suggerint una balanç entre les dues branques de la via que es modifica en funció de les condicions.

El perfil de carotenoides de les plantes transgèniques generades sobre el fons mutant *lut2-3* en homozigosi pel transgen format per la seqüència de *LCYE* de tomàquet fusionada a *CrtY* de *Pantonea ananas* es va analitzar per HPLC. De les 18 línies independents obtingudes tres d'elles mostraven la presència del pic corresponent a luteïna, en la resta aquest pic no apareixia. Tot i que la forma reproductiva preferent d'*Arabidopsis* és la autofecundació calia comprovar que totes les plantes mantenien el fons genètic mutant ja que els estudis de caracterització previs del mutant *lut2-3* mostraven que la presència d'una única copia del gen *LCYE* funcional genera un perfil de carotenoides amb nivells de luteïna equivalents als d'una planta silvestre. La comprovació del genotip de les plantes va revelar que de les 18 línies obtingudes 15 mantenien la mutació en homozigosi mentre que les tres en que es detectaven elevats nivells de luteïna mantenien una copia funcional del gen *LCYE* endogen.

Partint de la base que la proteïna bifuncional era activa en *E.coli* i per tant que la fusió es realitzava de manera que els dos pèptids mantenien la seva activitat es va intentar optimitzar la construcció substituint la *LCYE* de tomàquet per la de la pròpia *Arabidopsis*. Les noves plantes transgèniques (16 línies independents) portades a homozigosi pel nou transgen mostraven la mateixa absència de luteïna observada en el cas anterior

Descartats els falsos positius, el funcionament de cap de les dues versions de la proteïna bifuncional no havia reeixit en plantes. L'objectiu bàsic d'aquesta prova de concepte pretenia mostrar la possibilitat d'utilitzar aquest tipus d'estratègia, ja utilitzada anteriorment en altres sistemes de plantes, en la biosíntesi de carotenoides. Els resultats a priori no donen suport a la prova però cal tenir en compte la major complexitat d'un sistema vegetal respecte a un de bacterià. Els estudis previs en *E.coli* demostren que la fusió entre les dues proteïnes està realitzada de manera correcta permetent el correcte plegament d'ambdues proteïnes perquè puguin dur a terme la seva activitat catalítica. La generació de plantes transgèniques en primer lloc està

sotmesa a un factor d'atzar en funció del punt d'inserció del transgen dintre del genoma de les plantes que poc afectar decisivament a l'expressió o no del transgen. En aquest cas es va treballar amb un nombre suficientment gran de línies independents com per esperar que alguna d'elles hagués insertat el transgen en una zona hàbil per a la seva expressió. Un segon factor és la correcta localització subcel·lular de la proteïna. Les ciclasas en *Arabidopsis* són enzims que localitzen en plastidis i són dirigides per la presència d'un pèptid de trànsit en l'extrem amino terminal. En tomàquet la localització és equivalent de manera que l'ús de la seqüència LCYE de tomàquet que ja inclou aquest pèptid havia de conduir la proteïna a aquest orgànel. Tot i que pèptids de trànsit de tomàquet o pebrot s'han utilitzat prèviament per dirigir enzims bacterians a diferents plastidis els sistemes no deixen de ser diferents de manera que es pot donar lloc a un localització alterada. No obstant les plantes que utilitzen la pròpia proteïna LCYE d'*Arabidopsis* tampoc produeixen luteïna suggerint que la localització no hauria de ser el factor que impossibilita l'activitat de la quimera. En canvi aquesta segona quimera que incorpora un gen del propi sistema, tot i que s'ha suggerit que l'ús d'enzims bifuncionals reduiria els fenòmens de silenciament (De Wilde *et al.*, 2000) , està potencialment subjecte a aquest tipus de respostes. Per evitar-ho una de les opcions que s'ha demostrat viable en proves de concepte seria la inclusió dintre del T-DNA insertat d'algun supressor de silenciament com la proteïna p19 (Xia *et al.*, 2009) o equivalents (Saxena *et al.*, 2011). Evitar el silenciament va ser a l'inici del treball el motiu bàsic pel qual es van utilitzar homòlegs de tomàquet i bacteri per construir la quimera. Aquestes plantes però no mostren recuperació de l'activitat. Cada una de les plantes transgèniques obtingudes evita un dels problemes si bé és cert que cada una d'elles està potencialment exposada a l'altre de manera que no es pot aïllar un factor responsable de la inacció de la proteïna bifuncional. Recentment un dels factors implicats en l'activitat dels enzims de la via carotenogènica en el que s'han dut a terme avenços importants és el de la localització subcel·lular de diversos d'aquests enzims. A partir d'aquestes i altres dades s'ha pogut generar un model que proposa la formació de complexos proteics per canalitzar el flux de la via cap a uns productes o uns altres (Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012). En el cas concret de les dues ciclasas, basat en models anteriors de canalització del licopè cap a β,β -carotenoides (Cunningham and Gantt, 1998; Bai *et al.*, 2009) o cap a luteïna (Kim and DellaPenna, 2006) aquest nou model situa els dos enzims en la membrana interna del cloroplast i postula l'existència de complexos proteics per la canalització de fitoè cap a β -carotè per una banda i de fitoè fins a luteïna per l'altre. Aquest nou model implicaria la integració de cada un dels enzims en una estructura superior que podria no admetre la interacció amb l'enzim bifuncional.

3. Estudi de factors limitants de la biosíntesi de carotenoides.

Les plantes són sistemes de gran complexitat que disposen d'elements de regulació que encaixen les diverses rutes metabòliques en el conjunt de l'organisme. Per utilitzar les plantes amb finalitats biotecnològiques cal tenir en compte tots els mecanismes implicats que poden actuar com a factors limitants per a la seva òptima implantació. La síntesi de carotenoides en plantes ja sigui a través de estimular la síntesi de precursors IPP i DMAPP (compartits amb d'altres isoprenoides) o la pròpia via carotenogènica està altament regulada a diversos nivells. Tant en la via del MEP com de carotenogènesis s'han identificat alguns mecanismes transcripcionals però també post-transcripcionals que permeten modular l'activitat dels enzims en funció de les demandes puntuals però el coneixement en aquest àmbit és encara limitat.

3.1 Paper de PRL1.

Per intentar aprofundir en l'estudi dels mecanismes post-transcripcionals que modulen la biosíntesi de carotenoides es va utilitzar un mutant d'*Arabidopsis* que presenta una sèrie de característiques que el converteixen en un potencial model. Aquest mutant (inicialment *rif18* i posteriorment anomenat *prl1-8* després d'identificar la identitat molecular de la mutació) acumula nivells totals de carotenoides i clorofil·les superiors als d'una planta silvestre, resisteix l'efecte de CLM (inhibidor de DXS), FSM (inhibidor de DXR), i MEV (inhibidor de HMGR) i mostra nivells tan de transcrit com de proteïna per DXS, DXR i HMGR equivalents als de una planta silvestre. El fet que sense alterar els nivells de transcrit ni proteïna es mostri resistent als corresponents inhibidors específics d'aquest enzims suggeria la desregulació en el mutant de mecanismes post-transcripcionals relacionat amb la síntesi d'isoprenoides i/o carotenoides.

La capacitat de resistència del mutant a inhibidors de la ruta del MEP junt amb el fenotip d'arrels més curtes podria indicar una alteració en els mecanismes d'absorció de nutrients a través de les arrels o l'activació d'algun mecanisme general de resistència. No obstant la falta de resistència del mutant observada a inhibidors no relacionats amb la síntesi d'isoprenoides com KAN, HYG, o CAP (figura18) suggereix que les resistències estarien específicament relacionades amb la regulació de la síntesi d'isoprenoides.

Estudis previs han demostrat que un increment de les activitats DXS (Estévez *et al.*, 2001) i DXR (Carretero-Paulet *et al.*, 2006) produeixen un augment dels nivells d'isoprenoides finals en forma tant de carotenoides com clorofil·les i són responsables de la resistència als seus inhibidors específics respectius CLM i FSM. Per tant, el mutant, amb nivells de proteïna inalterats però resistent als inhibidors, podia ser un bon candidat a desvetllar un mecanisme de regulació post-traducciona que modulés l'activitat d'algun d'aquests dos enzims de la via MEP. Però les mesures d'activitat de DXS i DXR realitzades a partir de cloroplasts aïllats de plantules del mutant i la planta silvestre no mostren diferències significatives (figura 20). Els resultats descarten l'efecte d'un mecanisme de regulació d'aquest tipus sobre DXS o DXR en *rif18*. De fet estaria en consonància amb els diversos trets fenotípics observats en el mutant que no es donen en plantes transgèniques que incrementen el flux de la via MEP en base a la sobreexpressió d'aquests mateixos enzims. La inhibició del creixement de les arrels, les fulles serrades, una floració avançada, o un retard en el creixement vinculen el mutant amb processos de desenvolupament suggerint que la mutació podria tenir una afectació més generalitzada.

Un segon mecanisme independent de transcripció gènica que pogués explicar les resistències del mutant era l'intercanvi de precursors comuns sintetitzats en el cloroplasts per la via del MEP o en el citosol per la via del MVA. Des de fa més d'una dècada es coneix l'existència de l'intercanvi de precursors comuns entre compartiments subcel·lulars en *Arabidopsis* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004; Laule *et al.*, 2003). Experiments de marcatge han demostrat que aquest intercanvi es dona de cloroplasts (via MEP) a citosol (via MVA) i viceversa en diverses plantes (Kasahara *et al.*, 2002; Hemmerlin *et al.*, 2003; Dudareva *et al.*, 2005) però la taxa d'intercanvi però no és suficient per recuperar la pèrdua de tots els isoprenoides que es produeix quan una de les vies és bloquejada ja sigui farmacològica o genèticament. S'ha observat que la taxa és pot modular com a conseqüència de diversos factors ja siguin ambientals, metabòlics o simplement suplementant els medis amb intermediaris de la via del MEP o del MVA. (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004; Kasahara *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2002; Schuhr *et al.*, 2003). La naturalesa dels compostos implicats i els mecanismes moleculars que dirigeixen aquest intercanvi es desconeixen a dia d'avui. En aquest context una alteració en els nivells d'intercanvi de precursors entre els dos compartiments podria explicar la resistència als inhibidors sempre i quan els productes implicats es trobessin per sota de les etapes biosintètiques inhibides i per tant es poguessin incorporar a la ruta assegurant així la producció dels productes finals necessaris per a la viabilitat de la planta. Els resultats dels estudis d'incorporació de

marcatge tant d'intermediaris de la via del MVA (^{13}C -MVA) en productes finals sintetitzats en els cloroplasts (figura22) com d'intermediaris de la via del MEP (^2H -DX) incorporats en isoprenoides finals citosòlics (figura25) confirmen l'existència d'intercanvi però no mostren cap alteració de la taxa en el mutant. Els experiments es van fer tant en absència com en presència dels inhibidors CLM i MEV. La inclusió dels inhibidors havia de promocionar la incorporació dels intermediaris marcats i evitar la dilució del senyal per efecte dels intermediaris sintetitzats de manera endògena. Els resultats mostren com la incorporació de ^2H -DX en isoprenoides citosòlics s'enriqueix en presència de l'inhibidor CLM ja que en inhibir l'enzim DXS s'atura la síntesi *de novo* de DX i tota la que entra a la via inclou l'àtom marcat. Curiosament en la direcció inversa aquest efecte no s'observa. La incorporació de ^{13}C -MVA en isoprenoides plastídics no s'incrementa quan es treballa en presència de MEV. Aquest comportament aparentment anòmal ja s'havia observat en estudis previs d'intercanvi amb marcatge (Hemmerlin *et al.*, 2003). No obstant, el factor clau en aquest punt es podria trobar en les condicions lumíniques de l'experiment, realitzat a dia llarg. Està descrit que la llum és un factor important i que interrelaciona les dues vies. És un regulador negatiu de l'expressió de l'enzim clau de la via del MVA, HMGR (Learned, 1996), però en canvi regula positivament la via del MEP (Cordoba *et al.*, 2009). En condicions de dia llarg per tant, la via del MEP presenta un flux metabòlic superior al de la via del MVA que podria ser el responsable de que les diferències per efecte de la MEV no siguin importants. Una segona possibilitat radica en la diferència en l'absorció i metabolització dels dos compostos marcats i les concentracions de treball de cada un d'ells. El ^{13}C -MVA es subministra a concentracions molt elevades (4,5 mM) i en una forma directament metabolitzable després de la seva absorció a través de les arrels. En canvi la ^2H -DX s'aplica en el medi de creixement a concentracions molt menors (1,25 mM) ja que concentracions superiors ha estat descrit que resulten tòxiques per la planta (Kasahara *et al.*, 2002). Per altra banda el precursor es subministra en la seva forma desfosforilada i una vegada assimilada ha de ser fosforilada en el citosol per l'acció d'una xilulosa quinasa (Hemmerlin *et al.*, 2006) abans de ser importada fins als cloroplasts. Sembla clar que la incorporació del ^{13}C -MVA resulta molt més fàcil que la de la ^2H -DX i per tant la seva disponibilitat també, el que explicaria que en inhibir DXS amb CLM realment s'estigues potenciant la incorporació de la ^2H -DX a la via MEP. Si s'observa el fenotip de les plantes crescudes en presència dels inhibidors i suplementades amb els intermediaris marcats s'observa com el ^{13}C -MVA dona lloc a una recuperació total del fenotip letal provocat per la MEV mentre que en les plantes crescudes en CLM, la presència de ^2H -DX en el medi permet el rescat de la letalitat però les plantes mostren una certa pal·lidesa que indica que la recuperació no és total.

En canvi la disponibilitat de ^{13}C -MVA seria tan gran que independentment de la inhibició o no de HMGR seria el metabolit marcat l'incorporat a la via del MVA. D'aquesta possibilitat es podria deduir que els valors d'incorporació equivalents que s'observen en isoprenoides plastídics en presència i absència de MEV suposen els nivells màxims d'incorporació que permet l'intercanvi entre vies. De fet aquest valor és molt similar en el cas de la incorporació de marcatge en esterols en presència de CLM.

L'existència d'un intercanvi d'intermediaris de les dues vies entre citosol i cloroplasts és clar a tenor dels resultats obtinguts en aquest treball i en molts d'altres (Dudareva *et al.*, 2005; Schuhr *et al.*, 2003; Németh *et al.*, 1998). No obstant, molt poc o res es coneix sobre el funcionament a nivell molecular i del control que pugui existir sobre ell. El fet que aquest intercanvi no sigui suficient per rescatar la letalitat en les plantes bloquejades en una via o l'altre, i que es doni en els dos sentits i en una proporció molt similar a l'hora podria suggerir la possibilitat de que realment no es tracti d'un procés actiu regulat a través d'un mecanisme molecular complex sinó la conseqüència del pas directe d'un o diversos metabolits des de el citosol al cloroplast i viceversa de manera que les variacions en les incorporacions serien resultat de la activació o no de cada via en funció de les condicions de cada moment. La majoria de compostos potencialment involucrats en l'intercanvi són fosforilats i per tant és molt difícil pensar que simplement difonguin a través de les membranes però existeix la possibilitat de que l'intercanvi es doni aprofitant l'existència d'algun dels transportadors presents ja descrits en la envolta plastídica (Facchinelli and Weber, 2011) .

En qualsevol cas els nivells d'incorporació mesurats en el mutant no són diferents als que presenten les plantes silvestres de manera que no pot ser l'intercanvi de precursors el responsable del comportament observat pel mutant.

El mutant *prl1-8 (rif18)* és un mutant de pèrdua de funció de PRL1, una proteïna WD altament conservada que actua com a regulador pleiotròpic de les respostes a sucres i hormones en *Arabidopsis* (Németh *et al.*, 1998). Altres al·lels mutants ja descrits (*prl1-1*, *prl1-2*, *prl1-3*) també mostren els mateixos trets fenotípics que *prl1-8* a l'hora que alteren l'expressió de diversos gens (Baruah *et al.*, 2009) tot i no alterar els nivells de DXS ni DXR. L'ampli rang d'influència fa que els efectes de la pèrdua de funció generin alteracions indirectament lligades entre elles amb influència directe o no sobre la síntesi d'isoprenoides però afectant el metabolisme de sucres i hormones.

Està descrit que la pèrdua de funció de PRL1 provoca alteracions en la resposta hormonal de les plantes (Németh *et al.*, 1998). Algunes d'elles com les citoquinines, els brasinosteroides, giberelines o l'àcid absísic són de naturalesa isoprenoide de manera que els efectes en les vies del MVA i MEP observades en el mutant podrien estar indirectament implicades explicant alguns dels trets fenotípics observats com la menor mida de les plantes, o la coloració verda més intensa. Fenotips equivalents s'han observat en mutants amb nivells o respostes alterades a giberelines o brasinosteroides. (Fujioka and Yokota, 2003; Richards *et al.*, 2001)

PRL1 interacciona amb les proteïnes AKIN10 i AKIN11, que pertanyen a la família de les quinases SnRK1, inhibint la seva activitat molt probablement promovent la seva ubiquitinització i posterior degradació en el proteosoma (Lee *et al.*, 2008). Les SnRK1 han estat descrites com integradors centrals de les senyals relacionades amb estrès, carboni, i energia en les plantes. De fet modifiquen els nivells d'expressió de gens del metabolisme dels carbohidrats i fosforilen de manera directe diversos enzims del metabolisme de les plantes. Un dels enzims que ha estat descrit com a diana directe d'aquest enzim és HMGR que en ser fosforilat s'inactiva, (Sugden *et al.*, 1999) el que explicaria la reducció en l'activitat sense modificar els nivells de transcrit d'aquest enzim en el mutant *prl1-8*. A l'hora un descens en l'activitat HMGR s'ha correlacionat en treballs anteriors amb una reducció del creixement de les arrels tal i com també s'observa en el mutant (Kobayashi *et al.*, 2007) tot i que la alteració general del metabolisme de carbohidrats probablement degut a la absència de control sobre SnRK1 per la pèrdua de funció de PRL1 també podria participar de la inhibició de la elongació de les arrels.

En aquest mateix treball (Kobayashi *et al.*, 2007) s'observa, tal com passa en *prl1-8*, que el descens en l'activitat HMGR repercuteix mínimament en l'acumulació d'isoprenoides citosòlics. Considerant que aquest és l'enzim clau de la regulació de la via del MVA la falta d'efecte sobre els productes finals només pot ser deguda a que la activitat de l'enzim en condicions normals es troba per sobre de les necessitats mínimes de síntesi o bé que el mutant tingui alterats d'alguna manera els processos de degradació d'esterols (turnover).

No resulta evident la manera com la pèrdua de funció en PRL1 incideix directament sobre la síntesi d'isoprenoides principalment pels efectes creuats observats amb diverses vies metabòliques. No obstant, i tot i que el mecanisme pel qual PRL1 controla la resposta a sucres no es coneix en profunditat, els efectes observats sobre

la via del MEP en el mutant semblarien estar directament relacionats amb la disponibilitat de sucres. El mutant *prl1-1* acumula nivells incrementats de sucres i midó en fulles que podria establir una relació directe amb els efectes observats en la via del MEP per l'al·lel *prl1-8*. Un increment en els nivells de sucres i paral·lelament en la seva catàlisi produiria un augment del piruvat i GAP disponibles. Un major nivell de substrat previsiblement produiria un increment en el flux a través de la via sense alterar els nivells de transcrit, proteïna o activitat de DXS i DXR. Per tant s'estimularia una major acumulació de productes de naturalesa isoprenoide plastídics i permetria un increment de la resistència a CLM i FSM els quals són enzim competitiu i es poden veure desplaçats per un increment dels substrats amb els que competeixen. De fet, el creixement de plantes d'*Arabidopsis* en un medi suplementat amb sacarosa resulta en un augment molt important en la resistència a aquests inhibidors de la ruta del MEP sense canvis en els nivells de DXS o DXR (Flores-Perez *et al.*, 2010).

L'efecte final sobre la síntesi d'isoprenoides de PRL1 és difícil d'aïllar en un mutant de tanta complexitat. El mutant possiblement no està intervenint en un procés post-transcripcional estrictament parlant sobre la via del MEP però si demostra com PRL1 actua integrant i coordinant el metabolisme del isoprenoides amb les altres rutes metabòliques que s'hi relacionen, com el metabolisme del sucre (aportant els substrats de la via MEP i MVA), les hormones (derivades d'esquelets isoprenoides) i la resposta a estrès que aquestes activen.

3.2 Enzims de la via MEP

3.2.1 En plantes

L'estudi de la regulació de la via del MEP en plantes i per tant de la producció d'IPP i DMAPP per a la síntesi d'isoprenoides plastídics (entre ells els carotenoides) en l'organisme model *Arabidopsis thaliana* ha permès proposar a tres dels enzims com a directament implicats en el control del flux de la via, DXS (Estévez *et al.*, 2001), DXR (Carretero-Paulet *et al.*, 2006) i HDR (Botella-Pavía *et al.*, 2004). A aquesta conclusió s'hi ha arribat a partir d'estudis de sobreexpressió dels gens en plantes transgèniques. En aquest tipus d'estudis s'ha observat com en els tres casos un increment en els nivells de transcrit de l'enzim correlacionava positivament amb un increment d'isoprenoides plastídics finals. Estudis similars realitzats en altres organismes reforcen aquesta idea, com en el cas de tomàquets transgènics sobreexpressors de l'enzim bacterià DXS (Enfissi *et al.*, 2005), o plantes de menta sobreexpressores de DXR (Mahmoud and Croteau, 2001) en les que es produeix un augment de la producció de carotenoides i monoterpens respectivament. Poc o gens es coneix respecte la contribució de la resta d'enzims de la via (MCT, CMK, MDS i HDS) en el control del flux.

En aquest context es va plantejar l'estudi del paper de l'enzim HDS en base a diverses observacions que el postulaven com un possible candidat. Un anàlisi comparatiu de seqüència entre les proteïnes HDS de plantes i bacteris havia posat de manifest l'existència d'una regió addicional en l'extrem amino terminal en la seqüència d'*Arabidopsis thaliana* (independent del pèptid de trànsit a cloroplast) que no existia en *E.coli* la qual s'havia proposat com una possible regió de regulació diferencial (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2003; Querol *et al.*, 2002).

L'estudi de l'efecte de la sobreexpressió de HDS sota el control d'un promotor constitutiu fort es va realitzar sobre plantes transgèniques amb fons silvestre així com també sobre plantes amb fons *clb4-3* (Gil *et al.*, 2005). El mutant *clb4-3* produeix una proteïna HDS funcional però amb pèrdua parcial de funció resultat d'una mutació puntual (G696D) que es reflexa en uns nivells disminuïts de carotenoides (~20%). Les transgèniques sobreexpressores de HDS en fons silvestres tot i presentar nivells de transcrit i proteïna superiors als de les plantes control no mostren un increment significatiu en l'acumulació de productes finals com carotenoides i clorofil·les (Flores-

Perez *et al.*, 2008a). Les plantes transgèniques sobreexpressores en el fons mutant també presenten nivells més elevats de transcrit i proteïna. Aquest increment es reflexa en una recuperació dels nivells d'isoprenoides finals fins als observats en plantes silvestres però no hi ha una major acumulació (Flores-Perez *et al.*, 2008a). Aquest comportament demostra que la expressió i activitat de la proteïna transgènica funcionen correctament ja que és capaç de complementar la deficiència derivada de la pèrdua parcial de funció del gen endogen. No obstant i junt amb els resultats obtinguts per les transgèniques amb fons silvestre en que cap dels dos sistemes incrementa l'acumulació de productes finals indiquen que el pas catalitzat per l'enzim HDS no està limitat per l'activitat de l'enzim sinó per la disponibilitat de substrat i per tant en condicions normals de creixement no suposa un punt de control directe sobre el flux de la via. No s'ha d'oblidar però que HDS és una reductasa del tipus [4Fe-4S] (Seemann *et al.*, 2005) que necessita de la forma reduïda del cluster per dur a terme la seva activitat catalítica. Assajos *in vitro* han demostrat que el sistema flavodoxina/flavodoxina reductasa pot dur a terme aquesta reducció tot i que no es coneix amb certesa la manera com *in vivo* té lloc la reacció. Si que s'ha demostrat que en absència d'agents reductors els electrons de la fotosíntesi poden aportar els electrons necessaris per reduir el cluster a través de la ferredoxina (Seemann *et al.*, 2006). Aquest requisit pot fer que la sobreexpressió de HDS no provoqui un increment en productes finals per la falta de disponibilitat dels cofactors encarregats de reduir el cluster de l'enzim, emascarant el possible efecte de l'activació de l'enzim. Tot i que és una possibilitat plausible existeixen altres evidències que indicarien que la reducció del cluster no actua com a factor limitant. La sobreexpressió de HDR (l'últim enzim de la via) que també és una reductasa del tipus [4Fe-4S], i per tant en principi amb els mateixos requisits i limitacions, en *Arabidopsis thaliana* genera un increment significatiu en isoprenoides finals derivats de la ruta del MEP (Botella-Pavía *et al.*, 2004). No obstant el fet que no es conegui amb detall el funcionament d'aquests dos sistemes no permet descartar la possibilitat de que existeixi algun element diferencial no descrit fins el moment que expliqui aquest diferent comportament.

El fet que els resultats obtinguts suggereixin que el coeficient de control de HDS en la via MEP sigui massa baix com per incrementar-ne el flux en incrementar la seva expressió no significa que aquest enzim no estigui sotmès a regulació depenent de diferents estímuls. En *Arabidopsis* s'ha descrit que la acumulació del substrat de HDS, MecPP (figura2) està associada a la resistència contra determinats patògens (Gil *et al.*, 2005) i a la senyalització retrògrada des del plastidi per regular l'expressió de gens de resposta a estrès nuclears (Xiao *et al.*, 2012) suggerint una possible regulació negativa

de l'activitat HDS per incrementar els nivells del compost en resposta al patogen. Tot i que de forma general en la via MEP la regulació transcripcional juga un paper principal també s'han descrit mecanismes de regulació proteolítica a altres nivells per HDS (Sauret-Güeto *et al.*, 2006a; Oudin *et al.*, 2007; Flores-Perez *et al.*, 2008b) en un control que en part es depenent de la fotosíntesis (Seemann *et al.*, 2006).

En conjunt els resultats indiquen que en condicions de creixement normal hi ha uns nivells mantinguts d'activitat HDS en la planta que no semblen alterar-se com a resposta a un increment en la demanda d'IPP i DMAPP. No obstant, la identificació molt recentment del substrat de la reacció, el MEcPP, com senyal retrògrad del cloroplast per a l'expressió de gens plastídics en resposta a estrès ha postulat la via del MEP com un sensor a estrès amb capacitat de coordinar l'expressió dels gens de resposta a aquest estrès (Xiao *et al.*, 2012) i per tant obre la porta a algun tipus de regulació de HDS en resposta a aquest tipus d'estímuls. Aquest estudi demostra un increment de la quantitat de MEcPP en resposta a condicions d'elevada dosis de llum tot i que no aclareix el mecanisme de regulació pel qual el compost s'acumula. Una possibilitat és un increment generalitzat de la via com a conseqüència de l'augment de compostos com el piruvat o el GAP derivats d'una taxa fotosintètica més elevada que incrementi el flux de la via de manera que la capacitat catalítica de HDS no pugui transformar el MEcPP i aquest s'acumuli. Una segona possibilitat és un efecte directe de la llum sobre l'expressió de gens com DXS que incrementi el flux amb idèntiques conseqüències. O una darrera possibilitat és que les condicions d'estrès repercuteixin directament sobre la activitat HDS disminuint la seva expressió o la seva activitat per promoure l'acumulació de l'intermediari senyal.

En qualsevol cas l'existència del domini addicional identificat en la seqüència de la HDS d'*Arabidopsis* no sembla que estigui relacionat almenys de manera directa amb una regulació diferencial respecte les HDS bacterianes. De fet en els darrers anys s'ha identificat l'existència d'aquest mateix domini addicional en altres organismes com el paràsit de la malària, algues, molses i en diversos patògens intracel·lulars com *Babesia bovis*, *Theileria parva*, *Chlamidia trachomatis*, i *Leptospira interrogans* (Okada and Hase, 2005) definint dos tipus de IspG (HDS): Les formades per dos dominis (AB), i les formades per tres dominis (AA*B). Un treball molt recent ha aportat llum a la incògnita d'aquest domini addicional (A*) en base a la comparació de les proteïnes IspG de dos dominis (AB) d'*Aquifex aeolicus* (Lee *et al.*, 2010) i *Thermus thermophilus* (Rekittke *et al.*, 2011) amb la de tres dominis (AA*B) d'*Arabidopsis thaliana*. En el primer cas s'ha establert que la forma activa de l'enzim en solució es correspon amb

un homodímer en el que el domini A d'una subunitat interacciona amb el domini B de l'altre mentre que en el segon la forma activa és monomèrica. Tot i que no es disposa de la estructura de HDS d'*Arabidopsis* prediccions estructurals realitzades per computació han permès suggerir que la manera com els dominis A interaccionen en els dímers seria molt similar al tipus d'interaccions predites entre els dominis A i A* del monòmer el que indicaria un rol de tipus estructural pel domini addicional que mimetitzaria l'estructura del dímer permetent la correcta disposició dels dominis A i B de manera que el monòmer resulti actiu (Liu *et al.*, 2012). Considerant la elevada susceptibilitat descrita per aquesta proteïna envers l'oxigen (Rivasseau *et al.*, 2009) i els diferents organismes en els que s'ha identificat aquest tipus de HDS, els quals estan sotmesos a stress oxidatiu, es podria postular la fixació d'aquest domini addicional com una estratègia per obtenir un enzim amb una major protecció envers espècies químiques com els ROS.

3.2.2 En bacteris

E.coli utilitza la via del MEP per a la producció d'IPP i DMAPP a partir dels quals sintetitzar isoprenoides essencials entre els que destaquen les quinones i els hopanoids (associats a la modulació de les membranes), o bactoprenol (necessari per a la síntesi del peptidoglicà present en la paret cel·lular). Però per satisfer aquesta demanda no requereix de grans quantitats d'aquest precursor universal. Estudis de microarray mostren uns nivells d'expressió generalitzadament baixos dels enzims de la via MEP en condicions normals de creixement (Yuan *et al.*, 2006). No obstant la producció limitada d'IPP i DMAPP fa que els precursors actuïn com a factor limitant quan es volen afrontar estratègies biotecnològiques de producció de isoprenoides, incloent carotenoides.

L'IPP i DMAPP en *E.coli* es sintetitzen a través de la via del MEP. En el moment d'iniciar-se aquest treball diversos estudis havien posat de manifest el paper limitant de l'aport de precursors per a una síntesi massiva de compostos finals, i en varis casos específicament orientats a la producció de carotenoides, en diversos organismes no carotenogènics, predominantment *E.coli* (Harker and Bramley, 1999; Matthews and Wurtzel, 2000). Aquests estudis estaven centrats en DXS, que catalitza el primer pas de la via del MEP i ha estat postulat com l'enzim clau en el control del flux. Molt poc o pràcticament res es coneixia del paper que podien jugar la resta d'enzims de la via en aquest control.

En aquest marc es va plantejar l'estudi del paper en la regulació de la via MEP de cada un dels set enzims que la formen en el sistema no carotenogènic *E.coli*. Per fer-ho es va utilitzar cèl·lules de *E.coli* transformades amb un vector que expressa els gens necessaris (Cunningham *et al.*, 1993) per a la síntesi de licopè a partir de l'IPP i DMAPP endògens (figura 10). Cada un dels gens de la via MEP es va clonar en un vector d'expressió i després de comprovar la funcionalitat de les proteïnes recombinants corresponents es va transformar cada una de les construccions les cèl·lules de *E.coli* carotenogèniques per avaluar l'efecte de la sobreexpressió sobre els nivells de licopè finals acumulats. Els valors obtinguts per cada un dels enzims es van comparar amb els obtinguts per la mateixa soca transformada amb el vector buit.

Els experiments es van dur a terme treballant amb dos nivells d'expressió dels enzims de la via MEP, un nivell mínim incubant en absència d'agent inductor de l'expressió (IPTG) i un presumptament d'elevat incubant els medis en presència de concentracions elevades d'aquest agent. Es va observar com els millors resultats s'obtenien sense IPTG (figura 8). En aquestes condicions de baixa sobreexpressió l'enzim DXS produïa un gran increment en els nivells de licopè mentre que la sobreexpressió dels gens DXR i HDR també tenia un efecte significatiu però clarament inferior sobre la producció del pigment. La sobreexpressió de la resta d'enzims no tenia cap efecte sobre la taxa d'acumulació del producte final. Aquests resultats confirmarien que DXS seria el principal enzim regulador de la via del MEP en el control de l'aport de precursors per a la síntesi d'isoprenoides, tal y com ja s'havia proposat en anteriors treballs. (Harker and Bramley, 1999). El control però, seria compartit amb els enzims DXR i HDR els quals exercirien un paper menor complementari mentre que la resta dels enzims de la via, MCT, CMK, MDS, i HDS, no hi influirien decisivament tot i que un estudi orientat a la millora de la producció de carotenoides en *E.coli* substituint els promotors endògens per un promotor fort (T5) suggeria que els enzims MCT i MDS podrien tenir un paper rellevant (Yuan *et al.*, 2006). No obstant els resultats obtinguts no són comparables ja que els corresponents gens codificants però aquests enzims (*ispD* i *ispF*), a diferència de la resta dels enzims de la via del MEP que estan dispersats al llarg del genoma, es troben molt propers formant un operó (Rohdich *et al.*, 1999). La substitució del promotor endogen per un de fort fa que es produeixi un increment dels nivells d'expressió dels dos gens en paral·lel que acaba repercutint en una millora en els nivells de β -carotè. Aquest estudi suggereix que la acció dels dos enzims podria ser coordinada i que això seria una forma més de regulació de la via mentre els nostres resultats permeten avaluar el paper de cada un dels enzims

individualment i que no són capaços d'alterar el flux de la via. Ambdós resultats aporten dades d'interès de cara a la aplicació biotecnològica de la alteració de la via MEP per millorar l'aport de precursors amb la finalitat d'establir processos de síntesi de carotenoides en hostes no carotenogènics ja que defineixen els punts que de manera individual tenen una repercussió més important en la producció final.

En els casos dels enzims amb incidència sobre els nivells de productes finals (DXS, DXR i HDR), l'estudi suggereix una correlació negativa entre els nivells de sobreexpressió i la producció de licopè, acompanyada d'un descens en la taxa de creixement cel·lular. Comportaments equivalents han estat descrits de la mateixa manera en altres estudis (Yoon *et al.*, 2006). Diversos factors combinats poden ser els responsables d'aquest efecte. Un dels que probablement juguen un paper més important és l'increment en el consum de piruvat i GAP intracel·lular que es redirigeix cap a la síntesi d'IPP i DMAPP. El GAP i el piruvat, els dos substrats de partida de la via del MEP, són dos metabolits del metabolisme central i per tant estan implicats en altres processos metabòlics de la cèl·lula. Un descens brusc d'aquestes molècules com a resultat de la sobreexpressió de DXS pot tenir un efecte de desequilibri de tot el metabolisme cel·lular dificultant el creixement de l'organisme tal i com ja havia estat apuntat anteriorment (Kim and Keasling, 2001). Un segon factor que pot tenir un incidència limitada és el consum energètic associat a la sobreexpressió proteica. S'ha demostrat que l'ús de plasmidis de baixa copia poden donar resultats igual o millors en tècniques d'enginyeria metabòlica que plasmidis d'alta copia. Aquesta manera de controlar la sobreexpressió dels gens suggereix que un excés d'enzim no millora la síntesi per insuficiència dels substrats però en canvi suposa una inversió de recursos energètics per a la seva síntesi que no es poden dirigir cap a la síntesi del producte final. La incidència d'aquest factor podria ser avaluada sobreexpressant un enzim no implicat en la síntesi de licopè i seguint l'acumulació del producte i el creixement cel·lular. Un tercer factor que podria entrar en joc, i que en alguns treballs ha estat identificat (Ajikumar *et al.*, 2010), és el de l'acumulació d'intermediaris amb caràcter tòxic. De fet en el cas concret de la via del MEP s'ha proposat l'IPP com a agent amb efectes nocius sobre el creixement (Martin *et al.*, 2003; Sivy *et al.*, 2011). L'existència d'aquest factor en el nostre cas implicaria que els enzims introduïts en l'hoste necessaris per a la síntesi del licopè a partir de l'IPP no són capaços de canalitzar l'IPP produït i per tant que estan actuant com a etapa limitant. Una manera de comprovar l'efecte d'aquesta toxicitat és l'anàlisi de soques que sobreexpressin una segona via sintètica junt amb la de síntesi de licopè que utilitzi IPP i DMAPP per disminuir-ne la seva potencial acumulació. Aquesta acumulació també es pot intentar

estimar de manera més directe utilitzant mètodes analítics recents basats en espectrometria de masses que permeten quantificar l'acumulació dels metabolits de la via del MEP (Baidoo *et al.*, 2012). Un darrer factor és la toxicitat associada a l'acumulació del producte final. El licopè és un compost molt hidrofòbic de manera que s'acumula preferentment en la membrana cel·lular ja que *E.coli* no és un organisme carotenogènic i per tant no disposa de contenidors per acumular de manera controlada aquest tipus de compostos. Una acumulació molt gran de licopè pot afectar la integritat de la membrana desestructurant-la i afectant la funcionalitat de les proteïnes que s'hi integren i/o la seva funció com a barrera selectiva. (Sikkema *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 2007). La limitada capacitat de retenir licopè dels hostes no carotenogènics pot ser una de les grans dificultats a superar a mesura que les estratègies biotecnològiques generin quantitats substancials de carotenoides en aquests sistemes. La solució més evident seria la incorporació d'un sistema de transport que excreti els carotenoides a l'exterior cel·lular on puguin ser separats del cultiu en bioreactor amb una fase orgànica que els extregui. Lamentablement no es coneix cap transportador específic de carotenoides i molt probablement no existeixi com a tal sinó que el moviment d'aquests compostos tan hidrofòbics es produiria units a proteïnes. En l'actualitat una de les aproximacions per evitar el problema de la toxicitat associada a la acumulació de productes orgànics hidrofòbics és la aplicació de la estratègia de la recuperació de producte *in situ* (Fujiwara *et al.*, 2008) que consisteix en la inclusió d'una fase orgànica per treballar en cultius de dues fases en la que part del producte final és recuperat directament de la biomassa mentre es produeix. Aquesta metodologia s'ha provat pel cas del licopè amb resultats prometedors quan s'elimina la membrana externa del microorganisme per potenciar la interacció de la fase orgànica (decà en aquest cas) amb el producte a extreure (Yoon *et al.*, 2008).

La contribució de cada un dels factors exposats, en el creixement i acumulació de licopè és difícil d'establir però si que demostra l'existència de molts factors que cal considerar a l'hora d'aplicar la biotecnologia a la síntesi de carotenoides. La creixent experiència adquirida en tots els treballs realitzats en aquest sentit en els darrers anys ha destacat un factor per sobre de tots i és el subtil equilibri metabòlic que cal mantenir en l'hoste per obtenir els millors rendiments. Aquest equilibri no és obvi, i la introducció de noves modificacions respecte un model optimitzat obliga a reorganitzar el sistema ja que les variables han demostrat no ser additives (Ajikumar *et al.*, 2010).

3.2.3 Correlació del model planta-bacteri.

El conjunt de resultats obtinguts en l'estudi de la influència de cada un dels enzims sobre el flux de la via MEP en *E.coli*, junt amb l'estudi del paper de HDS en *Arabidopsis* combinat amb les dades bibliogràfiques estableix un paral·lelisme entre els dos organismes. Estudis previs ja havien proposat a DXS com a element clau de la regulació en bacteris, i els resultats obtinguts en aquest treball reforcen aquesta idea i afegeixen a DXR i HDR com a nous elements de control del flux de la via del MEP. La resta d'enzims no juguen un paper clau en la regulació. Per la seva banda en *Arabidopsis* la influència sobre l'acumulació de productes finals com a resultat de sobreexpressió de DXS (Estévez *et al.*, 2001), DXR (Carretero-Paulet *et al.*, 2006) i HDR (Botella-Pavía *et al.*, 2004) ja havia estat demostrada amb anterioritat. A aquests estudis s'hi afegeix el realitzat per l'enzim HDS que sembla no tenir influència directa sobre el flux de la via (Flores-Perez *et al.*, 2008a). No hi ha dades disponibles per *Arabidopsis* de l'efecte que podria tenir la sobreexpressió de MCT, CMK o MDS sobre l'acumulació de productes finals derivats de la via del MEP.

Aquestes similituds fan que la reconversió de *E.coli* en un sistema carotenogènic no només tinguin aplicacions de tipus biotecnològic sinó que es converteixi en un bon model per a estudis preliminars del control de la síntesis de precursors metabòlics (via del MEP) en plantes. Tot i que existeix una evident connexió entre la via en un sistema i l'altre en base a un model evolutiu també és clar que existeixen diferències clares entre els dos organismes com a conseqüència de la major complexitat de les plantes i els camins propis adoptats a partir del moment que els camins evolutius es separen. Un exemple són les variacions en l'acumulació de productes finals que s'obtenen en sobreexpressar els enzims clau en un i altre sistema que posen de manifest la possible existència de mecanismes reguladors diferencials. En *E.coli* s'han aconseguit millores molt importants en la producció de carotenoides mitjançant la sobreexpressió de DXS mentre que en *Arabidopsis* les millores observades no van més enllà del 20-30% en el millor dels casos. Aquesta no és la única diferència, doncs, mentre en planta s'observa una correlació positiva entre els nivells d'expressió del transgen i l'acumulació de productes finals en bacteris aquesta correlació es produeix a la inversa. No obstant aquesta diferència pot ser deguda a un efecte diferent de la sobreexpressió sobre el metabolisme de l'organisme. En plantes s'han descrit diversos mecanismes de regulació post-transcripcional que podrien ser els responsables de limitar l'efecte de la sobreexpressió minimitzant la incidència sobre el metabolisme central resultat d'un consum anormal de metabolits com piruvat i GAP.

4. La plasticitat i la biodiversitat com a font de noves eines biotecnològiques.

L'estudi del paper dels diversos enzims en el control de la via del MEP ha fet palès el paper predominant de DXS i DXR en diversos sistemes bacterians com vegetals (Estévez *et al.*, 2001; Carretero-Paulet *et al.*, 2006; Mahmoud and Croteau, 2001; Chaded *et al.*, 2000; Lois *et al.*, 2000; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006). Aquests enzims formen part de l'engranatge metabòlic global i per tant la seva evolució queda emmarcada dintre del context d'un equilibri entre les diverses vies que cal interrelacionar i per tan regular de manera coordinada. Per tant la seva activitat i regulació s'ha modelat en funció d'aquests requeriments per optimitzar-ne la integració en el context biològic però no per donar el màxim rendiment en valors absoluts. Sota aquesta premissa es va plantejar l'objectiu d'explorar les possibilitats que es deriven de la biodiversitat i plasticitat biològica que es dona especialment en procariotes per identificar activitats alternatives als enzims clau de la via del MEP. Un nou enzim capaç de sintetitzar el mateix metabolit podria donar rendiments catalítics millorats a l'hora que tant en hostes d'origen procariota com altres organismes podria actuar al marge dels mecanismes de regulació endògens que controlen l'enzim canònic.

De fet no cal anar molt lluny per trobar un exemple de les possibilitats que es deriven de la plasticitat gènica. La gran diversitat de carotenoides i enzims biosintètics que existeixen en la natura són un bon exemple de la capacitat dels processos evolutius de descobrir i optimitzar rutes metabòliques. La ruta de biosíntesi de carotenoides ha estat definida com una ruta evolucionable (Umeno *et al.*, 2005) entenent aquest concepte com una via capaç de produir nous metabolits en resposta a canvis genètics mínims. Els nous metabolits es produeixen ja sigui reclutant nous enzims o per alteració funcional dels ja existents. La gran capacitat adaptativa i de diversificació de la carotenogènesis radica en que diversos dels seus enzims són el que es coneix com localment específics (Britton, 1998) és a dir que reconeixen un motiu estructural comú a diversos substrats. Així la natura ha generat una varietat de gens biosintètics per mutació, recombinació i selecció natural. Aquesta circumstància es dona especialment en el cas de les ciclasses que comparteixen totes elles mecanismes pràcticament equivalents que difereixen únicament en el reordenament final de manera que petites variacions poden donar lloc a aquests metabolits nous. S'han caracteritzat diversos enzims que catalitzen la formació de diferents productes cíclics (Cunningham and Gantt, 2001; Arrach *et al.*, 2001; Krubasik and Sandmann, 2000a, b) tots ells amb un únic tipus d'anell però recentment s'han identificat també enzims capaços d'introduir tipus d'anells diferents (Stickforth *et al.*, 2003). Segurament el cas que millor il·lustra

aquesta plasticitat és el de la LCYE que només pot introduir un únic anell sobre una molècula lineal. En enciam però s'ha identificat un enzim que és capaç d'introduir-ne dos i la determinació del nombre de cicles es veu alterat modificant un únic aminoàcid (Cunningham and Gantt, 2001).

Però la plasticitat gènica i metabòlica va molt més enllà en el cas de la síntesi d'isoprenoides i més concretament de la síntesi dels precursors universals IPP i DMAPP. Estudis molt recents no han fet més que emfatitzar aquest punt que engloba diversos àmbits: **I)** L'existència de dues vies independents no relacionades per sintetitzar els mateixos metabolits finals, i la seva distribució (Boucher and Doolittle, 2000; Kuzuyama and Seto, 2003; Begley *et al.*, 2004). **II)** La identificació de l'existència de vies a l'hora independents a les descrites com les canòniques per produir alguns dels precursors. És el cas de la via alternativa del MVA identificada en arqueas (Lombard and Moreira, 2011) o la via alternativa de síntesi de precursors de la via MEP postulada pel cas de la cianobacteria *Synechocystis* en condicions de creixement autotròfiques (Ershov *et al.*, 2002; Poliquin *et al.*, 2004). **III)** El descobriment de la implicació d'enzim de la via MEP en la catàlisi de reaccions independents de la biosíntesi d'isoprenoides. Com la molt recentment descrita existència d'un enzim amb similitud a ispD/MCT que actua com a glicosiltransferasa en humans (Roscioli *et al.*, 2012; Willer *et al.*, 2012) o la identificació de la capacitat de ispH/HDR de *E.coli* de catalitzar la addició de molècules d'aigua a grups acetilè quan es troba en la seva forma oxidada (Span *et al.*, 2012). **IV)** La implicació de metabolits de la via MEP en altres processos que allunyen la idea mantinguda fins fa poc temps de la via del MEP com una ruta biosintètica lineal i aïllada. Com serien la DXP que és utilitzada com a metabolit en la síntesi de la vitamina B1 (Begley *et al.*, 1999) o la síntesi de vitamina B6 per la via dependent de DXP que es dona en *E.coli* i alguns membres de la subdivisió de les γ -proteobacteries (Mukherjee *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 1996). Com seria també el MEcPP identificat durant aquest 2012 com a molècula implicada en la senyal retrògrada del cloroplast cap al nucli per activar determinats gens de resposta a estrès (Xiao *et al.*, 2012). O Com també seria el cas del HMBPP que és capaç d'estimular la resposta immunològica en humans (Hintz *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2007), així com també ha estat descrit que en plantes pot ser glicosilat i acumular-se en determinades condicions d'estrès (Ward *et al.*, 2011). **V)** L'existència de diferents enzims capaços de catalitzar la mateixa reacció. Dues classes d'enzims HMGR han estat descrits en base a alineaments de seqüència i estudis filogenètics (Bochar *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2012), i s'han identificat dos tipus d'enzims IDI sense homologia de seqüència i mecanismes de reacció diferents (Kaneda *et al.*, 2001; Unno *et al.*, 2009).

Alguns dels resultats derivats d'aquest treball no fan més que emfatitzar i aportar noves evidències d'aquesta capacitat adaptativa i plàstica que existeix en la via de síntesi d'isoprenoides en bacteris i plantes. Tots els mecanismes de plasticitat coneguts fins ara i els nous identificats en aquest treball en forma d'activitats alternatives es representen en la figura 60.

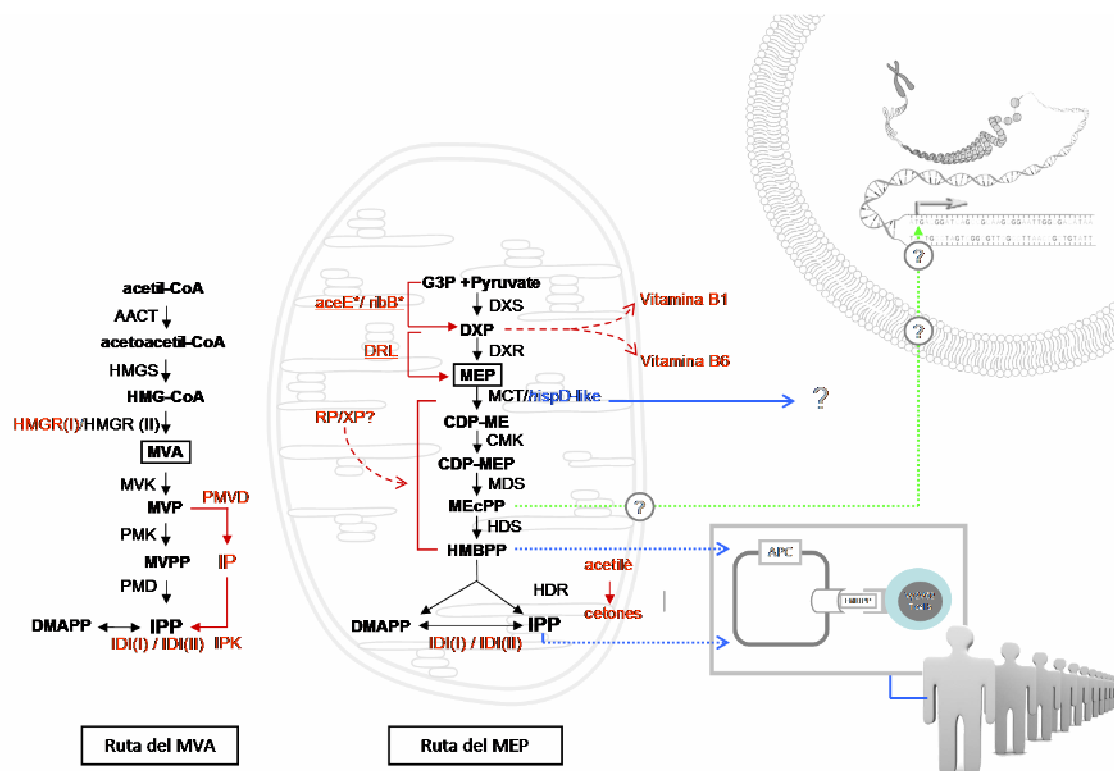


Figura 60. Vies per a la biosíntesi dels precursors d'isoprenoides. En negre es defineixen les vies del MVA i del MEP canòniques segons descrites en la figura 2. En vermell les activitats alternatives identificades en bacteris (subratllades les aportacions realitzades per aquest treball). En verd els mecanismes identificats en plantes. En blau les activitats i processos identificats en humans. Les línies contínues defineixen un únic pas catalític. Les línies discontinues defineixen diversos passos catalítics consecutius. Les línies puntejades defineixen moviment. Els interrogants defineixen processos per als quals es desconeix el funcionament a nivell molecular. Els asteriscs indiquen les proteïnes que en la forma mutada poden catalitzar la producció de DXP. APC: cèl·lula presentadora d'antigen. PMVD: fosfomevalonat descarboxilasa, IP: isopentenil fosfat, IPK: isopentenil quinasa. Atenuades les estructures corresponents al cloroplast i el nucli. En el recuadre, la representació de la presentació de HMBPP com a antígen estimador del sistema immune humà.

Per identificar noves activitats alternatives per DXS i DXR es va dur a terme una estratègia de tipus genètic aprofitant la disponibilitat de les soques de *E.coli* deficientes en els gens *dxs* i *dxr* respectivament (Taula 4). Aquestes soques incorporen a l'hora un operó sintètic que els permet sintetitzar IPP i DMAPP (necessari per la seva supervivència) a partir de MVA suplementat en el medi de creixement (figura 4).

4.1 Activitats alternatives a DXS.

Treballs anteriors en el grup realitzats amb la finalitat d'establir la taxa de mutació espontània que generava cèl·lules capaces de superar la deficiència en cada un dels set enzims de la via MEP (que resulta letal en tots els casos) van revelar la possibilitat de reversió del fenotip letal en els casos de la deficiència de DXS (Sauret-Güeto, 2005) i DXR (Uros, 2009). La reversió no es va detectar per la resta dels enzims de la via (Sauret-Güeto *et al.*, 2006b). Aquests resultats no haurien de resultar sorprenents si tenim en compte que els dos primers enzims de la via utilitzen substrats (piruvat i GAP en el cas de DXS, i DXP en el cas de DXR) que, especialment en el cas de DXS, són relativament comuns i que intervenen també en altres rutes metabòliques. Per tant hi ha un grup d'enzims amb centres catalítics capaços d'incorporar aquests molècules de manera que les modificacions necessàries que aquest centre pot requerir per dur a terme una transformació alternativa a partir d'un mateix substrat seran relativament poques. En canvi els restants 5 enzims de la via del MEP utilitzen substrats que es formen exclusivament en aquesta via de manera que els seus centres actius són molt més especialitzats i la alteració d'altres centres actius no relacionats per facultar-los a catalitzar una reacció d'aquest tipus serà molt més complexa. Un exemple molt clar és el de les transcetolases, enzims de la ruta de les pentoses fosfat dependents de TPP (com DXS) que catalitzen la formació de ribosa 5-fosfat i xilulosa 5-fosfat a partir de sedoheptulosa 7-fosfat i GAP o la formació de eritrosa 4-fosfat i xilulosa 5-fosfat a partir de fructosa 6-fosfat i GAP. S'ha descrit que aquests enzims mostren una baixa especificitat de substrat (Nilsson *et al.*, 1997; Schneider and Lindqvist, 1998) i que la seva sobreexpressió és capaç de revertir el fenotip letal d'absència de DXS (Sauret-Güeto, 2005) en el que s'interpreta com una activitat secundària poc eficient en utilitzar piruvat com a substrat alternatiu per generar DXP. En aquest cas no és necessària una mutació per adquirir la capacitat catalítica però il·lustra molt bé la flexibilitat catalítica que es dona en un ampli ventall d'enzims.

Els estudis realitzats tan per mutació espontània com induïda a través d'un agent mutagènic químic van identificar fins a 26 soques capaces de superar la pèrdua de DXS (Perez-Gil *et al.*, 2012). De tots ells 22 presentaven mutacions en el gen *aceE*. Fins a quatre diferents es van arribar a identificar: E636Q, E636G, L633R, i Q408R (Perez-Gil *et al.*, 2012). Per a la resta de soques no es va poder identificar el gen responsable de la reversió (Sauret-Güeto, 2005).

4.1.1 Les quatre mutacions en la subunitat E1 de la piruvat deshidrogenasa permeten superar la pèrdua de DXS.

El gen *aceE* codifica per la subunitat E1 del complex de la piruvat deshidrogenasa (PDH) que catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat per formar acetil-CoA. El complex està format per diverses components de tres tipus de subunitats diferents: E1 (piruvat deshidrogenasa), E2 (dihidrolipoil transacetilasa) i E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) en una estquiometria de 24:24:12. La subunitat E1 concretament catalitza la descarboxilació del piruvat i transfereix el fragment de 2 carbonis amb un grup ceto cap al grup prostètic tipus lipoamida de la subunitat E2 en una reacció depenent de TPP, en la que la forma dimèrica de l'enzim és la activa ja que el centre catalític es forma en la interfície de les dues subunitats (Arjunan *et al.*, 2002).

El cas de la E1-PDH és similar a l'apuntat en el cas anterior per les transcetolasas ja que exerceix la seva activitat catalítica utilitzant piruvat com a substrat. De fet abans de la identificació de l'enzim DXS la formació de DXP havia estat proposada com una activitat secundària de la E1-PDH (Sprenger *et al.*, 1997; Yokota and Sasajima, 1986). No obstant a diferència de les transcetolasas que no requereixen de mutacions per suplir la deficiència de DXS, en el cas de la E1-PDH la forma silvestre sobreexpressada en un fons mutant no és capaç de recuperar la viabilitat cel·lular de la soca EcAB4-2 mentre que si ho fan les quatre formes mutades (Perez-Gil *et al.*, 2012).

Els resultats negatius en assajos de complementació de soques mutants deficients en DXR (Perez-Gil *et al.*, 2012) posen de manifest que la forma mutada no està sintetitzant cap metabolit que s'incorpori a la ruta per sota de DXR i per tant que el tipus de reacció ha d'estar estretament relacionada amb la catalitzada per DXS, encara més considerant que tots dos enzims utilitzen piruvat com a substrat comú.

4.1.1.1 El mutant E636Q permet la síntesi de DXP *in vivo*.

Les evidències genètiques aportades indicaven que les proteïnes E1-PDH mutants havien de sintetitzar DXP tal com fa DXS o alternativament algun altre metabolit que pogués ser posteriorment transformat per DXR en el segon pas de la via. Experiments *in vivo* treballant amb soques deficients tant en DXS (per complementar la falta d'aquesta activitat) com en DXR (per evitar la transformació del metabolit generat i

millorar així la seva posterior identificació) transformades amb les proteïnes E1-PDH silvestre i E636Q van permetre identificar la acumulació de DXP a l'interior cel·lular (figura 30). Per tant la proteïna mutant és capaç de sintetitzar DXP o alternativament algun metabolit que posteriorment pugui donar lloc a DXP a l'interior cel·lular, com seria el cas de la DX que podria ser transformada a DXP per l'enzim D-xilulosa quinasa (Wungsintawee *et al.*, 2001) en *E.coli*. Aquest darrer cas seria una opció probable considerant que resultats preliminars amb l'enzim purificat han mostrat la capacitat de sintetitzar *in vitro* DX a partir de piruvat i D-gliceraldehid. El fet però que la proteïna silvestre no sigui capaç de rescatar el mutant deficient en DXS indicaria que la eficiència amb la que ho fa no és suficient com per generar quantitats suficients de DX (que després es transformin en DXP) per abastir les necessitats de síntesi d'isoprenoides de l'organisme. Tot i que ha estat reportat que la demanda de IPP i DMAPP per a la síntesi d'isoprenoides es baixa (Yuan *et al.*, 2006) i que el tant per cent d'activitat DXS estimada *in vitro* per E1-PDH es situa al voltant del 1%, (resultats no publicats) les condicions en les que la reacció ha de tenir lloc i les concentracions disponibles de substrats no són comparables de manera que molt probablement aquesta activitat DXS secundària de la forma silvestre de la E1-PDH no sigui suficient per restablir la via del MEP en els mutants sense DXS.

Per tant sembla que les proves indicarien que de manera directe o indirecte la forma E636Q de la proteïna E1-PDH adquiriria la capacitat de catalitzar de manera més eficient la síntesi de DX/DXP *in vivo*. Tot i que la estructura del complex E1 de la piruvat deshidrogenasa ha estat resolta i estudiada (Arjunan *et al.*, 2002; Nemeria *et al.*, 2002), no resulta trivial establir com aquest canvi puntual dirigiria aquesta nova activitat. Aquest estudi situa l'aminoàcid E636 en la protuberància del centre actiu però no identificava cap funció relacionada amb ell. Cal tenir en compte que el nou mecanisme teòricament hauria de variar ostensiblement. El putatiu grup hidroxietil que es formaria no seria transferit al grup prostètic lipoamida de la subunitat E2 sinó directament sobre el GAP i concretament sobre el carboni del grup aldehid. Per tant la ubicació dels aminoàcids que facilitin aquesta reacció no hauria de ser estrictament equivalent.

Un estudi posterior del residu E636 ha aportat nova informació valuosa sobre la implicació d'aquest aminoàcid en el centre actiu en establir un pont d'hidrogen amb la tirosina177 (associada a l'estabilització dels estats de transició de la reacció) de l'altre subunitat del dímer (Nemeria *et al.*, 2005). Per tant E636 contribuiria a l'estabilització de l'intermediari enamina com a part d'una extensa xarxa de ponts d'hidrogen teixit

amb diverses molècules d'aigua. (Nemeria *et al.*, 2005). La enamina es forma per l'addició del grup hidroxietil sobre l'anell de tiazol del cofactor TPP però aquesta forma està en equilibri amb la de C2 α -carboanió que afavoreix la formació d'enllaços C-C. La mutació en el residu E636 podria disminuir la estabilització de la enamina i per tant afavorir la reacció secundària.

Més important encara és el treball realitzat amb els mutants E636A i E636Q (el mateix identificat en aquest treball) que suggereix un paper protector d'aquest residu per evitar reaccions de condensació secundàries (típiques de carbol·ligases) en el centre actiu (Nemeria *et al.*, 2005). En la literatura ja havia estat descrita la formació d'acetoina (C4) com a producte majoritari de la descarboxolació no oxidativa del piruvat per acció del complex PDH en absència del CoA i el NAD⁺ o per acció de E1-PDH en absència del subcomplex E2-E3 (Khailova *et al.*, 1983). No obstant els mutants E636A i E636Q produeixen acetolactat (C5) a partir d'una segona molècula de piruvat emulant les reaccions típiques d'acetohidroxiacid sintases (AHAS II) depents de TPP les quals catalitzen la formació d'enllaços C-C-. En la forma silvestre de la E1-PDH el residu E636 actua evitant la entrada d'una segona molècula de piruvat que promogui la formació del acetolactat molt probablement a través d'una interacció repulsiva de la seva càrrega. La substitució de E636 per residus sense càrrega com és el cas de E636A i E636Q facilita la formació de l'acetolactat donant suport a aquesta possibilitat. Aquests estudis posen de manifest que la subunitat E1-PDH en la seva forma activa de dímer pot catalitzar la formació d'enllaços C-C a partir de la descarboxilació no oxidativa del piruvat i que el residu E636 està directament implicat en l'especificitat dels substrats que el centre actiu admet. Aquesta hipòtesis seria vàlida també per el mutant E636G ja que el canvi de glutàmic per glicina també suposa la pèrdua de la càrrega del residu.

El mecanisme detallat pel qual la proteïna mutant E1-PDH (E636Q) formaria DX o DXP és difícil d'establir clarament però les evidències descrites demostren que l'enzim és capaç de formar enllaços C-C i que pot admetre substrats de característiques similars a les de GA o GAP. Compostos C3 com el piruvat poden ser transformats i aldehids com l'acetaldehid (per formar acetoina) també ho són. A l'hora el centre actiu admet la formació de compostos C5 (acetolactat) com serien la DX o DXP. La demostració de que les reaccions tipus carbol·ligasa es donen en absència del subcomplex E2-E3 porten a pensar que la possible reacció de formació de DX/DXP també seria intrínseca a la subunitat E1. La circumstància de que en proves preliminars *in vitro* amb la proteïna mutant recombinant purificada no s'hagi pogut

detectar la formació de DX/DXP a partir de piruvat i GA/GAP (resultats no publicats) no dona suport a aquesta possibilitat tot i que els resultats *in vivo* sí que ho suggereixin. Resulta difícil establir si aquesta incoherència entre els dos resultats és deguda a les condicions de reacció que es donen en l'entorn biològic o a la necessitat de les subunitats E2 i/o E3 del complex PDHc per completar la reacció. Tot i que no és pot demostrar de manera inequívoca, les diverses evidències acumulades semblen indicar que E1-PDH (E636Q) és capaç de sintetitzar DX o DXP en base a l'activitat carbol·ligasa.

4.1.2 Mutacions en la 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfat sintasa també permeten superar la pèrdua de DXS.

La resta de mutants identificats capaços de rescatar la deficiència de DXS no presentaven mutacions en el gen *aceE*. De tots ells es van seleccionar els que mostraven una taxa de creixement més propera a la de la soca silvestre (figura 32) i es va intentar la identificació del gen responsable. La generació d'una genoteca del genoma complet de la soca aïllada i rastreig dels clons en una soca deficient en activitat DXS va permetre identificar el gen *ribB* que codifica per l'enzim DHBPS amb la mutació G108S. L'estudi d'aquest gen en les altres soques mutants va permetre, posteriorment, identificar una segona mutació: D113G (figura 34).

L'enzim DHBPS catalitza la conversió de D-ribulosa 5-fosfat en formiat i 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfat (figura 35) en una sèrie de reaccions que inclou una deshidratació, una reorganització intramolecular i una rehidratació (Volk and Bacher, 1991). En base a la gran similitud estructural entre la ribulosa 5-fosfat i la desoxixilulosa 5-fosfat junt amb l'analogia del mecanisme de la reacció de reordenament molecular que s'estableix amb el descrit per DXR (Takahashi *et al.*, 1998) resulta molt temptador especular amb la possibilitat de que la mutació habiliti la transformació directe de DXP a MEP o viceversa. Aquesta possibilitat tot i que també explicaria el rescat del mutant deficient en DXS no està suportada pels resultats de complementació obtinguts al laboratori (Perez-Gil *et al.*, 2012) ja que la proteïna no és capaç de revertir el fenotip letal de deficiència de DXR de la soca EcAB4-10.

4.1.2.1 El mutant DHBPS (G108S) promou l'acumulació de DXP in vivo.

Amb el mateix disseny experimental utilitzat anteriorment es va poder observar la acumulació de DXP en una soca doble mutant DXS i DXR transformada amb una construcció que expressava la proteïna mutant DHBPS (G108S) (figura 36). Tot i que la estructura de substrat i productes de reacció de DHBPS guarden una certa similitud amb els de la reacció de DXS en aquest cas resulta menys evident la modificació del mecanisme que podria tenir lloc. Més encara si tenim en compte que resultats *in vitro* preliminars utilitzant la proteïna mutant G108S purificada no semblen mostrar capacitat de formació de DXP utilitzant ribulosa o xilulosa com a substrats (resultats no publicats). Una possibilitat és el funcionament en el sentit invers per generar una molècula de C5 enlloc de consumir-la. *A priori* les estructures de la ribulosa 5-fosfat i la DXP són properes de manera que el centre actiu de l'enzim seria previsible que fos capaç d'acomodar-la un cop sintetitzada. Una segona possibilitat és que utilitzi algun altre tipus de sucre de 5 carbonis disponible en el medi intracel·lular i el transformi en DX o DXP. Una possible manera d'apropar-se a la resposta seria amb l'inhibidor ceto-clomazona (inhibidor específic de DXS). Si aquest inhibidor fos capaç d'inhibir el creixement d'una soca deficient en DXS però transformada amb un vector sobreexpressor de la forma mutant de DHBPS, molt probablement ens trobaríem més propers del primer cas que no pas del segon.

L'estructura d'aquesta proteïna que forma part de la ruta biosintètica de riboflavina ha estat resolta i el paper de diversos aminoàcids importants identificat (Liao *et al.*, 2001). Cap d'ells coincideix amb la glicina 108 però la substitució per una serina significa una funcionalització d'aquesta posició obrint la porta a un mecanisme totalment independent del que té lloc en la forma silvestre per trencar la ribulosa. Aquesta glicina no obstant, està molt conservada en base a l'alineament de seqüència de 19 espècies representatives el que indica la seva importància en l'estructura. L'anàlisi de l'estructura revela un paper de tipus estructural per aquesta com també per 4 glicines més localitzades totes elles en la regió de la interfície del dímer funcional. Totes elles són importants per mantenir els angles de torsió necessaris per la correcta conformació de la proteïna. En base a aquest rol assignat a la G108 la seva substitució podria suposar una alteració de l'estructura que sense canviar els aminoàcids implicats en la acció catalítica modifiqués la orientació de tots ells promovent reaccions noves.

La complexitat del mecanisme proposat per aquest enzim (Volk and Bacher, 1991) i la limitada informació de la que es disposa fa difícil establir hipòtesis ben fonamentades

dels efectes de la mutació. Les proves obtingudes suggereixen que la reversió de la deficiència de DXS seria a través de la síntesi de DX o DXP però altres possibilitats no es poden descartar. Tot i això resulta interessant el fet que per a la seva correcta activitat l'enzim requereix de dos ions metàl·lics que coordinen amb els oxígens dels grups ceto i hidroxil de la molècula de ribulosa. Les molècules de piruvat i GA/GAP tenen una estructura molt similar de manera que cada una d'elles podria coordinar-se amb un dels ions i quedar molt properes. El com a partir d'aquí es podria generar un enllaç C-C entre les dues molècules resulta difícil d'imaginar considerant que cap de les reaccions que realitza la DHBPS implica descarboxilació ni formació d'enllaços carboni.

4.2 Activitats alternatives a DXR.

Com a part dels treballs anteriors en el grup citats, també es van identificar mutacions espontànies en *E.coli* capaces de revertir el fenotip letal d'absència de DXR (Sauret-Güeto, 2005). Les soques mutants aïllades requerien de temps d'incubació llargs per observar-ne el seu creixement el que suggeria que la activitat de la potencial activitat alternativa a DXR tenia una activitat molt reduïda. Per aquest motiu es va iniciar una estratègia totalment diferent utilitzant les mateixes eines per identificar enzims nous amb capacitat de mimetitzar la conversió de DXP a MEP o simplement de produir-lo a partir de qualsevol altre metabolit.

4.2.1 DRL, la identificació d'una nova família de proteïnes que catalitza la mateixa reacció que DXR

L'anàlisi dels genomes seqüenciats disponibles en les bases de dades va permetre observar com en un grup d'organismes apareixien homòlegs per tots els enzims de la via MEP excepte per DXR. Tenint en compte que la majoria d'ells no presentaven gens homòlegs de la via del MVA per a la síntesi d'IPP i el caràcter essencial dels isoprenoides, havia d'existir alguna proteïna capaç de completar la via MEP o alternativament habilitar una ramificació o una via alternativa per a la síntesi d'IPP. Utilitzant el patògen *Brucella abortus* com a representant d'aquest grup d'organismes es va identificar el gen responsable de recuperar el fenotip letal d'absència de DXR). La proteïna (DRL), de funció desconeguda, estava anotada com una oxidoreductasa putativa en base a la identificació d'un domini d'unió de NADPH.

La proteïna DRL no presenta cap homologia a nivell de seqüència amb DXR més enllà de la assignable al domini d'unió de NADPH però la seva incapacitat de rescatar les soques deficientes en DXS (EcAB4-2) i en MCT (EcAB4-7) suggerien que la reacció que catalitza està íntimament relacionada amb la catalitzada per DXR respecte la formació de MEP o un metabolit similar transformable per MCT (figura 38). L'estudi *in vitro* de la reacció va demostrar que la proteïna DRL catalitza exactament la mateixa reacció bioquímica que DXR de transformació de DXP en MEP de forma NADPH dependent (figura 39). Per tant la proteïna DRL de *Brucella abortus* és el representant d'una nova família de proteïnes que catalitzen el segon pas de la via del MEP com a alternativa a DXR. De fet l'existència d'enzims alternatius per catalitzar el mateix pas biosintètic no és la primera vegada que es descriu en el camp dels isoprenoides. En bacteris s'han identificat dos tipus d'enzims IDI per a la interconversió dels precursors IPP i DMAPP que no estan relacionats entre ells a nivell de seqüència ni estructura però que duen a terme la mateixa transformació (Kaneda *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 1999; Steinbacher *et al.*, 2003a).

La recerca dels homòlegs de DRL mostra un segon punt de coincidència amb el cas de IDI. Apareixen organismes que només tenen DRL, altres que només tenen DXR i altres que tenen les dues. De manera similar entre els bacteris que utilitzen la via del MEP estudis de filogènia han mostrat que alguns utilitzen IDI de tipus I, altres de tipus II i alguns altres disposen dels dos (Laupitz *et al.*, 2004). L'anàlisi filogenètic dels homòlegs de DRL mostra una distribució molt discontinua en la que espècies relacionades utilitzen el mateix enzim mentre que bacteris no relacionats disposen del mateix. La opció més probable per explicar-la seria en base a fenòmens de transferència lateral gènica (LGT) repetits diverses vegades durant la evolució bacteriana. El fet que l'arbre filogenètic basat en els homòlegs de DRL (figura 45) mostri evidents discrepàncies amb la filogènia dels organismes que hi apareixen sembla reforçar aquesta possibilitat com a responsable de la irregular distribució de l'enzim. Fenòmens posteriors de duplicació gènica i/o de pèrdua en llinatges específics haurien acabat de generar algunes singularitats com el fet que alguns bacteris tinguin 2 o fins i tot 3 homòlegs de DRL o el cas singular de *Listeria monocytogenes*, que disposa de la via del MVA, la via del MEP completa i DRL. Fenòmens de LGT entre eucariotes, bacteris i arqueas també han estat proposats per explicar la distribució irregular dels gens de la via del MVA i del MEP observada en els organismes vius (Boucher and Doolittle, 2000; Lange *et al.*, 2000).

L'anàlisi filogenètic també desvetlla una segona classificació molt interessant quan es compara amb la distribució dels enzims de la via del MEP. Els organismes anomenats de classe A disposen de tots els enzims de la via MEP excepte DXR. Els de classe B disposen de tots els enzims de la via sense excepció (per tant coexisteixen DRL i DXR). I finalment els de classe C no disposen de cap dels enzims de la via MEP. Aquesta circumstància indueix a plantejar diverses possibilitats en termes evolutius. Una d'elles és la preexistència de DXR com a enzim utilitzat per la via MEP i posterior funcionalització de DRL. L'existència d'organismes amb DRL sense cap dels enzims de la via MEP (classe C) suggereix que DRL tenia o pot tenir una activitat catalítica no relacionada amb la síntesi d'isoprenoides però que per acumulació de mutacions podria haver adquirit aquesta nova activitat. En organismes sense la resta d'enzims de la via MEP aquesta activitat productora de MEP no suposaria cap avantatge i no es fixaria en el genoma (mantenint la seva activitat original o perdent el gen). Però en casos en els que existís la via MEP o aquesta estigués incompleta per absència de DXR la nova activitat de DRL sí que suposaria un avantatge pel fet de completar la via (classe A) o pel fet de tenir dos enzims (classe B) que podrien donar millor resposta a demandes puntuals de determinats metabolits en condicions ambientals concretes. En aquest cas la pressió de selecció positiva tendiria a fixar aquest nou gen. El fet que el gen DXR sigui majoritari junt amb el fet que la caracterització realitzada per l'enzim DRL de *Brucella* mostri una capacitat cinètica (valors de V_{max} i K_{cat}) d'aquest enzim inferior semblaria reforçar aquesta hipòtesi. De fet, en analitzar la capacitat de complementació de les DRL de diversos organismes repartits per l'arbre filogenètic es va observar que no totes eren funcionals però en canvi totes les que sí ho eren formaven part d'un mateix clade filogenètic definint per tant el que anomenen DRL autèntiques. Totes les DRL d'organismes de classe A tenen l'enzim DRL dintre del clade i totes elles rescaten la soca mutant deficient en DXR. Per contra en els organismes de classe B, que tenen tan DXR com DRL (figura 45), aquesta última només reverteix el fenotip letal de la soca EcAB4-10 en el casos en que es troba dintre del clade però en cap dels casos analitzats ho fa quan es troba fora. En organismes sense via MEP però amb DRL cap d'elles està inclosa en el clade i de les assajades en proves de complementació cap era capaç de revertir la letalitat del fenotip de deficiència de DXR. Aquest comportament donaria suport a la hipòtesis evolutiva formulada ja que les DRL que no s'integren en la via MEP no tenen activitat DXR però es mantenen en els genomes suggerint que duen a terme altres funcions mentre que quan tots els enzims de la via del MEP es troben en el genoma automàticament les DRL mostren activitat DXR. Entremig estan els organismes de classe B en els que els dos enzims coexisteixen que podrien incloure enzims que tenien DRL però han

incorporat DXR a posteriori com enzims que tenien DXR però per LGT han incorporat DRL. Entre aquest últim grup s'ha observat que coexisteixen organismes en els que la DRL no és funcional (fora del clade) i per tant la DXR si ha de ser-ho per permetre la viabilitat cel·lular, organismes en els que DRL si es funcional (dintre del clade) però DXR no ho és (com *Roseobacter litoralis*, figura 47), i organismes en els que els dos enzims són funcionals (com en el cas de *Listeria monocitogenes* o *Bacillus halodurans*, figura 47). Els resultats poden suggerir un comportament com l'hipotetitzat tot i que aquestes mateixes dades de manera menys consistent també podrien explicar altres models com el de la preexistència de DRL com a executor de l'activitat DRL i posterior substitució progressiva per un nou enzim més eficient com DXR que faria que amb el temps DRL acumulés mutacions i finalment fos eliminat. Resulta però difícil d'explicar en aquest cas l'existència d'organismes amb DRL que no tenen cap de la resta dels enzims de la via MEP si no existia una funció inicial que en justifiqui la seva presència en el genoma. Discernir entre aquestes o altres possibilitats resulta complex doncs el patró de distribució de DRL i DXR són bastant irregulars de manera que no resulta trivial establir quina de les dues havia aparegut en primer lloc o quin camí de substitució o coexistència han pogut seguir. No obstant, hi ha un factor important en termes evolutius. Només existeixen homòlegs de DRL entre els bacteris però no es troben en altres organismes com les plantes. Si acceptem com a vàlida la teoria endosimbiont que proposa la formació dels cloroplasts a partir de l'establiment d'una relació de coexistència d'una cèl·lula procariota a l'interior d'una eucariota superior, la absència d'homòlegs de DRL en plantes podria actuar com a rellotge evolutiu. D'aquesta manera resultaria més plausible que si en les plantes només trobem homòlegs per DXR en la via del MEP localitzada en el cloroplast fos DXR l'enzim ancestral i DRL l'incorporat posteriorment en determinats llinatges de bacteris que després per LGT el podrien disseminar entre diversos grups. Si DRL fos l'enzim ancestral que actualment es trobés en un procés de substitució per DXR resultat de la seva major eficiència enzimàtica esperaríem trobar homòlegs de DRL entre les plantes.

4.3 Aplicació de les noves activitats alternatives en estratègies biotecnològiques.

Els primers assajos realitzats per avaluar la potencial aplicació de les diverses activitats identificades com a alternatives a DXS i DXR es van dur a terme en el sistema model carotenogènic basat en *E.coli* (figura pendent de fer XXX). Cèl·lules d'aquest organisme que incorporaven el vector pLyc (o pACCRT-EIB. Taula 7) es van transformar amb vectors que expressaven els gens que codifiquen per a cada una de les diverses proteïnes, amb activitat alternativa, identificades. Per fer una primera estimació del potencial d'aquestes noves activitats es va mesurar l'acumulació de pigments (en aquest cas licopè) que produïen en les diverses soques. Els valors es van comparar amb els obtinguts per les soques transformades amb el vector buit i les soques transformades amb la activitat canònica equivalent (DXS o DXR en cada cas) per estimar la repercussió que tenien en la producció de productes finals i la possible millora que podien representar.

La co-transformació de la soca DH5α amb el vector pLYC (**Taula 7**) i amb les construccions que codifiquen les formes silvestres i mutades (amb activitat alternativa a DXS) de les proteïnes E1-PDH i DHBPS va posar de manifest diverses tendències. Com era d'esperar les dues proteïnes silvestres no produeixen cap increment respecte la soca transformada amb el vector buit. En canvi les formes mutades d'aquestes proteïnes de *E.coli* mostren un comportament dispar. La soca transformada amb la construcció que codifica per E1-PDH [E636Q] no produeix cap tipus d'increment en la producció de licopè respecte els obtinguts ja sigui per la proteïna silvestre o amb el vector buit. Per contra la soca que contenia la construcció que produïa DHBPS [G108S] sí que mostra un increment significatiu de pràcticament un 40% en la síntesi de licopè respecte la proteïna silvestre i el vector buit (figura 58). No obstant, aquests valors continuen quedant per sota dels increments que genera la sobreexpressió de la pròpia proteïna DXS de *E.coli* que sota aquest fons genètic es capaç de duplicar els nivells de licopè (figura 58). No s'ha d'oblidar però, a l'hora de valorar els resultats obtinguts, que aquests no poden comparar-se de manera estricta ja que les proteïnes mutants estaven clonades en vectors de clonatge tipus pCRII mentre DXS es trobava en un vector d'expressió (pTAC). Tenint en compte que no es disposa de mesures quantitatives de la síntesi de proteïna en cada cas, aquesta deferència podria ser significativa. Sobretot en el cas de E1-PDH. Aquesta proteïna amb les diverses mutacions identificades és, de molt, la que de manera més freqüent (un 70% de les

mutacions totals identificades) és reclutada per pal·liar la pèrdua de DXS el que suggereix que requereix de modificacions més lleus de la seva estructura o el seu centre actiu per adquirir aquesta capacitat. Per tant seria d'esperar un rendiment igual o superior a l'observat per la DHBPS [G108S] sobretot considerant que està descrita, tal i com s'ha apuntat en apartats anteriors, que aquesta proteïna posseeix una activitat secundària intrínseca de carbolligasa. No es pot descartar però que modificacions més dràstiques i per tant menys freqüents puguin donar lloc a una proteïna més eficient.

Per la seva banda la transformació amb la construcció que codifica per DRL de la soca EcAB4 de *E.coli* habilitada per a la síntesi de licopè no produeix un increment en l'acumulació comparat amb els nivells obtinguts quan es sobreexpressa DXR. De fet, els nivells mesurats es troben per sota, i no suposen un increment significatiu respecte els de la soca control transformada amb el vector de sobreexpressió buit. És clar que els resultats no poden ser estrictament comparables perquè no es pot establir els nivells de proteïna DXR i DRL que es produeixen en un i altre sistema principalment en absència de l'agent inductor d'expressió (IPTG). No obstant, proves prèvies de sobreexpressió de les construccions utilitzades havien demostrat (tinció de Comassie de gel de poliàcrilamida) que en presència d'IPTG en els dos casos les construccions rendien quantitats molt elevades de proteïna probablement molt per sobre de la necessària per observar algun efecte en la producció de licopè.

En els experiments de sobreexpressió, però, s'intueix un comportament diferent de la sobreexpressió de DXR i DRL. Mentre en DXR una gran sobreexpressió genera un descens en la producció de licopè en el cas de DRL sembla observar-se una tendència a incrementar-los (figura 59). Aquest comportament diferencial podria ser degut a les diferències a la menor eficiència catalítica determinada per DRL que presenta una afinitat (K_m) pel substrat (DXP) molt similar però una valors de V_{max} i K_{cat} clarament inferiors als de DXR. Per tant quantitats petites d'enzim DXR aportarien l'activitat necessària per dur a terme l'increment de licopè. En canvi l'activitat associada a nivells equivalents d'enzim DRL seria menor i per tant es compensaria amb l'increment de la quantitat de proteïna. En tot cas el comportament observat sembla indicar que el marge de regulació associat a un increment d'activitat DXR ja sigui per l'acció del propi enzim DXR o per DRL pot ser significatiu però limitat, indicant que la disponibilitat de substrat queda altament limitada pel pas previ catalitzat per DXS.

A priori, i en funció dels resultats inicials obtinguts, aquestes tres noves proteïnes amb activitats alternatives a enzims de la via del MEP (E1-PDH [E636Q], DHBPS [G108S] i DRL) no tindrien aplicació immediata en estratègies de tipus biotecnològic en sistemes bacterians. No obstant, atresoren un potencial molt interessant per la seva aplicació en altres sistemes com el vegetal. Els sistemes vegetals, com en alguns apartats d'aquest mateix treball a quedat palès, utilitzen sistemes de regulació altament complexos en la regulació de la síntesi d'isoprenoides incloent-ne a nivell post-transcripcional. En aquest entorn, tant DRL, que no presenta homòlegs en plantes, com E1-PDH i DHBPS podrien millorar la síntesi d'isoprenoides i concretament de carotenoides (si es dirigeix la proteïna cap al cloroplast afegint-los un pèptid de trànsit) en actuar de manera desvinculada dels mecanismes de regulació endògena.

Les proteïnes alternatives han estat identificades per dues vies metodològicament similars però conceptualment molt diferents que cal considerar a l'hora de valorar les seves possibilitats com a futures eines biotecnològiques. Les proteïnes mutants són el resultat d'una resposta immediata com a solució a un repte de supervivència pels microorganismes. Es podria considerar una solució d'emergència. El cas de DRL és diferent ja que la absència d'activitat DXR permanent implicaria que la seva substituta ja podria haver patit diverses adaptacions naturals durant la evolució per millorar-ne el seu rendiment. Es podria considerar una solució permanent. És per aquest motiu que no pot resultar estrany que les proteïnes alternatives a DXS mostrin una capacitat inferior a la canònica. Menys evident és el cas de DRL, però hi ha diverses possibilitats que podrien explicar el seu menor rendiment. Per una banda cal tenir en compte que en la naturalesa els processos no es dirigeixen cap a una eficiència màxima en valors absoluts sinó a un rendiment òptim dintre del seu context biològic. Per tant és perfectament possible que simplement DXR i DRL hagin seguit camins evolutius diferents que les hagin conduït a arribar a condicions diferents per cada una però òptimes o suficients en les seves circumstàncies específiques. Una segona possibilitat és que per algun motiu encara desconegut DRL fos reclutada posteriorment (potser en aquell determinat moment oferia millors prestacions que van fer que s'imposes a DXR) i amb el temps DXR desaparegués del genoma de *B.abortus* de manera que el temps d'exposició a fenòmens aleatoris de millora seria més curt.

El fenomen de reclutar enzims per dur a terme una nova funció no és estrany en la naturalesa però posteriorment la seva funcionalitat es va adaptant al llarg del temps. La funcionalització es pot assolir amb canvis a nivell genètic relativament petits en el cas d'enzims amb activitats pròximes però la seva adaptació a la nova funció requereix

de l'acció de fenòmens de mutagènesi i recombinació que es donen naturalment (Umeno *et al.*, 2005) i que perfilen la integració del nou enzim en la totalitat del metabolisme. Aquest no és el cas de les proteïnes E1-PDH (E636Q) i DHBPS (G108S) i probablement tampoc de DRL.

Per a la seva aplicació biotecnològica ja sigui en sistemes bacterians o vegetals, aquests enzims podrien considerar-se un material de partida a partir del qual iniciar processos d'evolució enzimàtica dirigida (Farinas *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2001). Aquesta metodologia consisteix en evolucionar les proteïnes de forma artificial en el laboratori generant una llibreria de variants (mutants) per tècniques de PCR amb propensió a l'error (*error-prone PCR*) (Cadwell and Joyce, 1994; Lin-Goerke *et al.*, 1997) o DNA barallat (*DNA shuffling*) (Stemmer, 1994a, b). La iteració sobre noves variants millorades permet optimitzar les característiques de l'enzim i portar-les al límit. La evolució en laboratori permet induir un procés sense restriccions biològiques imposades per la necessitat de complir una funció particular ni integrar-se en un context metabòlic tal com sí ha passat pels enzims DXS i DXR en les plantes. Òbviament aquest mateix procés es podria aplicar a les pròpies DXS i DXR però les activitats alternatives tenen l'avantatge potencial addicional d'escapar als mecanismes reguladors endògens de bacteris però sobretot de plantes. Els enzims identificats amb activitat alternativa no serien per tant una eina de present immediat en biotecnologia però sí un punt de partida molt prometedori per explorar noves estratègies que permetin millorar la producció d'isoprenoides i/o carotenoides en plantes o bacteris.

5. Noves dianes per antibiòtics.

En els darrers anys s'ha detectat un alarmant increment de la resistència dels organismes patògens enfront dels antibiòtics més comuns. L'ús indiscriminat a gran escala d'antibiòtics d'ampli espectre en medicina i en la indústria en són els principals motius. Aquesta situació demanda un pas endavant en la innovació en molècules totalment noves i l'acció sobre noves dianes no relacionades amb els mecanismes més habituals atacats fins ara (Norrby *et al.*, 2005). Una de les dianes més prometedores actualment és la via del MEP de síntesi d'isoprenoides que es troba present en la majoria de bacteris i alguns protozous (entre ells els responsables de la malària) però és absent en humans. Des de el moment en que aquesta via resulta essencial pels microorganismes, els 7 enzims que catalitzen les reaccions que dirigeixen la formació d'IPP i DMAPP a partir de piruvat i GAP es converteixen en potencials dianes pel desenvolupament d'antibiòtics. Inhibidors de la ruta del MEP podrien donar lloc al desenvolupament d'una nova generació d'antibiòtics amb efectes secundaris mínims.

5.1 Llums i ombres de la plasticitat gènica i la biodiversitat.

La plasticitat i la biodiversitat són dos poderosos processos de la naturalesa que permeten la adaptació dels organismes, i especialment els microorganismes, a les condicions canviants de l'entorn a mitjà i llarg termini. Aquests processos produeixen una diversitat a nivell d'enzims i metabolits que, com en aquest treball, poden ser font de noves eines d'aplicació en estratègies biotecnològiques. Però per altra banda tant la plasticitat gènica com la biodiversitat poden tenir conseqüències indesitjables en altres aplicacions com l'ús d'antibiòtics en la lluita contra microorganismes patògens.

El cas de DXS i DXR n'és un bon exemple. La recerca d'activitats alternatives als dos primers enzims de la via del MEP ha permès identificar dos enzims que en mutar adquireixen activitat DXS com a exemple de la plasticitat i un enzim natural amb activitat DXR com a exemple de biodiversitat amb un gran potencial per la seva aplicació futura en biotecnologia.

A l'hora aquest mateix estudi demostra dos factors a tenir en compte a l'hora d'afrontar la recerca i disseny de nous antibiòtics ja que poden ser causa de resistència.: **1.-** L'existència d'un enzim (DRL) no relacionat que du a terme la mateixa transformació

bioquímica que DXR. La resistència pot ser per efecte directe perquè l'inhibidor tingui efecte sobre DXR però no sobre DRL, o pot ser indirecte com ha quedat palès en els assajos *in vivo* pel cas de *Brucella abortus* que demostren que com ja s'havia descrit anteriorment pel cas de *Mycobacterium tuberculosis* (Brown and Parish, 2008) la resistència és deguda a la absència d'un transportador de l'inhibidor a l'interior cel·lular.

2.- La capacitat dels microorganismes de sortejar la inhibició genètica (i per tant previsiblement també la farmacològica) de DXS reclutant enzims que adquireixen aquesta capacitat catalítica perduda. Per tant aquests resultats indiquen que sobretot DXS, però en certa mesura també DXR, no seria el millor candidat com a diana pel desenvolupament d'antibiòtics des de el moment en que aparentment es podrien desenvolupar resistències amb facilitat. Per tant caldria centrar-se en la resta dels enzims de la via pels que no s'han identificat mutacions espontànies que reverteixin el fenotip letal (Sauret-Güeto *et al.*, 2006b).

El descobriment de la FSM com a inhibidor de l'enzim DXR i els prometedors resultats obtinguts en els assajos clínics contra la malària (Lell *et al.*, 2003) ha fet que la majoria d'esforços s'enfoquessin durant molt de temps en aquest enzim. En els darrers anys diverses iniciatives han començat a explorar la inhibició dels altres enzims de la via: MCT (Gao *et al.*, 2012; Witschel *et al.*, 2011), CMK (Gimenez-Oya *et al.*, 2011; Crane *et al.*, 2008), MDS (Geist *et al.*, 2010), HDS (Wang *et al.*, 2010a), HDR (Wang *et al.*, 2010b). En la majoria dels casos, però, aquests estudis es troben en fases molt inicials.

5.2 DHBPS(G108S) una potencial eina per a l'estudi de la síntesi de riboflavina, una altra diana per a nous antibiòtics.

La biosíntesi de riboflavina consta de 7 passos enzimàtics que produeixen aquesta vitamina (B₂) a partir de dues molècules de ribulosa 5-fosfat i una de GTP (Bacher *et al.*, 2001). Els cofactors enzimàtics derivats de la riboflavina són essencials per la vida i considerant que la seva síntesi es dona en plantes i microorganismes però és absent en animals converteix els seus enzims en potencials dianes per a nous antibiòtics (Long *et al.*, 2010). La majoria d'estudis relacionats amb la inhibició d'aquesta via estan centrats en els dos enzims clau de la biosíntesi, luzamina sintasa (LS) i riboflavina sintasa (RS) amb resultats prometedors *in vitro* però encara decebedors *in vivo* a càrrec del grup de compostos denominats antimetabolits (Mack and Grill, 2006). No hi ha estudis per a la resta d'enzims de la via, inclòs DHBPS.

El mecanisme de reacció d'aquest enzim presenta una elevada complexitat amb passos com enolitació, cetonització, deshidratació, reordenació i eliminació del formiat (Richter *et al.*, 1999) que dificulten el disseny d'inhibidors específics però que a l'hora obren les portes a múltiples possibilitats.

La identificació de la capacitat de l'enzim mutant DHBPS(G108S) de promoure la formació de DXP en soques de *E.coli* deficients en DXS introdueix un nou element a considerar. La modificació d'un únic aminoàcid podria estar conferint activitat DXS a l'enzim el que suggeriria una ordenació del centre actiu com a mínim similar al descrit per DXS. Hi ha reportat com a mínim un inhibidor de l'activitat DXS amb efecte sobre l'enzim *in vitro* i capacitat d'inhibir el creixement d' *Haemophilus influenzae* (Matsue *et al.*, 2010). La inhibició de la proteïna mutant DHBPS(G108S) amb aquest inhibidor, la cetoclomazona, podria aportar informació del centre actiu i la primera evidència d'un lligand capaç d'aturar el mecanisme de reacció. No obstant les primeres evidències cinètiques obtingudes per l'enzim DXS suggeririen que l'inhibidor s'uniria a una regió que no es correspon amb la d'unió del piruvat ni la del GAP (Matsue *et al.*, 2010), dificultant aquesta possibilitat.

5.3 DRL i el disseny d'antibiòtics específics de la síntesi d'isoprenoides

Els antibiòtics d'ampli espectre resulten de gran utilitat en la lluita contra els agents patògens ja que poden actuar sobre un gran nombre de microorganismes diferents que comparteixen un mateix mecanisme molecular. Lamentablement l'abús i mal ús dels antibiòtics en medicina, indústria i veterinària ha fet que aquesta virtut de determinats compostos es giri en la seva contra perquè molts patògens poden generar-ne resistència obligant a buscar noves molècules. A l'hora de buscar nous antibiòtics la recerca es centra en processos que es donen en els patògens però no tenen lloc en humans per evitar els efectes tòxics que se'n podrien derivar. Aquest és el cas de la via del MEP.

La caracterització de l'enzim DRL com a una nova família de proteïnes amb activitat DXR mostrava punts de coincidència i punts de divergència amb aquest enzim. Aquest fet suggeria la possibilitat de que tot i catalitzar exactament la mateixa reacció bioquímica, podien existir diferències importants. La inhibició *in vitro* de DRL per l'inhibidor competitiu específic de DXR podia ser un indicador de que la reacció seguia el mateix mecanisme de reacció però la menor eficiència de FSM sobre DRL també

il·lustrava l'existència de diferències. La resolució de l'estructura cristal·lina de la proteïna DRL de *Brucella* en la forma de apoproteïna i en forma de complex amb l'inhibidor FSM mostra com tot i l'existència de similituds en l'estat d'oligomerització o la distribució de dominis els residus del centre actiu de DRL no són estructuralment equivalents als descrits per les estructures de DXR (Mac Sweeney *et al.*, 2005; Reuter *et al.*, 2002; Ricagno *et al.*, 2004; Takenoya *et al.*, 2010; Umeda *et al.*, 2010). Tots dos enzims requereixen de NADPH com a cofactor el que es reflexa en els dominis estructurals que guarden gran similitud entre ells tal i com es podia preveure considerant que aquesta part de les proteïnes es la única que presenta homologia a nivell de seqüència. En l'altre extrem es situa el domini carboxi terminal. Sorprenentment aquest domini de DRL a nivell d'estructura mostra una clara similitud amb el domini *ice-binding* de les proteïnes anti congelants (*antifreeze*: AFP) de tipus III però no mostra cap tipus d'homologia a nivell de seqüència ni tampoc a nivell d'estructura amb el domini definit per DXR. No obstant, els dos dominis tenen volums totals molt similars i ocupen posicions equivalents respecte els altres dos dominis el que suggereix que el domini carboxi terminal de DRL actuaria com a suport estructural de l'arquitectura general de la proteïna però sense estar implicat en la catàlisi. La absència d'aminoàcids relacionats amb el centre catalític ni amb la interacció entre les dues subunitats que conformen la unitat dimèrica funcional donaria suport a aquesta possibilitat. La generació d'una proteïna funcional truncada en l'extrem C-terminal o una quimera en la que aquest domini es substitueixi per l'estructuralment equivalent *ice-binding* de la AFP de *Macrozoarces americanus* (el més similar a nivell de seqüència) podria aportar noves evidències al respecte. Aquest domini associat a les proteïnes AFP forma ponts d'hidrogen amb el gel inhibint-ne el seu creixement el que possibilita la supervivència d'organismes que viuen en entorns amb temperatures per sota de 0°C (Baardsnes *et al.*, 2001). *Brucella* és un cocobacil Gram negatiu que actua com a paràsit intracel·lular de manera que resulta difícil establir una relació d'aquest domini en un microorganisme d'aquestes característiques. La detecció de dominis homòlegs al d'unió a gel en organismes que no ocupen regions fredes ja ha estat descrit amb anterioritat (Baardsnes and Davies, 2001) i es relaciona amb proteïnes que interaccionen amb sucres i polisacàrids (Hamada *et al.*, 2006).

En el domini central de DRL hi ha tres residus que es coordinen amb un àtom de magnesi en concordança amb la necessitat de la presència de l'ió divalent per a l'activitat catalítica de l'enzim *in vitro* (figura 55). Els tres residus estan totalment conservats en la seqüència de totes les DRL que formen part del clade filogenètic que defineix les DRL autèntiques (o funcionals) de la mateixa manera que està descrit per

DXR. Canvis en aquests aminoàcids suposen la pèrdua d'activitat en els dos enzims. També suposa la pèrdua d'activitat la mutació dels aminoàcids E209 i R213 que es troben en una regió equivalent a la descrita per DXR com a tapa (*lid*) mòbil implicada en la catàlisi el que demostra el caràcter essencial per a l'activitat catalítica i suggereix un funcionament similar per DRL. En DXR la flexibilitat d'aquesta regió fa que en moltes ocasions no sigui possible la seva resolució estructural. En el cas de DRL la regió està ben definida però l'anàlisi dels núvols electrònics mostra una segona conformació alternativa d'aquesta regió que queda més pròxima al centre catalític. El fet que es pugui resoldre la estructura d'aquest loop i que la conformació alternativa mostri una baixa ocupació suggereix que en DRL la flexibilitat de la tapa és menor el que podria en part explicar la inferior capacitat enzimàtica de DRL respecte DXR. Aquesta doble conformació s'observa també per la H323 que pot ocupar dues posicions, una més allunyada i una segona més pròxima al centre actiu que podria ser indicatiu del paper d'aquest aminoàcid en el mecanisme de reacció.

Deixant de banda la coordinació del magnesi, el centre actiu de DRL presenta una distribució particular en la que els aminoàcids implicats en la unió de la cua de fosfat de l'inhibidor al centre actiu (K191, K193, T229) no tenen equivalència estructural amb els descrits per les estructures de DXR publicades (Steinbacher *et al.*, 2003b; Yajima *et al.*, 2007) però tots ells estan totalment conservats en totes les DRL funcionals amb la única excepció de la T229 de la DRL D'*Anaerofustis stercorihominis* que pateix un canvi conservatiu per un aminoàcid de tipus asparagina que manté la polaritat. Les propietats químiques del grup de residus es manté entre els dos enzims però els residus implicats no es conserven. Un fenomen similar es dona en la triada de residus carregats propers a l'ió divalent de magnesi que han estat proposats en DXR com a elements implicats en catàlisi i que en DRL no es conserven però són substituïts per una triada alternativa també carregada formada per E141, G222 i K228.

Aquesta dualitat entre interaccions equivalents però solucions estructurals diferents és molt evident en el cas de les interaccions d'apilament (*stacking*) que els dos enzims estableixen amb la FSM ajudant a la seva estabilització en el centre actiu. En el cas de DXR es dona amb un residu de triptofà mentre en DRL és amb un residu de fenilalanina. Les seves ubicacions en el centre actiu són oposades i la interacció s'exerceix amb regions diferents de la molècula de FSM.

Aquests dos residus tenen un paper que unit a la disposició dels aminoàcids en l'entorn del centre catalític donen lloc a una organització de la cavitat (*pocket*) diferent entre els dos enzims. Aquesta diferència ràpidament suggereix la possibilitat d'identificar o dissenyar compostos que inhibeixin de manera específica un enzim o l'altre. L'estructura de DRL i del complex amb FSM proporciona informació detallada i molt valuosa que permet establir hipòtesis de l'efecte de noves estructures.

L'anàlisi *in silico* de la FSM i alguns derivats (amb una α -fenil substitució i una orientació inversa del grup hidroxàmic) amb capacitat d'inhibició de DXR (Behrendt *et al.*, 2010; Behrendt *et al.*, 2011) indicava un millor posicionament de la FSM i el seu derivat metilat, el FR900098 en el centre actiu de DXR que es mantenia pels derivats α -fenil substituïts. En DRL la presència d'un grup voluminós en posició alfa de la molècula de FSM mostrava un potencial impediment estèric amb la F223 que ha d'impedir la unió de l'inhibidor. Aquestes prediccions es compleixen en els estudis d'inhibició *in vitro* realitzats amb la proteïna recombinant purificada l'activitat de la qual era inhibida per FSM i FR900098 però no en canvi pels derivats α -fenil substituïts demostrant que el disseny d'antibiòtics específics que actuïn sobre un enzim o l'altre és factible.

La inhibició específica de DXR pot resultar interessant però a ningú escapa el encara major interès que té la inhibició específica de DRL. Les dianes per a nous antibiòtics que no es troben en humans permeten desenvolupar drogues minimitzant l'impacte sobre el pacient. Aquest és el cas de la via del MEP i d'altres processos específics de microorganismes que no es donen en humans. No obstant en tots aquests casos existeix una forma de toxicitat indirecte que afecta al grup de microorganismes que formen part de la flora o biota intestinal establint una relació de simbiosis ja sigui de tipus comensal o de mutualisme i que són sensibles als antibiòtics (O'Hara and Shanahan, 2006). Diversos estudis metagenòmics de la flora intestinal han descrit la via del MEP com de distribució majoritària entre els seus representants. (Serban, 2011; Tuohy *et al.*, 2009). Ja que DRL és l'enzim que catalitza la síntesi de MEP en patògens humans i animals emergents com *Bartonella* (Pulliainen and Dehio, 2012) i *Brucella* (Morris and Southwick, 2010), el disseny d'inhibidors específics de DRL sense efecte sobre DXR rendiria antibiòtics de curt espectre i alta especificitat que no destruirien la biota del tracte intestinal (Heuston *et al.*, 2012). La seva potencial aplicació en afeccions molt concretes i en la indústria veterinària podria pal·liar l'efecte nociu de l'ús indiscriminat d'antibiòtics d'ampli espectre ajudant a frenar el desenvolupament de resistències derivat d'aquest mal ús.

Conclusions

1. Cèl·lules de *E.coli* modificades genèticament per habilitar la producció de carotenoides són un sistema vàlid per a l'estudi dels mecanismes de regulació bàsics que modulen la síntesi de precursors comuns a tots els isoprenoides.
2. DXS, el primer enzim de la via del MEP, juga un paper clau en el control de la síntesi dels precursors necessaris per a la producció d'isoprenoides com els carotenoides. DXR i HDR també intervenen en la modulació del flux de la via però ho fan en menor mesura.
3. L'enzim HDS no intervé de manera decisiva en el control de la via del MEP tant en bacteris (*E.coli*) com en plantes (*A. thaliana*) del que se'n deriva que no tots els enzims de la via del MEP incideixen en la regulació del flux.
4. Incrementos moderats de les activitats limitants de la via del MEP produeixen els millors rendiments en termes d'acumulació de productes finals.
5. La caracterització de la proteïna bifuncional LCYE-CrtY mostra que l'ús d'enzims bifuncionals pot simplificar la manipulació biotecnològica de la ruta de síntesi de carotenoides.
6. En plantes existeix un nivell superior de regulació en base al control exercit sobre la ruta del MEP per a la seva integració i coordinació amb la resta del metabolisme.
7. La pèrdua de funció de PRL1 en el mutant *rif18 (prl1-8)* d'*A.thaliana* influeix de manera directa sobre la síntesi d'isoprenoides a través de la via del MVA provocant una inhibició de l'enzim HMGR mediada per les quinases de la família SnRK1. A l'hora modula també la síntesi d'isoprenoides plastídics de manera indirecte en alterar el metabolisme d'hormones i sucres amb el que estan íntimament relacionats.
8. La plasticitat gènica per a la síntesi d'isoprenoides que mostren els procariotes és una font de variabilitat amb potencial aplicació biotecnològica però a l'hora facilita el desenvolupament de resistències a antibiòtics dirigits contra aquesta via.
9. Les mutacions E636G, E636Q, L633R, i Q408R permeten a la subunitat E1 del complex de la piruvat deshidrogenasa catalitzar la producció de DXP en la primera etapa de la via del MEP.

10. Les mutacions G108S i D113G permeten a l'enzim DHBPS catalitzar la producció de DXP probablement a partir de substrats diferents als utilitzats per DXS.
11. DRL defineix una nova família de proteïnes capaces de catalitzar exactament la mateixa reacció bioquímica que DXR tot i no mostrar cap tipus d'homologia a nivell de seqüència amb aquesta.
12. DRL és similar a DXR en l'estat d'oligomerització, la temperatura i pH òptims, però hi ha marcades diferències en els paràmetres cinètics.
13. Les seqüències homòlogues a DRL amb activitat DXR s'agrupen en el mateix cluster filogenètic, del que se'n deriva que existeixen una sèrie de requisits de seqüència per adquirir aquesta activitat.
14. L'estructura tridimensional de la proteïna DRL de *B.abortus* revela una conformació única del centre actiu en el que els residus G209 i R213 resulten essencials per a l'activitat catalítica.
15. Les diferències en els centres actius de DRL i DXR permeten la síntesi d'antibiòtics específics contra un o l'altre enzim.

- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J.** 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* **9**, 331-338.
- Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G.** 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* **330**, 70-74.
- Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P.** 2000. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett* **485**, 168-172.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J.** 2004. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* **39**, 697-714.
- Albrecht M, Misawa N, Sandmann G.** 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids beta-carotene and zeaxanthin. *Biotechnol Lett* **21**, 791-795.
- Albrecht M, Takaichi S, Steiger S, Wang ZY, Sandmann G.** 2000. Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **18**, 843-846.
- Alder A, Holdermann I, Beyer P, Al-Babili S.** 2008. Carotenoid oxygenases involved in plant branching catalyse a highly specific conserved apocarotenoid cleavage reaction. *Biochem J* **416**, 289-296.
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S.** 2012. The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**, 1348-1351.
- Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G.** 2005. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol* **23**, 612-616.
- Altincicek B, Duin, E.C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A.K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa H.** 2002. LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **532**, 437-440.
- An G, Watson BD, Chiang CC.** 1986. Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiol* **81**, 301-305.
- Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG.** 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.
- Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R.** 2010. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* **232**, 1251-1262.
- Arigoni D, Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H.** 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(20), 10600-10605.
- Arjunan P, Nemeria N, Brunskill A, Chandrasekhar K, Sax M, Yan Y, Jordan F, Guest JR, Furey W.** 2002. Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* **41**, 5213-5221.
- Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, Gershenson A.** 2001. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* **26**, 100-106.

Arrach N, Fernandez-Martin R, Cerda-Olmedo E, Avalos J. 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1687-1692.

Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 315-321.

Baardsnes J, Davies PL. 2001. Sialic acid synthase: the origin of fish type III antifreeze protein? *Trends Biochem Sci* **26**, 468-469.

Baardsnes J, Jelokhani-Niaraki M, Kondejewski LH, Kuiper MJ, Kay CM, Hodges RS, Davies PL. 2001. Antifreeze protein from shorthorn sculpin: identification of the ice-binding surface. *Protein Sci* **10**, 2566-2576.

Bach TJ, Rohmer M. 2013. *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms. New Concepts and Experimental Approaches*: Springer.

Bacher A, Eberhardt S, Eisenreich W, Fischer M, Herz S, Illarionov B, Kis K, Richter G. 2001. Biosynthesis of riboflavin. *Vitam Horm* **61**, 1-49.

Bai L, Kim EH, DellaPenna D, Brutnell TP. 2009. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J* **59**, 588-599.

Baidoo EE, Benke PI, Keasling JD. 2012. Mass spectrometry-based microbial metabolomics. *Methods Mol Biol* **881**, 215-278.

Bailey JE. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.

Barrero JM, Rodríguez PL, Quesada V, Alabadí D, Blázquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL. 2008. The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **31**, 227-234.

Baruah A, Simkova K, Hinch DK, Apel K, Laloi C. 2009. Modulation of O-mediated retrograde signaling by the PLEIOTROPIC RESPONSE LOCUS 1 (PRL1) protein, a central integrator of stress and energy signaling. *Plant J* **60**, 22-32.

Beaujean A, Ducrocq-Assaf C, Sangwan RS, Lilius G, Bulow L, Sangwan-Norreel BS. 2000. Engineering direct fructose production in processed potato tubers by expressing a bifunctional alpha-amylase/glucose isomerase gene complex. *Biotechnol Bioeng* **70**, 9-16.

Begley M, Gahan CG, Kollas AK, Hintz M, Hill C, Jomaa H, Eberl M. 2004. The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gamma delta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett* **561**, 99-104.

Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, Campobasso N, Chiu HJ, Kinsland C, Reddick JJ, Xi J. 1999. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* **171**, 293-300.

Behrendt CT, Kunfermann A, Illarionova V, Matheeussen A, Grawert T, Groll M, Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W, Fischer M, Maes L, Kurz T. 2010. Synthesis and antiparasitic activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate fosmidomycin. *ChemMedChem* **5**, 1673-1676.

Behrendt CT, Kunfermann A, Illarionova V, Matheeussen A, Pein MK, Grawert T, Kaiser J, Bacher A, Eisenreich W, Illarionov B, Fischer M, Maes L, Groll M, Kurz T. 2011. Reverse fosmidomycin derivatives against the antimalarial drug target IspC (Dxr). *J Med Chem* **54**, 6796-6802.

- Beisel KG, Jahnke S, Hofmann D, Koppchen S, Schurr U, Matsubara S.** 2010. Continuous turnover of carotenes and chlorophyll a in mature leaves of *Arabidopsis* revealed by $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase labeling. *Plant Physiol* **152**, 2188-2199.
- Bino RJ, de Vos CHR, Lieberman M, Hall RD, Bovy A, Jonker HH, Tikunov Y, Lommen A, Moco S, Levin I.** 2005. The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytol* **166**, 427-438.
- Blanco AM, Moreno J, Del Campo JA, Rivas J, Guerrero MG.** 2007. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1259-1266.
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
- Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW.** 1999. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* **66**, 122-127.
- Bolan GA, Sparling PF, Wasserheit JN.** 2012. The emerging threat of untreatable gonococcal infection. *N Engl J Med* **366**, 485-487.
- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodríguez-Concepción M.** 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* **40**, 188-199.
- Botella-Pavía P, Rodríguez-Concepción M.** 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol Plant* **126**, 369-381.
- Boucher Y, Doolittle WF.** 2000. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol* **37**, 703-716.
- Boucher Y, Huber H, L'Haridon S, Stetter KO, Doolittle WF.** 2001. Bacterial origin for the isoprenoid biosynthesis enzyme HMG-CoA reductase of the archaeal orders Thermoplasmatales and Archaeoglobales. *Mol Biol Evol* **18**, 1378-1388.
- Boucher Y, Kamekura M, Doolittle WF.** 2004. Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol Microbiol* **52**, 515-527.
- Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreux D.** 2008. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 208-233.
- Bouvier F, D'Harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B.** 2000. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biochem* **267**, 6346-6352.
- Bouvier F, Rahier A, Camara B.** 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* **44**, 357-429.
- 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**, 248-254.
- Bramley PM.** 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* **53**, 2107-2113.
- Brammer LA, Smith JM, Wade H, Meyers CF.** 2011. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase catalyzes a novel random sequential mechanism. *J Biol Chem* **286**, 36522-36531.

- Britton G.** 1993. In Pigment-protein complexes in plastids:synthesis and assembly. *Carotenoids in chlrooplasts pigment-protein complexes* C. Sundqvist and M Ryberg (San Diego Academic Press), 447-483.
- Britton G.** 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. Carotenoids, vol3:biosynthesis and metabolism. Basel. Switzerland. 13-147.
- Brown AC, Parish T.** 2008. Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiol* **8**, 78.
- Bulow L.** 1987. Characterization of an artificial bifunctional enzyme, beta-galactosidase/galactokinase, prepared by gene fusion. *Eur J Biochem* **163**, 443-448.
- Cadwell RC, Joyce GF.** 1994. Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl* **3**, S136-140.
- Campos N, Rodriguez-Concepcion M, Sauret-Gueto S, Gallego F, Lois LM, Boronat A.** 2001a. 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.
- Campos N, Rodriguez-Concepcion M, Sauret-Gueto S, Gallego F, Lois LM, Boronat A.** 2001b. 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.
- Cane D.E., Rossi T., Tillman A.M., J.P. P.** 1981. Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis: Biosynthesis of pentalenolactone from [U-13C6]glucose and [6-2H2]glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1838-1843.
- Carol P, Kuntz M.** 2001. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci* **6**, 31-36.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N.** 2002. Expression and Molecular Analysis of the *Arabidopsis* DXR Gene Encoding 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, the First Committed Enzyme of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Physiol* **129**, 1581-1591.
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2006. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**, 683-695.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ.** 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**, 266-274.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Consortium TG.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-641.
- Cordoba E, Salmi M, Leon P.** 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* **60**, 2933-2943.
- Couso I, Vila M, Rodriguez H, Vargas MA, Leon R.** 2011. Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga Chlamydomonas reinhardtii leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnol Prog* **27**, 54-60.

- Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL.** 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* **9**, R130.
- Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP.** 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**, 315-319.
- Crane CM, Hirsch AK, Alphey MS, Sgraja T, Lauw S, Illarionova V, Rohdich F, Eisenreich W, Hunter WN, Bacher A, Diederich F.** 2008. Synthesis and characterization of cytidine derivatives that inhibit the kinase IspE of the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. *ChemMedChem* **3**, 91-101.
- Croteau R, Kutchan T, N L.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W, Jones R, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), 1250–1268.
- Cunningham FX, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E, Hirschberg J.** 1993. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene. *FEBS Lett* **328**, 130-138.
- Cunningham FX, Gantt E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 557-583.
- Cunningham FX, Jr., Gantt E.** 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2905-2910.
- Cunningham FX, Jr., Lafond TP, Gantt E.** 2000. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Bacteriol* **182**, 5841-5848.
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E.** 1996. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**, 1613-1626.
- Chaded K, Oudin A, Guivarc'h N, Hamdi S, Chenieux JC, Rideau M, 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**, 559-566.
- Chamovitz D, Misawa N, Sandmann G, Hirschberg J.** 1992. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS Lett* **296**, 305-310.
- Chen B, McClements DJ, Decker EA.** 2012. Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. *Annu Rev Food Sci Technol*.
- Chen M, Poulter CD.** 2010. Characterization of thermophilic archaeal isopentenyl phosphate kinases. *Biochemistry* **49**, 207-217.
- Chen Y, Li F, Wurtzel ET.** 2010. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiol* **153**, 66-79.
- Cheung AY, McNellis T, Piekos B.** 1993. Maintenance of Chloroplast Components during Chromoplast Differentiation in the Tomato Mutant Green Flesh. *Plant Physiol* **101**, 1223-1229.
- Chew AG, Bryant DA.** 2007. Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Annu Rev Microbiol* **61**, 113-129.
- Christopherson RI, Heyde E, Morrison JF.** 1983. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*: spatial relationship of the mutase and dehydrogenase sites. *Biochemistry* **22**, 1650-1656.

- Chroma M, Kolar M.** 2010. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum beta-lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **154**, 289-296.
- Dairi T.** 2005. Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **58**, 227-243.
- Dalton T, Cegielski P, Akksilp S, Asencios L, Caoili JC, Cho SN, Erokhin VV, Ershova J, Gler MT, Kazenny BY, Kim HJ, Kliiman K, Kurbatova E, Kvasnovsky C, Leimane V, van der Walt M, Via LE, Volchenkov GV, Yagui MA, Kang H.** 2012. Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study. *Lancet*.
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Bramley PM, Pennings HM, Bowler C.** 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol* **23**, 890-895.
- De Wilde C, Van Houdt H, De Buck S, Angenon G, De Jaeger G, Depicker A.** 2000. Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol* **43**, 347-359.
- Demmig-Adams B, Adams WW.** 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* **298**, 2149-2153.
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW.** 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J* **10**, 403-412.
- Dhiman RK, Schaeffer ML, Bailey AM, Testa CA, Scherman H, Crick DC.** 2005. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC) from *Mycobacterium tuberculosis*: towards understanding mycobacterial resistance to fosmidomycin. *J Bacteriol* **187**, 8395-8402.
- DiMascio P, Kaiser S, Sies H.** 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* **274**, 532-538.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G.** 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol* **6**, 13.
- Diretto G, Welsch R, Tavazza R, Mourgues F, Pizzichini D, Beyer P, Giuliano G.** 2007. Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol* **7**, 11.
- Doolittle WF, Logsdon JM, Jr.** 1998. Archaeal genomics: do archaea have a mixed heritage? *Curr Biol* **8**, R209-211.
- Ducreux LJ, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA.** 2005. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *J Exp Bot* **56**, 81-89.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J.** 2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 933-938.
- Eliassen AH, Hendrickson SJ, Brinton LA, Buring JE, Campos H, Dai Q, Dorgan JF, Franke AA, Gao YT, Goodman MT, Hallmans G, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Hulten K, Sesso HD, Sowell AL, Tamimi RM, Toniolo P, Wilkens LR, Winkvist A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Hankinson SE.** 2012. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. *J Natl Cancer Inst* **104**, 1905-1916.

- Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM.** 2005. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotech J* **3**, 17-27.
- Engels B, Dahm P, Jennewein S.** 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab Eng* **10**, 201-206.
- Ershov YV, Gantt RR, Cunningham Jr FX, Jr., Gantt E.** 2002. Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* **184**, 5045-5051.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **276**, 22901-22909.
- Facchinelli F, Weber AP.** 2011. The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front Plant Sci* **2**, 50.
- Fann M, Davies AH, Varadhachary A, Kuroda T, Sevier C, Tsuchiya T, Maloney PC.** 1998. Identification of two essential arginine residues in UhpT, the sugar phosphate antiporter of *Escherichia coli*. *J Membr Biol* **164**, 187-195.
- Farinas ET, Bulter T, Arnold FH.** 2001. Directed enzyme evolution. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 545-551.
- Farmer WR, Liao JC.** 2001. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **17**, 57-61.
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Closa M, Wright LP, Botella-Pavia P, Phillips MA, Ferrer A, Gershenzon J, Rodriguez-Concepcion M.** 2010. Pleiotropic regulatory locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **3**, 101-112.
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Rodriguez-Villalon A, Gil MJ, Vera P, Rodriguez-Concepcion M.** 2008a. Contribution of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase to carotenoid biosynthesis in bacteria and plants. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 510-514.
- Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, Jarvis P, Rodríguez-Concepción M.** 2008. A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in *Arabidopsis* Plastids. *Plant Cell* **20**, 1303-1315.
- Flores-Perez U, Sauret-Gueto S, Gas E, Jarvis P, Rodriguez-Concepcion M.** 2008b. A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* **20**, 1303-1315.
- Fraser PD, Bramley PM.** 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**, 228-265.
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, 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**, 551-558.
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM.** 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1092-1097.
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, 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**, 693-701.

- Fujioka S, Yokota T.** 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 137-164.
- Fujisaki S, Ohnuma S, Horiuchi T, Takahashi I, Tsukui S, Nishimura Y, Nishino T, Kitabatake M, Inokuchi H.** 1996. Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. *Gene* **175**, 83-87.
- Fujiwara S, Yamanaka A, Yamada Y, Hirooka K, Higashibata H, Fukuda W, Nakayama J, Imanaka T, Fukusaki E.** 2008. Efficient synthesis of trans-polyisoprene compounds using two thermostable enzymes in an organic-aqueous dual-liquid phase system. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 118-123.
- Gabrielsen M, Rohdich F, Eisenreich W, Grawert T, Hecht S, Bacher A, Hunter WN.** 2004. Biosynthesis of isoprenoids: a bifunctional IspDF enzyme from *Campylobacter jejuni*. *Eur J Biochem* **271**, 3028-3035.
- Gao P, Yang Y, Xiao C, Liu Y, Gan M, Guan Y, Hao X, Meng J, Zhou S, Chen X, Cui J.** 2012. Identification and validation of a novel lead compound targeting 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase (IspD) of mycobacteria. *Eur J Pharmacol*.
- Geist JG, Lauw S, Illarionova V, Illarionov B, Fischer M, Grawert T, Rohdich F, Eisenreich W, Kaiser J, Groll M, Scheurer C, Wittlin S, Alonso-Gomez JL, Schweizer WB, Bacher A, Diederich F.** 2010. Thiazolopyrimidine inhibitors of 2-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem* **5**, 1092-1101.
- Gil MJ, Coego A, Mauch-Mani B, Jordà L, Vera P.** 2005. The *Arabidopsis* *csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant J* **44**, 155-166.
- Gimenez-Oya V, Villacanas O, Fernandez-Busquets X, Rubio-Martinez J, Imperial S.** 2009. Mimicking direct protein-protein and solvent-mediated interactions in the CDP-methylerythritol kinase homodimer: a pharmacophore-directed virtual screening approach. *J Mol Model* **15**, 997-1007.
- Gimenez-Oya V, Villacanas O, Obiol-Pardo C, Antolin-Llovera M, Rubio-Martinez J, Imperial S.** 2011. Design of novel ligands of CDP-methylerythritol kinase by mimicking direct protein-protein and solvent-mediated interactions. *J Mol Recognit* **24**, 71-80.
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C.** 2008. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* **275**, 527-535.
- Giovannoni J.** 2001. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 725-749.
- Giovannoni JJ.** 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 283-289.
- Goldstein JL, Brown MS.** 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430.
- Gomez-Roldan V, Feras S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF.** 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-194.
- Grawert T, Kaiser J, Zepeck F, Laupitz R, Hecht S, Amslinger S, Schramek N, Schleicher E, Weber S, Haslbeck M, Buchner J, Rieder C, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F.** 2004. IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *J Am Chem Soc* **126**, 12847-12855.

- Grochowski LL, Xu H, White RH.** 2006. Methanocaldococcus jannaschii uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate. *J Bacteriol* **188**, 3192-3198.
- Gross J, Bhattacharya D.** 2011. Endosymbiont or host: who drove mitochondrial and plastid evolution? *Biol Direct* **6**, 12.
- Guevara-Garcia A, San Roman C, Arroyo A, Cortes ME, Gutierrez-Nava ML, Leon P.** 2005. Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell* **17**, 628-643.
- Hahn FM, Hurlburt AP, Poulter CD.** 1999. Escherichia coli open reading frame 696 is idi, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol* **181**, 4499-4504.
- Hamada T, Ito Y, Abe T, Hayashi F, Guntert P, Inoue M, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Tanaka A, Sugano S, Yokoyama S, Hirota H.** 2006. Solution structure of the antifreeze-like domain of human sialic acid synthase. *Protein Sci* **15**, 1010-1016.
- Handelman GJ.** 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* **17**, 818-222.
- Harker M, Bramley PM.** 1999. Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in Escherichia coli increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett* **448**, 115-119.
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI.** 2011. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr Biol* **21**, R346-355.
- Havaux M, Dall'osto L, Bassi R.** 2007. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in Arabidopsis leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol* **145**, 1506-1520.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H.** 2000. Technical Focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* **5**, 446-451.
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ.** 2012. A raison d'etre for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res* **51**, 95-148.
- Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, Bach TJ.** 2003. Crosstalk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem* **278**, 26666-26676.
- Hemmerlin A, Tritsch D, Hartmann M, Pacaud K, Hoeffler JF, van Dorsselaer A, Rohmer M, Bach TJ.** 2006. A cytosolic Arabidopsis D-xylulose kinase catalyzes the phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose into a precursor of the plastidial isoprenoid pathway. *Plant Physiol* **142**, 441-457.
- Henriksson LM, Unge T, Carlsson J, Aqvist J, Mowbray SL, Jones TA.** 2007. Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis. *J Biol Chem* **282**, 19905-19916.
- Heuston S, Begley M, Gahan CG, Hill C.** 2012. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology* **158**, 1389-1401.
- Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, Pauloski RM, Sayer BG, Wolf E, Spenser ID.** 1996. The biogenetic anatomy of vitamin B6. A 13C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in Escherichia coli. *J Biol Chem* **271**, 30426-30435.
- Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, Beck E, Wiesner J, Eberl M, Jomaa H.** 2001. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gamma delta T cells in Escherichia coli. *FEBS Lett* **509**, 317-322.

- Holm L, Rosenstrom P.** 2010. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549.
- Horbach S, Sahm H, Welle R.** 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? *FEMS Microbiol Lett* **111**, 135-140.
- Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI.** 2001. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg Med Chem* **9**, 2237-2242.
- Humphrey JH, West KPJ, Sommer A.** 1992. Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. *Bull World Health Organ* **70**, 225-232.
- Hunter WN.** 2007. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* **282**, 21573-21577.
- Initiative* TAG.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Iwata-Reuyl D, Math SK, Desai SB, Poulter CD.** 2003. Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression, and characterization of *Erwinia herbicola* phytoene synthase. *Biochemistry* **42**, 3359-3365.
- James CL, Viola RE.** 2002a. Production and characterization of bifunctional enzymes. Substrate channeling in the aspartate pathway. *Biochemistry* **41**, 3726-3731.
- James CL, Viola RE.** 2002b. Production and characterization of bifunctional enzymes. Domain swapping to produce new bifunctional enzymes in the aspartate pathway. *Biochemistry* **41**, 3720-3725.
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK.** 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol* **131**, 516-524.
- Jawaid S, Seidle H, Zhou W, Abdirahman H, Abadeer M, Hix JH, van Hoek ML, Couch RD.** 2009. Kinetic characterization and phosphoregulation of the *Francisella tularensis* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (MEP synthase). *PLoS One* **4**, e8288.
- Jensen KF.** 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J Bacteriol* **175**, 3401-3407.
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW.** 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**, 217-230.
- Jin YS, Stephanopoulos G.** 2007. Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **9**, 337-347.
- Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E.** 1999. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573-1576.
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N.** 2009. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* **2**, 1154-1180.
- Julliard JH, Douce R.** 1991. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2042-2045.
- Kahri J, Syvanne M.** 2012. [Statin therapy--for whom?]. *Duodecim* **128**, 811-818.

- Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H.** 2001. An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 932-937.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**, 185-209.
- Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ.** 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 987-994.
- Kang MJ, Lee YM, Yoon SH, Kim JH, Ock SW, Jung KH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW.** 2005. Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. *Biotechnol Bioeng* **91**, 636-642.
- Kannenberg E, Poralla K.** 1999. Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. . *Naturwissenschaften* **86**, 168-176.
- Kasahara H, Hanada A, Kuzuyama T, Takagi M, Kamiya Y, Yamaguchi S.** 2002. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 45188-45194.
- Kawamukai M.** 2002. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J Biosci Bioeng* **94**, 511-517.
- Keasling JD.** 2012. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab Eng* **14**, 189-195.
- Keasling JD.** 2010. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* **330**, 1355-1358.
- Keshavjee S, Farmer PE.** 2012. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med* **367**, 931-936.
- Khailova LS, Nemerya NS, Severin SE.** 1983. The substrate-mediated inactivation of the pyruvate dehydrogenase component of the pigeon breast muscle pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Int* **7**, 423-432.
- Kim J, DellaPenna D.** 2006. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3474-3479.
- Kim SW, Keasling JD.** 2001. Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production. *Biotechnol Bioeng* **72**, 408-415.
- Kirby J, Keasling JD.** 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 335-355.
- Klassen JL.** 2010. Phylogenetic and evolutionary patterns in microbial carotenoid biosynthesis are revealed by comparative genomics. *PLoS One* **5**, e11257.
- Kleinegris DM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH.** 2011. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme Microb Technol* **48**, 253-259.

- Kobayashi K, Suzuki M, Tang J, Nagata N, Ohyama K, Seki H, Kiuchi R, Kaneko Y, Nakazawa M, Matsui M, Matsumoto S, Yoshida S, Muranaka T.** 2007. Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **48**, 322-331.
- Kohls D, Sulea T, Purisima EO, MacKenzie RE, Vrielink A.** 2000. The crystal structure of the formiminotransferase domain of formiminotransferase-cyclodeaminase: implications for substrate channeling in a bifunctional enzyme. *Structure* **8**, 35-46.
- Koornneef M, Meinke D.** 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* **61**, 909-921.
- Koppisch AT, Fox DT, Blagg BS, Poulter CD.** 2002. E. coli MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding. *Biochemistry* **41**, 236-243.
- Kourtz L, Dillon K, Daughtry S, Madison LL, Peoples O, Snell KD.** 2005. A novel thiolase-reductase gene fusion promotes the production of polyhydroxybutyrate in Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* **3**, 435-447.
- Koussevitzky S, Stanne TM, Peto CA, Giap T, Sjogren LL, Zhao Y, Clarke AK, Chory J.** 2007. An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development. *Plant Mol Biol* **63**, 85-96.
- Krubasik P, Sandmann G.** 2000a. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem Soc Trans* **28**, 806-810.
- Krubasik P, Sandmann G.** 2000b. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol Gen Genet* **263**, 423-432.
- Kuemmerle HP, Murakawa T, Soneoka K, Konishi T.** 1985. Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **23**, 515-520.
- Kuzuyama T, Seto H.** 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* **20**, 171-183.
- Kuzuyama T, Seto H.** 2012. Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**, 41-52.
- Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, 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**, 7913-7916.
- 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), 19928-19932.
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH.** 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* **26**, 631-638.
- Lange BM, Ghassemian M.** 2003. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **51**, 925-948.
- 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 U S A* **97**, 13172-13177.
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R.** 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2100-2104.

- Laule O, Furholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grussem W, Lange M.** 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6866-6871.
- Laupitz R, Hecht S, Amslinger S, Zepeck F, Kaiser J, Richter G, Schramek N, Steinbacher S, Huber R, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F.** 2004. Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem* **271**, 2658-2669.
- Lauw S, Illarionova V, Bacher A, Rohdich F, Eisenreich W.** 2008. Biosynthesis of isoprenoids: studies on the mechanism of 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase. *FEBS J* **275**, 4060-4073.
- Lawrence JG, Ochman H.** 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9413-9417.
- Lazzeri V, Calvenzani V, Petroni K, Tonelli C, Castagna A, Ranieri A.** 2012. Carotenoid profiling and biosynthetic gene expression in flesh and peel of wild-type and hp-1 tomato fruit under UV-B depletion. *J Agric Food Chem* **60**, 4960-4969.
- Learned RM.** 1996. Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**, 645-655.
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW.** 2008. Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**, 152-167.
- Lee M, Grawert T, Qwitterer F, Rohdich F, Eppinger J, Eisenreich W, Bacher A, Groll M.** 2010. Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG. *J Mol Biol* **404**, 600-610.
- Lee PC, Schmidt-Dannert C.** 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 1-11.
- Lell B, Ruangweeraayut R, Wiesner J, Missinou MA, Schindler A, Baranek T, Hintz M, Hutchinson D, Jomaa H, Kremsner PG.** 2003. Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 735-738.
- Lemieux MJ, Huang Y, Wang da N.** 2005. Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **54 Suppl 1**, i43-46.
- Lherbet C, Pojer F, Richard SB, Noel JP, Poulter CD.** 2006. Absence of substrate channeling between active sites in the *Agrobacterium tumefaciens* IspDF and IspE enzymes of the methyl erythritol phosphate pathway. *Biochemistry* **45**, 3548-3553.
- Li D, Gui J, Li Y, Feng L, Han X, Sun Y, Sun T, Chen Z, Cao Y, Zhang Y, Zhou L, Hu X, Ren Y, Wan J.** 2012. Structure-Based Design and Screen of Novel Inhibitors for Class II 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase from *Streptococcus Pneumoniae*. *J Chem Inf Model*.
- Liao DI, Calabrese JC, Wawrzak Z, Viitanen PV, Jordan DB.** 2001. Crystal structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of riboflavin biosynthesis. *Structure* **9**, 11-18.
- Lin-Goerke JL, Robbins DJ, Burczak JD.** 1997. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *Biotechniques* **23**, 409-412.
- Liu J, Chen X, Zou Y.** 2012a. [Progress on chemical pattern recognition in traditional Chinese medicines by multidimensional information of metabolic fingerprinting analysis]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **37**, 1081-1088.

- Liu J, Murkin AS.** 2012. Pre-Steady-State Kinetic Analysis of 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals Partially Rate-Limiting Product Release by Parallel Pathways. *Biochemistry*.
- Liu YL, Guerra F, Wang K, Wang W, Li J, Huang C, Zhu W, Houlihan K, Li Z, Zhang Y, Nair SK, Oldfield E.** 2012b. Structure, function and inhibition of the two- and three-domain 4Fe-4S IspG proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8558-8563.
- Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A.** 1998. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2105-2110.
- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A.** 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**, 503-513.
- Lokstein H, Tian L, Polle JE, DellaPenna D.** 2002. Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in Photosystem II antenna size and stability. *Biochim Biophys Acta* **1553**, 309-319.
- Lombard J, Moreira D.** 2011. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* **28**, 87-99.
- Long Q, Ji L, Wang H, Xie J.** 2010. Riboflavin biosynthetic and regulatory factors as potential novel anti-infective drug targets. *Chem Biol Drug Des* **75**, 339-347.
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R.** 2009. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**, e6373.
- Mabanglo MF, Schubert HL, Chen M, Hill CP, Poulter CD.** 2010. X-ray structures of isopentenyl phosphate kinase. *ACS Chem Biol* **5**, 517-527.
- Mac Sweeney A, Lange R, Fernandes RP, Schulz H, Dale GE, Douangamath A, Proteau PJ, Oefner C.** 2005. The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J Mol Biol* **345**, 115-127.
- Mack M, Grill S.** 2006. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 265-275.
- Mackie RS, McKenney ES, van Hoek ML.** 2012. Resistance of *Francisella novicida* to fosmidomycin associated with mutations in the glycerol-3-phosphate transporter. *Front Microbiol* **3**, 226.
- Mahmoud SS, 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**, 8915-8920.
- Maragakis LL.** 2010. Recognition and prevention of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. *Crit Care Med* **38**, S345-351.
- Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD.** 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* **21**, 796-802.
- Matsue Y, Mizuno H, Tomita T, Asami T, Nishiyama M, Kuzuyama T.** 2010. The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-

phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. *J Antibiot (Tokyo)* **63**, 583-588.

Matthews PD, Wurtzel ET. 2000. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 396-400.

Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ. 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* **139**, 920-934.

Maury J, Asadollahi MA, Moller K, Clark A, Nielsen J. 2005. Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **100**, 19-51.

McGarvey DJ, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.

Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET. 2011. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* **5**, 77.

Meinke MC, Friedrich A, Tschersch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H, Groth N, Lademann J, Rohn S. 2012. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. *Eur J Pharm Biopharm.*

Messiaen AS, Verbruggen T, Declerck C, Ortmann R, Schlitzer M, Nelis H, Van Calenberg S, Coenye T. 2011. Resistance of the *Burkholderia cepacia* complex to fosmidomycin and fosmidomycin derivatives. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 261-264.

Miziorko HM. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **505**, 131-143.

Mogi T, Saiki K, Anraku Y. 1994. Biosynthesis and functional role of haem O and haem A. *Mol Microbiol* **14**, 391-398.

Mordmuller B, Kremsner PG. 2006. Malarial parasites vs. antimalarials: never-ending rumble in the jungle. *Curr Mol Med* **6**, 247-251.

Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* **215**, 59-76.

Morris JG, Jr., Southwick FS. 2010. Brucella, voles, and emerging pathogens. *J Infect Dis* **202**, 1-2.

Mueller C, Schwender J, Zeidler J, Lichtenthaler HK. 2000. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem Soc Trans* **28**, 792-793.

Mukherjee T, Hanes J, Tews I, Ealick SE, Begley TP. 2011. Pyridoxal phosphate: biosynthesis and catabolism. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 1585-1596.

Munos JW, Pu X, Mansoorabadi SO, Kim HJ, Liu HW. 2009. A secondary kinetic isotope effect study of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-catalyzed reaction: evidence for a retroaldol-aldol rearrangement. *J Am Chem Soc* **131**, 2048-2049.

Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J. 2006. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol* **142**, 890-900.

- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD.** 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **379**, 413-431.
- Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C.** 1999. Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *Plant Cell* **11**, 145-157.
- Nagata N, Suzuki M, Yoshida S, Muranaka T.** 2002. Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* **216**, 345-350.
- Nakamura CE, Whited GM.** 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 454-459.
- Nayyar GM, Breman JG, Newton PN, Herrington J.** 2012. Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* **12**, 488-496.
- Nemeria N, Arjunan P, Brunskill A, Sheibani F, Wei W, Yan Y, Zhang S, Jordan F, Furey W.** 2002. Histidine 407, a phantom residue in the E1 subunit of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex, activates reductive acetylation of lipoamide on the E2 subunit. An explanation for conservation of active sites between the E1 subunit and transketolase. *Biochemistry* **41**, 15459-15467.
- Nemeria N, Tittmann K, Joseph E, Zhou L, Vazquez-Coll MB, Arjunan P, Hubner G, Furey W, Jordan F.** 2005. Glutamate 636 of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase-E1 participates in active center communication and behaves as an engineered acetolactate synthase with unusual stereoselectivity. *J Biol Chem* **280**, 21473-21482.
- Németh K, Salchert K, Putnok P, Bhalerao R, Koncz-Kálmán Z, Stankovic-Stangeland B, Bakó L, Mathur J, Okrész L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Rédei GP, Schell J, Koncz C.** 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes Dev* **12**, 3059-3073.
- Nicolaou KC, Ueno H, Liu JJ, Nantermet PG, Yang Z, Renaud J, Paulvannan K, Chadha R.** 1995. Total synthesis of Taxol. 4. The final stages and completion of the synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 653-659.
- Nilsson U, Meshalkina L, Lindqvist Y, Schneider G.** 1997. Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **272**, 1864-1869.
- Norrby SR, Nord CE, Finch R.** 2005. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis* **5**, 115-119.
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A.** 2007. The Arabidopsis ABA-deficient mutant aba4 demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**, 810-824.
- O'Hara AM, Shanahan F.** 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**, 688-693.
- Oh SK, Han KH, Ryu SB, Kang H.** 2000. Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from Arabidopsis thaliana. Implications in rubber biosynthesis. *J Biol Chem* **275**, 18482-18488.
- Okada, K. S, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Kamiya, Y.** 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122(4)**, 1045-1056.

- Okada K, Hase T.** 2005. Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *J Biol Chem* **280**, 20672-20679.
- Okuhara M, Kuroda Y, Goto T, Okamoto M, Terano H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H.** 1980. Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J Antibiot (Tokyo)* **33**, 24-28.
- Opitz S, Kunert G, Gershenzon J.** 2008. Increased terpenoid accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum*) foliage is a general wound response. *J Chem Ecol* **34**, 508-522.
- Ortmann R, Wiesner J, Reichenberg A, Henschker D, Beck E, Jomaa H, Schlitzer M.** 2003. Acyloxyalkyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo anti-malarial activity. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2163-2166.
- Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodriguez-Concepcion M, St-Pierre B, Burlat V.** 2007. Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* **65**, 13-30.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R.** 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* **23**, 482-487.
- Parry AD, Horgan R.** 1992. Absciscic acid biosynthesis in roots I. The identification of potential absciscic acid precursors, and other carotenoids. *Planta* **187**, 185-191.
- Peracchi A.** 2001. Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. *Trends Biochem Sci* **26**, 497-503.
- Peralta-Yahya PP, Ouellet M, Chan R, Mukhopadhyay A, Keasling JD, Lee TS.** 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nat Commun* **2**, 483.
- Peralta-Yahya PP, Zhang F, del Cardayre SB, Keasling JD.** 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature* **488**, 320-328.
- Perez-Gil J, Bergua M, Boronat A, Imperial S.** 2010. Cloning and functional characterization of an enzyme from *Helicobacter pylori* that catalyzes two steps of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 919-928.
- Perez-Gil J, Uros EM, Sauret-Gueto S, Lois LM, Kirby J, Nishimoto M, Baidoo EE, Keasling JD, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2012. Mutations in *Escherichia coli* aceE and ribB Genes Allow Survival of Strains Defective in the First Step of the Isoprenoid Biosynthesis Pathway. *PLoS One* **7**, e43775.
- Persson BC, Esberg B, Olafsson O, Bjork GR.** 1994. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**, 1152-1160.
- Peterson SN, Lucier T, Heitzman K, Smith EA, Bott KF, Hu PC, Hutchison CA, 3rd.** 1995. Genetic map of the *Mycoplasma genitalium* chromosome. *J Bacteriol* **177**, 3199-3204.
- Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E.** 2008a. The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell* **20**, 677-696.
- Phillips MA, Leon P, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2008b. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci* **13**, 619-623.

Phillips MA, Walter MH, Ralph SG, Dabrowska P, Luck K, Uros EM, Boland W, Strack D, Rodriguez-Concepcion M, Bohlmann J, Gershenzon J. 2007. Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* **65**, 243-257.

Pogson BJ, McDonald KA, Truong M, Britton G, DellaPenna D. 1996. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* **8**, 1627-1639.

Pogson BJ, Rissler HM. 2000. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 1395-1403.

Poliquin K, Ershov YV, Cunningham FX, Jr., Woreta TT, Gantt RR, Gantt E. 2004. Inactivation of *sls1556* in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrates in vitro. *J Bacteriol* **186**, 4685-4693.

Ponaire S, Zingle C, Tritsch D, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M. 2012. Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by prodrugs of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase inhibitors, promising anti-mycobacterial agents. *Eur J Med Chem* **51**, 277-285.

Proteau PJ. 2004. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg Chem* **32**, 483-493.

Pulliaainen AT, Dehio C. 2012. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 563-599.

Querol J, Campos N, Imperial S, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M. 2002. Functional analysis of the Arabidopsis thaliana GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **514**, 343-346.

Quinlan RF, Shumskaya M, Bradbury LM, Beltran J, Ma C, Kennelly EJ, Wurtzel ET. 2012. Synergistic Interactions between Carotene Ring Hydroxylases Drive Lutein Formation in Plant Carotenoid Biosynthesis. *Plant Physiol* **160**, 204-214.

Rawn JD, ed. 1989. *Bioquímica*. Madrid: McGraw Hill-Interamericana de España.

Rekittke I, Nonaka T, Wiesner J, Demmer U, Warkentin E, Jomaa H, Ermler U. 2011. Structure of the E-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate synthase (GcpE) from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett* **585**, 447-451.

Renninger NM, D. 2008. Fuel compositions comprising farnesane and farnesane derivatives and method of making and using same. Vol. US patent 7,399,323.

Reuter K, Sanderbrand S, Jomaa H, Wiesner J, Steinbrecher I, Beck E, Hintz M, Klebe G, 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**, 5378-5384.

Ricagno S, Grolle S, Bringer-Meyer S, Sahm H, Lindqvist Y, Schneider G. 2004. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9-Å resolution. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 37-44.

Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP. 2001. HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 67-88.

Richter G, Kelly M, Krieger C, Yu Y, Bermel W, Karlsson G, Bacher A, Oschkinat H. 1999. NMR studies on the 46-kDa dimeric protein, 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase, using ²H, ¹³C, and ¹⁵N-labelling. *Eur J Biochem* **261**, 57-65.

- Rivasseau C, Seemann M, Boisson AM, Streb P, Gout E, Douce R, Rohmer M, Bligny R.** 2009. Accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in illuminated plant leaves at supraoptimal temperatures reveals a bottleneck of the prokaryotic methylerythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell Environ* **32**, 82-92.
- Rodríguez-Concepción M.** 2004. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des* **10**, 2391-2400.
- Rodríguez-Concepción M.** 2010. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* **504**, 118-122.
- Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* **27**, 213-222.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A.** 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**, 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción M, Campos N, Maria Lois L, Maldonado C, Hoeffler JF, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, 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**, 328-332.
- Rodríguez-Concepción M, Forés O, Martínez-García JF, González V, Phillips MA, Ferrer A, Boronat A.** 2004. Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *Plant Cell* **16**, 144-156.
- Rodríguez-Concepción M, Querol J, Lois LM, Imperial S, Boronat A.** 2003. Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (GCPE) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. *Planta* **217**, 476-482.
- Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S, Gruissem W.** 1999. Protein prenylation in plants: old friends and new targets. *Plant Mol Biol* **39**, 865-870.
- Rodriguez-Villalon A, Perez-Gil J, Rodriguez-Concepcion M.** 2008. Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. *J Biotechnol* **135**, 78-84.
- Roels OA, Trout M, Dujacquier R.** 1958. Carotene balances on boys in Ruanda here vitamin A deficiency is prevalent. *J Nutr* **65**, 115-127.
- Rohdich F, Hecht S, Gartner K, Adam P, Krieger C, Amslinger S, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W.** 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1158-1163.
- Rohdich F, Lauw S, Kaiser J, Feicht R, Kohler P, Bacher A, Eisenreich W.** 2006. Isoprenoid biosynthesis in plants - 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase (IspC protein) of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* **273**, 4446-4458.
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, 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 U S A* **96**, 11758-11763.
- Rohmer M.** 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**, 565-574.

- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H.** 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**, 517-524.
- Rohmer M, Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H.** 1996. Glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J Am Chem Soc* **118**, 2564-2566.
- Römer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM.** 2000. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* **18**, 666-669.
- Romer S, Lubeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann G.** 2002. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metab Eng* **4**, 263-272.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J.** 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* **17**, 341-351.
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G.** 2000. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* **24**, 413-419.
- Roscioli T, Kamsteeg EJ, Buysse K, Maystadt I, van Reeuwijk J, van den Elzen C, van Beusekom E, Riemersma M, Pfundt R, Vissers LE, Schraders M, Altunoglu U, Buckley MF, Brunner HG, Grisart B, Zhou H, Veltman JA, Gilissen C, Mancini GM, Delree P, Willemsen MA, Ramadza DP, Chitayat D, Bennett C, Sheridan E, Peeters EA, Tan-Sindhunata GM, de Die-Smulders CE, Devriendt K, Kayserili H, El-Hashash OA, Stemple DL, Lefeber DJ, Lin YY, van Bokhoven H.** 2012. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet* **44**, 581-585.
- Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M.** 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* **10**, e0158.
- Sacchettini JC, Poulter CD.** 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788-1789.
- Saier MH, Jr., Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jahn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS.** 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 257-279.
- Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M.** 2003. Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of Escherichia coli. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 2030-2033.
- Sauret-Güeto S.** 2005. Estrategias genéticas para el estudio de la síntesis de isoprenoides en bacterias y plastos. *Doctoral Thesis (Universitat de Barcelona)*.
- Sauret-Güeto S, Botella-Pavia P, Flores-Perez U, Martinez-Garcia JF, San Roman C, Leon P, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2006a. Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**, 75-84.
- Sauret-Güeto S, Ramos-Valdivia A, Ibanez E, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2003. Identification of lethal mutations in Escherichia coli genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 408-415.
- Sauret-Güeto S, Uros EM, Ibanez E, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2006b. A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of Escherichia coli strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett* **580**, 736-740.
- Sauter A, Davies WJ, Hartung W.** 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot* **52**, 1991-1997.

- Saxena P, Hsieh YC, Alvarado VY, Sainsbury F, Saunders K, Lomonossoff GP, Scholthof HB.** 2011. Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmless. *Plant Biotechnol J* **9**, 703-712.
- Schaub P, Al-Babili S, Drake R, Beyer P.** 2005. Why is golden rice golden (yellow) instead of red? *Plant Physiol* **138**, 441-450.
- Schneider G, Lindqvist Y.** 1998. Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1385**, 387-398.
- Schuhr CA, Radykewicz T, Sagner S, Latzel C, Zenk MH, Arigoni D, Bacher A, Rohdich F, Eisenreich W.** 2003. Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev* **2**, 3-16.
- Seemann M, Bui BT, Wolff M, Tritsch D, Campos N, Boronat A, Marquet A, Rohmer M.** 2002. Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 4337-4339.
- Seemann M, Tse Sum Bui B, Wolff M, Miginiac-Maslow M, Rohmer M.** 2006. Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: direct thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG. *FEBS Lett* **580**, 1547-1552.
- Seemann M, Wegner P, Schunemann V, Bui BT, Wolff M, Marquet A, Trautwein AX, Rohmer M.** 2005a. Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J Biol Inorg Chem* **10**, 131-137.
- Seemann M, Wegner P, Schunemann V, Bui BT, Wolff M, Marquet A, Trautwein AX, Rohmer M.** 2005b. Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J Biol Inorg Chem* **10**, 131-137.
- Serban DE.** 2011. The gut microbiota in the metagenomics era: sometimes a friend, sometimes a foe. *Roum Arch Microbiol Immunol* **70**, 134-140.
- Shiba Y, Paradise EM, Kirby J, Ro DK, Keasling JD.** 2007. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metab Eng* **9**, 160-168.
- Shigi Y.** 1989. Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J Antimicrob Chemother* **24**, 131-145.
- Siegel RE.** 2008. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. *Respir Care* **53**, 471-479.
- Sikkema J, de Bont JA, Poolman B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**, 201-222.
- Sivy TL, Fall R, Rosenstiel TN.** 2011. Evidence of isoprenoid precursor toxicity in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 2376-2383.
- Somerville C, Koornneef M.** 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet* **3**, 883-889.
- Span I, Grawert T, Bacher A, Eisenreich W, Groll M.** 2012. Crystal structures of mutant IspH proteins reveal a rotation of the substrate's hydroxymethyl group during catalysis. *J Mol Biol* **416**, 1-9.

- Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S, Sahm H.** 1997. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12857-12862.
- Stahl W, Sies H.** 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 101-107.
- Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, Huber R, Bacher A, Rohdich F.** 2003a. Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem* **278**, 18401-18407.
- Steinbacher S, Kaiser J, Gerhardt S, Eisenreich W, Huber R, Bacher A, Rohdich F.** 2003b. Crystal structure of the type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **329**, 973-982.
- Stemmer WP.** 1994a. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391.
- Stemmer WP.** 1994b. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10747-10751.
- Stickforth P, Steiger S, Hess WR, Sandmann G.** 2003. A novel type of lycopene epsilon-cyclase in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *Arch Microbiol* **179**, 409-415.
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG.** 1999. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* **120**, 257-274.
- Sung WS, Lee IS, Lee DG.** 2007. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 1797-1804.
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H.** 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9879-9884.
- Takenoya M, Ohtaki A, Noguchi K, Endo K, Sasaki Y, Ohsawa K, Yajima S, Yohda M.** 2010. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding. *J Struct Biol* **170**, 532-539.
- Tamimi RM, Colditz GA, Hankinson SE.** 2009. Circulating carotenoids, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer. *Cancer Res* **69**, 9323-9329.
- Tang G, Hu Y, Yin SA, Wang Y, Dallal GE, Grusak MA, Russell RM.** 2012. beta-Carotene in Golden Rice is as good as beta-carotene in oil at providing vitamin A to children. *Am J Clin Nutr* **96**, 658-664.
- Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA.** 2009. Golden Rice is an effective source of vitamin A. *Am J Clin Nutr* **89**, 1776-1783.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, et al.** 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**, 1141-1160.
- Testa CA, Johnson LJ.** 2012. A whole-cell phenotypic screening platform for identifying methylerythritol phosphate pathway-selective inhibitors as novel antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4906-4913.

Tian L, Dixon RA. 2006. Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta* **224**, 496-507.

Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D. 2003. Functional analysis of beta- and epsilon-ring carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1320-1332.

Tian L, Musetti V, Kim J, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D. 2004. The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 402-407.

Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodriguez-Concepcion M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11626-11631.

Tomco PL, Tjeerdema RS. 2012. Photolytic versus microbial degradation of clomazone in a flooded California rice field soil. *Pest Manag Sci* **68**, 1141-1147.

Tsuchiya T, Ishibashi K, Terakawa M, Nishiyama M, Itoh N, Noguchi H. 1982. Pharmacokinetics and metabolism of fosmidomycin, a new phosphonic acid, in rats and dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **7**, 59-64.

Tuohy KM, Gougoulis C, Shen Q, Walton G, Fava F, Ramnani P. 2009. Studying the human gut microbiota in the trans-omics era--focus on metagenomics and metabonomics. *Curr Pharm Des* **15**, 1415-1427.

Ubersax JP, D. 2010. Genetically modified microbes producing isoprenoids.

Uh E, Jackson ER, San Jose G, Maddox M, Lee RE, Boshoff HI, Dowd CS. 2011. Antibacterial and antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their lipophilic analogs. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 6973-6976.

Umeda T, Tanaka N, Kusakabe Y, Nakanishi M, Kitade Y, Nakamura KT. 2010. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from Plasmodium falciparum. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**, 330-332.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195-200.

Umeno D, Tobias AV, Arnold FH. 2005. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 51-78.

Unno H, Yamashita S, Ikeda Y, Sekiguchi SY, Yoshida N, Yoshimura T, Kusunoki M, Nakayama T, Nishino T, Hemmi H. 2009. New role of flavin as a general acid-base catalyst with no redox function in type 2 isopentenyl-diphosphate isomerase. *J Biol Chem* **284**, 9160-9167.

Uros EM. 2009. Analisis molecular de mutantes de Escherichia coli resistentes al bloqueo en diferentes etapas de la ruta del metileritritol fosfato (MEP). *Tesis Doctoral (Universitat de Barcelona)*.

Vadali RV, Fu Y, Bennett GN, San KY. 2005. Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in Escherichia coli. *Biotechnol Prog* **21**, 1558-1561.

Volk R, Bacher A. 1991. Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J Biol Chem* **266**, 20610-20618.

Walsh C. 2003a. *Antibiotics: Actions, origins, resistance*. Washington: DC: ASM Press.

- Walsh C.** 2003b. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* **1**, 65-70.
- Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM.** 2009. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* **460**, 894-898.
- Wang W, Li J, Wang K, Huang C, Zhang Y, Oldfield E.** 2010a. Organometallic mechanism of action and inhibition of the 4Fe-4S isoprenoid biosynthesis protein GcpE (IspG). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11189-11193.
- Wang W, Tong TJ.** 1999. [The key enzyme of cholesterol synthesis pathway: HMG-CoA reductase and disease]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **30**, 5-9.
- Wang W, Wang K, Liu YL, No JH, Li J, Nilges MJ, Oldfield E.** 2010b. Bioorganometallic mechanism of action, and inhibition, of IspH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4522-4527.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT.** 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* **93**, 2325-2327.
- Ward JL, Baker JM, Llewellyn AM, Hawkins ND, Beale MH.** 2011. Metabolomic analysis of Arabidopsis reveals hemiterpenoid glycosides as products of a nitrate ion-regulated, carbon flux overflow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10762-10767.
- Wei KF, Chen J, Chen YF, Wu LJ, Jia WS.** 2012. [Molecular mechanism for dynamic regulation of endogenous ABA signal level]. *Yi Chuan* **34**, 296-306.
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H, von Lintig J.** 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* **211**, 846-854.
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P.** 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol* **147**, 367-380.
- Willer T, Lee H, Lommel M, Yoshida-Moriguchi T, de Bernabe DB, Venzke D, Cirak S, Schachter H, Vajsar J, Voit T, Muntoni F, Loder AS, Dobyns WB, Winder TL, Strahl S, Mathews KD, Nelson SF, Moore SA, Campbell KP.** 2012. ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet* **44**, 575-580.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ.** 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Witschel MC, Hoffken HW, Seet M, Parra L, Mietzner T, Thater F, Niggeweg R, Rohl F, Illarionov B, Rohdich F, Kaiser J, Fischer M, Bacher A, Diederich F.** 2011. Inhibitors of the herbicidal target IspD: allosteric site binding. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 7931-7935.
- Wolfertz M, Sharkey TD, Boland W, Kuhnemann F.** 2004. Rapid regulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway during isoprene synthesis. *Plant Physiol* **135**, 1939-1945.
- Woo YH, Fernandes RP, Proteau PJ.** 2006. Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Bioorg Med Chem* **14**, 2375-2385.
- Wungsintaweeikul J, Herz S, Hecht S, Eisenreich W, Feicht R, Rohdich F, Bacher A, Zenk MH.** 2001. Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **268**, 310-316.
- Wurtzel ET, Cuttriss A, Vallabhaneni R.** 2012. Maize provitamin a carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Front Plant Sci* **3**, 29.

- Wurtzel ET, Valdez G, Matthews PD.** 1997. Variation in expression of carotenoid genes in transformed *E. coli* strains. *Biores J* **1**, 1-11.
- Xia Z, Zhu Z, Zhu J, Zhou R.** 2009. Recognition mechanism of siRNA by viral p19 suppressor of RNA silencing: a molecular dynamics study. *Biophys J* **96**, 1761-1769.
- Xiao Y, Savchenko T, Baidoo EE, Chehab WE, Hayden DM, Tolstikov V, Corwin JA, Kliebenstein DJ, Keasling JD, Dehesh K.** 2012. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell* **149**, 1525-1535.
- Xie X, Yoneyama K.** 2010. The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 93-117.
- Xue J, Ahning BK.** 2011. Enhancing isoprene production by genetic modification of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2399-2405.
- Yajima S, Hara K, Iino D, Sasaki Y, Kuzuyama T, Ohsawa K, Seto H.** 2007. Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 466-470.
- Yamamoto HY.** 2006. Functional roles of the major chloroplast lipids in the violaxanthin cycle. *Planta* **224**, 719-724.
- Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S.** 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem* **270**, 25328-25331.
- Ye X, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I.** 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303-305.
- Yokota A, Sasajima K.** 1986. formation of 1-deoxy-ketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 2517-2524.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5046-5054.
- Yoon KW, Doo EH, Kim SW, Park JB.** 2008. In situ recovery of lycopene during biosynthesis with recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **135**, 291-294.
- Yoon SH, Kim JE, Lee SH, Park HM, Choi MS, Kim JY, Lee SH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW.** 2007. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 131-139.
- Yoon SH, Lee YM, Kim JE, Lee SH, Lee JH, Kim JY, Jung KH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW.** 2006. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng* **94**, 1025-1032.
- Yuan LZ, Rouviere PE, Larossa RA, Suh W.** 2006. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng* **8**, 79-90.
- Yun UW, Yan Z, Amir R, Hong S, Jin YW, Lee EK, Loake GJ.** 2012. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambial meristematic cells. *Biotechnol Genet Eng Rev* **28**, 47-59.
- Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH.** 2012. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J Invest Surg* **25**, 67-77.

Zeidler J, Schwender J, Mueller C, 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**, 796-798.

Zhang B, Watts KM, Hodge D, Kemp LM, Hunstad DA, Hicks LM, Odom AR. 2011. A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochemistry* **50**, 3570-3577.

Zhang S, Pohnert G, Kongsaree P, Wilson DB, Clardy J, Ganem B. 1998. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J Biol Chem* **273**, 6248-6253.



Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways

Antía Rodríguez-Villalón^{a,b}, Jordi Pérez-Gil^{a,b}, Manuel Rodríguez-Concepción^{a,b,*}

^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Laboratori de Genètica Molecular Vegetal, Consorci CSIC-IRTA, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2007

Received in revised form 14 February 2008

Accepted 22 February 2008

Keywords:

Carotenoids

Isoprenoids

Metabolic engineering

Methylerythritol 4-phosphate pathway

Mevalonate pathway

ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid pigments of industrial and nutritional interest. Although they are produced in non-carotenogenic *Escherichia coli* engineered with the appropriate biosynthetic genes, only a limited pool of their metabolic precursors is available in these bacteria. We have compared the production of carotenoids (lycopene) in strains in which the supply of precursors was enhanced either by upregulating the endogenous pathway via overexpression of deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS) or by incorporating an exogenous MVA⁺ operon. In strains expressing DXS under the control of a leaky IPTG-inducible promoter, lycopene accumulation was increased up to 8-fold in the absence of inducer. Addition of IPTG, however, negatively affected lycopene production. Although induction of too high levels of the MVA⁺ operon enzymes also appeared to cause interference with cell metabolism, supplementation with mevalonate (to be metabolized into carotenoid precursors) resulted in a 10-fold increase in lycopene levels in cells with a near wild-type background. An additional 2-fold increase (up to 228 mg/l) was obtained using an engineered BL21 strain. These results confirm that the MVA⁺ pathway is most convenient to upregulate the production of carotenoids (lycopene) production in *E. coli* but that factors other than precursor supply should be considered for high pigment accumulation levels.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Carotenoids are an abundant group of isoprenoid pigments synthesized by all photosynthetic organisms and some non-photosynthetic bacteria and fungi. Animals do not synthesize carotenoids de novo but take them from their diet as an essential source of vitamin A and retinoids. Carotenoids such as lycopene also act as natural antioxidants that help to prevent some types of human cancer and degenerative diseases (Fraser and Bramley, 2004). Besides their activity as pro-vitamin A and their potential as nutraceuticals, the colorant and aromatic properties of some carotenoids and derived compounds have an important industrial value (Bartley and Scolnik, 1995; Hirschberg, 2001; Sandmann, 2001; Fraser and Bramley, 2004). Most commercial carotenoids are obtained by chemical synthesis, but the growing demand of natural

additives has spurred several metabolic engineering approaches to increase carotenoid production in plants and microorganisms (Lee and Schmidt-Dannert, 2002; Fraser and Bramley, 2004; Botella-Pavía and Rodríguez-Concepción, 2006). Carotenoids have been successfully produced even in non-carotenogenic bacteria such as *Escherichia coli* after transformation with appropriate genes from carotenogenic organisms (Fig. 1). However, important problems remain to be solved to efficiently overproduce carotenoids in non-carotenogenic hosts. One of such problems is the supply of their metabolic precursors.

Structurally carotenoids are tetraterpenes derived from the 5-carbon units isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP), the universal precursors of all isoprenoid compounds (Cunningham and Gantt, 1998). IPP and DMAPP can be interconverted by the enzyme IPP/DMAPP isomerase (IDI). The addition of three molecules of IPP to one DMAPP unit catalyzed by the enzyme geranylgeranyl diphosphate (GGPP) synthase (GDS) yields GGPP, the immediate precursor for carotenoids (Fig. 1). There are two pathways for the synthesis of these prenyl diphosphates: the mevalonic acid (MVA) pathway and the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway (Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Eisenreich et al., 2004). Archaeobacteria, fungi and animals synthesize their isoprenoids exclusively through the operation of the MVA

Abbreviations: DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; DXS, DXP synthase; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; MVA, mevalonic acid.

* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934006100; fax: +34 932045904.

E-mail address: mrcgmp@ibmb.csic.es (M. Rodríguez-Concepción).

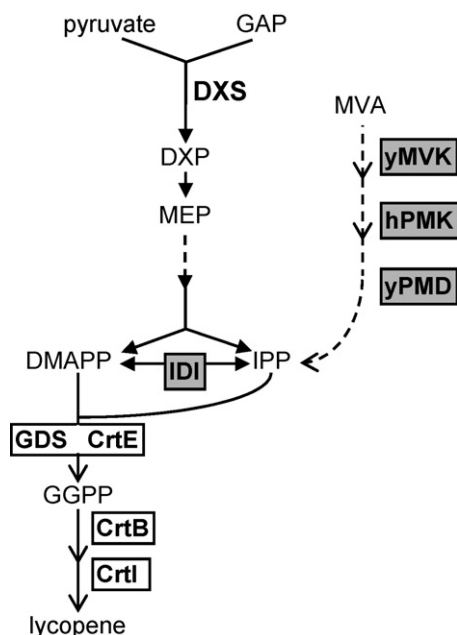


Fig. 1. Pathways involved in lycopene biosynthesis in engineered *E. coli* cells. GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; MVA, mevalonic acid; DXS, DXP synthase. The enzymes encoded by the MVA+ operon are boxed in gray: yMVK, yeast mevalonate kinase; hPMK, human 5-phosphomevalonate kinase; yPMD, yeast 5-diphosphomevalonate decarboxylase; IDI, *E. coli* IPP/DMAPP isomerase. The enzymes encoded by the pLYC plasmid are boxed in white: CrtE, GGPP synthase (GDS); CrtB, phytoene synthase; CrtI, phytoene desaturase.

pathway, whereas the MEP pathway is the only one present in most eubacteria, including *E. coli* (revised in Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002).

The first reaction of the MEP pathway (Fig. 1) is the production of deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate, catalyzed by DXP synthase (DXS). Many studies have reported a positive correlation between DXS levels and carotenoid production in bacteria (Albrecht et al., 1999; Harker and Bramley, 1999; Cunningham et al., 2000; Jones et al., 2000; Matthews and Wurtzel, 2000; Kim and Keasling, 2001; Kang et al., 2005; Yuan et al., 2006) and plants (Estévez et al., 2001; Botella-Pavía et al., 2004; Enfissi et al., 2005; Carretero-Paulet et al., 2006). Furthermore, upregulation of DXS levels also results in increased accumulation of other MEP-derived isoprenoids such as monoterpenes, diterpenes, sesquiterpenes, and the prenyl tail of ubiquinone in bacteria (Harker and Bramley, 1999; Martin et al., 2003; Reiling et al., 2004; Kim et al., 2006) and chlorophylls, tocopherols, taxadiene, cytokinins, gibberellins, and essential oils in plant cells (Estévez et al., 2001; Botella-Pavía et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Morris et al., 2006; Muñoz-Bertomeu

et al., 2006), confirming that the effect of DXS overexpression on carotenoid levels is due to an enhanced production of their metabolic precursors. Although increasing the levels of other individual MEP pathway enzymes has sometimes been reported to result in enhanced carotenoid production in *E. coli* cells, the increase was always lower than that achieved by DXS overexpression (Albrecht et al., 1999; Cunningham et al., 2000; Miller et al., 2000; Kim and Keasling, 2001; Yuan et al., 2006). DXS therefore appears to be the most appropriate enzyme to overexpress in order to increase the production of IPP and DMAPP by the endogenous MEP pathway in *E. coli*. Activities downstream the MEP pathway such as IDI and GDS (Fig. 1) have also been shown to be limiting for carotenoid synthesis in engineered *E. coli* cells (Kajiwar et al., 1997; Albrecht et al., 1999; Wang et al., 1999; Cunningham et al., 2000).

Disruption of the gene encoding DXS or any other MEP pathway enzyme is lethal in *E. coli* cells but it can be rescued by engineering a synthetic operon harboring heterologous MVA pathway genes required to transform exogenously supplied MVA into IPP (Campos et al., 2001) (Fig. 1). The endogenous IDI activity of *E. coli* can produce DMAPP from MVA-derived IPP. Nevertheless, the introduction of the bacterial *idi* gene into the synthetic operon to create the MVA+ operon resulted in improved growth, likely because the production of high IPP levels is toxic for bacterial cells (Campos et al., 2001; Martin et al., 2003). The MVA+ operon, under the transcriptional control of the arabinose-induced P_{BAD} promoter, is amenable to a high degree of control (Campos et al., 2001). A similar operon was shown to produce very high levels of IPP and DMAPP molecules from the MVA added to the growth medium and to outperform DXS overexpression for improving amorphanthene production in bacteria (Martin et al., 2003). It is not known, however, to what extent the accumulation of carotenoids in *E. coli* cells is limited by the supply of isoprenoid precursors. Here we have standardized the experimental conditions with *E. coli* cells harboring the MVA+ operon and a plasmid to synthesize lycopene from IPP and DMAPP to compare the accumulation of lycopene after upregulating the supply of precursors via the endogenous MEP pathway or the synthetic MVA+ operon.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Plasmids and strains used in this study are included in Table 1. The MVA+ synthetic operon from strain EcAB4-1 (Sauret-Güeto et al., 2006) was incorporated into the genome of the BL21 (DE3) strain by phage P1 transduction to construct strain EcAM5-1. Competent cells were transformed with plasmid pACCRT-EIB (here designated pLYC) harboring the *Erwinia uredovora* (currently named *Pantoea ananatis*) *crtE*, *crtB* and *crtI* genes for lycopene synthesis (Cunningham et al., 1993) and, when indicated, plasmid pTAC-ORF2 (here designated pTAC-DXS) containing the *E.*

Table 1
Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Antibiotic marker	Reference
Plasmids			
pLYC	pACCRT-EIB, with <i>crtE</i> , <i>crtB</i> and <i>crtI</i> genes	Chloramphenicol	Cunningham et al. (1993)
pTAC-DXS	pTAC-ORF2, with a IPTG-inducible <i>dxs</i> gene	Ampicillin	Lois et al. (1998)
Strains			
K12 MG1655	F-lambda- <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>	None	Blattner et al. (1997)
EcAB4-1	K12 MG1655 with an arabinose-inducible MVA+ operon	Kanamycin	Sauret-Güeto et al. (2006)
BL21(DE3)	B F- <i>dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λ</i> (DE3)	None	Stratagene
EcAM5-1	BL21(DE3) with an arabinose-inducible MVA+ operon	Kanamycin	This work

coli dxs gene under the control of an IPTG-inducible promoter (Lois et al., 1998). All strains were grown at 37 °C in Luria broth (LB) medium supplemented with antibiotics to final concentrations of 25 µg/ml kanamycin (Km, to select for the MVA⁺ operon), 17 µg/ml chloramphenicol (Cm, to select for the pLYC plasmid) or/and 100 µg/ml ampicillin (Ap, to select for the pTAC-DXS plasmid). When indicated, the growth medium was supplemented with arabinose and MVA prepared as described (Campos et al., 2001). Bacterial growth in liquid media was monitored by measuring optical density at 600 nm (OD₆₀₀). When required, the culture was diluted to enable photometric measurement in the linear range (OD₆₀₀ = 0.1–0.5).

2.2. Quantification of lycopene production

Fresh LB medium containing the appropriate supplements was inoculated with 0.01 volumes of overnight cultures of several independent colonies from each *E. coli* strain and grown at 37 °C. After quantifying cell growth (OD₆₀₀), a 1.3 ml aliquot of the culture was centrifuged at 13,000 × *g* for 3 min and the cell pellet was resuspended in 700 µl of acetone. The samples were incubated at 55 °C for 15 min in the dark and then centrifuged at 13,000 × *g* for 10 min to recover the supernatant with the pigment, which was placed in a clean tube. At least two samples were taken from each culture for lycopene extraction. When necessary, up to three extractions in acetone were performed to remove all color from the cell pellet of a single sample. In this case, the supernatants of the different extractions were pooled. Lycopene was quantified as described (Harker and Bramley, 1999) by measuring absorbance at 472 nm of diluted supernatants in acetone and comparing with a standard curve made with known concentrations of a lycopene standard (Sigma).

3. Results and discussion

3.1. Induction of too high DXS levels negatively impacts lycopene accumulation in *E. coli*

The most direct strategy to increase the supply of precursors for carotenoid production in *E. coli* is engineering the endogenous MEP pathway. Although increased levels of several MEP pathway enzymes has been reported to result in enhanced carotenoid production in *E. coli* cells, the increase was always highest with DXS (Albrecht et al., 1999; Cunningham et al., 2000; Miller et al., 2000; Kim and Keasling, 2001; Yuan et al., 2006), supporting that DXS catalyzes the main flux-controlling step of the MEP pathway. We therefore selected DXS as the most appropriate enzyme to overexpress in order to efficiently upregulate the endogenous MEP pathway for the production of IPP and DMAPP in *E. coli*.

E. coli K12 MG1655 cells with a genomic copy of the MVA⁺ operon (strain EcAB4-1) (Sauret-Güeto et al., 2006) were transformed with the pLYC plasmid harboring the *Erwinia uredovora* genes required to synthesize lycopene from IPP and DMAPP (Table 1 and Fig. 1). Successful transformants were identified based on their double antibiotic resistance and the red color imparted by lycopene production. The presence of the *E. coli idi* gene in the MVA⁺ operon (Campos et al., 2001) and the *E. uredovora crtE* gene in the pLYC plasmid (Cunningham et al., 1993) ensured that carotenoid production was not limited by the endogenous IDI or GDS activities in EcAB4-1 pLYC cells. Competent EcAB4-1 pLYC cells were then transformed with the pTAC-DXS plasmid (Table 1), in which the expression of the *E. coli dxs* gene is under the control of an IPTG-inducible promoter (Lois et al., 1998), or an empty pTAC vector. Several overnight cultures of pigmented colonies of each strain in media without IPTG were used to inoculate fresh liquid media and quantify the production of lycopene in the presence or absence of IPTG.

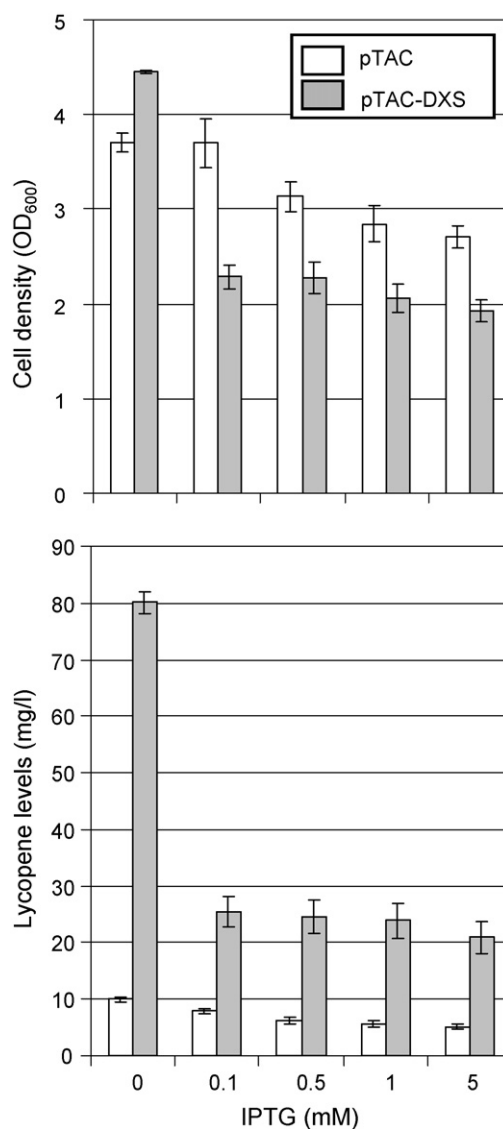


Fig. 2. Effect of DXS overexpression on cell growth and lycopene levels in EcAB4-1 pLYC cells. Liquid media (10 ml) supplemented with the indicated concentrations of IPTG was inoculated with 0.1 ml of overnight cultures of EcAB4-1 pLYC cells harboring the pTAC-DXS plasmid (gray columns) or an empty pTAC vector (white columns) and grown overnight at 37 °C. Cell growth was determined by optical density at 600 nm (OD₆₀₀) and lycopene content was calculated by measuring the absorbance at 472 nm of acetone extracts of the cells and comparison with a standard curve. Mean values and standard errors corresponding to four independent experiments with several replicas each are represented.

In the absence of IPTG, overnight cultures of EcAB4-1 pLYC pTAC-DXS cells accumulated 8-fold higher lycopene levels compared to control cells harboring the pTAC plasmid (Fig. 2). Upregulation of DXS levels in *E. coli* cells using different expression vectors have been reported to result in typically 2–5-fold increases in lycopene accumulation (Harker and Bramley, 1999; Cunningham et al., 2000; Jones et al., 2000; Kim and Keasling, 2001; Reiling et al., 2004; Kang et al., 2005). The use of the pTAC-DXS construct, however, was shown to lead to 7-fold higher lycopene levels in *E. coli* colonies grown in the absence of IPTG (Matthews and Wurtzel, 2000), an increase similar to that reported here in liquid cultures (Fig. 2). The pTAC vectors lack tight control of the basal expression level from the strong *P*_{tac} promoter, leading to DXS expression in the absence of induction by IPTG. Addition of IPTG to the growth media, however, resulted in much lower increases in lycopene

accumulation (Fig. 2). Low concentrations of the inducer (0.1 mM) had no effect on the growth of control EcAB4-1 pLYC pTAC cells but it dramatically reduced growth of EcAB4-1 pLYC pTAC-DXS cells to 50% compared to that in the absence of IPTG (Fig. 2). Addition of higher concentrations of IPTG progressively decreased growth of both strains (Fig. 2). The strong negative effect of IPTG on cell growth and lycopene production in *E. coli* cells expressing DXS under a strong inducible promoter has been repeatedly observed by other authors using different strains and constructs (Matthews and Wurtzel, 2000; Jones et al., 2000; Kim and Keasling, 2001). It has been suggested that production of excess DXS levels might divert a substantial amount of its substrates pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate to the MEP pathway and prevent their use in other central metabolic pathways. This, together with the energetic requirements associated to the production of high protein levels, might compromise the energetic and metabolic resources of the cell. Additionally, the production of a single molecule of lycopene requires 8 molecules of pyruvate, 8 glyceraldehyde 3-phosphate, 8 CTP, 8 ATP, and 16 NADPH (Alper et al., 2005) and the development of storage structures for such a lipophilic compound is also expensive in energetic terms. It is therefore expected that the metabolic burden likely caused by DXS overexpression has a negative impact on the production and accumulation of lycopene. Together, our data show that high increases in lycopene production can be achieved in EcAB4-1 pLYC pTAC-DXS cells, which accumulated up to 80 mg of lycopene per liter of culture. However, manipulation of the endogenous MEP pathway in *E. coli* by altering DXS levels may have effects on cell metabolism that are difficult to control, resulting in suboptimal production of lycopene.

3.2. An exogenous supply of isoprenoid precursors dramatically increases lycopene accumulation

To better determine the influence of highly increased IPP and DMAPP levels on the production of lycopene in bacteria, we took advantage of the MVA+ operon. The transformation of exogenously supplied MVA into IPP and DMAPP by the MVA+ operon enzymes was expected to have little or no interference with the endogenous cell metabolism in EcAB4-1 pLYC cells, as bacteria do not produce MVA or have the enzymes to metabolize it into isoprenoid precursors. Because the MVA+ operon is under the control of the arabinose-induced P_{BAD} promoter (Campos et al., 2001), we first tested the influence of the concentration of arabinose in the accumulation of lycopene in overnight EcAB4-1 pLYC cultures. As expected, cells grown in media supplemented with 1 mM MVA and different concentrations of arabinose (from 0.1 to 1%) accumulated more lycopene than cells grown without the inducer (Fig. 3). However, lycopene accumulation was highest at the lowest concentration of arabinose tested (0.1%), reaching levels that were ca. 4-fold higher than those measured in the absence of inducer. No effect on cell growth was observed at this concentration of the inducer. Although increasing concentrations of arabinose did have an inhibitory effect on cell growth, the decrease in cell growth was not as dramatic as that observed for lycopene accumulation (Fig. 3). Both total and normalized (in a per cell basis) lycopene levels decreased in an arabinose concentration-dependent manner. It is therefore possible that inducing the production of high levels of MVA+ operon enzymes could actually interfere with cell metabolism. Alternatively, the inhibitory effect on growth and lycopene accumulation observed in EcAB4-1 pLYC cultures grown in the presence of high arabinose concentrations might be derived from the production of excess IPP and DMAPP that cannot be efficiently channeled to the production of lycopene and become toxic for the cell (Campos et al., 2001; Martin et al., 2003).

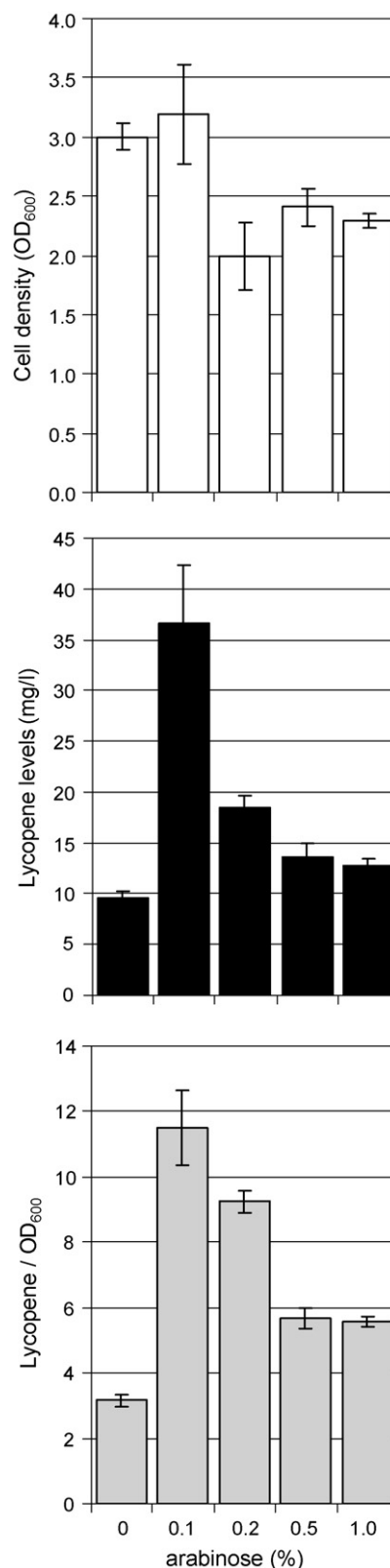


Fig. 3. Influence of arabinose concentration on cell growth and lycopene accumulation in EcAB4-1 pLYC cultures. Liquid media (10 ml) containing 1 mM MVA and different concentrations of arabinose (from 0 to 1%) were inoculated with 0.1 ml of overnight cultures of EcAB4-1 pLYC cells in media lacking arabinose and MVA and grown overnight at 37 °C. Cell growth (white columns) and lycopene content (black columns) were measured as described in Fig. 2. Lycopene levels normalized to cell density are also shown (gray columns). Mean values and standard errors from two replicates of two independent cultures are shown.

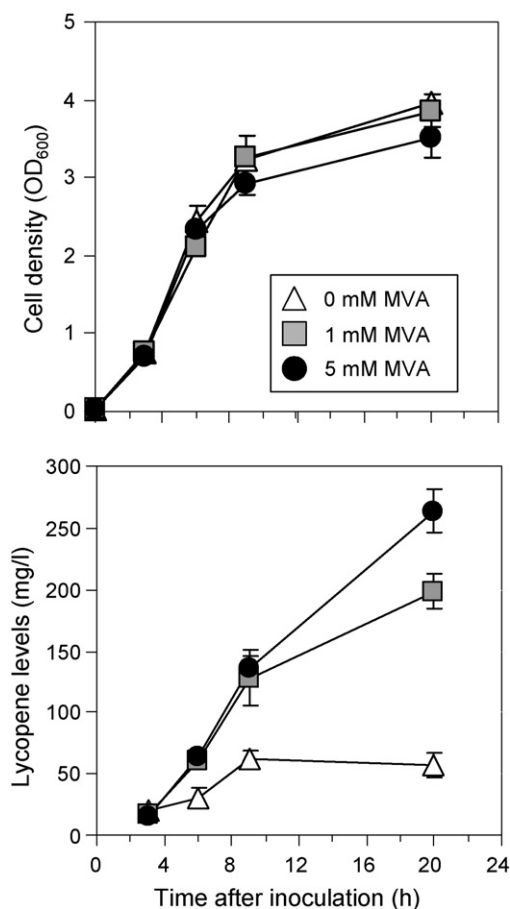


Fig. 4. Time course of cell growth and lycopene accumulation in EcAB4-1 pLYC cultures. Liquid media (100 ml) containing 0.1% arabinose and either supplemented or not with MVA were inoculated with 1 ml of overnight cultures of EcAB4-1 pLYC cells in media lacking arabinose and MVA and grown at 37 °C. At the indicated times, 1 ml samples were collected and used to measure cell growth and lycopene content as described in Fig. 2. Mean values and standard errors from two replicates of two independent cultures are shown.

To distinguish between these two possibilities, we grew EcAB4-1 pLYC cells in media supplemented with 0.1% arabinose and two concentrations of MVA (1 and 5 mM) and monitored the time-course of growth and lycopene accumulation. As shown in Fig. 4, lycopene accumulation in EcAB4-1 pLYC cultures grown in liquid medium supplemented with 0.1% arabinose but no MVA reached a maximum level at the end of the exponential growth phase. When 1 mM MVA was included in the medium, cells accumulated significantly higher lycopene levels during their exponential growth and they continued synthesizing this carotenoid when reaching the stationary phase. No effect was observed in cell growth (Fig. 4), consistent with our previous results (Fig. 3). When the concentration of MVA added to the growth medium was increased to 5 mM, a slight inhibition of growth was observed when cells were reaching the stationary stage (Fig. 4). Lycopene accumulation during the stages of active cell growth was similar in media supplemented with 1 mM or 5 mM MVA. In overnight (20 h) cultures, however, lycopene levels in cultures supplemented with 5 mM MVA were significantly higher than those measured in cultures supplemented with 1 mM MVA (Fig. 4). It is therefore possible that the decrease of cell growth observed in overnight cultures might be caused by a deleterious effect of increased accumulation of hydrophobic lycopene molecules within bacterial cells. Together, the fact that lycopene accumulation was negatively correlated with arabi-

nose concentration in the medium (Fig. 3) but positively correlated with MVA concentration (Fig. 4) supports that excess levels of the enzymes encoded by the MVA⁺ operon cause interference with cell metabolism and eventually result in a lower production of lycopene. Our results also support that an enhanced production of MVA-derived IPP and DMAPP only marginally affects growth of EcAB4-1 pLYC cells, possibly because a large proportion of these precursors is efficiently channeled to the biosynthesis of lycopene.

We next determined the maximum level of lycopene that could be produced in overnight (20 h) cultures of EcAB4-1 pLYC cells with an excess supply of MVA. As shown in Fig. 5, some inhibition of

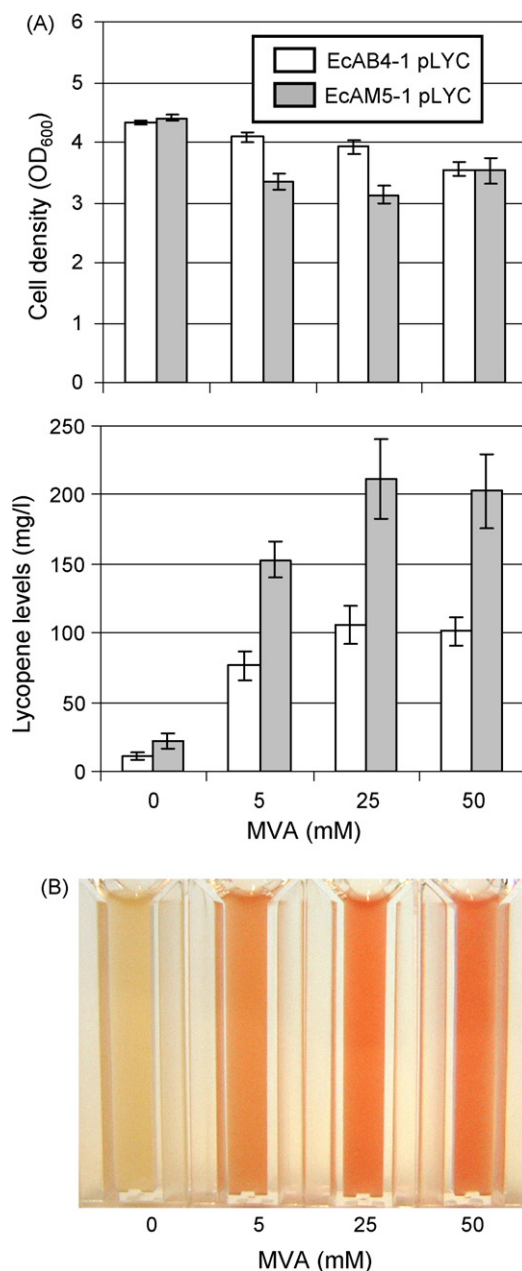


Fig. 5. Cell growth and lycopene levels in MVA-supplemented cultures. Liquid media (10 ml) containing 0.1% arabinose and the indicated concentrations of MVA were inoculated with 0.1 ml of overnight cultures of EcAB4-1 pLYC (white columns) or EcAM5-1 pLYC (gray columns) strains in media lacking arabinose and MVA and grown overnight at 37 °C. Cell growth and lycopene levels (A) were measured as described in Fig. 2. Mean values and standard errors correspond to two replicates of at least four independent cultures. Aliquots of EcAM5-1 pLYC cultures grown in the presence of the indicated concentrations of MVA are also shown (B).

cell growth was observed as the amount of MVA added to the growth medium increased. By contrast, the production of lycopene in overnight EcAB4-1 pLYC cultures was highly increased with MVA concentration up to 25 mM, reaching levels that were 10-fold higher than those measured in the absence of MVA (Fig. 5). No significant increases were observed when MVA concentration was doubled to 50 mM, suggesting that factors other than precursor supply might be limiting lycopene production under these conditions. Since only a fraction of the supplied MVA appears to be eventually metabolized into lycopene (Yoon et al., 2006), improved production of lycopene by increasing addition of MVA to the growth medium might be at least in part due to a facilitated import into *E. coli* cells (which do not have a transport system for MVA) by simple diffusion.

3.3. Further increases in lycopene accumulation can be achieved by optimizing factors other than precursor supply

Because the genetic background can substantially influence lycopene accumulation in *E. coli* cells (Wurtzel et al., 1997; Kim and Keasling, 2001; Vadali et al., 2005; Yuan et al., 2006), we investigated the production of lycopene in a different *E. coli* strain. When the MVA+ operon was transduced from the K12 MG1655 wild-type background of the EcAB4-1 strain to BL21 (DE3) cells to create strain EcAM5-1 (Table 1), a significant increase in lycopene levels (ca. 2-fold) was observed in EcAM5-1 pLYC cells compared to EcAB4-1 pLYC cells at all the concentrations of MVA tested (Fig. 5). Similarly to that shown for EcAB4-1 pLYC, however, lycopene levels in EcAM5-1 pLYC cells reached a maximum at 25 mM MVA (Fig. 5). These results confirm that the enzymes expressed in *E. coli* cells harboring the pLYC plasmid can channel an enhanced supply of metabolic precursors (IPP and DMAPP) to the production of lycopene until other factors become limiting for its accumulation.

A question arising from our results is why carotenoid accumulation in the BL21 background of the EcAM5-1 strain was improved relative to the near wild-type background of EcAB4-1 cells. No obvious correlation has been found between genetic markers and carotenoid accumulation (Wurtzel et al., 1997). However, because the K12 MG1655 strain has been maintained with minimal genetic modifications, whereas BL21 is the most widely used host background for overexpression of foreign recombinant proteins and is deficient in both Lon and OmpT proteases, it is likely that the mutations in EcAM5-1 cells result in a more appropriate expression of the heterologous genes introduced in the MVA+ operon and the pLYC plasmid or/and an increased stability of the encoded proteins compared to EcAB4-1. Alternatively, EcAM5-1 cells might be able to more efficiently meet the metabolic (energy) and physical (storage) requirements associated with an upregulated production of lycopene. Attempts to control and optimize the production of the enzymes required to synthesize lycopene from its prenyl diphosphate precursors have shown that low levels of such enzymes are enough for efficient lycopene synthesis in rich media, whereas too high levels can actually be deleterious for cell growth and lycopene accumulation (Ruther et al., 1997; Yoon et al., 2006; Yoon et al., 2007). Much less is known about how carotenoid storage can be improved in bacteria.

Our results confirm that engineering an exogenous pathway for enhanced IPP and DMAPP biosynthesis results in higher carotenoid (lycopene) production and less interference with the metabolism of *E. coli* cells when compared to upregulating the levels of enzymes (DXS) of the endogenous MEP pathway. Under our growth conditions, EcAM5-1 pLYC cells accumulated up to 228 mg of lycopene per liter of overnight culture, an impressive 20-fold increase compared to the levels measured in EcAB4-1 pLYC cells grown in the absence of MVA (Fig. 5). Further optimization of growth conditions, vectors, and host strains should result in even higher production

of lycopene. In any case, the increase in lycopene accumulation observed in EcAB4-1 pLYC and EcAM5-1 pLYC cells grown in the presence of MVA is substantially higher than that reported for *E. coli* DH5 α cells harboring a plasmid-bound IPTG-inducible MVA+ operon from *Streptococcus pneumoniae* (Yoon et al., 2006, 2007). The use of a “complete” MVA operon with all the *Streptomyces* genes required to convert acetyl coenzyme-A (produced by the bacteria) into IPP and DMAPP (Takagi et al., 2000) has been found to only result in increased lycopene production in *E. coli* strains in which the acetate pathway is inactivated (Vadali et al., 2005). However, further work is required to establish whether a complete MVA pathway constructed with genes from other species and with a fine control of its expression might allow to significantly increase the production of lycopene in rich media with no added MVA without compromising the metabolic balance of *E. coli* cells.

Acknowledgements

We thank Kirin Brewery Co for the pACCRT-EIB (pLYC) plasmid and Anna Orozco for valuable technical assistance. The help and advice of the staff of the Serveis Científicotècnics of the Universitat de Barcelona and the Consorci CSIC-IRTA are greatly appreciated. This work was supported in part by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER (BIO2005-00367) and Generalitat de Catalunya (Distinció) to MRC. ARV and JPG received Ph.D. fellowships of the Generalitat de Catalunya FI program and the Ministerio de Educación y Ciencia FPI program, respectively.

References

- Albrecht, M., Misawa, N., Sandmann, G., 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids beta-carotene and zeaxanthin. *Biotechnol. Lett.* 21, 791–795.
- Alper, H., Jin, Y.S., Moxley, J.F., Stephanopoulos, G., 2005. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 7, 155–164.
- Bartley, G.E., Scolnik, P.A., 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7, 1027–1038.
- Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1474.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M., 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 40, 188–199.
- Botella-Pavía, P., Rodríguez-Concepción, M., 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plant* 126, 369–381.
- Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Sauret-Gueto, S., Gallego, F., Lois, L.M., 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.
- Carretero-Paulet, L., Cairo, A., Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Campos, N., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M., 2006. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol. Biol.* 62, 683–695.
- Cunningham, F.X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E., Hirschberg, J., 1993. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene. *FEBS Lett.* 328, 130–138.
- Cunningham, F.X., Gantt, E., 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557–583.
- Cunningham Jr., F.X., Lafond, T.P., Gantt, E., 2000. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182, 5841–5848.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F., 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1401–1426.
- Enfissi, E.M.A., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W., Bramley, P.M., 2005. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotech. J.* 3, 17–27.

- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., León, P., 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276, 22901–22909.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43, 228–265.
- Harker, M., Bramley, P.M., 1999. Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 448, 115–119.
- Hirschberg, J., 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 210–218.
- Jones, K.L., Kim, S.W., Keasling, J.D., 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab. Eng.* 2, 328–338.
- Kajiwarra, S., Fraser, P.D., Kondo, K., Misawa, N., 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324, 421–426.
- Kang, M.J., Lee, Y.M., Yoon, S.H., Kim, J.H., Ock, S.W., Jung, K.H., Shin, Y.C., Keasling, J.D., Kim, S.W., 2005. Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 636–642.
- Kim, S.W., Keasling, J.D., 2001. Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 408–415.
- Kim, S.J., Kim, M.D., Choi, J.H., Kim, S.Y., Ryu, Y.W., Seo, J.H., 2006. Amplification of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase level increases coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 982–985.
- Lee, P.C., Schmidt-Dannert, C., 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 1–11.
- Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 47–65.
- Lois, L.M., Campos, N., Putra, S.R., Danielsen, K., Rohmer, M., Boronat, A., 1998. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2105–2110.
- Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21, 796–802.
- Matthews, P.D., Wurtzel, E.T., 2000. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 396–400.
- Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W., 2000. Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 481, 221–226.
- Morris, W.L., Ducreux, L.J., Hedden, P., Millam, S., Taylor, M.A., 2006. Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J. Exp. Bot.* 57, 3007–3018.
- Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R., Segura, J., 2006. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.* 142, 890–900.
- Reiling, K.K., Yoshikuni, Y., Martin, V.J., Newman, J., Bohlmann, J., Keasling, J.D., 2004. Mono and diterpene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 200–212.
- Rodríguez-Concepción, M., 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, 1079–1089.
- Ruther, A., Misawa, N., Boger, P., Sandmann, G., 1997. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 162–167.
- Sandmann, G., 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 4–12.
- Sauret-Güeto, S., Urós, E.M., Ibáñez, E., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M., 2006. A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett.* 580, 736–740.
- Takagi, M., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Seto, H., 2000. A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *J. Bacteriol.* 182, 4153–4157.
- Vadali, R.V., Fu, Y., Bennett, G.N., San, K.Y., 2005. Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 21, 1558–1561.
- Wang, C.W., Oh, M.K., Liao, J.C.R.A., Links, 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 235–241.
- Wurtzel, E.T., Valdez, G., Matthews, P.D., 1997. Variation in expression of carotenoid genes in transformed *E. coli* strains. *Biores. J.* 1, 1–11.
- Yoon, S.H., et al., 2006. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 1025–1032.
- Yoon, S.H., et al., 2007. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 131–139.
- Yuan, L.Z., Rouviere, P.E., Larossa, R.A., Suh, W., 2006. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab. Eng.* 8, 79–90.



Contribution of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase to carotenoid biosynthesis in bacteria and plants

Úrsula Flores-Pérez^{a,b,1}, Jordi Pérez-Gil^{a,b,1}, Antía Rodríguez-Villalón^{a,b}, María José Gil^c, Pablo Vera^c, Manuel Rodríguez-Concepción^{a,b,*}

^a Departament de Genètica Molecular de Plantes, Consorci CSIC-IRTA, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^b Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^c Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), UPV-CSIC, Camí de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2008

Available online 29 April 2008

Keywords:

Carotenoids

Isoprenoids

Metabolic engineering

Methylerythritol 4-phosphate pathway

Hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase

ABSTRACT

The methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway synthesizes the precursors of carotenoids and other isoprenoids in bacteria and plant plastids. Despite recent progress in the identification of rate-determining steps, the relative contribution of most pathway enzymes to flux control remains to be established. In this work we investigated whether upregulated levels of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (HDS) could increase the metabolic flux through this pathway, as judged by endpoint (carotenoid) measurements. Unlike other MEP pathway enzymes, however, increasing the levels of an active HDS protein in carotenoid-producing *Escherichia coli* cells and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants did not result in an enhanced accumulation of MEP-derived isoprenoids. Our data suggest that enhanced flux through the MEP pathway for peak demand periods in bacteria and plastids does not require increased HDS activity.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Isoprenoids (also called terpenoids) are essential in all organisms but are particularly abundant and diverse in plants. Some act as primary metabolites in respiration, photosynthesis, and in the regulation of growth and development, but the bulk of plant isoprenoids are secondary metabolites that modulate the interaction of plants with their environment [1–3]. Despite their functional and structural diversity, all isoprenoids derive from the same five-carbon building blocks, isopentenyl diphosphate (IPP) and its double-bound isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Consecutive condensation of one or several IPP units with DMAPP results in the production of prenyl diphosphates of increasing size which constitute branch points for the biosynthesis of isoprenoid endproducts such as sterols, carotenoids, hormones, and the prenyl moiety of chlorophylls, tocopherols, and quinones [2].

Plants synthesize IPP and DMAPP by two independent pathways: the cytosolic mevalonic acid (MVA) pathway and the plastidial methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway [1]. By contrast, the MEP pathway is the only one present in most eubacteria, including *Escherichia coli*. Upregulating the biosynthesis of

MEP-derived prenyl diphosphate precursors has been shown to be a viable biotechnological strategy to increase the production of economically-important isoprenoid end-products in bacteria and plant plastids [4,5]. This has been achieved by overexpression of the enzymes catalyzing the first two and the last step of the pathway (Fig. 1), deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) synthase (DXS), DXP reductoisomerase (DXR), and hydroxymethylbutenyl diphosphate (HMBPP) reductase (HDR). The enhanced accumulation of carotenoids and other MEP-derived isoprenoid products in transgenic bacteria and plants overexpressing DXS, DXR, or HDR indicates that their production is limited by the supply of precursors and that several enzymes share control over the metabolic flux of the MEP pathway, with different enzymes exhibiting different degrees of control [6]. The contribution of other enzymes of the pathway to flux control remains to be established. However, a regulatory role has been suggested for HMBPP synthase (HDS), the enzyme catalyzing the transformation of methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate (ME-cPP) into HMBPP in the penultimate step of the MEP pathway (Fig. 1). The proposal that HDS might be a flux-controlling enzyme is based on the distinctive sequence features of the plant enzyme [7,8], its post-transcriptional regulation in plastids [9,10], its participation in defense mechanisms [11], and the photosynthesis-dependent control of its enzymatic activity in plant cells [12]. In this work we have evaluated this hypothesis by upregulating HDS levels in transgenic bacteria (*E. coli*) and

* Corresponding author. Address: Departament de Genètica Molecular de Plantes, Consorci CSIC-IRTA, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain. Fax: +34 932045904.

E-mail address: mrcgmp@ibmb.csic.es (M. Rodríguez-Concepción).

¹ These authors contributed equally to this work.

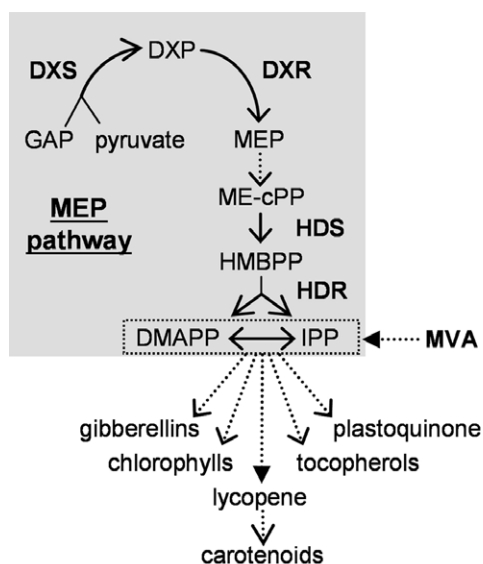


Fig. 1. Isoprenoid biosynthesis in plant cells. Dashed arrows represent multiple enzymatic steps. Pathways introduced in the *E. coli* strains used in this work are indicated with solid head arrows. GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxyxylulose 5-phosphate; MEP, 2-methylerythritol 4-phosphate; ME-cPP, 2-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; MVA, mevalonic acid. MEP pathway enzymes are indicated in bold: DXS, DXP synthase; DXR, DXP reductoisomerase; HDS, HMBPP synthase; HDR, HMBPP reductase.

plants (*Arabidopsis thaliana*) and analyzed the effects on the levels of derived isoprenoids (carotenoids).

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions. The EcAB4-4 (*gcpE::CAT*) strain was constructed as described [13]. Briefly, after incorporating the MVA⁺ synthetic operon into the genome of the K-12 MG1655 wild type strain, most of the coding region of the *gcpE* gene was replaced with the *CAT* gene encoding chloramphenicol acetyltransferase. Competent EcAB4-4 cells were transformed with the pQE32-GcpE plasmid [14] or an empty pQE32 vector (Qiagen) as a control and used for complementation experiments as described [8]. The same plasmids were also used to transform BL21(DE3) cells (Stratagene) together with plasmid pACCRT-EIB, which harbors the *Erwinia uredovora crtE*, *crtB*, and *crtI* genes for lycopene synthesis [15]. Double transformants were selected on plates with solid Luria broth (LB) medium supplemented with antibiotics to final concentrations of 17 µg/ml chloramphenicol (to select for the pACCRT-EIB plasmid) and 100 µg/ml ampicillin (to select for the pQE32 or pQE32-GcpE plasmids). Overnight cultures of several independent pink (lycopene-producing) colonies in antibiotic-supplemented medium were then used to inoculate fresh LB medium (1:100 dilution) containing the appropriate supplements with or without 0.5 mM IPTG. Aliquots of cultures grown at 37 °C for 15 h were used for protein and lycopene extraction as described below.

Plant material and growth conditions. Plasmid pCambia-35S-CSB3 (with the *A. thaliana* cDNA sequence encoding HDS under the transcriptional control of the constitutive 35S promoter) was used for transformation of *Arabidopsis* plants of the Columbia-0 background harboring the P69C-GUS reporter or mutant *clb4-3* plants as described [11]. Plants were grown on plates and soil as described [16].

Analysis of transcript levels. Total RNA was isolated from 10-day-old seedlings grown on plates, copied to cDNA, and used for real-

time quantitative RT-PCR as described [16]. A predesigned FAM-labeled TaqMan MGB probe and unlabeled primers (Applied Biosystems) were used for HDS (At02186785_g1). The threshold cycle for each probe assay was normalized using EF1α (elongation factor – 1α, At02337969_g1) and relative transcript levels were estimated as described [16].

Immunoblot analysis. After growing *E. coli* BL21(DE3) cells containing the pACCRT-EIB and pQE32-GcpE or pQE32 plasmids as described above, 1 ml aliquots were harvested and cells were pelleted by centrifugation. Protein crude extracts were made from 7.5 mg of cells and used for immunoblot analysis of RGS-His-GcpE levels as described [9,10] using a 1:2000 dilution of a commercial antibody against the RGS-His epitope (Qiagen). Immunoblot analysis of HDS levels in protein extracts of *Arabidopsis* 10-day-old seedlings was performed as described [9].

Quantification of pigment levels. For quantification of lycopene in *E. coli* strains harboring the pACCRT-EIB plasmid, the cell pellet of a 1.3 ml aliquot of cultures grown as described above was resuspended in 700 µl of acetone. Samples were then incubated at 55 °C for 15 min in the dark and centrifuged at 13,000g for 10 min to recover the supernatant with the pigment, which was placed in a clean tube. At least two samples were taken from each culture for lycopene extraction. Lycopene was quantified by measuring absorbance at 505 nm of diluted supernatants in acetone and comparing with a standard curve made with known concentrations of a lycopene standard (Sigma). Chlorophylls and carotenoids were extracted from 10-day-old seedlings, separated by HPLC, and quantified as described [16]. Statistical analysis of the data was performed using the Simple Interactive Statistical Analysis (SISA) T-test available online (<http://home.clara.net/sisa/t-test.htm>).

Results and discussion

Upregulated HDS levels in E. coli cells do not result in an enhanced production of isoprenoid precursors

A recent work showed that replacing the native promoter of the endogenous *E. coli gcpE* gene encoding HDS (also named GcpE or IspG in bacteria) with the strong bacteriophage T5 promoter in carotenoid-producing strains did not affect the accumulation of these MEP-derived isoprenoids [17]. Although the results suggested that the production of carotenoid precursors might not be limited by HDS activity in *E. coli* cells, no experiments were reported to confirm that increased levels of active enzyme were actually present in the engineered strains. As an alternative strategy to successfully upregulate HDS activity levels in bacteria, we used the pQE32-GcpE plasmid [14]. In this multi-copy vector, the T5 promoter (which can be induced by IPTG) drives the expression of a recombinant *E. coli* HDS protein with an N-terminal RGS-His epitope [14]. We first confirmed that the addition of the RGS-His tag did not impair enzyme activity by complementation of the lethal phenotype of HDS-defective cells. Disruption of the *gcpE* gene in the EcAB4-4 (*gcpE::CAT*) strain, which also harbors a synthetic MVA⁺ operon encoding heterologous MVA pathway enzymes that can transform exogenously supplied MVA into IPP and DMAPP, results in MVA auxotrophy [13]. As shown in Fig. 2A, transformation of EcAB4-4 cells with the pQE32-GcpE construct eliminated the requirement of MVA for survival, whereas cells from the same strain transformed with the empty pQE32 plasmid remained auxotrophic for MVA. These results confirmed that the recombinant RGS-His-GcpE protein retained HDS activity. We next co-transformed *E. coli* BL21(DE3) cells with the same constructs and a plasmid (pACCRT-EIB) encoding heterologous enzymes to synthesize the carotenoid lycopene from IPP and DMAPP [15] in order to eval-

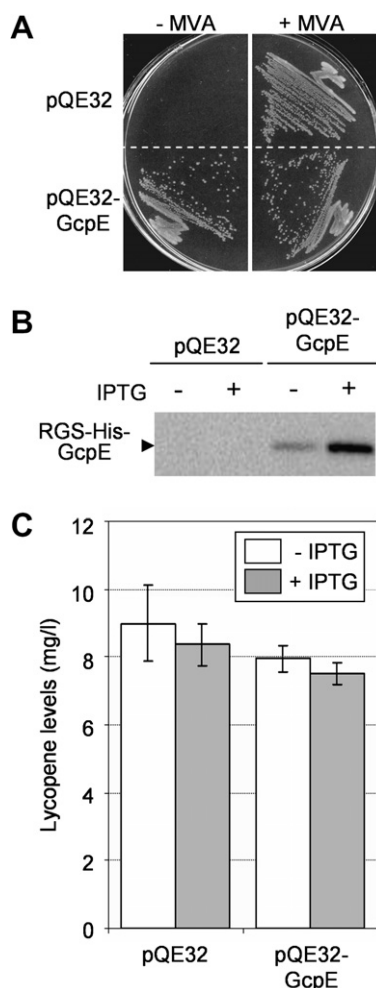


Fig. 2. Upregulation of HDS in bacteria. (A) Complementation of HDS-deficient *E. coli* cells. EcAB4-4 cells were transformed with a construct to express the recombinant RGS-His-GcpE protein (pQE32-GcpE) or an empty pQE32 vector and plated on LB medium supplemented with 1 mM MVA and antibiotics to recover transformants. Positive colonies were then streaked on new plates with (+) or without (–) MVA. (B) Immunoblot analysis of RGS-His-GcpE levels. BL21(DE3) cells were transformed with the indicated vectors together with plasmid pACCRT-EIB for lycopene synthesis. The resulting co-transformants (identified by their pink color) were grown in liquid medium supplemented (+) or not (–) with 0.5 mM IPTG for 15 h at 37 °C. Aliquots of the cultures were then used for protein extraction and immunoblot analysis with antibodies against the RGS-His epitope. Arrowhead indicates the position of the RGS-His-GcpE protein. (C) Lycopene content of the cultures described in (B). Mean values and standard errors of two replicates of at least four independent cultures are shown.

uate whether upregulated levels of HDS activity resulted in an enhanced production of isoprenoids using carotenoid (lycopene) accumulation as a reporter. Colonies of double transformants grown on plates supplemented with the appropriate antibiotics were visually identified based on the red color imparted by lycopene accumulation and used to inoculate liquid media. Grown cultures were then used to analyze the production of recombinant protein and to quantify the levels of lycopene. Immunoblot analysis of RGS-His-GcpE levels with an antibody specific for the RGS-His epitope showed that this protein was synthesized in BL21(DE3) cells harboring the pQE32-GcpE plasmid even in the absence of the IPTG inducer (Fig. 2B). However, lycopene accumulation was not increased compared to control cells transformed with the pQE32 vector (Fig. 2C). Addition of 0.5 mM IPTG to the growth medium resulted in a substantially increased production of RGS-His-GcpE protein (Fig. 2B), but no significant ($P < 0.05$) changes were observed in lycopene accumulation (Fig. 2C). Our data confirm that

overproduction of an active HDS enzyme in *E. coli* cells does not result in increased carotenoid levels, consistent with a non-limiting role of this activity for isoprenoid biosynthesis in bacteria.

HDS levels are not limiting for plastid isoprenoid biosynthesis in wild type Arabidopsis plants

The control exerted by HDS over the metabolic flux to plastidial isoprenoids in plant cells was examined by upregulating its levels in *Arabidopsis* plants with a wild type *HDS* gene (At5g60600, named *GCPE*, *ISPG*, *CLB4*, or *CSB3* in the literature) and in mutants with reduced HDS activity. Complete loss of HDS function in the *chloroplast biogenesis 4* (*clb4*) null alleles *clb4-1* and *clb4-2* results in a seedling lethal albino phenotype, as expected for a knock-out mutant of the MEP pathway [18]. A point mutation at this locus has been reported to result in a partial loss of function in the *constitutive subtilisin 3* (*csb3*, renamed *clb4-3*) mutant, causing a developmental delay and, unexpectedly, a strikingly enhanced resistance to biotrophic pathogens [11]. We also observed that *clb4-3* plants had a slightly pale phenotype (Fig. 3A) caused by a decreased accumulation of MEP-derived photosynthetic pigments, chlorophylls and carotenoids (Fig. 4). Transformation of *clb4-3* plants with a construct to constitutively express the *Arabidopsis* HDS enzyme under the control of the 35S promoter restored a wild type phenotype in terms of growth and pigmentation (Fig. 3A), confirming that the mutant phenotypes were caused by reduced HDS levels and that the recombinant protein produced in these lines was active. Quantitative real-time PCR analysis of three of these *clb4-3* 35S::*HDS* lines (1.1, 5.6 and 4.2) confirmed that *HDS* transcripts were increased several fold in the rescued lines (Fig. 3B). Immunoblot analysis with HDS-specific antibodies demonstrated a corresponding accumulation of the encoded protein (Fig. 3C). But despite the observed upregulation of an active HDS enzyme, the levels of chlorophylls and carotenoids were unchanged ($P < 0.05$) compared to those observed in plants with wild type HDS activity levels (Fig. 4). The same construct was used for transformation of *Arabidopsis* plants with wild type HDS levels (line P69C-GUS) [11]. The generated lines (G5.A, G6.A, and G6.B) were visually undistinguishable from untransformed plants or *clb4-3* 35S::*HDS* lines (Fig. 3B). Also similar to *clb4-3* 35S::*HDS* plants, G5.A, G6.A, and G6.B lines displayed enhanced *HDS* transcript (Fig. 3B) and protein levels (Fig. 3C) but no significant ($P < 0.05$) changes in the accumulation of chlorophylls or carotenoids compared to untransformed controls (Fig. 4). Together, our data suggest that the production of carotenoids and other MEP-derived isoprenoids is not limited by the levels of HDS activity present in wild type *Arabidopsis* chloroplasts under normal growth conditions. Consistent with this observation, no major changes in the levels of HDS-encoding transcripts are detected when carotenoid biosynthesis is boosted during the transition from etioplasts to chloroplasts in deetioliating *Arabidopsis* seedlings and from chloroplasts to chromoplasts in ripening tomato fruit [6,7].

Several MEP pathway enzymes, but not HDS, control isoprenoid precursor supply during peak demand periods in bacteria and plastids

Accumulation of ME-cPP, the substrate of HDS (Fig. 1), has been observed in bacteria under oxidative stress [19], whereas in *Arabidopsis* plants it appears to be involved in resistance to some pathogens [11]. On the other hand, HMBPP, the product of HDS, acts as a potent antigen that triggers human immunological responses [20]. Furthermore, plant HDS has been shown to be an essential enzyme [18] whose activity is post-transcriptionally regulated in plastids [9,10] in part by a photosynthesis-dependent control [12]. These observations suggest that a certain level of HDS activity is maintained under normal growth conditions but it might be changed

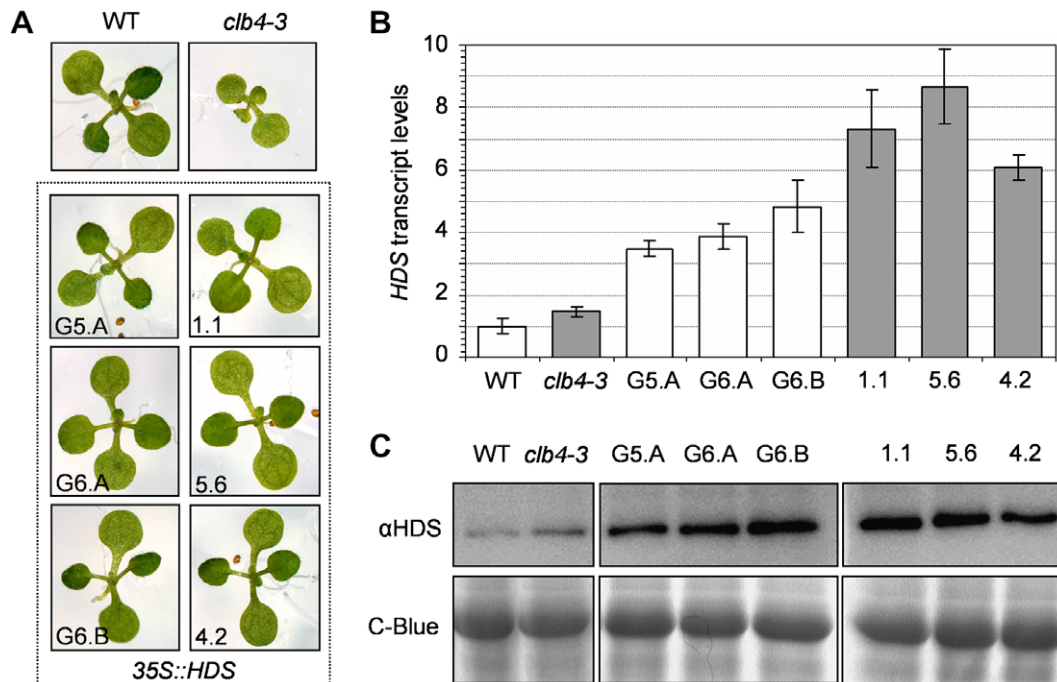


Fig. 3. Phenotype of *Arabidopsis* lines with altered levels of HDS activity. *Arabidopsis* plants with a wild type (WT) gene encoding HDS or a partial loss of function mutant allele (*clb4-3*) were transformed with a construct to constitutively overproduce the enzyme (*35S::HDS*). Several independent lines with the WT (G5.A, G6.A, G6.B) or mutant (1.1, 5.6, 4.2) genomic locus were selected. (A) Representative 10-day-old seedlings of the indicated lines. All panels are to the same scale. (B) Real-time quantitative RT-PCR analysis of *HDS* transcript levels in seedlings of lines shown in (A). Mean and standard error of duplicates of two independent experiments is shown. Levels are represented relative to those in untransformed WT seedlings. (C) Immunoblot analysis of HDS protein levels in 10-day-old seedlings of the indicated lines with a HDS-specific antibody (α HDS). Coomassie Blue (C-Blue) staining is shown as an estimate of equal protein loading.

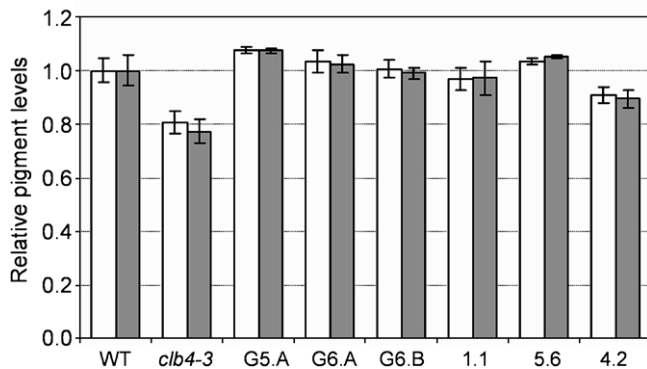


Fig. 4. Accumulation of plastidial isoprenoid pigments in transgenic *35S::HDS* lines. Total carotenoid (white columns) and chlorophyll (gray columns) levels of 10-day-old seedlings of the indicated lines are shown. Pigment levels are represented relative to those in untransformed WT plants. Mean values and standard errors correspond to two experiments.

in response to different stimuli in bacteria and plant cells. Consistently, our results with *clb4-3 35S::HDS* lines suggest that the production of wild type levels of plastidial isoprenoids such as chlorophylls and carotenoids requires a threshold level of HDS enzyme activity. However, two observations imply that the flux control coefficient of HDS could be quite low. First, the effect of the *clb4-3* mutation on carotenoid and chlorophyll production is relatively slight (Fig. 4), suggesting the flux control coefficient of this step does not rise to a significant level until HDS activity has decreased below its wild type level. By contrast, similar point mutations in the gene encoding DXS produce a far more dramatic phenotype [21,22]. Secondly, that overexpression has no effect on endproduct accumulation (Fig. 4) indicates that the flux control

coefficient (under wild type expression levels) is too low to increase flux by upregulating this step.

Alternatively, it is possible that the availability of enzyme cofactors required for HDS activity might limit the production of plastidial prenyl diphosphates upon upregulation of enzyme levels. Both HDS and HDR, the last two enzymes of the MEP pathway (Fig. 1), are iron-sulfur reductases that require a reduced $[4Fe-4S]^{1+}$ cluster for enzymatic activity [23–26]. The oxidized $[4Fe-4S]^{2+}$ form of the two enzymes can be reduced *in vitro* by a flavodoxin/flavodoxin reductase/NADPH system, probably the *in vivo* reducing system in *E. coli* [24,25]. In plants, electron flow from photosynthesis can directly provide the electrons required for HDS activity in chloroplasts via ferredoxin in the absence of any reducing cofactor [12]. However, it is not likely that this reducing system is limiting for HDS activity or/and the production of MEP-derived isoprenoid precursors in chloroplasts because overexpression of HDR (another enzyme that most likely requires the same reducing system) successfully increased the accumulation of chlorophylls and carotenoids in *Arabidopsis* [27]. Moreover, upregulated HDR levels in *E. coli* also resulted in enhanced accumulation of carotenoids [28], indicating that the reducing power required for the activity of both HDS and HDR is also non-limiting in bacteria.

Although it is possible that another unknown factor required for the activity of HDS (but not HDR) might prevent an increased production of carotenoids in transgenic bacteria and plants with enhanced levels of active HDS protein, it is more likely that the activity of a different MEP pathway enzyme becomes limiting when HDS activity is upregulated. Here, we have shown for the first time that not all the MEP pathway enzymes cause a significant change in the pathway flux when their concentration is altered, i.e. not all of them might be considered rate-determining according to metabolic control analysis (MCA) terminology. Based on overexpression studies, the control of flux through the MEP pathway

should be shared by the rate-determining enzymes DXS, DXR, and HDR [6,16], whereas the contribution of HDS to overall flux appears to be comparatively much lower. A thorough examination of the relevant MCA parameters is now in progress in our lab to confirm this model, which has important implications for metabolic engineering of carotenoids and other isoprenoids of interest in bacterial and plant systems.

Acknowledgments

We thank M.A. Phillips for critical reading of the manuscript and Kirin Brewery Co., for the pACCRT-EIB plasmid. The excellent technical support from A. Orozco and the staff of the Serveis Científicotècnics and the Serveis de Camps Experimentals of the Universitat de Barcelona and the Greenhouse facilities at the Consorci CSIC-IRTA is greatly appreciated. Work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER to MRC (BIO2005-00357) and PV (BFU2006-00803) and from the Generalitat de Catalunya (Distinció) to MRC. UFP and JPG received PhD fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (FPU and FPI programs, respectively). ARV received a PhD fellowship from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat, Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics, *Plant Physiol.* 130 (2002) 1079–1089.
- [2] F. Bouvier, A. Rahier, B. Camara, Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 357–429.
- [3] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1401–1426.
- [4] A. Aharoni, M.A. Jongsma, H.J. Bouwmeester, Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 594–602.
- [5] S.T. Withers, J.D. Keasling, Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 980–990.
- [6] M. Rodríguez-Concepción, Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells, *Phytochem. Rev.* 5 (2006) 1–15.
- [7] M. Rodríguez-Concepción, J. Querol, L.M. Lois, S. Imperial, A. Boronat, Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (GCPE) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit, *Planta* 217 (2003) 476–482.
- [8] J. Querol, N. Campos, S. Imperial, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* 514 (2002) 343–346.
- [9] S. Sauret-Güeto, P. Botella-Pavía, U. Flores-Pérez, J.F. Martínez-García, C. San Román, P. León, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 141 (2006) 75–84.
- [10] A. Oudin, S. Mahroug, V. Courdavault, N. Hervouet, C. Zelwer, M. Rodríguez-Concepción, B. St-Pierre, V. Burlat, Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*, *Plant Mol. Biol.* 65 (2007) 13–30.
- [11] M.J. Gil, A. Coego, B. Mauch-Mani, L. Jordà, P. Vera, The *Arabidopsis csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway, *Plant J.* 44 (2005) 155–166.
- [12] M. Seemann, B. Tse Sum Bui, M. Wolff, M. Miginiac-Maslow, M. Rohmer, Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: direct thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG, *FEBS Lett.* 580 (2006) 1547–1552.
- [13] S. Sauret-Güeto, E.M. Urós, E. Ibáñez, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, *FEBS Lett.* 580 (2006) 736–740.
- [14] S. Sauret-Güeto, A. Ramos-Valdivia, E. Ibanez, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (2003) 408–415.
- [15] F.X. Cunningham, D. Chamovitz, N. Misawa, E. Gantt, J. Hirschberg, Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene, *FEBS Lett.* 328 (1993) 130–138.
- [16] L. Carretero-Paulet, A. Cairo, P. Botella-Pavía, O. Besumbes, N. Campos, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase, *Plant Mol. Biol.* 62 (2006) 683–695.
- [17] L.Z. Yuan, P.E. Rouviere, R.A. Larossa, W. Suh, Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*, *Metab. Eng.* 8 (2006) 79–90.
- [18] M.L. Gutierrez-Nava, C.S. Gillmor, L.F. Jimenez, A. Guevara-Garcia, P. Leon, Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development, *Plant Physiol.* 135 (2004) 471–482.
- [19] D. Ostrovsky, G. Diomina, E. Lysak, E. Matveeva, O. Ogrel, S. Trutko, 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 (1998) 69–72.
- [20] K.J. Puan, H. Wang, T. Dai, T. Kuzuyama, C.T. Morita, *fldA* is an essential gene required in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3802–3806.
- [21] N. Araki, K. Kusumi, K. Masamoto, Y. Niwa, K. Iba, Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *Physiol. Plant* 108 (2000) 19–24.
- [22] D.N. Crowell, C.E. Packard, C.A. Pierson, J.L. Giner, B.P. Downes, S.N. Chary, Identification of an allele of CLA1 associated with variegation in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant* 118 (2003) 29–37.
- [23] M. Seemann, P. Wegner, V. Schunemann, B.T. Bui, M. Wolff, A. Marquet, A.X. Trautwein, M. Rohmer, Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe–4S] protein, *J. Biol. Inorg. Chem.* 10 (2005) 131–137.
- [24] M. Seemann, B.T. Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe–4S] protein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 4337–4339.
- [25] F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Grawert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1586–1591.
- [26] M. Wolff, M. Seemann, B. Tse Sum Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A.G. Estrabot, M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe–4S] protein, *FEBS Lett.* 541 (2003) 115–120.
- [27] P. Botella-Pavía, O. Besumbes, M.A. Phillips, L. Carretero-Paulet, A. Boronat, M. Rodríguez-Concepción, Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors, *Plant J.* 40 (2004) 188–199.
- [28] F.X. Cunningham Jr., T.P. Lafond, E. Gantt, Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 5841–5848.

PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) Integrates the Regulation of Sugar Responses with Isoprenoid Metabolism in *Arabidopsis*

Úrsula Flores-Pérez^{a,d}, Jordi Pérez-Gil^a, Marta Closa^b, Louwrance P. Wright^c, Patricia Botella-Pavía^a, Michael A. Phillips^a, Albert Ferrer^b, Jonathan Gershenzon^c and Manuel Rodríguez-Concepción^{a,1}

^a Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^b Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^c Department of Biochemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, D-07745 Jena, Germany

^d Present address: Department of Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, United Kingdom

ABSTRACT The biosynthesis of isoprenoids in plant cells occurs from precursors produced in the cytosol by the mevalonate (MVA) pathway and in the plastid by the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway, but little is known about the mechanisms coordinating both pathways. Evidence of the importance of sugar signaling for such coordination in *Arabidopsis thaliana* is provided here by the characterization of a mutant showing an increased accumulation of MEP-derived isoprenoid products (chlorophylls and carotenoids) without changes in the levels of relevant MEP pathway transcripts, proteins, or enzyme activities. This mutant was found to be a new loss-of-function allele of *PRL1* (*Pleiotropic Regulatory Locus 1*), a gene encoding a conserved WD-protein that functions as a global regulator of sugar, stress, and hormone responses, in part by inhibition of SNF1-related protein kinases (SnRK1). Consistent with the reported role of SnRK1 kinases in the phosphorylation and inactivation of the main regulatory enzyme of the MVA pathway (hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase), its activity but not transcript or protein levels was reduced in *prl1* seedlings. However, the accumulation of MVA-derived end products (sterols) was unaltered in mutant seedlings. Sucrose supplementation to wild-type seedlings phenocopied the *prl1* mutation in terms of isoprenoid metabolism, suggesting that the observed isoprenoid phenotypes result from the increased sugar accumulation in the *prl1* mutant. In summary, PRL1 appears to coordinate isoprenoid metabolism with sugar, hormone, and stress responses.

Key words: Carbohydrate metabolism; metabolic regulation; secondary metabolism—terpenoids, isoprenoids, and carotenoids; *Arabidopsis*.

INTRODUCTION

Isoprenoids, also known as terpenoids, are a diverse class of natural products found in all organisms. In plants, a subgroup comprising hormones, sterols, carotenoids, and the side chain of chlorophylls serves essential functions, but the majority of plant isoprenoids can be classified as secondary metabolites that modulate the interaction of plants with their environment (Bouvier et al., 2005). All isoprenoids derive from isopentenyl diphosphate (IPP) and its allylic isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). These 5-carbon units are condensed during the synthesis of larger prenyl diphosphates that act as precursors for the production of different groups of isoprenoids. Two distinct pathways generate these precursors in plant cells (Figure 1). The mevalonate (MVA) pathway synthesizes cytosolic IPP for the production of sesquiterpenes and triterpenes such as sterols and brassinosteroids. The

methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway is localized in plastids and produces IPP and DMAPP for the biosynthesis of photosynthesis-related isoprenoids (carotenoids and the side chain of chlorophylls, plastoquinones, and tocopherols) and hormones, including gibberellins and abscisic acid (reviewed in Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Phillips et al., 2008b). Although these two pathways are compartmentalized in plant cells, there is

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail: mrcgmp@cid.csic.es, fax +34 932045904, tel. +34 934006100.

© The Author 2009. Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPP and IPPE, SIBS, CAS.

doi: 10.1093/mp/ssp100, Advance Access publication 14 December 2009

Received 21 May 2009; accepted 2 November 2009

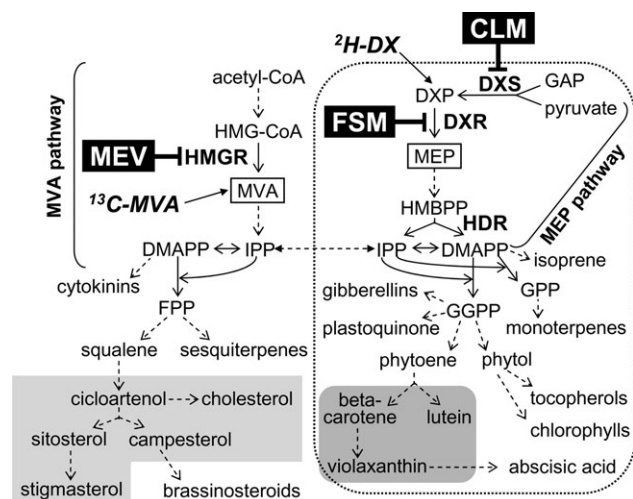


Figure 1. Isoprenoid Biosynthesis in Plant Cells.

Two independent pathways for the biosynthesis of the universal isoprenoid precursors isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) exist in plant cells: the cytosolic mevalonate (MVA) pathway and the plastidial methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway. The production of MVA from hydroxymethylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) by the enzyme HMG-CoA reductase (HMGR) can be blocked by mevastatin (MEV). The production of MEP from deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) catalyzed by DXP reductoisomerase (DXR) can be inhibited by fosmidomycin (FSM), whereas the production of DXP from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) by DXP synthase (DXS) can be blocked with clomazone (CLM). In the last step of the MEP pathway, IPP and DMAPP are simultaneously synthesized from hydroxymethylbutenyl diphosphate (HMBPP) by the activity of HMBPP reductase (HDR). Condensation of IPP and DMAPP units produces prenyl diphosphates of increasing size such as farnesyl diphosphate (FPP), geranyl diphosphate (GPP), and geranylgeranyl diphosphate (GGPP), which are the starting points for the biosynthesis of isoprenoid end products. The major isoprenoid products of the MVA and MEP pathways are sterols (boxed in light gray) and carotenoids (boxed in dark gray), respectively. Dashed arrows represent multiple biosynthetic steps. Exchange of common prenyl diphosphates between cell compartments is indicated with a dotted closed arrow. The labeled precursors used in this work to evaluate this exchange are indicated in italics.

evidence of a limited exchange of common precursors between the cytosol and plastids (Bick and Lange, 2003; Dudareva et al., 2005; Hemmerlin et al., 2003; Kasahara et al., 2002; Laule et al., 2003). The extent of the exchange can be manipulated by supplying intermediates of the MVA or the MEP pathways exogenously and is sensitive to metabolic, environmental, and developmental cues (Hemmerlin et al., 2003; Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002; Rodríguez-Concepción et al., 2004; Schuhr et al., 2003). However, the exchange rate in *Arabidopsis thaliana* is not high enough to rescue the production of all types of isoprenoids when one of the two pathways is pharmacologically or genetically blocked (Carretero-Paulet et al., 2006; Estévez et al., 2001; Hsieh and Goodman, 2005; Kobayashi et al., 2007; Nagata et al., 2002; Rodríguez-Concepción et al., 2004; Suzuki et al., 2009).

It is generally accepted that the main rate-controlling step of the MVA pathway is catalyzed by the enzyme hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), mainly because altered HMGR levels usually result in concomitant changes in MVA-derived isoprenoid production. For example, *Arabidopsis* plants overexpressing different HMGR isoforms show increased sterol levels (Leivar et al., 2005; Manzano et al., 2004), whereas partial loss of HMGR activity leads to reduced accumulation of sterols (Ohya et al., 2007; Suzuki et al., 2004). For the MEP pathway, several steps have been proposed to share control over the pathway flux. Thus, overexpression of deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) synthase (DXS), DXP reductoisomerase (DXR), and hydroxymethylbutenyl diphosphate (HMBPP) reductase (HDR) leads to increased chlorophyll and carotenoid accumulation in photosynthetic tissues of *Arabidopsis* plants, whereas their reduced activity in mutants results in decreased production of plastidial isoprenoids (Araki et al., 2000; Botella-Pavía et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Crowell et al., 2003; Estévez et al., 2001; Hsieh and Goodman, 2005). Despite the progress in identifying key enzymes for the production of isoprenoid precursors in plants, the regulatory mechanisms that control the metabolic flux through the MVA and MEP pathway as well as the processes involved in the communication between pathways are not fully understood.

The MEP pathway inhibitors clomazone (CLM) and fosmidomycin (FSM) have been shown to prevent seedling establishment and photosynthetic development in *Arabidopsis* by specifically inhibiting the enzymes DXS and DXR, respectively (Carretero-Paulet et al., 2006; Zeidler et al., 2000, 1998). The bleached phenotype caused by the specific block of the production of MEP-derived plastidial isoprenoid pigments (e.g. chlorophylls and carotenoids) by CLM or FSM can be rescued by up-regulating the activity of the target enzymes as well as by activating the exchange of isoprenoid precursors between the cytosol and the plastid (Carretero-Paulet et al., 2006; Laule et al., 2003; Rodríguez-Concepción et al., 2004). A screening of publicly available collections of *Arabidopsis* T-DNA insertion lines for seedlings capable of greening and developing in the presence of otherwise lethal concentrations of FSM resulted in the identification of several mutant lines showing a clear phenotype of *resistance to inhibition by FSM*, which we named *rif* mutants (Sauret-Güeto et al., 2006). In some of these mutants (including *rif1* and *rif10*), FSM resistance resulted from an enhanced accumulation of active DXS and DXR enzymes. The up-regulated levels of these flux-controlling enzymes, however, did not result in increased levels of MEP-derived isoprenoid products because the mutations prevented the correct development of chloroplasts (Flores-Pérez et al., 2008; Sauret-Güeto et al., 2006). Here, we describe the isolation and characterization of a FSM-resistant mutant, *rif18*, which, unlike *rif1* and *rif10*, accumulates increased levels of plastidial isoprenoid pigments compared to the Columbia wild-type (WT) when grown in the absence of inhibitors. Our results show that *rif18* is a novel loss-of-function allele of the *PRL1* (*Pleiotropic Regulatory Locus 1*) gene encoding

a WD protein that exerts a pleiotropic effect on sugar and hormone responses and influences the phosphorylation status (and hence the activity) of HMGR. These data reveal a strong influence of PRL1 activity and sugar availability for isoprenoid production in *Arabidopsis* seedlings.

RESULTS

Identification of *rif18*, a Mutant that Displays a Dark-Green Phenotype Coupled to FSM and CLM Resistance

To identify mutants with an enhanced flux through the MEP pathway leading to an up-regulated accumulation of plastidial isoprenoid end products such as chlorophylls and carotenoids, we selected *Arabidopsis rif* lines displaying a dark-green color when grown in the absence of inhibitors. One of the identified mutants, *rif18*, showed a clear resistance to both FSM and CLM (Figure 2). Mutant *rif18* seedlings accumulated more MEP-derived photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) than the WT, a phenotype that was stronger when the MEP pathway was inhibited (Figure 2A). They also showed an improved seedling establishment in the presence of FSM or CLM (Figure 2B). Neither of these resistance phenotypes was observed when *rif18* seedlings were grown in the presence of different classes of inhibitors interfering with other pathways required for plastid development such as phosphinotricin, chloramphenicol, hygromycin, or kanamycin (Figure 2B and data not shown). These results suggest that the resistance of the *rif18* mutant to FSM and CLM is not caused by the activation of a general multidrug resistance mechanism but it specifically results from interference with the regulation of the MEP pathway. The slightly darker green color of both seedlings and adult *rif18* plants compared to the WT (Figure 3) most likely results from the described accumulation of ~30% more chlorophylls and carotenoids (Figure 2A). All major chlorophyll and carotenoid species detected in chloroplasts of light-grown seedlings were increased in the mutant (Table 1), similar to that observed in transgenic *Arabidopsis* plants with an enhanced flux through the MEP pathway by overexpression of DXS, DXR, or HDR (Botella-Pavía et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Estévez et al., 2001). But unlike these transgenic lines, mutant *rif18* plants also showed other phenotypic alterations compared to the WT, including a clear inhibition of root growth, flat leaves with serrated margins, and early flowering (Figure 3). Together, the pleiotropic phenotype of *rif18* plants suggests that the mutation not only positively affects flux through the MEP pathway (causing resistance to both FSM and CLM and an enhanced accumulation of plastidial isoprenoid end products), but also impacts developmental processes in the plant.

The *rif18* Mutant Is a New Loss-of-Function Allele of *PLR1*, a Gene Involved in Sugar and Hormone Responses

Backcrossing of homozygous *rif18* plants with the WT followed by selfing and segregation analysis of the offspring

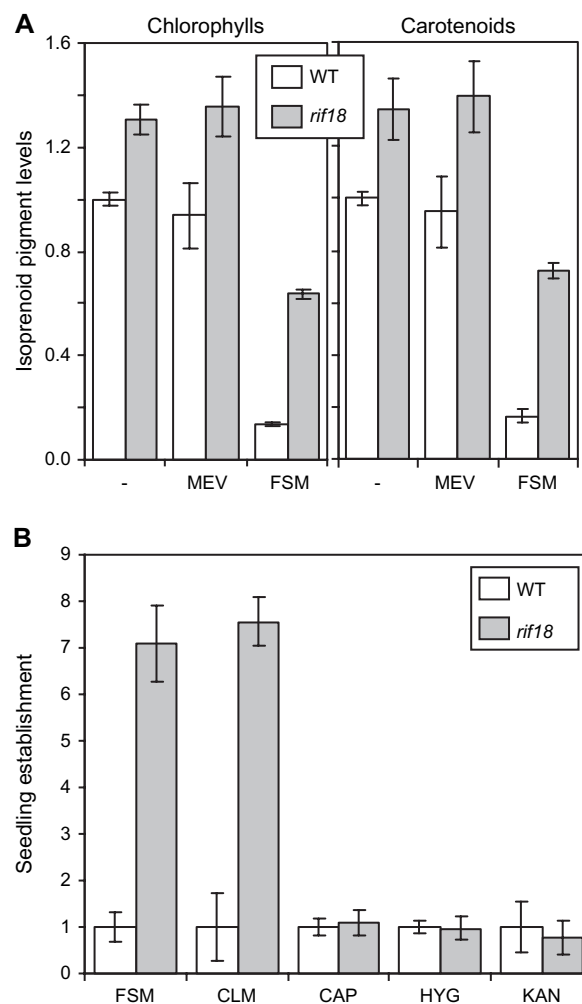


Figure 2. Isoprenoid Phenotypes of Mutant *rif18* Seedlings.

(A) Total chlorophyll and carotenoid levels in 10-day-old wild-type (WT) and *rif18* seedlings grown on MS plates supplemented or not with 10 μ M MEV or 30 μ M FSM. Mean and standard errors correspond to two different experiments with duplicates. Data are represented relative to the values in WT seedlings grown in the absence of inhibitors.

(B) Quantification of seedling establishment (number of seedlings developing green true leaves) after growth for 15 d on MS plates supplemented with 30 μ M FSM, 10 μ M CLM, 50 μ M kanamycin (KAN), 50 μ M hygromycin (HYG), or 15 μ M chloramphenicol (CAP). Data are represented relative to the values in WT seedlings. Mean and standard error from populations of more than 50 individuals in $n = 3$ (FSM, CLM) or $n = 2$ (KAN, HYG, CAP) independent experiments is represented.

showed that the T-DNA insertion co-segregated (in a recessive and monogenic manner) with both the resistance to CLM and FSM and the pleiotropic phenotype displayed by the mutant. For the identification of the gene responsible for the *rif18* phenotype, we analyzed the T-DNA flanking sequences in the mutant genome. As shown in Figure 4A, the T-DNA insertion interrupts the coding region of the *PRL1* (Pleiotropic Regulatory Locus 1) gene (At4g15900). PRL1 is a conserved WD

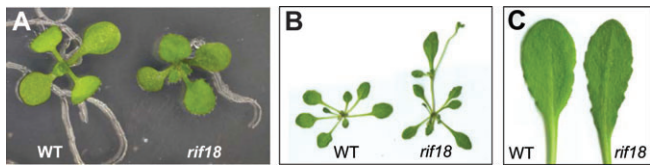


Figure 3. Morphological Phenotypes of *rif18* Mutant Plants. WT and *rif18* seedlings were grown on MS plates with no inhibitors for 2 weeks before transferring them to soil. (A) Seedlings grown for 12 d on plates. (B) Plants grown for 2 more weeks on soil under long-day conditions. (C) Leaves from the plants shown in (B).

Table 1. Accumulation of Individual Carotenoids and Chlorophylls in *rif18* Seedlings.

	Percent relative to WT	
	Mean	SE
<i>Carotenoids</i>		
Lutein	139	11
Beta-carotene	139	13
Zeaxanthin	109	9
Violaxanthin	121	9
Neoxanthin	137	22
<i>Chlorophylls</i>		
Chlorophyll <i>a</i>	130	11
Chlorophyll <i>b</i>	130	9

Levels are given relative to those in WT seedlings grown under the same conditions and correspond to the mean and standard error of at least seven samples ($n = 7$) from four independent experiments.

protein that functions as a pleiotropic regulator of sugar and hormone responses in *Arabidopsis* (Németh et al., 1998). To ascertain whether the loss of PRL1 function was the cause of the observed *rif18* phenotypes, two other insertion alleles identified in the Salk collection (Baruah et al., 2009) were analyzed. Homozygous individuals of both alleles (*prl1-2* and *prl1-3*) displayed a *rif18* phenotype of greener seedlings with shorter roots compared to the WT, and they also showed a clear resistance to CLM and FSM (Figure 4B). Furthermore, the original *prl1* mutant (*prl1-1*) displayed the morphological root and shoot phenotypes described here, and it also accumulated higher levels of chlorophylls (Németh et al., 1998). We therefore concluded that all these phenotypes were caused by a defective PRL1 activity and renamed the *rif18* mutant as *prl1-8*.

The *prl1* Mutation Has No Effect on DXS or DXR Levels but It Significantly Reduces HMGR Activity

Because the *prl1* mutation results in changes in gene expression (Baruah et al., 2009; Lee et al., 2008; Li et al., 2007; Németh et al., 1998), we next investigated whether the observed accumulation of isoprenoid pigments in *prl1* chloroplasts and the resistance of the mutant to both CLM and FSM (Figures 2 and 4) could be the

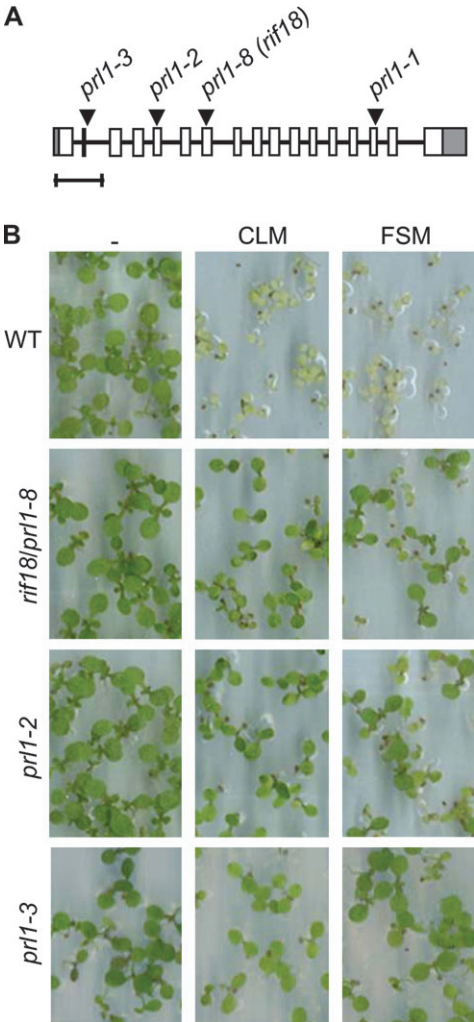


Figure 4. Identification of the Gene Responsible for the *rif18* Phenotype. (A) Map of the *RIF18/PRL1* (At4g15900) gene and insertion alleles. Untranslated regions are represented with gray boxes, and protein coding exons are shown as white boxes. Arrowheads mark the T-DNA insertion site in *prl1-1* (Németh et al., 1998), *prl1-2* (SALK_008466; Baruah et al. 2009), *prl1-3* (SALK_096289; Baruah et al., 2009) and *prl1-8 (rif18)*. Bar = 500 bp. (B) Representative pictures of 10-day-old seedlings grown as described in Figure 2.

result of up-regulated expression of MEP pathway genes. As shown in Figure 5A, however, real-time quantitative PCR analysis of *DXS* and *DXR* transcript abundance showed no significant differences between *prl1-8* and WT seedlings. Levels of *DXS* or *DXR* proteins (Figure 5B) and enzymatic activity (Figure 5C) also remained similar in WT and mutant seedlings. Similarly, transcripts and protein levels of *HDR*, another flux-controlling enzyme of the MEP pathway (Botella-Pavía et al., 2004), were unchanged in the mutant (Figure 5). These results indicate that the enhanced accumulation of chlorophylls and carotenoids in the mutant and its resistance to both CLM and FSM are not the result of up-regulated levels of MEP pathway enzymes or activity.

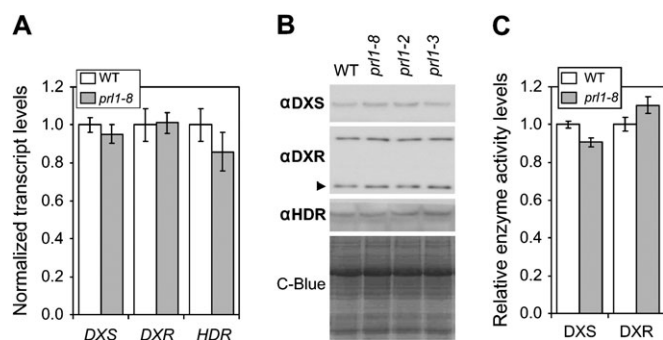


Figure 5. Analysis of Transcript, Protein, and Activity Levels of MEP Pathway Enzymes in *prl1* Seedlings.

RNA and protein were extracted from 5-day-old WT and mutant seedlings grown on MS plates, whereas enzyme activity measurements were carried out with chloroplasts isolated from 10-day-old seedlings.

(A) Real-time quantitative RT-PCR analysis of transcript levels of the indicated genes. Data are normalized to *EF1α* levels and represented relative to WT seedlings. Mean and standard error from five independent experiments ($n = 5$) are shown.

(B) Immunoblot analyses with antibodies against DXS, DXR, and HDR. The position of the DXR protein is indicated with an arrowhead. The other major band recognized by the anti-DXR serum is shown as a protein loading control. Coomassie Blue (C-Blue) staining is also shown to monitor total protein loading.

(C) DXS and DXR enzyme activity levels. Mean and standard error are represented relative to the levels in WT seedlings and correspond to three ($n = 3$) independent experiments.

PRL1 has been shown to directly interact with AKIN10 and AKIN11, two *Arabidopsis* members of the SnRK1 (SNF1-related protein kinase 1) family (Bhalerao et al., 1999). The activation of these kinases was found to be higher in *prl1-1* plants (Bhalerao et al., 1999), presumably because PRL1 targets them for proteosomal degradation (Lee et al., 2008). Plant SnRK1 phosphorylates important metabolic enzymes, including the MVA pathway central enzyme HMGR, resulting in enzyme inactivation (Dale et al., 1995; Polge and Thomas, 2007; Sugden et al., 1999). Therefore, it was expected that the loss of PRL1 function would result in increased SnRK1 activity and subsequently increased phosphorylation and decreased activity of HMGR. To verify whether HMGR enzyme activity was post-translationally down-regulated in *prl1* seedlings, HMGR transcript, protein and activity levels were measured. Mutant seedlings only showed slightly altered levels of transcripts (Figure 6A) and protein (Figure 6B) corresponding to the two genes encoding HMGR in *Arabidopsis* (Enjuto et al., 1994), whereas HMGR activity was significantly lower in *prl1-8* seedlings (Figure 6C). Despite an important decrease in HMGR activity (to about half the activity measured in WT seedlings), the accumulation of sterols, the main product of the MVA pathway, was similar in mutant and WT seedlings (Table 2). Of the four major sterol species analyzed, only stigmasterol showed decreased levels in the mutant, whereas the other three (sitosterol, campesterol, and cholesterol) showed no significant changes (Table 2).

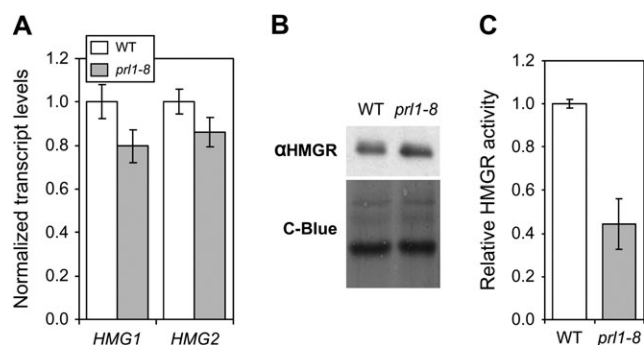


Figure 6. Analysis of HMGR Gene Expression, Protein Accumulation, and Activity Levels in *rif18/prl1-8* Seedlings.

WT and mutant seedlings were grown for 5 (A, B) or 10 (C) d on MS plates under long-day conditions.

(A) Real-time quantitative RT-PCR analysis of the abundance of HMGR-encoding transcripts from the indicated genes. Data are normalized with *GAPDH* and represented relative to the levels in WT seedlings.

(B) Immunoblot analyses with antibodies against HMGR. Coomassie Blue (C-Blue) staining is shown to illustrate equal protein loading.

(C) HMGR activity levels relative to those in WT seedlings. Mean and standard error in (A) and (C) correspond to three ($n = 3$) independent experiments with duplicates.

Table 2. Accumulation of Individual Sterols in WT and *rif18/prl1-8* Seedlings.

– FSM Sterol	WT		<i>rif18/prl1-8</i>	
	Mean	SE	Mean	SE
Cholesterol	48	8	51	9
Campesterol	496	58	591	55
Sitosterol	3115	260	3333	443
Stigmasterol	237	33	118	13
Total	3980	348	4201	480
+ FSM Sterol	WT		<i>rif18/prl1-8</i>	
	Mean	SE	Mean	SE
Cholesterol	69	14	63	10
Campesterol	483	77	540	51
Sitosterol	3075	147	2832	200
Stigmasterol	382	8	189	37
Total	4115	307	3747	219

Levels are given as ng per mg of dry weight and correspond to the mean and standard error of six samples ($n = 6$) from three independent experiments carried out in the presence (+) or absence (–) of 30 μ M FSM.

Exchange of Common Prenyl Diphosphates between Plastids and the Cytosol Is Not Altered in *prl1-8* Seedlings

The puzzling observations that *prl1-8* mutant seedlings accumulate more plastidial isoprenoids (chlorophylls and carotenoids) despite normal MEP enzyme activity levels while displaying WT levels of cytosolic isoprenoids (sterols) in spite of reduced HMGR levels prompted us to investigate whether the exchange of common prenyl diphosphate products of both

pathways between the cytosol and the plastid (Figure 1) might be altered in the mutant. To test this hypothesis, WT and *prl1-8* seedlings were grown on plates supplemented with isotopically labeled intermediates of the MVA pathway ([2-¹³C]mevalonolactone, which is rapidly hydrolyzed to [2-¹³C]MVA) or the MEP pathway ([5,5-²H]deoxyxylulose, which is phosphorylated to [5,5-²H]DXP and imported into plastids) to follow the distribution of the labels in cytosolic and plastidial isoprenoid products by mass spectrometry. To maximize the incorporation of these exogenously supplied intermediates into their respective pathways, the production of endogenous DXP and MVA was blocked with CLM or mevastatin (MEV), respectively (Figure 1). Levels of incorporation were similar to those observed previously (Kasahara et al., 2002). In WT and mutant seedlings fed with [5,5-²H]DX, about 7% of total sitosterol (the major phytosterol in *Arabidopsis*; Table 2) bore at least one label, as judged by measuring the abundance of *m/z* 488, 490, and 492 mass fragments (corresponding to one, two, or three labeled DX units) above background levels (Figure 7A). Feeding with [2-¹³C]MVA resulted in labeling of carotenoids (beta-carotene) at approximately 18% (based on the enrichment of the *m/z* 537, 538, 539, and 540 fragments, corresponding to one to four incorporations) and chlorophylls (phytol chain) at about 9% (as deduced from the enrichment of the *m/z* 872, 873, 874, and 875 fragments) in both WT and *prl1-8* seedlings (Figure 7B). Incorporation of [5,5-²H]DX into sterols significantly improved in the presence of CLM (Figure 7A). By contrast, incorporation of [2-¹³C]MVA into plastidial isoprenoids did not change with MEV (Figure 7B), similar to that observed elsewhere (Hemmerlin et al., 2003). This might be due to

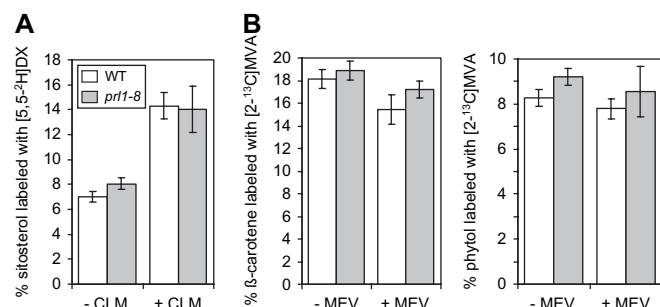


Figure 7. Incorporation of MVA and MEP Pathway Precursors into Sterols, Carotenoids, and Chlorophylls.

WT and *rif18/prl1-8* seedlings were grown for 18 d under long-day conditions on MS plates supplemented with 1.25 mM [5,5-²H]DX or 4.5 mM [2-¹³C]MVA in the presence (+) or absence (–) of the indicated inhibitors of the MEP pathway or the MVA pathway (Figure 1). Incorporation of these precursors is represented as the percentage of the indicated isoprenoid end product bearing one or more labeled isoprenoid units as judged by mass spectral analysis of the molecular ion cluster after correcting for natural isotope abundance. Mean and standard errors of five independent samples (*n* = 5) are shown.

(A) Level of [5,5-²H]DX incorporation into the sterol sitosterol as judged by GC–MS analysis.

(B) Levels of [2-¹³C]MVA incorporation into the carotenoid beta-carotene and into the phytol side chain of chlorophylls as judged by LC–MS analysis.

a much lower metabolic flux of the endogenous MVA pathway compared to that of the MEP pathway in light-grown seedlings (Rodríguez-Concepción, 2006). In any case, these results confirmed that an exchange of isoprenoid precursors derived from MVA or MEP indeed takes place in *Arabidopsis* seedlings. However, the very similar labeling results obtained with WT and *prl1-8* seedlings (Figure 7) suggest that such exchange of precursors is not altered in the mutant. In agreement with these results, block of the MVA pathway with MEV had no effect on the production of plastidial isoprenoids (Figure 2A) nor did the inhibition of the MEP pathway with FSM alter the accumulation of sterols (Table 2) in either *prl1-8* or WT seedlings.

Addition of Sucrose to the Growth Medium of WT Seedlings Results in a *prl1* Phenotype of Enhanced Isoprenoid Pigment Accumulation and Resistance to CLM and FSM

Loss of PRL1 function has been shown to cause an increased accumulation of starch and sugars (fructose, glucose, and sucrose) in mutant leaves (Németh et al., 1998), which could eventually result in a decreased HMGR activity following sugar-triggered activation of SnRK1 kinases (Bhalerao et al., 1999). It is also possible that higher sugar availability in *prl1-8* seedlings was responsible for the observed up-regulation of the accumulation of MEP-derived products such as chlorophylls and carotenoids. This hypothesis was tested by growing WT seedlings in the presence of sucrose (or mannitol as a control) to evaluate whether they showed an enhanced accumulation of isoprenoid pigments and/or a resistance to FSM similar to that observed in *prl1-8* seedlings. As shown in Figure 8A, resistance to FSM increased in WT seedlings when grown in the presence of sucrose but not when grown in the presence of mannitol, demonstrating that FSM resistance was not due to osmotic changes, but to the availability of a readily metabolizable carbon source. Similarly, a FSM-resistance phenotype was also observed when sucrose was included in the growth medium of tomato seedlings (Figure 8B). Sucrose supplementation had no effect on the resistance of WT seedlings to other inhibitors unrelated to the MEP pathway such as kanamycin and phosphinotricin (Figure 8A). Although no major changes in DXS or DXR levels were observed when WT *Arabidopsis* seedlings were germinated and grown on sucrose-supplemented medium (Figure 8D), they accumulated more chlorophylls and carotenoids compared to controls grown without sucrose (Figure 8C). All these phenotypes observed in sucrose-fed WT seedlings (enhanced specific resistance to MEP pathway inhibitors and higher isoprenoid pigment accumulation without changes in DXS and DXR levels) resembled those described for *prl1-8* seedlings grown in the absence of sucrose, indicating that the addition of sugar to WT seedlings phenocopies a *prl1* phenotype related to the MEP pathway.

DISCUSSION

Plants have a unique compartmentation of isoprenoid biosynthesis, with two completely different routes (the MVA

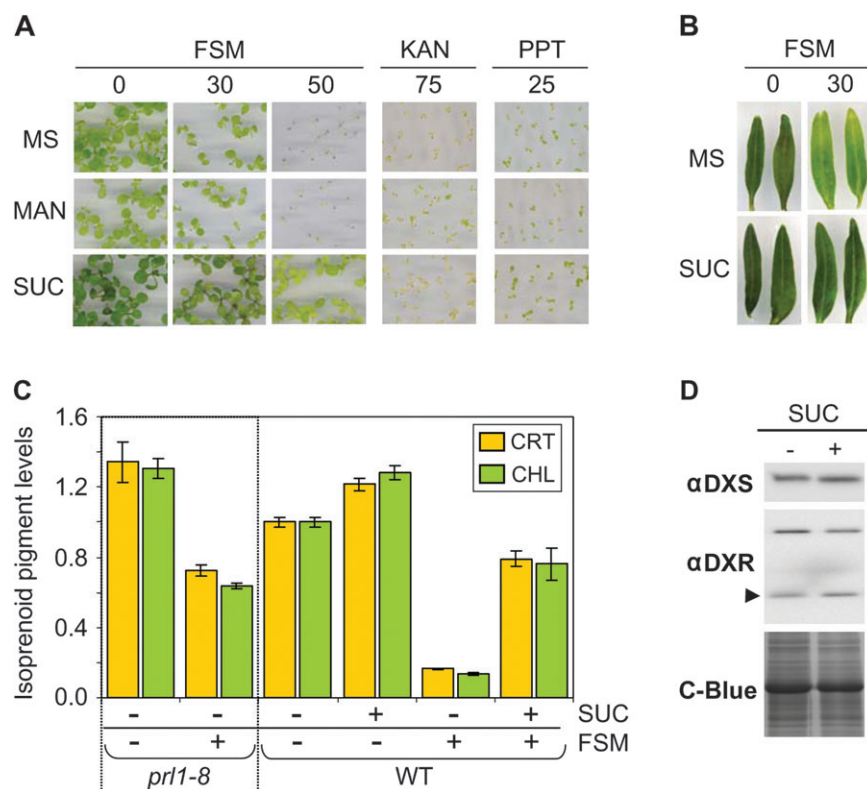


Figure 8. Phenocopy of *prl1* Isoprenoid Phenotypes by Sucrose Supplementation to WT Seedlings.

(A) *Arabidopsis* WT seedlings grown for 8 d on MS plates supplemented or not with 2% mannitol (MAN), 2% sucrose (SUC), and the inhibitors fosmidomycin (FSM), kanamycin (KAN), or phosphinotricin (PPT) at the indicated concentrations (μ M).

(B) Cotyledons of tomato seedlings grown for 2 weeks on MS medium supplemented or not with 30 μ M FSM and/or 2% SUC.

(C) Total carotenoid (CRT) and chlorophyll (CHL) levels of 10-day-old WT and *prl1-8* seedlings grown on MS medium supplemented (+) or not (–) with 2% SUC and/or 30 μ M FSM. Mean and standard error values correspond to two experiments ($n = 2$) and are represented relative to those in untreated seedlings (166 ng CRT mg^{-1} fresh weight and 626 ng CHL mg^{-1} fresh weight).

(D) Immunoblot analysis of DXS and DXR levels in 5-day-old seedlings grown on MS medium supplemented or not with 2% SUC. The position of the DXR protein is indicated with an arrowhead. Coomassie Blue staining is shown to illustrate equal protein loading.

pathway and the MEP pathway) simultaneously functioning for the production of the same universal isoprenoid precursors (IPP and DMAPP) in the cytosol and plastids of plant cells. As confirmed here (Figure 7), final isoprenoid products are usually formed from precursors synthesized primarily, but not exclusively, by one of the two pathways (Dudareva et al., 2005; Hemmerlin et al., 2003; Kasahara et al., 2002; Laule et al., 2003). This distribution of isoprenoid biosynthesis involves the existence of plant-specific control mechanisms modulating the exchange between compartments and the coordinated regulation of the MVA and MEP pathways in plant cells. In recent years, functional genomics and molecular genetic approaches have provided clues to start understanding this interpathway cross-talk.

Modeling of genetic networks from global gene expression profiles found a mutually exclusive pattern of expression of MVA and MEP pathway genes and suggested that the coordination at the transcriptional level may be restricted to single genes in both pathways (Wille et al., 2004). The characterization of the MEV-resistant *rim1/phyB-m1* mutant showed that

light was one of the factors triggering opposing effects on the regulation of these pathways (Rodríguez-Concepción et al., 2004). Thus, light down-regulates the expression of genes encoding HMGR and other MVA pathway genes (Enjuto et al., 1994; Learned, 1996; Rodríguez-Concepción, 2006; Stermer et al., 1994) but it up-regulates the expression of genes encoding flux-controlling MEP pathway enzymes such as DXS, DXR, and HDR (Botella-Pavía et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2002; Córdoba et al., 2009; Hans et al., 2004; Hsieh and Goodman, 2005; Rodríguez-Concepción, 2006). Light might additionally activate the metabolic flux through the MEP pathway by increasing the activity of MEP pathway enzymes such as DXR and HDR, which are targets for chloroplast thioredoxin (Balmer et al., 2003; Lemaire et al., 2004). Furthermore, light-triggered photosynthetic metabolism is expected to result in an enhanced production of MEP pathway substrates (such as glyceraldehyde 3-phosphate, derived from the Calvin cycle), which would contribute to an increased production of IPP and DMAPP in chloroplasts via increased substrate availability. Sucrose supplementation might also

enhance the availability of MEP pathway substrates with a concomitant influence over MEP pathway flux, thus leading to increased levels of MEP-derived plastidial isoprenoids (chlorophylls and carotenoids) as shown in Figure 8. Enhanced chlorophyll production in intact *Arabidopsis* seedlings grown in the light on media supplemented with sucrose has also been reported elsewhere (Laby et al., 2000). In light-grown plants, sugar levels do not appear to have a direct influence in regulating the accumulation of MEP pathway enzymes at the level of transcripts (Bläsing et al., 2005; Hsieh and Goodman, 2005) or proteins (Figure 8). By contrast, sucrose supplementation has been shown to result in an activation of SnRK1 kinases (Bhalerao et al., 1999), which could lead to decreased HMGR activity (Dale et al., 1995; Sugden et al., 1999). Together, light and sugar availability appear to be two closely interacting factors that regulate both the MVA pathway and the MEP pathway and influence isoprenoid metabolism in a complex, multilevel manner.

Our data indicate that PRL1 has a role in the sugar-mediated control of isoprenoid homeostasis. Unlike other *rif* mutants such as *rif10* and *rif1*, in which FSM resistance results from the post-transcriptional up-regulation of DXS and DXR levels (Flores-Pérez et al., 2008; Sauret-Güeto et al., 2006), no change in DXS or DXR transcript, protein or even *in vitro* activity levels was observed in *rif18/prl1-8* seedlings (Figure 5). An alternative explanation for the specific resistance of mutant seedlings to a block of the MEP pathway and their increased isoprenoid pigment levels was an increased import of MVA-derived prenyl diphosphates into the plastid, but we found no evidence supporting this possibility in labeling experiments (Figure 7B). It is possible that part of the detected label of chlorophylls (phytol) and carotenoids (beta-carotene) might derive from shunt pathways that could convert fed [2-¹³C]MVA and/or its products to intermediates of central metabolism during the incubation period, complicating the interpretation of the labeling data. However, it seems unlikely that decreased HMGR activity in the mutant (Figure 6C) could provide more MVA for plastidial isoprenoid biosynthesis without negatively affecting the production of sterols (Table 2). In addition, further inhibition of HMGR activity with MEV had no effect on the accumulation of plastidial isoprenoid pigments in the mutant (Figure 2A), supporting our conclusion that the contribution of the MVA pathway to the biosynthesis of these products in *prl1-8* seedlings is not affected compared to the WT.

The loss of PRL1 function results in altered hormone responses (Németh et al., 1998). As shown here, *prl1-8* mutants also display alterations in the MVA pathway and the MEP pathway, which may impact the production of isoprenoid hormones such as cytokinins, abscisic acid, gibberellins, or brassinosteroids (Figure 1). These effects might explain the smaller size and the dark-green phenotype of mutant plants, similar to that of mutants with altered levels or response to gibberellins or brassinosteroids (reviewed in Fujioka and Yokota, 2003; Richards et al., 2001). However, none of the gibberellin or brassinosteroid mutants analyzed in our lab shows

a FSM resistance phenotype (data not shown). Although it cannot be ruled out that the resistance to FSM and CLM in mutant *prl1* seedlings and sucrose-fed WT plants is due to impaired uptake, detoxification, or degradation of these herbicides in the plastid, we observed that neither the *prl1* mutation nor sucrose supplementation resulted in a multidrug resistance phenotype when presented with other herbicides that act in the plastid (Figures 2B and 8A). Thus, we conclude that the *prl1* mutation affects isoprenoid metabolism specifically and is not related to the metabolism of herbicides. Instead, we propose that increased sugar availability in the mutant (Németh et al., 1998) and in WT plants supplemented with sucrose (Figure 8) might be responsible for the observed pigment and resistance phenotypes. As these higher than normal levels of sucrose are catabolized, yielding MEP pathway precursors such as pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate, the flux through the MEP pathway is predicted to increase despite no change in DXS or DXR enzyme concentration as a simple consequence of increased substrate availability, ultimately leading to increased levels of pigments. Resistance to FSM and CLM in this case, both of which are competitive inhibitors of their respective targets, could be due to enhanced competition from native substrate concentrations. Calculation of metabolic control analysis parameters should serve to confirm this model in the future.

The mechanism by which PRL1 controls sugar levels and responses is currently unknown, but it might be related to the ability of this WD protein to interact and to inhibit the activity of the *Arabidopsis* SnRK1 proteins AKIN10 and AKIN11 (Bhalerao et al., 1999), presumably targeting them for ubiquitination and proteasomal degradation (Lee et al., 2008). SnRK1 kinases are central integrators of stress, carbon, and energy signaling in plants (Baena-González and Sheen, 2008; Polge and Thomas, 2007). Besides regulating plant development and stress responses, SnRK1 kinases modulate the transcription of genes involved in carbohydrate metabolism and they phosphorylate and reversibly inactivate important plant metabolic enzymes, including *Arabidopsis* HMGR (Dale et al., 1995; Sugden et al., 1999). Thus, it was expected that the *prl1* mutation would negatively affect the MVA pathway by de-repression of SnRK1 kinases, eventually leading to an enhanced HMGR phosphorylation and reduced enzyme activity (but not transcript or protein levels) in mutant seedlings (Figure 6). A reduction in HMGR activity levels might explain some of the *prl1-8* phenotypes, such as the observed short root phenotype (Kobayashi et al., 2007; Rodríguez-Concepción et al., 2004; Suzuki et al., 2004). This effect does not appear to be a direct consequence of sugar hypersensitivity because WT seedlings develop normal roots at concentrations of up to 6% sucrose (Németh et al., 1998). Surprisingly, the ~50% reduction observed in HMGR activity in *prl1-8* seedlings had little impact on the production of derived cytosolic isoprenoids such as sterols (Table 2). The use of increasing amounts of isoprenoid precursors synthesized in plastids for the production of sterols synthesized in the cytosol of *prl1-8* seedlings is unlikely, as

deduced from feeding experiments with [5,5-²H]DX (Figure 7A). In agreement, the production of sterols was not reduced in mutant seedlings when the MEP pathway was blocked with FSM (Table 2). It is more likely that in our experimental conditions, the remaining HMGR activity in *prl1-8* seedlings was sufficient to achieve virtually normal levels of sterol biosynthesis. Alternatively, sterol turnover might be down-regulated in *prl1-8* seedlings. A lack of correlation between altered HMGR activity and sterol levels has also been observed in the MEV-resistant *loi1* mutant (Kobayashi et al., 2007). This mutant, which also shows resistance to CLM without changes in DXS levels, might be defective in the regulation of mitochondrial RNAs (Kobayashi et al., 2007). It is tempting to speculate that an altered mitochondrial function in *loi1* plants could result in metabolic changes that eventually resulted in the observed alterations in the MVA and MEP isoprenoid pathways, similar to that discussed here for *prl1-8*.

Although we still have an incomplete picture of how PRL1 controls the production of final isoprenoid products and the biosynthesis of their precursors by the MVA pathway and the MEP pathway, our results, together with the pleiotropic phenotypes of the *prl1* mutants (Baruah et al., 2009; Li et al., 2007; Németh et al., 1998) and the interaction of PRL1 with SnRK1 (Bhalerao et al., 1999) and components of the ubiquitination machinery (Lee et al., 2008) and the plant innate immunity response (Palma et al., 2007), indicate that PRL1 coordinates isoprenoid metabolism with sugar, hormone, and stress responses, contributing to the dynamic regulation of plant cell metabolism during growth and development.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana seeds from the Weigel and Scheible-Somerville activation tagging T-DNA collections (Weigel et al., 2000) and Salk T-DNA insertion lines (Alonso et al., 2003) were obtained from the European Arabidopsis Stock Centre (NASC). All the lines were in the Columbia background. Seeds were surface-sterilized and germinated in Petri dishes with solid Musrashige and Skoog (MS) medium. When indicated, plates were supplemented with the inhibitors fosmidomycin, clomazone, mevastatin, phosphinotricin, kanamycin, hygromycin, or chloramphenicol and/or sugars (mannitol or sucrose). After stratification for at least 48 h at 4°C, plates were incubated in a growth chamber at 22°C under long-day conditions (8 h darkness, 16 h under fluorescent white light at a photon fluence rate of 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). In soil, plants were grown in 1:1:1 (v/v) perlite:vermiculite:phagnum mixture irrigated with mineral nutrients and grown under long-day conditions.

Identification of the T-DNA Insertion Site

After extraction of genomic DNA from *rif18/prl1-8* seedlings, the insertion site was identified using an inverse-PCR strategy as described (Sauret-Güeto et al., 2006). T-DNA condition in

Salk alleles was determined following the procedure described on the SIGnAL web page (<http://signal.salk.edu/>).

Analysis of Isoprenoid Transcript, Protein, and Metabolite Levels

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR analysis of DXS, DXR, and HDR transcript levels was carried out as described (Carretero-Paulet et al., 2006). Transcripts of the two genes encoding HMGR in *Arabidopsis*, *HMG1* and *HMG2*, were quantified as described (Nieto et al., 2009). Protein extraction and immunoblot analyses were carried out as described for DXS, DXR, and HDR (Flores-Pérez et al., 2008; Sauret-Güeto et al., 2006) and HMGR (Nieto et al., 2009). Chlorophyll and carotenoid pigments were extracted as described (Fraser et al., 2000). Dried pigment extract samples were re-suspended in 100 μl of ethylacetate and a volume of 25 μl was used to prepare a 1:40 dilution with acetone for spectrophotometric measurements of total chlorophyll and carotenoid contents as described (Lichtenthaler, 1987). Alternatively, pigment extracts were subjected to HPLC separation and quantification as described (Rodríguez-Concepción et al., 2004). Sterols were extracted and quantified as described (Nieto et al., 2009).

Enzyme Activity Determination

Enzyme activities were measured in 10-day-old seedlings grown on MS plates. For DXS and DXR, chloroplasts from 3 g of seedlings were isolated and re-suspended in 300 μl of HMS buffer as described (Flores-Pérez et al., 2008). Approximately one-third of this was re-centrifuged and re-suspended in an equal volume of 100 mM Tris-HCl pH 8 containing 10% glycerol, 0.5% TWEEN-20, 100 μM thiamin pyrophosphate (TPP), 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ascorbate, 2 mM imidazole, 1 mM sodium fluoride, 1.15 mM sodium molybdate, and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). After vortexing, three aliquots of 30 μl were mixed with 70 μl of enzyme reaction buffer each and incubated for 4 h at 24°C with gentle shaking (600 rpm). The reaction buffer for DXS activity contained 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 10% glycerol, 2.5 mM DTT, 1 mM TPP, 10 mM pyruvate, 10 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 2 mM imidazole, 1 mM sodium fluoride, 1.15 mM sodium molybdate, and 1% protease inhibitor cocktail. The reaction buffer for DXR activity contained 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10 mM NADPH, 10 mM DXP, phosphatase inhibitor mix, and 1% protease inhibitor cocktail. After incubation, aliquots of 100 μl of chloroform were added to each reaction mix and vigorously vortexed. The mixture was centrifuged at 13 000 g for 5 min and the aqueous (upper) phase was recovered. The products of DXS and DXR activities (DXP and MEP, respectively) were separated using a 1100 series liquid chromatograph (Agilent Technologies) as follows. A 20- μl aliquot of the reaction mixture was injected onto a Luna 5 μ C18(2) RP LC 250 $\times$ 4.6 mm column (Phenomenex) equilibrated at 100% 2 mM triethylamine (Fluka) in water with a pH of 4.95, which was adjusted with acetic acid (solvent A) and 0% acetonitrile (solvent B).

After 5 min of isocratic separation at 100% solvent A and 1 mL min⁻¹, a gradient was initiated, leading to 99% solvent A by 10 min, followed by a wash step with 100% solvent B for 5 min and a return to initial conditions and 5 min of further equilibration. Flow into the mass spectrometer electrospray chamber was diverted with a 4:1 ratio. Mass selective detection of the eluent was carried out using a coupled Esquire 6000 ESI ion trap mass spectrometer (Bruker-Daltonics) operating in negative mode and scanning from 50 to 800 m/z. The instruments settings were as follows: capillary voltage 4000 V, end plate offset -500 V, skimmer 40.0 V, exit capillary -50 V, nebulizer gas pressure 35 psi, gas temperature 330°C, drying gas setting 10 mL min⁻¹. DXP was detected as a molecular ion of 213 m/z. Using the same method, MEP was detected as a molecular ion of 215 m/z. DXS or DXR activities measured in this way were normalized to the number of chloroplasts used in each reaction mixture. HMGR activity was estimated as described (Nieto et al., 2009).

Precursor Feeding and Labeled Isoprenoid Analysis

Seedlings were grown for 18 d on MS plates supplemented with 4.5 mM [2-¹³C]mevalonolactone (Sigma-Aldrich) or 1.25 mM [5,5-²H]deoxyxylulose (Dudareva et al., 2005), kindly provided by S. Garms, in the presence or absence of isoprenoid biosynthesis inhibitors, 10 μM mevastatin or 10 μM clomazone. Sterols were extracted from 50 mg of whole seedlings and converted to their trimethylsilane (TMS) derivatives as described using cholesterol as an internal standard (Phillips et al., 2008a). The TMS-sterol derivatives were analyzed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass selective detector. Isotopic labeling patterns of sitosterol (the most abundant sterol in *Arabidopsis*) were determined following identification by retention time and mass spectra as described (Phillips et al., 2008a). Chlorophylls and carotenoids were extracted from 50 mg of frozen tissue by homogenization in cold acetone. After gentle shaking for 3 h at 4°C in the dark and centrifugation for 5 min at 3500 g, the supernatant was mixed with 0.25 vol. of water and filtered. The chlorophylls and carotenoids were separated using a 1100 series liquid chromatograph (Agilent Technologies) as follows. A 10-μL aliquot of the extract was injected onto a Supelcosil LC-18 RP column (particle size 3 μm, 75 × 4.6 mm, Sigma-Aldrich) equilibrated at 33% solvent A (0.2% formic acid in water) and 67% solvent B (acetone). After 4 min of isocratic separation at 33% solvent A and 1 mL min⁻¹, a gradient was initiated, leading to 10% solvent A by 12 min, followed by an adjusted gradient to 5% solvent A at 18 min. The column was then rinsed with 100% acetone for 2 min and then returned to initial conditions for 5 min. Flow from the column entering the mass spectrometer electrospray chamber was reduced with a 4:1 split. Mass selective detection of the eluent was carried out using a coupled Esquire 6000 ESI ion trap mass spectrometer (Bruker-Daltonics) operating in positive mode and scanning from 50 to 1000 m/z. The instrument settings were as follows: capillary

voltage -4000 V, end plate offset -500 V, skimmer 40.0 V, exit capillary 158 V, nebulizer gas pressure 25 psi, gas temperature 330°C, drying gas setting 8 mL min⁻¹. To determine incorporation levels of labeled intermediates into isoprenoid end products, the background arising from natural isotopic abundance was first calculated by observing the mass spectra from samples grown in MS media only. Incorporation of [2-¹³C]MVA was calculated by subtracting this background from the raw abundance of mass ions that represented the [M+1]⁺, [M+2]⁺, [M+3]⁺, etc. molecular species (corresponding to one, two, three, or more labeled units incorporated, respectively). For [5,5-²H]DX, the same calculation was made but using [M+2]⁺ and [M+4]⁺ (mass ions representing higher labeling events were too close to background levels for quantitation). Following background subtraction, the remaining abundance was attributed to exogenously applied label, and this was expressed as a percentage of the abundance of the entire molecular ion cluster. The percentage of labeled sitosterol, beta-carotene, or phytol was taken as the fraction of the total pool bearing at least one labeled unit in the end product.

FUNDING

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2005-00367, BIO2008-00432, BFU2006-00544, and CSD2007-00036) and the Generalitat de Catalunya (2005SGR-00914 and XaRBA) to M.R.C. and A.F., and the Max Planck Society to J.G. U.F.P., J.P.G., and P.B.P. received Ph.D. fellowships from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Garms for help with labeling experiments, and P. León and M. Walter for the gift of antibodies. The excellent technical support from A. Orozco and members of the Greenhouse, Genomics, and Microscopy facilities at CRAG is greatly appreciated. No conflict of interest declared.

REFERENCES

- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. **301**, 653–657.
- Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y., and Iba, K. (2000). Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol. Plant.* **108**, 19–24.
- Baena-González, E., and Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 474–482.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P., and Buchanan, B.B. (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **100**, 370–375.
- Baruah, A., Simkova, K., Hinch, D.K., Apel, K., and Laloi, C. (2009). Modulation of O-mediated retrograde signaling by the PLEIOTROPIC RESPONSE LOCUS 1 (PRL1) protein, a central integrator of stress and energy signaling. *Plant J.* **60**, 22–32.

- Bhalerao, R.P., et al. (1999). Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **96**, 5322–5327.
- Bick, J.A., and Lange, B.M. (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **415**, 146–154.
- Bläsing, O.E., et al. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**, 3257–3281.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* **40**, 188–199.
- Bouvier, F., Rahier, A., and Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **44**, 357–429.
- Carretero-Paulet, L., et al. (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**, 1581–1591.
- Carretero-Paulet, L., et al. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol. Biol.* **62**, 683–695.
- Córdoba, E., Salmi, M., and León, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J. Exp. Bot.* **60**, 2933–2943.
- Crowell, D.N., Packard, C.E., Pierson, C.A., Giner, J.L., Downes, B.P., and Chary, S.N. (2003). Identification of an allele of *CLA1* associated with variegation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **118**, 29–37.
- Dale, S., et al. (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**, 506–513.
- Dudareva, N., et al. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **102**, 933–938.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78–84.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., and 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. U S A.* **91**, 927–931.
- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., and León, P. (2001). 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 22901–22909.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., and Rodríguez-Concepción, M. (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell.* **20**, 1303–1315.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E., Holloway, D.E., and Bramley, P.M. (2000). Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**, 551–558.
- Fujioka, S., and Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 137–164.
- Hans, J., Hause, B., Strack, D., and Walter, M.H. (2004). Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize. *Plant Physiol.* **134**, 614–624.
- Hemmerlin, A., et al. (2003). Crosstalk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 26666–26676.
- Hsieh, M.H., and Goodman, H.M. (2005). The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* **138**, 641–653.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 45188–45194.
- Kobayashi, K., et al. (2007). Lovastatin insensitive 1, a novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **48**, 322–331.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D., and Gibson, S.I. (2000). The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* **23**, 587–596.
- Laule, O., et al. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **100**, 6866–6871.
- Learned, R.M. (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 645–655.
- Lee, J.H., et al. (2008). Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4–RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell.* **20**, 152–167.
- Leivar, P., et al. (2005). Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol.* **137**, 57–69.
- Lemaire, S.D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M., and Decottignies, P. (2004). New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **101**, 7475–7480.
- Li, Y., et al. (2007). Signaling from an altered cell wall to the nucleus mediates sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **19**, 2500–2515.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 351–382.
- Manzano, D., et al. (2004). The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 15) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta.* **219**, 982–992.

- Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., and Muranaka, T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta*. **216**, 345–350.
- Németh, K., et al. (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **12**, 3059–3073.
- Nieto, B., Fores, O., Arro, M., and Ferrer, A. (2009). *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry*. **70**, 53–59.
- Ohyama, K., Suzuki, M., Masuda, K., Yoshida, S., and Muranaka, T. (2007). Chemical phenotypes of the hmg1 and hmg2 mutants of *Arabidopsis* demonstrate the *in-planta* role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **55**, 1518–1521.
- Palma, K., et al. (2007). Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes Dev.* **21**, 1484–1493.
- Phillips, M.A., D'Auria, J.C., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2008a). The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell*. **20**, 677–696.
- Phillips, M.A., Leon, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2008b). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* **13**, 619–623.
- Polge, C., and Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* **12**, 20–28.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-Ali, T., and Harberd, N.P. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 67–88.
- Rodríguez-Concepción, M. (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem. Rev.* **5**, 1–15.
- Rodríguez-Concepción, M., and Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **130**, 1079–1089.
- Rodríguez-Concepción, M., et al. (2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell*. **16**, 144–156.
- Sauret-Güeto, S., et al. (2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 75–84.
- Schuur, C.A., et al. (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem. Rev.* **2**, 3–16.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M., and Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* **35**, 1133–1140.
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., and Hardie, D.G. (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol.* **120**, 257–274.
- Suzuki, M., et al. (2004). Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant J.* **37**, 750–761.
- Suzuki, M., et al. (2009). Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J. Exp. Bot.* **60**, 2055–2064.
- Weigel, D., et al. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 1003–1013.
- Wille, A., et al. (2004). Sparse graphical Gaussian modeling of the isoprenoid gene network in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* **5**, R92.
- Zeidler, J., et al. (1998). Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z. Naturforsch.* **53c**, 980–986.
- Zeidler, J., Schwender, J., Mueller, C., and Lichtenthaler, H.K. (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 796–798.

A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria

Félix J. Sangari^{a,1}, Jordi Pérez-Gil^b, Lorenzo Carretero-Paulet^{c,d}, Juan M. García-Lobo^a, and Manuel Rodríguez-Concepción^{b,1}

^aDepartamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), CSIC-UC-IDICAN, 39011 Santander, Spain; ^bDepartment of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAg) CSIC-IRTA-UAB, 08034 Barcelona, Spain; ^cDepartment of Applied Biology (Area of Genetics), University of Almería, 04120 Almería, Spain; and ^dFaculty of Life Sciences, University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, United Kingdom

Edited* by Elisabeth Gantt, University of Maryland, College Park, MD, and approved May 18, 2010 (received for review February 18, 2010)

Isoprenoids are a large family of compounds with essential functions in all domains of life. Most eubacteria synthesize their isoprenoids using the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway, whereas a minority uses the unrelated mevalonate pathway and only a few have both. Interestingly, *Brucella abortus* and some other bacteria that only use the MEP pathway lack deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) reductoisomerase (DXR), the enzyme catalyzing the NADPH-dependent production of MEP from DXP in the first committed step of the pathway. Fosmidomycin, a specific competitive inhibitor of DXR, inhibited growth of *B. abortus* cells expressing the *Escherichia coli* GlpT transporter (required for fosmidomycin uptake), confirming that a DXR-like (DRL) activity exists in these bacteria. The *B. abortus* DRL protein was found to belong to a family of uncharacterized proteins similar to homoserine dehydrogenase. Subsequent experiments confirmed that DRL and DXR catalyze the same biochemical reaction. DRL homologues shown to complement a DXR-deficient *E. coli* strain grouped within the same phylogenetic clade. The scattered taxonomic distribution of sequences from the DRL clade and the occurrence of several paralogues in some bacterial strains might be the result of lateral gene transfer and lineage-specific gene duplications and/or losses, similar to that described for typical mevalonate and MEP pathway genes. These results reveal the existence of a novel class of oxidoreductases catalyzing the conversion of DXP into MEP in prokaryotic cells, underscoring the biochemical and genetic plasticity achieved by bacteria to synthesize essential compounds such as isoprenoids.

Brucella | DXR | fosmidomycin | methylerythritol | phylogenetic

Isoprenoids, one of the largest groups of natural compounds, have a variety of roles in respiration, photosynthesis, membrane structure, allelochemical interactions, and growth regulation (1–3). All free-living organisms synthesize isoprenoids from the five carbon precursors isopentenyl diphosphate (IPP) and its double-bond isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). For decades it was believed that IPP was exclusively synthesized from acetyl coenzyme A by the mevalonate (MVA) pathway and then converted into DMAPP by a IPP/DMAPP isomerase (IDI) enzyme (4). However, in the early nineties of the last century it was discovered that IPP and DMAPP could be formed simultaneously from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate by an alternative route currently known as the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway (5, 6). It is now well established that most organisms only use one of the two pathways for isoprenoid biosynthesis. Thus, archaea (archaeobacteria), fungi, and animals synthesize IPP from MVA, whereas most bacteria (eubacteria) only use the MEP pathway for the production of isoprenoid precursors. Plants employ both pathways, but in different cell compartments: The MVA pathway synthesizes cytosolic isoprenoid precursors whereas the MEP pathway is located in plastids (7).

Because the MEP pathway is absent from animals (including humans) but it is essential in a large number of major bacterial pathogens, it has been proposed as a promising new target for the development of novel anti-infective agents (8, 9). However, information on possible mechanisms for resistance to a block of the MEP pathway is scarce. Antibiotic resistance can be caused by an active export or blocked import of the drug, by its inactivation inside the cell, by the genetic modification of its protein target, or by the use of an alternative pathway not affected by the inhibitor, to mention just a few possibilities. The best characterized inhibitor of the MEP pathway is fosmidomycin (FSM), first identified as a natural antibiotic effective against a wide bacterial spectrum. FSM is a specific competitive inhibitor of deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) reductoisomerase (DXR), the enzyme catalyzing the NADPH-dependent production of MEP from DXP in the first committed step of the pathway (10). The uptake of FSM by bacterial cells is an active process involving a cAMP-dependent glycerol 3-phosphate transporter (GlpT) protein (11). A defective *glpT* gene in *Escherichia coli* mutants or the absence of a GlpT homologue in other bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* leads to FSM resistance (11, 12). Overexpression of the *E. coli* *fsr* gene, encoding a protein with similarity to bacterial drug-export proteins, also results in FSM resistance, likely because this protein facilitates the export of the inhibitor (13). Furthermore, a number of independent mutations have been shown to rescue the survival of *E. coli* strains defective in the first two genes of the MEP pathway, suggesting that bacteria can respond to a block of DXP synthase (DXS) or DXR activities by using other enzymes that produce DXP or MEP when mutated (14). Alternative pathways and metabolic intermediates have been proposed to be used for the biosynthesis of isoprenoid precursors in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, which lacks the MVA pathway and does not use the MEP pathway under photosynthetic conditions (15, 16). These results illustrate how limited is still our knowledge of the alternative pathways that can be used by bacteria to synthesize their isoprenoids. In this context, we noticed that the completely sequenced genomes of a number of bacteria, including the pathogenic *Brucella abortus* 2308 (17), contain the genes of the MEP pathway with the only exception of that encoding DXR, suggesting that these bacteria

Author contributions: F.J.S., J.P.-G., and M.R.-C. designed research; F.J.S. and J.P.-G. performed research; F.J.S., J.P.-G., L.C.-P., and J.M.G.-L. contributed new reagents/analytic tools; F.J.S., J.P.-G., L.C.-P., J.M.G.-L., and M.R.-C. analyzed data; and F.J.S. and M.R.-C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: sangarif@unican.es or mrcgmp@cid.csic.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1001962107/-DCSupplemental.

may use an alternative enzyme to produce MEP. Here we report the cloning of the gene encoding such an alternative enzyme, demonstrate its biochemical activity both in vivo and in vitro, and examined its phylogenetic distribution across bacteria.

Results

***B. abortus* Cells Expressing GltT Become Sensitive to FSM.** The completely sequenced genome of *B. abortus* lacks a DXR-encoding gene but it contains homologues of the rest of MEP pathway enzymes (Fig. 1 and Table S1). This suggests that a *B. abortus* protein showing no overall homology to DXR might be involved in transforming DXP into MEP. However, growth of *B. abortus* cells was not inhibited by concentrations of FSM up to 1 mg/mL. This result suggested that the putative DXR-like (DRL) enzyme might not be inhibited by FSM or, alternatively, that the inhibitor was degraded, expelled, or not taken by living cells. Consistent with the last possibility, the *B. abortus* genome contains a *fsr* gene (*BAB1_0676*) but no *gltT* homologue. To investigate whether a defective uptake of FSM was the cause of the resistance phenotype of this bacterium, the *E. coli* gene encoding the GltT transporter was expressed in *B. abortus* cells. As shown in Fig. S1, transformants became FSM sensitive with a minimal inhibitory concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$, confirming that the resistance phenotype of wild-type cells resulted solely from the absence of an appropriate uptake mechanism. These data also suggested that the activity of the putative *B. abortus* DRL protein

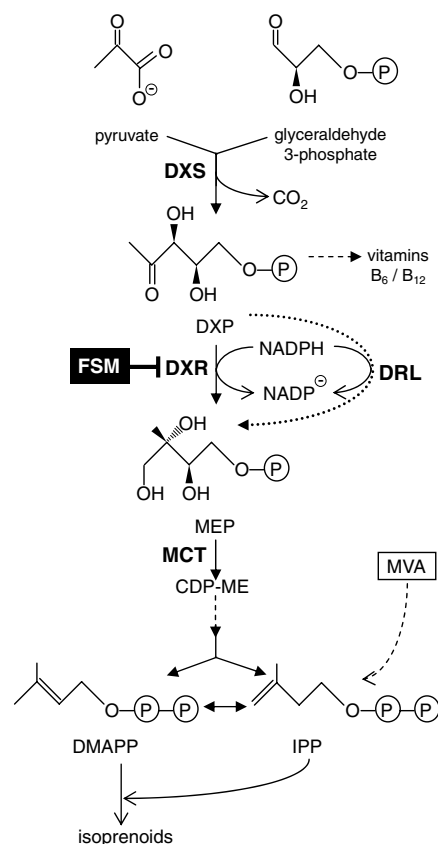


Fig. 1. The MEP pathway in bacteria. DXP, deoxyxylulose 5-phosphate; MEP, methylerythritol 4-phosphate; CDP-ME, cytidine diphosphomethylerythritol; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate. Enzymes are indicated in bold: DXS, DXP synthase (EC 2.2.1.7); DXR, DXP reductoisomerase (EC 1.1.1.267); MCT, MEP cytidyltransferase (EC 2.7.7.60). The step inhibited by FSM is indicated. Dashed closed arrows represent several steps. The *E. coli* strains defective in DXS (EcAB4-2), DXR (EcAB4-10), or MCT (EcAB4-7) activities used here were engineered to utilize exogenously supplied MVA for the biosynthesis of IPP (dashed open arrow). The dotted closed arrow marks the reaction catalyzed by the DRL enzyme identified in this work.

was actually inhibited by FSM, consistent with the hypothesis that the biochemical mechanism used by this alternative enzyme to produce MEP from DXP might be similar to that used by DXR.

Complementation of *E. coli* Strains Defective in DXR Leads to the Identification of DRL. To identify the gene encoding DRL in *B. abortus*, we constructed a genomic library of this bacterium and used it to complement a DXR-deficient *E. coli* mutant. The genome of *E. coli* strain EcAB4-10 harbours a deletion of the *dxr* gene and a synthetic MVA operon that allows the production of IPP and DMAPP (and therefore the survival of the cells) when MVA is supplied to the growth medium (14). Competent EcAB4-10 cells were transformed with the *B. abortus* genomic library and plated in the absence of MVA. Plasmids from positive transformants that grew without exogenous MVA were sequenced and shown to contain overlapping *B. abortus* genomic fragments containing the genes *BAB2_0264* and *BAB2_0265* (Fig. S2A). *BAB2_0265* codes for a hydrolase whereas *BAB2_0264* codes for a protein annotated as a putative oxidoreductase (a family that includes DXR) and was therefore selected for further experiments. Transformation of EcAB4-10 cells with a vector harbouring only *BAB2_0264* led to full complementation of MVA auxotrophy (Fig. 2), suggesting that the encoded protein (Q2YIM3) was the predicted *B. abortus* DRL enzyme. The same construct was used in complementation experiments with the *E. coli* strains EcAB4-2 and EcAB4-7, defective in DXS and MEP cytidyltransferase (MCT) activities respectively (14). As shown in Fig. 2, expression of *BAB2_0264* in these strains did not rescue their MVA auxotrophy. These results are strong in vivo evidence that this gene encodes a DXR-like enzyme that requires a supply of DXP (or a derived metabolite synthesized by DXS) to produce MEP (or a precursor that could be transformed into MEP or used by MCT activity) for isoprenoid biosynthesis (Fig. 1).

DRL and DXR Catalyze the Same Biochemical Reaction. The identified *B. abortus* DRL protein sequence showed no overall homology to DXR but to homoserine dehydrogenase (HD) enzymes (18). A search for functional domains detected the existence of an N-terminal NAD(P)-binding domain (Fig. S2B) arranged forming a modified Rossmann fold similar to that found in numerous dehydrogenases. This, together with the in vivo results (Fig. 2 and Fig. S1), suggested that DRL might use NADPH to catalyze a reaction very similar (or even identical) to that catalyzed by DXR. To verify this possibility, a recombinant DRL protein fused to a polyhistidine tail was produced in *E. coli* and purified (Fig. S3) to be used in in vitro DXR activity assays. Control assays were performed with recombinant DXR protein from *E. coli*, and the reaction products were analyzed by UPLC-MS/MS. Samples containing either DRL or DXR were found to produce MEP from DXP in a similar fashion (Fig. 3A). The identity of the reaction product in the DRL sample was confirmed by comparing its fragmentation pattern with that of a MEP standard (Fig. 3B). When reaction mixtures were prepared without enzyme or without NADPH, only peaks for m/z 213/97 (DXP) transition were detected (Fig. 3A). Furthermore, the activity of the recombinant DRL enzyme was sensitive to inhibition with FSM (Fig. 3C). Size-exclusion chromatography (Fig. S3) showed that the molecular weight of the active enzyme is ca. 80 kDa (i.e., about twice the size deduced from the protein sequence), suggesting that DRL is a homodimer, like DXR (10, 19). Also similarly, DRL activity has a pH optimum in the range 7.5–8 and a temperature optimum of 40–45 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. S4). Lineweaver–Burk plot of enzyme parameters (Fig. S4) showed a $V_{\text{max}} = 0.083 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, a $k_{\text{cat}} = 0.065 \text{ s}^{-1}$, and a $K_{\text{m}}(\text{DXP}) = 109 \mu\text{M}$ for the recombinant DRL protein. Under the same experimental conditions the $K_{\text{m}}(\text{DXP})$ for *E. coli* DXR was 211 μM , of the same order as the values reported in the literature for different DXR enzymes (19). By contrast, the k_{cat} values for DXR

Table 1 Complementation of the DXR-defective *E. coli* strain EcAB4-10 with the indicated sequences

DRL								DXR	
Accession	Length	Identity	Organism (Strain)	Group	Class	Clade	C-DRL	C-DXR	
1	Q2YIM3	438	100	<i>Brucella abortus</i> 2308	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
2	A6WYQ0	438	90	<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG3331	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
3	A6X6G6	439	75	<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG3331	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
4	Q98FT2	442	73	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
5	Q989B6	433	67	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
6	Q6G2D9	445	65	<i>Bartonella henselae</i> str Houston	Alphaproteobacteria	A	+	+	np
7	A9HDV1	443	62	<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	Alphaproteobacteria	B	+	+	–
8	Q9KES5	439	43	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Firmicutes	B	+	+	+
9	Q723A4	416	40	<i>Listeria monocytogenes</i> F2365	Firmicutes	B	+	+	+
10	B0S038	430	33	<i>Finagoldia magna</i> ATCC 29328	Firmicutes	A	+	+	np
11	B2IVC2	437	36	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Cyanobacteria	B	–	–	nt
12	Q3ME48	437	35	<i>Anabaena variabilis</i> PCC 7937	Cyanobacteria	B	–	–	nt
13	A9CES2	489	35	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Alphaproteobacteria	B	–	–	nt
14	Q1V2P9	430	29	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> HTCC1002	Alphaproteobacteria	B	–	–	nt
15	A0QQV9	454	32	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155	Actinobacteria	B	–	–	nt
16	B4EB12	442	27	<i>Burkholderia cepacia</i> J2315	Betaproteobacteria	B	–	–	nt

Identity values (%) are relative to the *B. abortus* DRL protein (Q2YIM3). Class column indicates whether sequences similar to both DRL and DXR (class B) or only to DRL but not to DXR (class A) are present in the genome of the same strain. Clade column indicates the sequences belonging (+) or not (–) to the DRL clade shown in Fig. 4. C-DRL column indicates the DRL sequences complementing (+) or not (–) the DXR-defective *E. coli* strain. C-DXR column indicates the DXR sequences complementing (+) or not (–) the DXR-defective *E. coli* strain; np, DXR sequence not present in the genome; nt, DXR sequence not tested in complementation experiments.

are between two and three orders of magnitude higher than that calculated for the *B. abortus* recombinant DRL (19). Together, DRL defines a new class of NADPH-dependent enzymes related to HD-like oxidoreductases that catalyze the formation of MEP

from DXP almost identically to DXR, even though the rate of conversion appears to be lower in the case of DRL.

The Distribution of DRL and DXR Sequences Is Not Mutually Exclusive in All Organisms. BLAST searches of Universal Protein Resource (UNIPROT) databases using the *B. abortus* DRL sequence (Q2YIM3) as a query retrieved 185 hits (Table S2). Most bacteria only had one putative DRL homologue, but 17 strains had two and 3 strains had three (Table S1 and Table S2). When the distribution of putative DRL sequences was compared to that of MEP pathway enzymes, three classes were established. The first one (class A) was formed by bacteria with DRL instead of DXR sequences in their genomes. Most of these DRL sequences (including the *B. abortus* protein identified here) were from alpha-proteobacteria, but some were also found in firmicutes (Table S1). In particular, the single DRL sequences found in the genomes of the alpha-proteobacterium *Bartonella henselae* (Q6G2D9) or the firmicute *Finagoldia magna* (B0S038) were found to be active in complementation experiments with the EcAB4-10 strain (Table 1). The same approach confirmed the activity of the duplicated DRL sequences present in the genome of the alpha-proteobacteria *Ochrobactrum anthropi* (A6WYQ0 and A6X6G6) and *Mesorhizobium loti* (Q98FT2 and Q989B6). The second class (B) was formed by bacteria with sequences encoding both DRL and DXR enzymes (Table S1). From these, the DRL sequences from the alpha-proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens* (A9CES2) and *Candidatus Pelagibacter ubique* (Q1V2P9), the beta-proteobacterium *Burkholderia cepacia* (B4EB12), the actinobacterium *Mycobacterium smegmatis* (A0QQV9), and the cyanobacteria *Nostoc punctiforme* (B2IVC2) and *Anabaena variabilis* (Q3ME48) failed to rescue the loss of DXR activity in *E. coli* cells (Table 1). By contrast, sequences from the alpha-proteobacterium *Roseobacter litoralis* (A9HDV1) and the firmicutes *Listeria monocytogenes* (Q723A4) and *Bacillus halodurans* (Q9KES5) were shown to be active in complementation assays (Table 1), suggesting that these organisms might have redundant enzymes catalyzing the production of MEP. However, only the DXR homologues from *Listeria monocytogenes* (Q720A5) and *Bacillus halodurans* (Q9KA69) were found to complement the EcAB4-10 mutant (Table 1 and Fig. S5). The DXR sequence from *Roseobacter litoralis* (A9GU34) was found to be inactive, likely as a consequence of the high number of amino acid changes in positions highly conserved across functional DXR enzymes

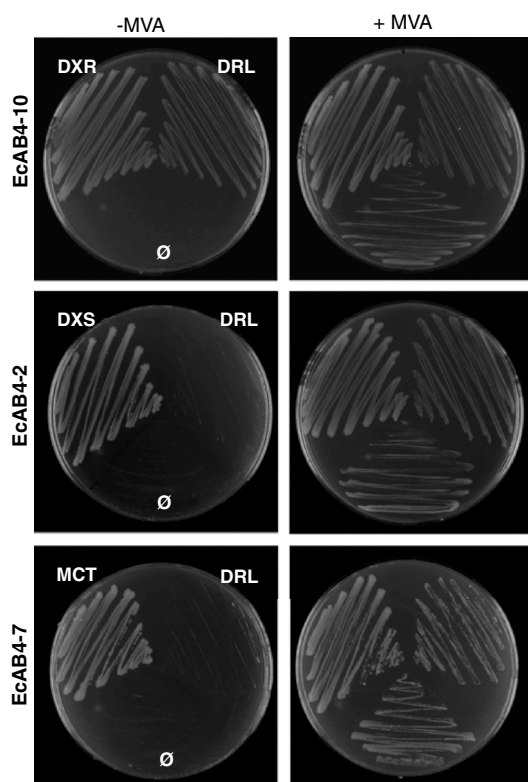


Fig. 2. Complementation of mutant *E. coli* strains with the *B. abortus* gene encoding DRL. *E. coli* strains defective in DXR (EcAB4-10), DXS (EcAB4-2), or MCT (EcAB4-7) activities were transformed with a plasmid expressing the *BAB2_0264* gene (DRL). Control experiments were made with plasmids for the expression of the *E. coli* genes encoding DXR, DXS, or MCT (33), as well as empty vectors (Ø). Ability of the cloned gene to rescue growth of the corresponding mutant strains was ascertained by streaking single colonies on plates either supplemented (+) or not (–) with 1 mM MVA as indicated.

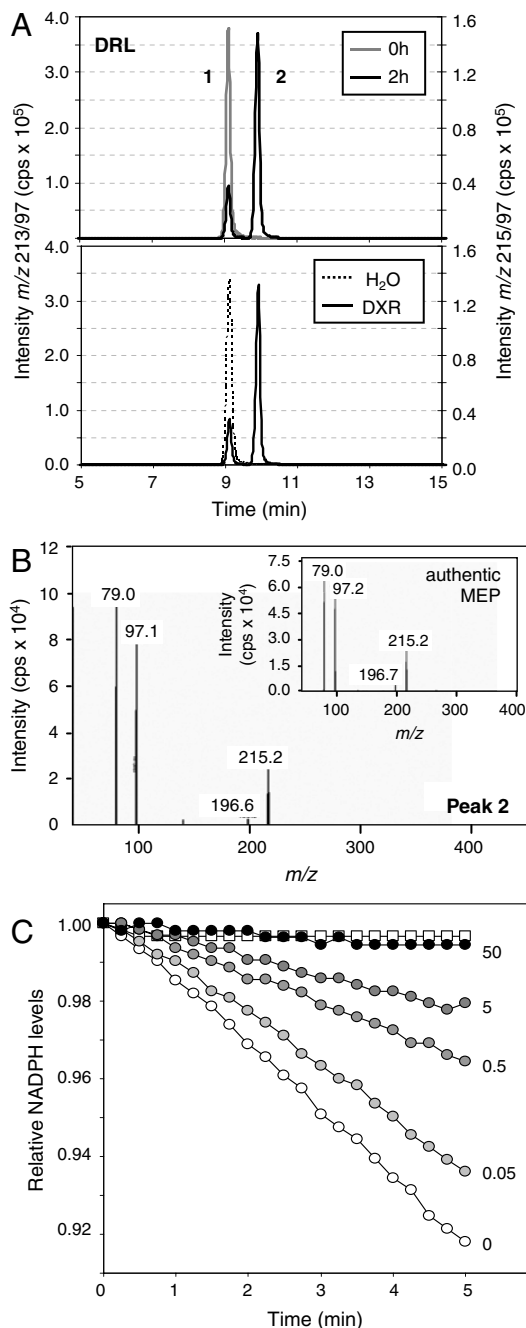


Fig. 3. Biochemical characterization of a recombinant DRL protein. (A) MRM chromatograms of a reaction mixture containing $MgCl_2$, DTT, NADPH, and DXP before (0 h) and 2 h after adding recombinant DRL. (Lower) Result after incubation for 2 h with either no enzyme or purified DXR instead of DRL. Peak 1 corresponds to DXP (m/z 213/97, 9.15 min). Peak 2 corresponds to MEP (m/z 215/97, 9.90 min), as demonstrated by comparing its mass spectra with that of a MEP standard (B). (C) Changes in NADPH levels monitored by absorbance at 340 nm in reaction mixtures like those described in (A) after adding recombinant DRL (circles). The DXR inhibitor FSM was incorporated in the mixtures at the indicated concentration (μ M). A control without DXP (white squares) is shown.

(Fig. S6). These results indicate that some class B strains are functionally equivalent in terms of the MEP pathway to those in class A (i.e., have an active DRL enzyme but lack DXR activity). A third class (C) was formed by bacteria with DRL but no MEP pathway enzymes. This group included archaea and bacteria that do not use the MEP pathway for isoprenoid biosynthesis (Table S1).

DRL Homologues Cluster in a Monophyletic Group. When putative DRL amino acid sequences resulting from BLAST searches were subjected to Maximum Likelihood (ML) phylogenetic analysis, all DRL sequences shown to be active in complementation experiments could be grouped in a clade (Fig. 4). Sequence identity of the proteins within the DRL clade ranged from 33–100% (Table S2). The DRL clade was supported by relatively low bootstrap values (64), but was consistently retrieved through two additional independent phylogenetic reconstruction methods [Neighbor Joining (NJ) and Maximum Parsimony (MP)]. All the organisms from class A had at least one DRL sequence from this clade (Table S1). The only exception was protein B5J045 from the strain 307 of the alpha-proteobacterium *Octadecabacter antarcticus*. However, a DRL sequence belonging to the clade (B5K941) was found in the genome of strain 238 (Table S1). *Chloroflexus aurantiacus* (chloroflexi) was the only class C organism harbouring a sequence from the DRL clade (Table S1). The rest of sequences in the DRL clade were from organisms belonging to class B (i.e., also had a DXR sequence in their genomes although not necessarily encoding an active DXR enzyme; Table 1). Most of these organisms were firmicutes but sequences from the alpha-proteobacterium *Roseobacter litoralis*, the beta-proteobacterium *Verminephrobacter eiseniae* and the marine actinobacterium PHSC20C1 were also included in the clade (Fig. 4 and Table S1). All the sequences tested from class B organisms that were not included in the DRL clade failed to complement the EcAB4-10 strain (Table 1), indicating that they were not true DRL enzymes. Taken together, these results strongly suggest that sequences showing identity to DRL but excluded from the DRL clade might not be functional DRL enzymes. Although some residues and short motifs are only found in active DRL sequences (Fig. S2B), future work will be necessary to ascertain their importance for enzymatic activity.

Discussion

Phylogenetic analyses suggest that eukaryotes have inherited their pathways for IPP and DMAPP production from prokaryotes (20, 21). These studies proposed that the MVA pathway is germane to archaea (where it is required for the production of membrane ether-linked isoprenoid lipids) whereas the MEP pathway is the ancestral route in bacteria, serving for the production of precursors for quinones, carotenoids, and membrane stabilizers such as hopanoids. Although the majority of bacteria exclusively use the MEP pathway for IPP and DMAPP biosynthesis, there are some exceptions (20–22). For example, several species of parasitic *Rickettsia* and *Mycoplasma* bacteria have no genes encoding enzymes of the MVA or the MEP pathway, probably because they obtain their isoprenoids from host cells. Some bacteria have been confirmed to use the MVA pathway instead of the MEP pathway for IPP and DMAPP synthesis, whereas others possess the two full pathways (21–24). Strikingly, related species may use different pathways for isoprenoid biosynthesis as well as unrelated bacteria may use the same pathway. Here we show that some bacteria that synthesize their isoprenoids by the MEP pathway do not use DXR but DRL, either because they lack a copy of DXR in their genomes (those belonging to class A) or because their DXR sequence is not functional (such as that of *Roseobacter litoralis*; Table 1). Other class B strains might use both DXR and DRL (Table 1). Interestingly, some bacteria such as *Listeria monocytogenes* have complete and functional MVA and MEP pathways (24), including an active DXR protein, and additionally possess an active DRL enzyme (Table 1). Others such as *Chloroflexus aurantiacus*, which only uses the MVA pathway, might have a functional DRL (A9W9R9) as deduced for its position in the DRL clade (Fig. 4). Although functional DRL sequences have been mainly found in groups of alpha-proteobacteria and firmicutes, isolated instances of likely active DRL enzymes (as deduced by their grouping within the DRL clade) can be found

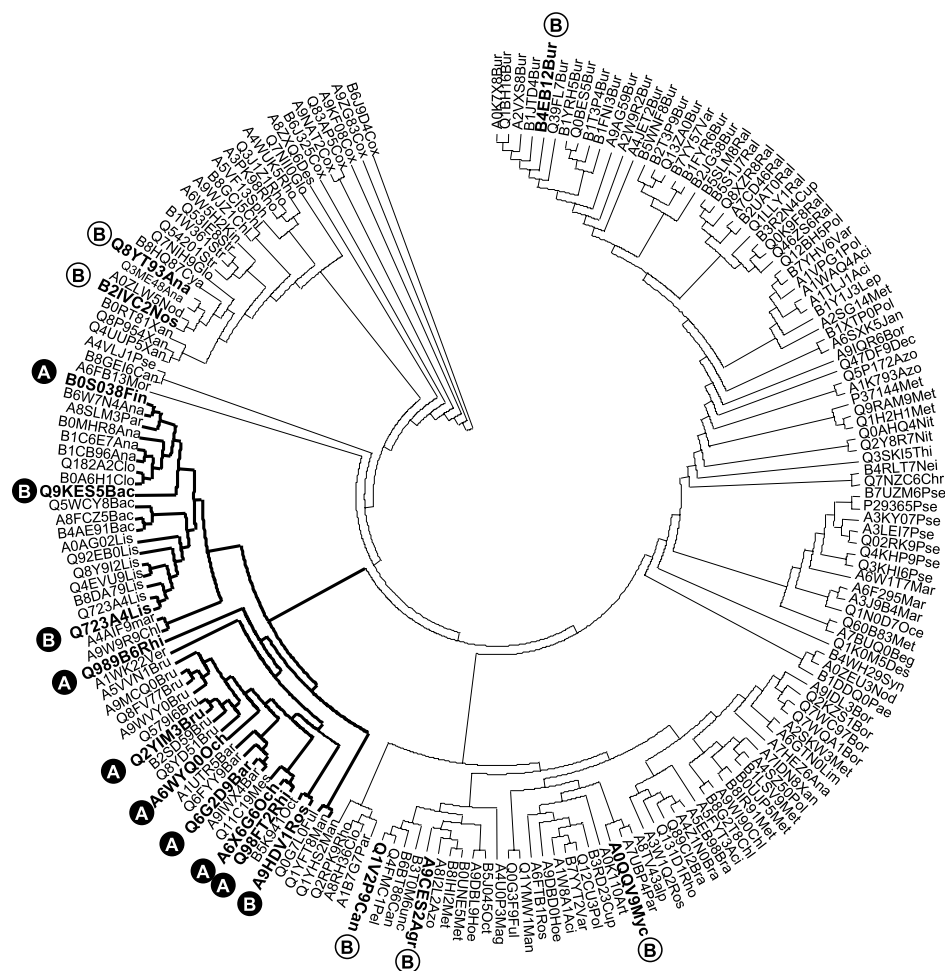


Fig. 4. Phylogenetic analysis of putative DRL homologues. Unrooted ML phylogenetic tree depicting evolutionary relationships among DRL sequences resulting from BLAST searches with *B. abortus* DRL as a query (Table S2). Sequences complementing the *E. coli* EcAB4-10 strain are indicated with a black circle, whereas those that do not complement the mutant are indicated with a white circle. The letter inside the circles indicates whether the sequence belongs to an organism from class A (lacking a DXR sequence) or class B (harboring a DXR sequence). The DRL clade grouping all active DRLs is highlighted.

in specific beta-proteobacteria, chloroflexi, and actinobacteria strains (Table S1). The scattered distribution of genes from both the MVA and the MEP pathways observed in living organisms was explained as a result of lateral gene transfer (LGT) among eukaryotes, bacteria, and archaea (20, 21). The outstanding discontinuity found in DRL distribution might be also explained by LGT occurring at different times during bacterial evolution (25). Further support for LGT as the most parsimonious explanation for the patchy distribution of DRL enzymes is provided by the discrepancy between DRL-based phylogenetic trees and organism phylogenies. Subsequent gene duplication and/or loss in specific bacterial evolutionary lineages might also have contributed to shape the puzzling phylogenetic distribution of DRL.

The use of alternative enzymes for the same biosynthetic step is not new in the isoprenoid field. For example, the interconversion of the universal IPP and DMAPP precursors is catalyzed by two types of IDI enzymes in bacteria: type I (similar to that found in animals, fungi, and plants) and type II, an unrelated enzyme (26). Although IDI activity is only essential in organisms that rely exclusively on the MVA pathway for IPP synthesis, a recent phylogenetic analysis found that many bacteria using the MEP pathway possess either a type I or a type II isomerase, whereas some bacteria have both (22). Similar to that proposed for bacteria with both type I and type II IDI enzymes, the presence of different enzymes catalyzing the conversion of DXP into MEP in the same organism (as it is the case of DXR and DRL in the firmicutes *Listeria monocytogenes* or *Bacillus halodurans*; Table 1) might confer an advantage in critical situations where isoprenoid biosynthesis is absolutely required. The existence of other class B organisms with a nonfunctional copy of any of those two enzymes

would imply that such redundancy is not always favored, resulting in the mutation and inactivation of either DRL or DXR in that particular strain. This scenario provides an invaluable natural model to examine the evolutionary mechanisms responsible for the co-occurrence of homologous and nonhomologous genes encoding functionally redundant enzymes. All together, these results underscore the biochemical and genetic plasticity achieved by bacteria to synthesize essential compounds such as isoprenoids, a crucial point that should be further investigated before considering the MEP pathway as a convenient target for new anti-infective drugs.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Media, and Reagents. The *Brucella abortus* 2308 strain was grown in *Brucella* broth or *Brucella* agar plates (Pronadisa). *Escherichia coli* strains were grown in LB broth or plates. When indicated, the growth medium was supplemented with different concentrations of fosmidomycin (Molecular Probes) or 1 mM MVA prepared as described (27). Unless stated otherwise, chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich. Restriction enzymes and DNA modifying enzymes were purchased from Promega. Oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich, and are shown in Table S3.

Construction and Screening of a *B. abortus* Library. Genomic DNA was extracted from *B. abortus* 2308 cells as previously described (28). Following partial digestion with *Sau*3A, fragments ranging from 3–6 kb were gel-purified and ligated into pUC19 previously digested with *Bam*HI and dephosphorylated. The ligation mixture was transformed into *E. coli* DH5 α and plated in LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin to amplify the library. Plasmid DNA was obtained from cells scrapped from the plates and pooled. For the screening, 1 μ g of this DNA was electroporated into the DXR-defective EcAB4-10 strain and transformants were selected on LB plates supplemented with 20 μ g/mL chloramphenicol (to select for the disruption of the *dxr* gene), 25 μ g/mL kanamycin

(to select for the presence of the MVA operon) and 100 µg/mL ampicillin (to select for the incorporation of library plasmids). Plasmids isolated from transformants were sequenced to check the identity of the inserts.

Cloning of DRL Sequences and Complementation Assays. Genomic DNA from bacteria containing putative DRL sequences was PCR-amplified with the sets of oligonucleotides described in Table S3. DNA fragments of the expected size were purified and analyzed by restriction enzyme digestion to confirm their identity. Positive fragments were cloned into pJET1.2 (Fermentas). Plasmid DNA from two independent clones of each construct was used to transform *E. coli* EcAB4-10 cells. The cloned fragments were considered to encode functional DRL enzymes when they allowed growth of transformant EcAB4-10 cells in the absence of MVA. When indicated, *E. coli* strains EcAB4-2 and EcAB4-7 were also used for complementation assays as described (14).

Production of Recombinant *B. abortus* DRL Protein. Oligonucleotides DRL_NdeI.F and DRL_XhoI.R (Table S3) were used to amplify *BAB2_02264* without the stop codon from *B. abortus* 2308 genomic DNA. The amplified DNA fragment was cloned into the expression vector pET23b (Novagen) after digestion with *NdeI* and *XhoI*. Following transformation of *E. coli* BL21(DE3) pLys cells with the resulting construct (pET-DRL), the production of a chimeric DRL protein with a C-terminal tag of six histidine residues was induced by adding 0.4 mM IPTG to cultures with an OD₆₀₀ = 0.5. After growth for 14 h at 28 °C, bacterial cells were recovered by centrifugation and the recombinant DRL protein was purified as described in *SI Materials and Methods*. Fractions containing DRL were pooled and stored at –20 °C in 50% glycerol.

Biochemical Characterization of the *B. abortus* DRL Enzyme. The purified *B. abortus* DRL protein was assayed for potential DXR activity as follows. Reaction mixtures were prepared with 15 µg of recombinant DRL in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.78 mM DXP (Echelon), and 1 mM NADPH. Control reactions were prepared with either 15 µg of recombinant *E. coli* DXR protein or water. After incubation at 37 °C for 2 h, samples were diluted 2:1 with water and analyzed by ultraperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) in tandem mode as

described in *SI Materials and Methods*. For the FSM inhibition assay and calculation of kinetic parameters, DXR activity was monitored by the change in absorbance at 340 nm as NADPH was oxidized.

Sequence and Phylogenetic Analysis. Genes encoding isoprenoid biosynthetic enzymes were retrieved using the genomic BLAST tool at the National Center for Biotechnology Information database. BLAST searches for putative DRL sequences were performed in the UNIPROT database. Only hits returning scores corresponding to E-values <0.001 were considered significant. Phylogenetic analyses were performed from protein sequence alignments obtained with CLUSTALW (29) by the ML, NJ, and MP methods. ML analyses were performed in PHYML v2.4.5, using the Jones, Taylor, and Thornton model of protein evolution (30, 31). NJ and MP were implemented in MEGA 4.0, using the default settings (32). To provide statistical confidence for the retrieved topology, a bootstrap analysis with 1,000 replicates was performed in each case.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank L. M. Lois and J. F. Martínez-García for critical reading of the manuscript; Ana M. Cayón for technical help; and Juan Sanjuán (Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, Spain), Héctor D. de Paz (University of Cantabria, Santander, Spain), Cristina Viadas and Ignacio López-Gorri (University of Navarra, Pamplona, Spain), M. Pilar Garcillán (University of Cantabria-IBBTEC, Santander, Spain), Annette Vergunst (Université de Montpellier, Nîmes, France), Carlos Martín (University of Zaragoza, Zaragoza, Spain), Jose A. Vazquez-Bolland (University of Edinburgh, Edinburgh, UK), Takatsugu Goto (Gifu University, Gifu, Japan), Hideto Takami (Institute of Biogeosciences-JAMSTEC, Yokosuka, Japan), Amke den Dulk-Ras (Leiden University, Leiden, The Netherlands) Marie Johnson and Stephen Giovannoni (Oregon State University, Corvallis, OR), Yanhong Liu (US Department of Agriculture Agricultural Research Service, Pennsylvania), and Thorsten Brinkhoff (University of Oldenburg, Germany) for generously providing us with bacterial strains or DNA samples. The Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación provided a PhD fellowship to J.P.-G., a Juan de la Cierva contract to L.C.-P. (cofinanced by the European Social Fund), research Grants BIO2007-63656 to F.J.S. and BIO2008-00432 to M.R.-C., as well as funding through a Consolider program (CSD2007-00036). This work was also supported by grants from the Fundación Marqués de Valdecilla (API 07/01) to F.J.S., and the Generalitat de Catalunya (SGR and XaRBA) to M.R.-C.

- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation, and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44:357–429.
- Sacchetti JC, Poulter CD (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277:1788–1789.
- Croteau R, Kutchan T, Lewis N (2000) Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds B Buchanan, W Gruissem, and R Jones (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD), pp 1250–1268.
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430.
- Phillips MA, Leon P, Boronati A, Rodriguez-Concepcion M (2008) The plastidial MEP pathway: Unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci* 13:619–623.
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* 101:643–652.
- Rodriguez-Concepcion M, Boronati A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130:1079–1089.
- Rodriguez-Concepcion M (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des* 10:2391–2400.
- Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem Soc Trans* 33:785–791.
- Steinbacher S, et al. (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem* 278:18401–18407.
- Sakamoto Y, Furukawa S, Ogiwara H, Yamasaki M (2003) Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:2030–2033.
- Brown AC, Parish T (2008) Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiol* 8:78.
- Fujisaki S, et al. (1996) Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. *Gene* 175:83–87.
- Sauret-Gueto S, Uros EM, Ibanez E, Boronati A, Rodriguez-Concepcion M (2006) A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett* 580:736–740.
- Poliquin K, et al. (2004) Inactivation of *slf1556* in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrates in vitro. *J Bacteriol* 186:4685–4693.
- Ershov YV, Gantt RR, Cunningham FX, Jr, Gantt E (2002) Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* 184:5045–5051.
- Chain PS, et al. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* 73:8353–8361.
- DeLaBarre B, Thompson PR, Wright GD, Berghuis AM (2000) Crystal structures of homoserine dehydrogenase suggest a novel catalytic mechanism for oxidoreductases. *Nat Struct Biol* 7:238–244.
- Proteau PJ (2004) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg Chem* 32:483–493.
- 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* 97:13172–13177.
- Boucher Y, Doolittle WF (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol* 37:703–716.
- Laupitz R, et al. (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem* 271:2658–2669.
- Kuzuyama T, Seto H (2003) Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* 20:171–183.
- Begley M, et al. (2004) The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett* 561:99–104.
- Boucher Y, et al. (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu Rev Genet* 37:283–328.
- Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:932–937.
- Rodriguez-Concepcion M, et al. (2000) Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 473:328–332.
- Sangari FJ, Agüero J (1994) Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the *ery* locus. *Vaccine* 12:435–438.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275–282.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Sauret-Gueto S, Ramos-Valdivia A, Ibanez E, Boronati A, Rodriguez-Concepcion M (2003) Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 307:408–415.

Crystal Structure of *Brucella abortus* Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase-like (DRL) Enzyme Involved in Isoprenoid Biosynthesis^{*,§}

Received for publication, February 20, 2012, and in revised form, March 20, 2012. Published, JBC Papers in Press, March 22, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.354811

Jordi Pérez-Gil^{‡1}, Bárbara M. Calisto^{§1}, Christoph Behrendt[¶], Thomas Kurz[¶], Ignacio Fita[§], and Manuel Rodríguez-Concepción^{‡2}

From the [‡]Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)-Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)-Universitat de Barcelona (UB), 08193 Barcelona, Spain, the [§]Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) and Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), 08028 Barcelona, Spain, and the [¶]Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

Background: The current antibiotic resistance epidemic demands new drugs specifically targeting infective agents.

Results: The crystal structure of the *Brucella* DRL enzyme shows major differences compared with DXR, which catalyzes the same reaction in most other bacteria.

Conclusion: Structural information will allow development of inhibitors targeting only DRL.

Significance: Drugs against DRL could function as highly specific, narrow-range antibiotics.

Most bacteria use the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway for the synthesis of their essential isoprenoid precursors. The absence of the MEP pathway in humans makes it a promising new target for the development of much needed new and safe antimicrobial drugs. However, bacteria show a remarkable metabolic plasticity for isoprenoid production. For example, the NADPH-dependent production of MEP from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate in the first committed step of the MEP pathway is catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) in most bacteria, whereas an unrelated DXR-like (DRL) protein was recently found to catalyze the same reaction in some organisms, including the emerging human and animal pathogens *Bartonella* and *Brucella*. Here, we report the x-ray crystal structures of the *Brucella abortus* DRL enzyme in its apo form and in complex with the broad-spectrum antibiotic fosmidomycin solved to 1.5 and 1.8 Å resolution, respectively. DRL is a dimer, with each polypeptide folding into three distinct domains starting with the NADPH-binding domain, in resemblance to the structure of bacterial DXR enzymes. Other than that, DRL and DXR show a low structural relationship, with a different disposition of the domains and a topologically unrelated C-terminal domain. In particular, the active site of DRL presents a unique arrangement, suggest-

ing that the design of drugs that would selectively inhibit DRL-harboring pathogens without affecting beneficial or innocuous bacteria harboring DXR should be feasible. As a proof of concept, we identified two strong DXR inhibitors that have virtually no effect on DRL activity.

The increased prevalence of antibiotic resistance, mainly caused by the use of broad-spectrum antibiotics at a huge scale in medicine and industry, is an ecological disaster that threatens to end the golden age of antibiotic therapy. One of the most promising novel antibiotic targets is the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP)³ pathway for isoprenoid biosynthesis (1, 2). Isoprenoids are a large group of compounds synthesized by all free-living organisms from the universal precursors isopentenyl diphosphate and its isomer dimethylallyl diphosphate (3–5). Two pathways have been described for the synthesis of these precursors. Archaea (archaeobacteria), fungi, and animals synthesize isopentenyl diphosphate from mevalonate (MVA) and then convert it into dimethylallyl diphosphate by an isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase enzyme. By contrast, most bacteria (eubacteria) and Apicomplexa protozoa (including the malaria parasites) use the MEP pathway, a completely different route that simultaneously produces both isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate (3, 6). Specific inhibitors of the MEP pathway (which is absent in mammals) are expected to develop into much needed antibiotics and novel antimalaria agents (1, 2). Among them, fosmidomycin (FSM) and derivatives such as FR900098 (Fig. 1) have already been shown to act as broad-spectrum agents against multidrug-resistant bacteria and malaria parasites

^{*} This work was supported by a FPI fellowship (to J. P. G.), Research Grants BFU2009-09268 (to I. F.) and BIO2008-00432 (to M. R.-C.), and Consolider Program Grant CSD2007-00036 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and by Grants 2009SGR-26 and XRB from the Generalitat de Catalunya.

[§] This article was selected as a Paper of the Week.

[§] This article contains supplemental Figs. S1–S4 and Table S1.

The atomic coordinates and structure factors (codes 3UPL and 3UPY) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-563-6600 (ext. 3222); E-mail: manuel.rodriguez@craggenomica.es.

³ The abbreviations used are: MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; MVA, mevalonate; FSM, fosmidomycin; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; DXR, DXP reductoisomerase; DRL, DXR-like; BaDRL, *B. abortus* DRL; EcDXR, *E. coli* DXR.

Targeting Isoprenoid Enzymes for Novel Antibiotics

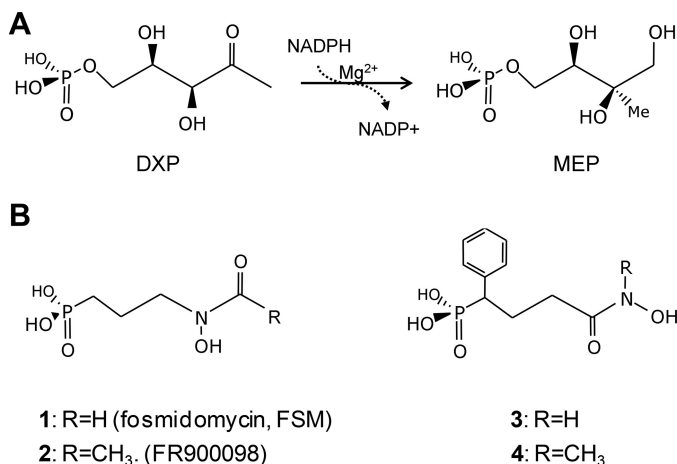


FIGURE 1. **Schemes of chemical structures.** A, reaction catalyzed by DXR and DRL enzymes. B, structure of DXR inhibitors used in this work.

(7–9). FSM is an inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) reductoisomerase (DXR), the enzyme catalyzing the NADPH-dependent production of MEP from DXP (Fig. 1) (10, 11). DXR crystal structures from different bacteria (including *Escherichia coli*) and the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* are currently available (12–19).

Selection acts to maintain isoprenoid production but not necessarily at the level of individual enzymes (20, 21). Thus, two types of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase enzymes with no sequence, structural, or catalytic similarity have been found in bacteria (22–24). In the case of DXR, we recently identified a DXR-like (DRL) enzyme that shows some sequence similarity to DXR only at the level of the NADPH-binding domain but catalyzes the same biochemical reaction (25). DRL is found instead of DXR in emerging animal and human pathogens such as *Bartonella* (which is responsible for a variety of HIV-associated infections) and *Brucella* (which usually infects livestock but can also spread to humans) (26–28). Although DRL can be inhibited with FSM (25), it would be most interesting to develop specific antibiotics against DRL-harboring pathogens that would not affect beneficial bacteria that use DXR (like those present in the intestine). However, the identification and development of such narrow-spectrum drugs require structural information for both enzymes.

Here, we report the crystal structure of the *Brucella abortus* DRL (*Ba*DRL) enzyme in its apo form and in complex with FSM solved to 1.5 and 1.8 Å resolution, respectively. DRL catalytic residues were found to be structurally nonequivalent to DXR catalytic residues. Furthermore, comparison of the active sites of both enzymes led to the identification of FSM derivatives that inhibited DXR but had virtually no effect on DRL activity *in vitro*, opening the door to the design of new, safe, and highly specific antibiotics against only one of these two types of enzymes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Expression and Purification—Protein expression and purification were carried out as described (25). Protein-containing fractions were pooled, concentrated, and loaded onto a HiLoad Superdex 200 16/60 gel filtration column (GE Health-

care) that was equilibrated in buffer solution containing 0.02 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, and 5% (v/v) glycerol. The correct size of the recombinant *Ba*DRL protein was verified by SDS-PAGE. Size exclusion chromatography and dynamic light scattering experiments confirmed *Ba*DRL to be a dimer in solution by showing a monodisperse peak of the dimer size. Purified *Ba*DRL was concentrated to 10 mg/ml and flash-frozen in liquid nitrogen for storage at –80 °C. The SeMet-labeled protein was produced by the methionine pathway inhibition method (29). PCR amplification of the pET-DRL plasmid (25) with complementary primers containing the desired mutations (E209S/R213A-F, 5'-GATTACAGGCA-ATCAGCAGACCGCGCGAACATGAATGTG; and E209S/R213A-R, 5'-CACATTCATGTTTCGCGCGGTCTGCTGAT-TGCCTGTAATC) followed by DpnI digestion generated the construct for the expression of the double-mutant *Ba*DRL protein. Both SeMet-labeled and mutant *Ba*DRL proteins were expressed and purified following the protocol used for the unlabeled wild-type protein.

Crystallization—Initial crystallization conditions were screened by the sparse matrix method at 20 °C. In the optimized crystallization conditions obtained by vapor diffusion in hanging drops, 1 μl of protein (7.5–10 mg/ml) in 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, and 5% (v/v) glycerol was mixed with 1 μl of reservoir solution (0.1 M HEPES (pH 7.0), 14–20% (w/v) PEG 4000, and 0.2 M MgCl₂). The drops were equilibrated against 1 ml of reservoir solution. SeMet-labeled crystals were obtained at a protein concentration of 5 mg/ml in the same conditions determined for the unlabeled protein. *Ba*DRL crystals were, in some cases, soaked with 0.5 mM FSM for 10 min to solve the structure of the *Ba*DRL-FSM complex. Large needle-like crystals grew in just 5 days, reaching a maximum size of ~0.03 × 0.03 × 0.15 mm.

Data Collection and Reduction—Crystals were briefly soaked in a drop of cryoprotectant solution composed of 100 mM HEPES (pH 7.0), 20% (w/v) PEG 4000, 200 mM MgCl₂, and 20% (v/v) glycerol (and also 0.5 mM FSM when complexation with the inhibitor was intended) before being flash-cooled in liquid nitrogen and exposed to x-rays. Diffraction data were collected in several beam lines of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) (supplemental Table S1). Data were processed and scaled using DENZO and SCALEPACK (30). Processing statistics are summarized in supplemental Table S1.

Structure Determination and Refinement—The program package HKL2MAP (31) was used both to locate the osmium sites in the primitive orthorhombic P2₁2₁2 crystal form, which had been soaked with OsCl₆, and to calculate initial phases to 2.8 Å resolution. To improve the electron density, the osmium derivative was then combined with data from two other crystal forms: a SeMet-labeled *Ba*DRL crystal belonging to space group C2 and a native data set from a primitive triclinic (P1) crystal. The crystal density modification protocol was performed with DMM (32), including averaging, solvent flattening, and histogram matching. A model containing *Ba*DRL residues 2–437 was derived from progressive improvement of the electron density map using iterative rounds of restrained refinement with Refmac5 (33) and manual building with Coot (32). Refinement statistics are summarized in supplemental Table

S1. TLS refinement in Refmac5 was applied in the last stage using eight TLS groups. Atomic isotropic *B*-factors were refined only in the final cycles. The stereochemical quality of the final models, assessed with MolProbity (34), showed no residues in the disallowed region of the Ramachandran plot. Atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank (apo-*BaDRL*, code 3UPL; and *BaDRL*-FSM complex, code 3UPY).

Activity Assays—*In vivo* activity assays were carried out by complementation of the MVA auxotrophy of DXR-defective *E. coli* EcAB4-10 cells as described (35). Positive transformants carrying plasmids with either wild-type or mutant versions of *BaDRL* were selected on MVA-supplemented LB plates. Three independent colonies were then streaked on LB plates with no MVA or used to inoculate 5 ml of LB liquid medium with no MVA. After incubation at 37 °C, complementation was assessed by visually monitoring the development of colonies on plates and by quantifying the growth of liquid cultures by absorbance at 600 nm. *In vitro* activity was estimated using a photometric assay as described (25). For calculation of IC_{50} values, seven concentrations of the inhibitors in the range of 0.016–100 μ M were added to the reaction mixtures with 35 μ g of recombinant *BaDRL*. Means $\pm$ S.D. were calculated from three replicates with GraphPad Prism 5 using a nonlinear regression method.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall Architecture—The crystal structure of the full-length *BaDRL* enzyme fused to a C-terminal hexahistidine tag was solved by the single-wavelength anomalous dispersion method of an osmium derivative together with density averaging between the three crystal forms available (see “Experimental Procedures”). The structures of the apoprotein (Fig. 2) and a binary complex, obtained by soaking with the inhibitor FSM (Fig. 3), were refined to 1.5 and 1.8 Å resolution, respectively (supplemental Table S1). The refined models comprise Thr-2 to Gly-437, with most of the side chains defined unambiguously in the electron density maps for the two subunits found in the asymmetric unit of the triclinic crystals (Fig. 2). The subunits are related by an accurate molecular binary axis with a buried surface of ~ 2000 Å². A dimeric form of *BaDRL* had been previously detected by gel filtration (25) and confirmed by dynamic light scattering studies. The same dimer was also found in the other two *BaDRL* crystal forms available, where the molecular binary axis coincides with a crystallographic 2-fold axis, leaving only one *BaDRL* subunit in the asymmetric unit of these crystals.

Each *BaDRL* subunit is organized in three structural domains: N-terminal, central, (catalytic), and C-terminal (Fig. 2A). The N-terminal domain, formed by residues 1–166 and 328–339, corresponds to the NADPH-binding domain, as anticipated from the sequence similarity between DRL and DXR in this region (25). This N-terminal domain starts with a helix (α 1) followed by a Rossmann-like motif composed of seven parallel β -strands surrounded by seven α -helices (supplemental Fig. S1). The central or catalytic domain, stretching from residues 167 to 327, has an α/β -fold with a central four-stranded mixed β -sheet (Fig. 2A). Two long α -helices (α 8 and

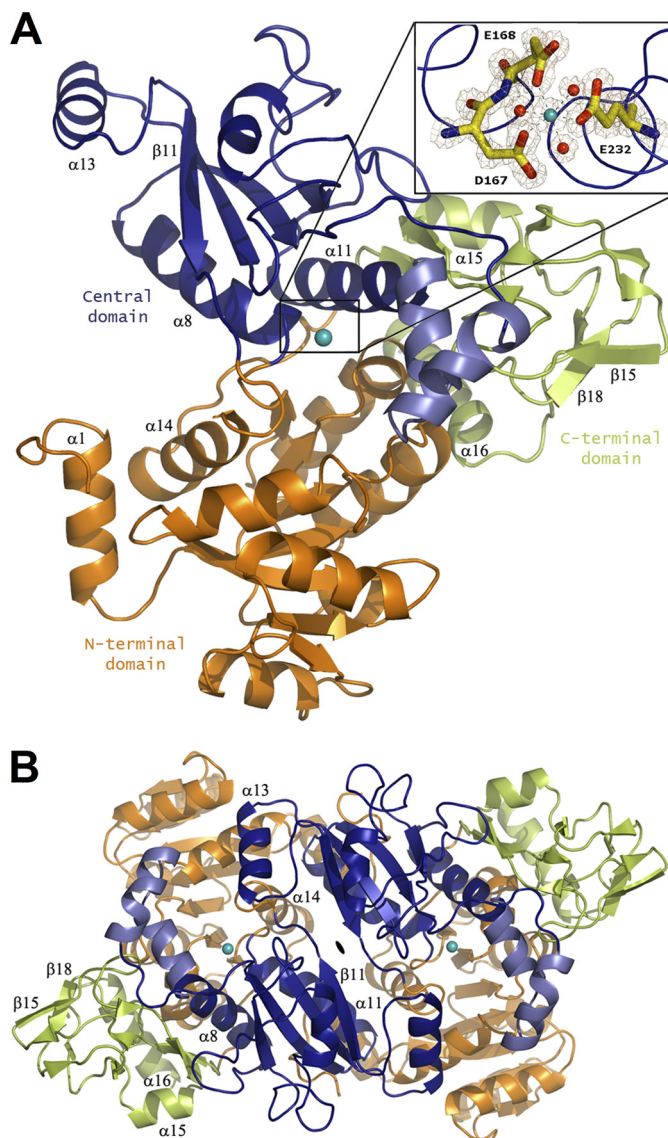


FIGURE 2. Overall architecture of *BaDRL* enzyme. A, schematic representation of the structure of a *BaDRL* subunit, with the N-terminal domain in orange, the central domain in dark blue, and the C-terminal domain in green. The active site lid found in the central domain (helices α 9 and α 10) is depicted in light blue. The inset shows a close-up view of the conserved active site residues Asp-167, Glu-168, and Glu-232, which, together with three water molecules (red spheres), coordinate octahedrally a Mg^{2+} ion (cyan sphere), shown with their corresponding $2F_o - F_c$ electron density contoured at 1σ . B, view of the *BaDRL* dimer down the molecular 2-fold axis (indicated as an oval dot).

α 11) are situated on the sheet face facing the N-terminal domain, whereas helix α 12 is located on the opposite side of the sheet. A protrusion in the central domain, formed by two antiparallel helices (α 9 and α 10) connected by a short loop, forms the active site lid (see below). The central domains of *BaDRL* and DXR proteins present a distant structural relationship, with a root mean square difference of 2.4 Å for 90 equivalent residues (55%) for the *E. coli* DXR (*EcDXR*) enzyme (supplemental Fig. S1). Finally, the small C-terminal domain of *BaDRL*, starting at residue 340, adopts a distorted β -sandwich topology that includes two three-stranded antiparallel β -sheets (Fig. 2A). The C-terminal domain is completed by helices α 15 and α 16, the later located at the C-terminal end of the domain

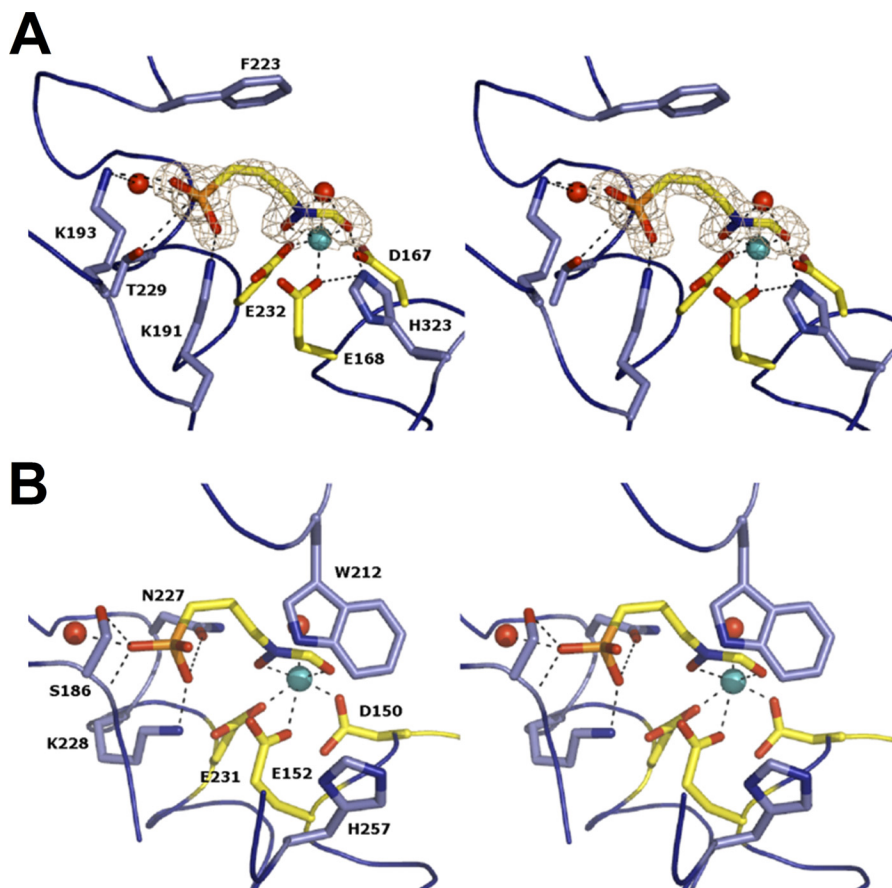


FIGURE 3. **FSM-binding sites in *BaDRL* and *EcDXR*.** A, stereo view of the *BaDRL* active site, with relevant residues explicitly depicted in stick mode. The acidic residues that coordinate the catalytic Mg^{2+} ion (cyan sphere) are shown in yellow. The residues that bind the FSM phosphonate group and the (putative) catalytic residues referenced under “Results and Discussion” are shown in blue. A bound FSM molecule is shown as atom colored sticks, with its corresponding $2F_o - F_c$ electron density contoured at 1σ . Two water molecules (red spheres), involved in the coordination of the Mg^{2+} ion and in phosphonate moiety binding, are also shown. B, stereo view of the *EcDXR* active site with a bound FSM molecule. Residues are explicitly depicted in stick mode using the same color code as in A.

and oriented perpendicularly to helices $\alpha 6$ and $\alpha 7$. A search with Dali (36) found that the C-terminal domain of *BaDRL* has a clear structural similarity only to the ice-binding domain of type III antifreeze proteins, with a root mean square difference of 2.2 Å for 57 equivalent residues (87%) for the ocean pout (*Macrozoarces americanus*) protein (supplemental Fig. S2) (37). The C-terminal domain of DXR presents a four-bundle helix topology unrelated to the one found for DRL. However, the two domains have similar overall volumes and occupy approximately the same position relatively to the N-terminal and central domains.

The interactions between the two subunits of the *BaDRL* dimer involve the N-terminal and central domains (Fig. 2B), with only one interaction being formed exclusively by residues of the central domains (Phe-178 and Tyr-322). A cavity at the dimer interface contains bulky blobs of electron density that were modeled as glycerol molecules forming hydrogen bonds with side chains from Glu-174, Arg-320, and Tyr-322, which are highly conserved in DRL enzymes (supplemental Fig. S3).

Active Site and FSM Binding—The active site, identified at the cleft formed between the N-terminal and central domains, contains a Mg^{2+} ion bound with an octahedral coordination to Asp-167, Glu-168, and two water molecules (equatorial ligands) and to Glu-232 and a third water (axial ligands) (Fig.

2A). These three residues are fully conserved in all of the *bona fide* DRL enzymes, *i.e.* those belonging to the DRL phylogenetic clade (supplemental Fig. S3) (25). The presence of the catalytic Mg^{2+} ion and its coordination geometry in *BaDRL* resemble those in DXR structures. Asp-167, Glu-168, and Glu-232 in *BaDRL* are structurally close to the Mg^{2+} -coordinating residues Asp-150, Glu-152, and Glu-231 in *EcDXR*. In the vicinity of the Mg^{2+} coordination sphere of DXR enzymes there is a highly conserved triad of charged residues (Lys-125, Glu-126, and Asp-221 in *EcDXR*), which are assumed to play an important role in catalysis. Although not structurally equivalent, a similar triad of charged residues (Glu-141, Glu-222, and Lys-228) is also found in *BaDRL*, with side chains of Glu-141 and Glu-222 interacting with each other in the SeMet crystal. Other catalytic residues identified in *EcDXR* such as Met-214, His-257, and Met-276 (12) appear to be maintained in *BaDRL* but by the structurally nonequivalent residues Met-215, His-323, and Met-34, respectively (supplemental Fig. S1).

In DXR enzymes, the active site requires the closing of a lid formed by residues from a flexible loop that is generally not well defined in the available structures. A similar role might be performed in *BaDRL* by the protrusion formed by the central domain helices $\alpha 9$ and $\alpha 10$ (Fig. 2 and supplemental Fig. S1). The electron density in the *BaDRL*-FSM complex shows a low

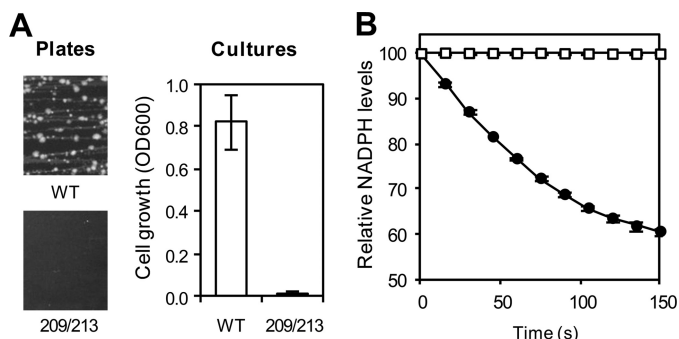


FIGURE 4. *In vivo* and *in vitro* activity assays of wild-type and mutant *BaDRL* proteins. A, complementation of *E. coli* EcAB4-10 cells with plasmids carrying WT and mutant E209S/R213A (209/213) versions of the *B. abortus* DRL gene. DRL activity was deduced from the ability of the cloned gene to rescue growth of the DXR-deficient strain in the absence of MVA. Positive transformants selected on MVA-supplemented plates were used for inoculation of solid (left) or liquid (right) LB medium lacking MVA. After incubation at 37 °C for 18 h, growth was observed only with the WT construct. B, enzymatic activity of purified WT (black circles) and mutant E209S/R213A (white squares) *BaDRL* proteins *in vitro*. DRL activity was estimated from the decrease in NADPH levels monitored by absorbance at 340 nm. Means $\pm$ S.D. of three experiments ($n = 3$) are represented.

occupancy alternative conformation, where this protrusion has moved toward the active site, suggesting that inhibitor binding facilitates the closing of the lid. The *EcDXR* lid residue His-209, shown to play a relevant catalytic role (38), is not conserved in *BaDRL*, where it might have been functionally replaced by Glu-209 and Arg-213 from the lid. Both residues are highly (but not fully) conserved in sequences of the DRL clade (supplemental Fig. S3). To verify their relevance for *BaDRL* enzymatic activity, the mutant E209S/R213A enzyme was constructed, and its activity was assayed both *in vivo* (based on its ability to complement a DXR-defective *E. coli* strain) and *in vitro* (based on the use of NADPH for the conversion of DXP into MEP). As shown in Fig. 4, the double-mutant protein showed no enzymatic activity in either of these assays, supporting the conclusion that lid residues Glu-209 and Arg-213 are essential for the activity of the *BaDRL* enzyme.

In the *BaDRL*-FSM complex, the electron density corresponding to the FSM molecule was well defined in the active center of one of the *BaDRL* subunits, with an estimated occupancy above 75% (Fig. 3A). Two oxygen atoms (O1 and O2) from the hydroxamic acid tail of the inhibitor coordinate with the catalytic Mg^{2+} ion, replacing the two water molecules found as equatorial ligands in the apo structure. The hydroxamic acid moiety also makes a hydrogen bond with His-323 and participates in a stacking interaction with the aromatic side chain of the mobile residue Phe-223. The phosphonate moiety of FSM is well anchored by two ionic bridges with Lys-191 and Lys-193 and with two hydrogen bonds with the side chain of Thr-229 and a water molecule (Fig. 3A). The five residues participating in the binding of FSM are fully conserved in all of the *bona fide* DRL enzymes, with the only exception of protein B1CB96 from *Anaerofustis stercorihominis*, in which Thr-229 is conservatively changed to Asn (supplemental Fig. S3). Together, it is likely that these residues have an essential role in DRL activity, presumably participating either in the proper binding of the substrate (DXP) or in catalysis.

The *EcDXR* residues involved in the binding of FSM are Trp-212, which participates in stacking with the hydroxamic acid moiety, and Ser-186, Asn-227, and Lys-228, which interact with the phosphonate moiety of the inhibitor (Fig. 3B). It is remarkable that, despite the overall similarity of the binding of FSM to DRL and DXR, none of the residues participating directly in the binding are structurally equivalent, and even the identities of many of the residues differ between both families of enzymes (Fig. 3).

Inhibition Studies—The described data indicate that, despite the fact that DRL and DXR enzymes catalyze the same biochemical reaction (25), the arrangement of their active sites shows major differences, particularly between the lids. Interestingly, such substantial differences create the possibility of identifying new drugs selectively inhibiting either DRL or DXR. As a first step in this direction, several FSM derivatives known to inhibit the activity of DXR enzymes *in vitro* (compounds 2–4 in Fig. 1) were positioned into the *BaDRL*-FSM structure such that the phosphonate group and the hydroxamic acid skeleton common to all of these compounds coincided with the experimental position of FSM (supplemental Fig. S4). In FR900098 (compound 2 in Fig. 1), the formyl hydrogen of FSM is replaced by a methyl group that was shown to favorably interact with the lid residue Trp-296 in the *P. falciparum* DXR enzyme (Trp-212 in *EcDXR*), resulting in an increased affinity (supplemental Fig. S4A) (8, 11, 19). In *BaDRL*, the extra methyl group of FR900098 is predicted to establish new hydrophobic interactions, without steric clashes, with the side chains of Thr-325 and Leu-308 (supplemental Fig. S4B), suggesting that FR900098 might also be more efficient than FSM in inhibiting DRL activity. On the other hand, FSM derivatives with an α -phenyl substitution and a reverse orientation of the hydroxamic acid group (such as compounds 3 and 4 in Fig. 1) are excellent DXR inhibitors that consistently fit well into the active site of *EcDXR* (supplemental Fig. S4C) (39, 40). However, positioning of compounds 3 and 4 into the *BaDRL* structure revealed that, for the two possible stereoisomers of both compounds, the α -phenyl group would either crash against the side chain of Phe-223 (supplemental Fig. S4D) or remain exposed. This is expected to either prevent or destabilize binding, suggesting that these two compounds might not be good inhibitors of *BaDRL*.

To substantiate these predictions experimentally, purified recombinant *BaDRL* and *EcDXR* enzymes were used for *in vitro* activity assays in the presence of different concentrations of FSM and compounds 2 (FR900098), 3, and 4 (Fig. 5). FR900098 inhibited *BaDRL* activity more efficiently than FSM (FR900098 $IC_{50} = 1.09 \pm 0.19 \mu M$ versus FSM $IC_{50} = 2.39 \pm 0.62 \mu M$), suggesting that the interactions predicted for the methyl group of FR900098 with *BaDRL* residues (supplemental Fig. S4B) might indeed improve the affinity for this enzyme. Interestingly, both FSM and FR900098 inhibited *BaDRL* with less efficiency than *EcDXR* (Fig. 5A), resulting in IC_{50} values for *BaDRL* that were ~ 10 -fold higher than those reported in the literature for DXR (39, 41). This might be due to the structural differences between the two types of enzymes since the large size of the pocket around the hydroxamic acid tail of both FSM and FR900098 in *BaDRL* is predicted to result in looser binding compared with DXR enzymes (Fig. 3 and supplemental Fig. S4).

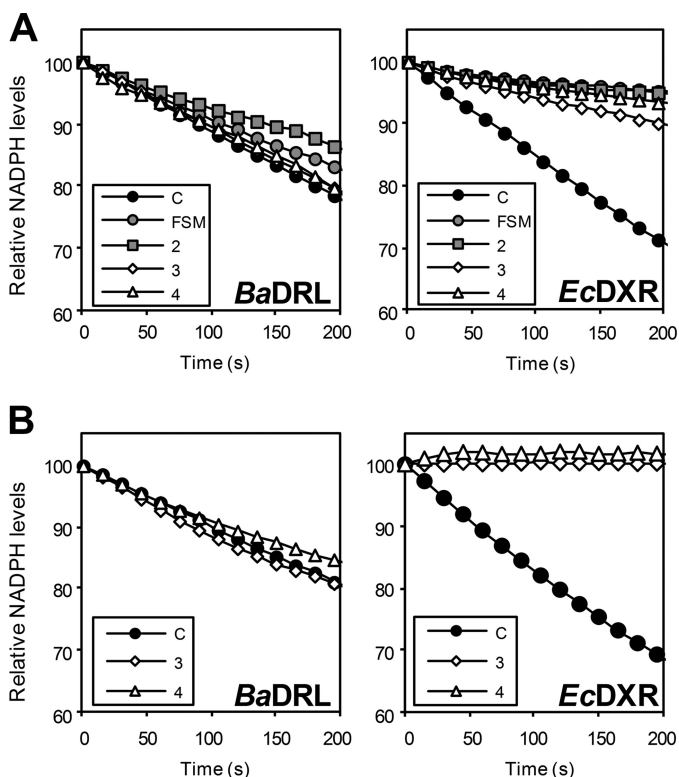


FIGURE 5. *In vitro* activity of BaDRL and EcDXR proteins in presence of inhibitors. Activity assays were carried out at 37 °C in reaction mixtures containing DXP (substrate), NADPH (cofactor), and the inhibitors shown in Fig. 1 at a concentration of 0.5 μ M (A) or 500 μ M (B). Control reactions (C; ●) were prepared with no inhibitor. Following the addition of the same amount of either BaDRL or EcDXR, activity was monitored by the decrease in absorbance at 340 nm as NADPH was oxidized. Representative assays are shown.

Most strikingly, compounds **3** and **4** inhibited EcDXR activity at similar concentrations compared with FSM and FR900098 (Fig. 5A), but they were unable to significantly inhibit BaDRL activity at concentrations up to 1 mM (Fig. 5B). These results confirm the structural analysis and represent a proof of concept for the development of highly specific antibiotics targeting only one of the two enzyme families.

Perspectives—The large-scale, indiscriminate use of broad-spectrum antibiotics has resulted in a worldwide epidemic of antibiotic resistance. A solution to this problem is to find new antibiotics with novel targets that are present only in the specific pathogenic bacteria causing the infection. Here, we show that DRL can be one such target. The determination of the crystal structures of the BaDRL enzyme in its apo form and in complex with FSM showed a low structural relationship to DXR proteins and revealed important differences in the active sites of these enzymes, opening the door to the development of highly specific inhibitors against only one of the two types of enzymes. Because DRL (but not DXR) is the enzyme catalyzing the essential production of MEP in important human and livestock pathogens such as *Brucella*, which can be potentially used as a biological weapon (42), inhibitors exclusively targeting DRL should be useful as highly specific, narrow-range antibiotics that would not cause undesired side effects by affecting beneficial or innocuous bacteria harboring only DXR. Although finding and developing such inhibitors are not straightforward

tasks, we have shown how the structural information can contribute to their identification.

Acknowledgments—We thank F. J. Sangari and J. Querol for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Rodríguez-Concepción, M. (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics, and antimalarial drugs. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 2391–2400
- Rohdich, F., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 785–791
- Bouvier, F., Rahier, A., and Camara, B. (2005) Biogenesis, molecular regulation, and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **44**, 357–429
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430
- Sacchettini, J. C., and Poulter, C. D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788–1789
- Phillips, M. A., León, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2008) The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* **13**, 619–623
- Davey, M. S., Tyrrell, J. M., Howe, R. A., Walsh, T. R., Moser, B., Toleman, M. A., and Eberl, M. (2011) A promising target for treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3635–3636
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., and Beck, E. (1999) Inhibitors of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573–1576
- Singh, N., Chevê, G., Avery, M. A., and McCurdy, C. R. (2007) Targeting the methylerythritol phosphate (MEP) pathway for novel antimalarial, antibacterial, and herbicidal drug discovery: inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) enzyme. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 1161–1177
- Proteau, P. J. (2004) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg. Chem.* **32**, 483–493
- Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., and Rohdich, F. (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J. Biol. Chem.* **278**, 18401–18407
- Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Proteau, P. J., and Oefner, C. (2005) The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J. Mol. Biol.* **345**, 115–127
- Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G., and Stubbs, M. T. (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**, 5378–5384
- Yajima, S., Nonaka, T., Kuzuyama, T., Seto, H., and 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.* **131**, 313–317
- Ricagno, S., Grolle, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., Lindqvist, Y., and Schneider, G. (2004) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9 Å resolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 37–44
- Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Aqvist, J., Mowbray, S. L., and Jones, T. A. (2007) Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis. *J. Biol. Chem.* **282**, 19905–19916
- Takenoya, M., Ohtaki, A., Noguchi, K., Endo, K., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Yajima, S., and Yohda, M. (2010) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-

- 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and inhibitor binding. *J. Struct. Biol.* **170**, 532–539
18. Yajima, S., Hara, K., Iino, D., Sasaki, Y., Kuzuyama, T., Ohsawa, K., and Seto, H. (2007) Structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH, and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 466–470
 19. Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., and Nakamura, K. T. (2010) Crystallization and preliminary x-ray crystallographic study of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 330–332
 20. Boucher, Y., and Doolittle, W. F. (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* **37**, 703–716
 21. Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13172–13177
 22. Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., and Seto, H. (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 932–937
 23. Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Zepeck, F., Kaiser, J., Richter, G., Schramek, N., Steinbacher, S., Huber, R., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W., and Rohdich, F. (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2658–2669
 24. Steinbacher, S., Kaiser, J., Gerhardt, S., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., and Rohdich, F. (2003) Crystal structure of the type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **329**, 973–982
 25. Sangari, F. J., Pérez-Gil, J., Carretero-Paulet, L., García-Lobo, J. M., and Rodríguez-Concepción, M. (2010) A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14081–14086
 26. Maurin, M., Birtles, R., and Raoult, D. (1997) Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 487–506
 27. Morris, J. G., Jr., and Southwick, F. S. (2010) *Brucella*, voles, and emerging pathogens. *J. Infect. Dis.* **202**, 1–2
 28. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., and Tsianos, E. V. (2006) The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 91–99
 29. Doublé, S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol.* **276**, 523–530
 30. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326
 31. Pape, T., and Schneider, T. R. (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J. Appl. Crystallogr.* **37**, 843–844
 32. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
 33. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
 34. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
 35. Sauret-Güeto, S., Urós, E. M., Ibáñez, E., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2006) A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase. *FEBS Lett.* **580**, 736–740
 36. Holm, L., and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, W545–W549
 37. Yang, D. S., Hon, W. C., Bubanko, S., Xue, Y., Seetharaman, J., Hew, C. L., and Sicheri, F. (1998) Identification of the ice-binding surface on a type III antifreeze protein with a “flatness function” algorithm. *Biophys. J.* **74**, 2142–2151
 38. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Takagi, M., and Seto, H. (2000) Characterization of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J. Biol. Chem.* **275**, 19928–19932
 39. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheeussen, A., Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., Fischer, M., Maes, L., and Kurz, T. (2010) Synthesis and antiparasitic activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate fosmidomycin. *Chem. Med. Chem.* **5**, 1673–1676
 40. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheeussen, A., Pein, M. K., Gräwert, T., Kaiser, J., Bacher, A., Eisenreich, W., Illarionov, B., Fischer, M., Maes, L., Groll, M., and Kurz, T. (2011) Reverse fosmidomycin derivatives against the antimalarial drug target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* **54**, 6796–6802
 41. Zinglé, C., Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., and Rohmer, M. (2010) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: structural variations around phosphonate anchor and spacer of fosmidomycin, a potent inhibitor of deoxyxylulose-phosphate reductoisomerase. *J. Org. Chem.* **75**, 3203–3207
 42. Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., and Akritidis, N. (2006) *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2229–2236

Mutations in *Escherichia coli* *aceE* and *ribB* Genes Allow Survival of Strains Defective in the First Step of the Isoprenoid Biosynthesis Pathway

Jordi Perez-Gil¹, Eva Maria Uros¹, Susanna Sauret-Güeto^{1*}, L. Maria Lois¹, James Kirby², Minobu Nishimoto², Edward E. K. Baidoo², Jay D. Keasling², Albert Boronat^{1,3}, Manuel Rodriguez-Concepcion^{1*}

1 Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, Barcelona, Spain, **2** Joint BioEnergy Institute, Emeryville, California, United States of America, **3** Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

A functional 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway is required for isoprenoid biosynthesis and hence survival in *Escherichia coli* and most other bacteria. In the first two steps of the pathway, MEP is produced from the central metabolic intermediates pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) by the activity of the enzymes DXP synthase (DXS) and DXP reductoisomerase (DXR). Because the MEP pathway is absent from humans, it was proposed as a promising new target to develop new antibiotics. However, the lethal phenotype caused by the deletion of DXS or DXR was found to be suppressed with a relatively high efficiency by unidentified mutations. Here we report that several mutations in the unrelated genes *aceE* and *ribB* rescue growth of DXS-defective mutants because the encoded enzymes allowed the production of sufficient DXP *in vivo*. Together, this work unveils the diversity of mechanisms that can evolve in bacteria to circumvent a blockage of the first step of the MEP pathway.

Citation: Perez-Gil J, Uros EM, Sauret-Güeto S, Lois LM, Kirby J, et al. (2012) Mutations in *Escherichia coli* *aceE* and *ribB* Genes Allow Survival of Strains Defective in the First Step of the Isoprenoid Biosynthesis Pathway. PLoS ONE 7(8): e43775. doi:10.1371/journal.pone.0043775

Editor: John McCutcheon, University Of Montana – Missoula, United States of America

Received: June 22, 2012; **Accepted:** July 25, 2012; **Published:** August 21, 2012

Copyright: © 2012 Perez-Gil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants from the Spanish Dirección General de Investigación (DGI) and FEDER to MRC (BIO2011-23680) and AB (BIO2009-09523). Work performed at JBEI was supported by the US Department of Energy contract DE-AC02-05CH11231. JGP and SSG received PhD fellowships from DGI and Generalitat de Catalunya, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: manuel.rodriguez@cragenomica.es

‡ Current address: John Innes Centre, Colney, Norwich, United Kingdom

Introduction

Isoprenoids (also called terpenoids) are a ubiquitous and highly diverse family of compounds produced from the five-carbon precursor isopentenyl diphosphate (IPP) and its double-bond isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP) in all living organisms [1–3]. These precursors are synthesized from acetyl-CoA by the mevalonic acid (MVA) pathway in archaea (archaeobacteria), fungi, and animals. By contrast, the unrelated 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway produces IPP and DMAPP from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate in most bacteria (eubacteria) and apicomplexan protozoa, including important human pathogens such as those causing tuberculosis and malaria [3–5]. Because the MEP pathway is essential in such pathogens but is not present in animals, it has been proposed as a promising target for the design of new antibacterial and antimalarial agents that would be potentially innocuous for humans [6–8]. However, we still know little about possible mechanisms of resistance to current and potential drugs targeting the MEP pathway in bacterial pathogens.

The genes and enzymes of the MEP pathway are best characterized in *Escherichia coli*. The initial reaction of the pathway (Fig. 1) is catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP)

synthase (DXS, encoded by the *dxs* gene) and involves the condensation of (hydroxyethyl)thiamine, derived from pyruvate, with the C1 aldehyde group of D-glyceraldehyde 3-phosphate to produce DXP [9–11]. In the second step, an intramolecular rearrangement and reduction of DXP by the enzyme DXP reductoisomerase (DXR, encoded by the *ispC/yaee/dxr* gene) yields MEP [12,13]. An alternative oxidoreductase enzyme with a DXR-like (DRL) activity was recently found in a reduced number of bacteria [14]. MEP produced by DXR or DRL is eventually converted to both IPP and DMAPP by sequential activities of the enzymes encoded by the genes *ispD/ygbP*, *ispE/yehB*, *ispF/ygbP*, *ispG/gcpE*, and *ispH/lytB* [5,15].

The best studied inhibitor of the MEP pathway is fosmidomycin (FSM), a specific inhibitor of the enzyme DXR which also inhibits DRL [14,16–19]. The uptake of FSM by bacterial cells is an active process involving a cAMP-dependent glycerol 3-phosphate transporter (GlpT) protein [20]. Loss of GlpT activity in *E. coli* mutants or the absence of a GlpT homologue in other bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* or *Brucella abortus* leads to FSM resistance [14,20,21]. Enhanced export of the inhibitor by overexpression of the *E. coli* *fsr* gene also results in FSM resistance [22]. Antibiotic resistance can result not only from interfering with drug transport or mode of action but also from the use of an alternative pathway

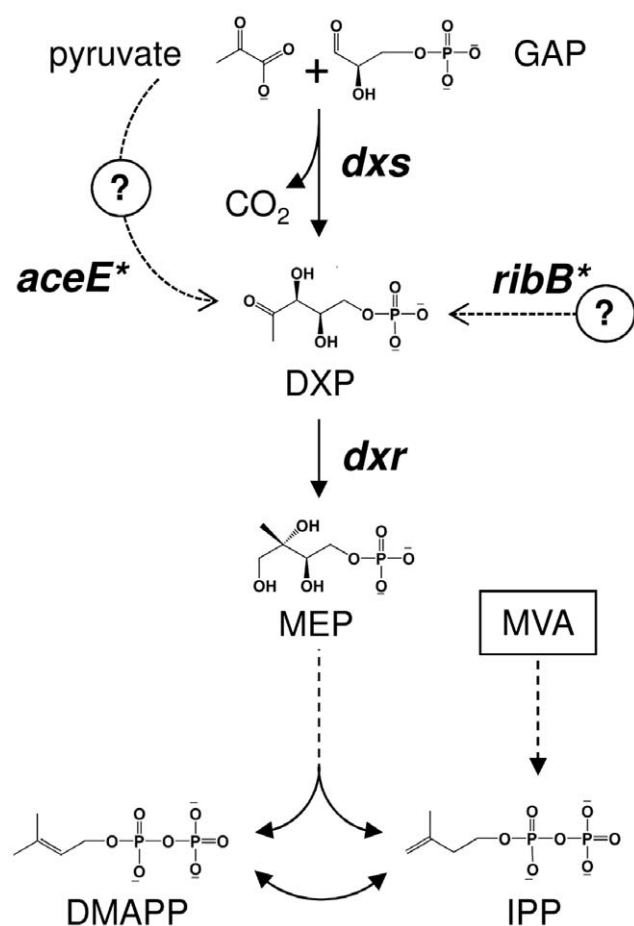


Figure 1. Biosynthesis of isoprenoid precursors in *E. coli*. The indicated genes (in italics) encode enzymes that produce the first intermediates of the MEP pathway either originally (*dxs*, *dxr*) or by mutation as indicated by asterisks (*aceE*, *ribB*). The *E. coli* strains used in this work are engineered to synthesize isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) from exogenously supplied mevalonic acid (MVA). GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate.

doi:10.1371/journal.pone.0043775.g001

not affected by the inhibitor. To investigate the relevance of the latter type of mechanisms for resistance to MEP pathway inhibitors, we aimed to identify spontaneous mutations that could suppress an otherwise lethal obstruction of the pathway in living bacteria.

Loss of function of the MEP pathway in *E. coli* can be rescued in strains containing a synthetic MVA operon that allows the production of IPP and DMAPP from exogenously supplied MVA (Fig. 1) [23,24]. However, in cells harboring a deletion of the *dxs* gene (strain EcAB4-2), MVA auxotrophy was suppressed with a relatively high frequency (6.4 per 10^9 cells) by mutations in other genes [25]. As a result, colonies of DXS-defective suppressor mutants could grow overnight on plates lacking MVA. Suppressor mutants were also found in the DXR-deficient strain EcAB4-10, although with a slightly lower frequency (2.4 per 10^9 cells) and poor growth. No suppressor mutants were found in strains with disruptions to the other MEP pathway genes [25]. These results suggested that bacteria can respond to a block of DXS or DXR activities by using other proteins that deliver DXP or MEP when mutated [25]. In this work we identify genes and mutations that

allow survival of DXS-deficient strains and demonstrate that the mutant proteins are indeed able to synthesize DXP (or a precursor molecule) *in vivo*.

Materials and Methods

Bacterial strains and screening for suppressor mutants

Disruption of individual MEP pathway genes in *E. coli* strains EcAB4-2 (*dxs::CAT*) and EcAB4-10 (*dxr::CAT*), each containing a chromosomal copy of a synthetic MVA operon, was carried out as described [25] by deleting most of their coding region and introducing chloramphenicol resistance (*CAT*) genes. Similarly, strain EcAB1-6 (*dxs::CAT dxr::TET*) was constructed by disrupting both *dxs* and *dxr* genes with chloramphenicol and tetracycline resistance genes, respectively, in MC4100 cells harboring the MVA operon in plasmid pAB-M3 [23,26]. For isolation of suppressor mutants, EcAB4-2 cells were cultured at 37°C in Luria broth (LB) medium supplemented with 1 mM MVA, 25 µg/ml kanamycin (to select for the MVA operon) and 17 µg/ml chloramphenicol (to select for the disruption of the *dxs* gene) until exponential phase. After cells were pelleted and rinsed twice with LB, several batches of $ca. 10^8$ cells (estimated by measuring optical density at 600 nm, OD600) were plated on LB agar containing only kanamycin and chloramphenicol. In some plates, a paper disk soaked in 30 µl ethylmethane sulphonate (EMS) was placed on the surface of the medium to induce mutations. Spontaneous and EMS-induced mutants that formed a colony in the absence of MVA were analyzed to confirm the deletion of the *dxs* genes by PCR.

Identification of the genes mutated in the suppressor lines

Genomic DNA from suppressor mutants was isolated as described [25,27] and partially digested with *Sau3A*. Fragments of 2–4 kb were gel-purified using the Qiaquick (Qiagen) system and ligated into the *Bam*HI site of pUC19. After amplification of the genomic library in TOP10 cells, EcAB4-2 competent cells were transformed with aliquots of the library, and transformants resistant to kanamycin, chloramphenicol, and 100 µg/ml ampicillin that were able to grow without MVA were selected. Plasmid DNA isolated from these transformants was used to transform new EcAB4-2 cells to confirm that it conferred the ability to grow in the absence of MVA. Positive clones were sequenced to identify the gene (and the mutation) responsible for the suppression phenotype. Screenings for mutations specifically in *aceE* and *ribB* were carried out by amplification of their coding regions by colony PCR with high-fidelity AccuPrime DNA polymerase (Invitrogen), followed by sequencing.

Plasmid constructs

The wild-type and mutant *aceE* and *ribB* genes (including the promoter region) were amplified from EcAB4-2 and suppressor mutant cells by PCR using AccuPrime DNA polymerase and primers aceE-1F (5'-C C A G A A G A T G T T G T A A A T C A A G C -3') and aceE-4R (5'-T T T A C C T C T T A C G C C A G A C G -3') for *aceE* and ribB-pNF (5'-A G C A T A T G A G T G C C A T T G T A G T G -3') and ribB-XR (5'-A G T C A C T C G A G G C T G G C T T T A C G C T C A T G T G C -3') for *ribB*. The PCR products were gel-purified and cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen). Inserts were sequenced using vector and gene-specific primers to confirm the presence of the identified mutations.

Detection of DXP in cell extracts

EcAB1-6 cells were transformed with plasmids harboring wild type and mutant versions of *aceE* or *ribB* (or an empty pCRII-TOPO plasmid as a control) and positive transformants were selected on LB plates supplemented with 1 mM MVA, 50 µg/ml kanamycin (to select for the pCRII-TOPO constructs), 100 µg/ml ampicillin (to select for the pAB-M3 plasmid with the MVA operon), 17 µg/ml chloramphenicol (to select for the disruption of the *dxs* gene), and 5 µg/ml tetracyclin (to select for the disruption of the *dxr* gene). Individual colonies were then grown at 37°C overnight in liquid media with the same supplements. The overnight cultures were used to confirm the identity of the strain and plasmids by PCR and restriction analysis and to inoculate fresh 10 ml cultures to an OD600 of 0.05. Inoculated cultures were grown at 37°C for 5 hours and aliquots corresponding to an OD600 of 10 were then collected. Cells were pelleted and immediately resuspended in 200 µl of 1:1 (v/v) methanol: water. Cell suspensions were loaded in Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter devices and spun at 14,000 rpm and 4°C for 90 min in a refrigerated microfuge. DXP was detected and quantified in the flow-through by liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS).

LC was conducted on an ZIC-pHILIC column of 150-mm length, 2.1-mm internal diameter, and 5-µm particle size (Merck SeQuant), using an Agilent 1200 Series HPLC system. A sample injection volume of 2 µL was used throughout. The temperature of the sample tray was maintained at 4°C by an Agilent FC/ALS Thermostat. The column compartment was set to 50°C. The mobile phases used were composed of A) 80 mM ammonium carbonate and B) acetonitrile. Isocratic elution was achieved at 68% B via a flow rate of 0.23 mL/min for 12 min. From there the flow rate was gradually increased to 0.3 mL/min until 12.5 min. The flow rate was then held at 0.3 mL/min for a further 2.5 min. The HPLC system was coupled to an Agilent 6210 time-of-flight mass spectrometer (LC-TOF MS), by a 1/3 post-column split. Contact between both instrument set-ups was established by a LAN card in order to trigger the MS into operation upon the initiation of a run cycle from the MassHunter workstation (Agilent). Nitrogen gas was used as both the nebulizing and drying gases to facilitate the production of gas-phase ions. The drying and nebulizing gases were set to 10 L/min and 25 psi, respectively, and a drying gas temperature of 300°C was used throughout. Electrospray ionization (ESI) was conducted in the negative ion mode and a capillary voltage of -3500 V was utilized. MS experiments were carried out in the full scan mode, at 0.86 spectra/sec and a cycle time of 1.1162.8 sec, for the detection of [M-H]⁻ ions. The instrument was tuned for a range of 50–1700 m/z. Prior to LC-ESI-TOF MS analysis, the TOF MS was calibrated via an ESI-L-low concentration tuning mix (Agilent). Data acquisition and processing were performed by the MassHunter software package. DXP was quantified via a five-point calibration curve. The R² coefficient for the calibration curve was >0.99. The chemical standard for DXP (Echelon) was made up to 500 µM, as the stock solution, in methanol-water (50:50, v/v).

Results

Most DXS-defective suppressor mutants harbour mutations in the *aceE* gene

To investigate the mechanisms by which bacteria could survive in the absence of a DXS enzyme, we aimed to identify the genes responsible in a collection of DXS-defective suppressor mutants (SX lines). Previous screening for suppressors of MVA auxotrophy

in DXS-defective EcAB4-2 cells (i.e. the lethality caused by *dxs* deletion) resulted in the isolation of 6 spontaneous mutants (SX1 to SX6) [25]. A second screening led to the isolation of 14 more spontaneous mutants (SX7 to SX20) and 14 EMS-induced mutants (SX1E to SX14E). However, 6 spontaneous mutants and 2 EMS-induced mutants lost the ability to grow without MVA after storage as glycerol stocks and re-streaking on fresh LB plates supplemented only with kanamycin and ampicillin. Of the remaining 26 mutants, one (SX5) was previously reported to harbor a missense mutation in the *aceE* gene (encoding the catalytic E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex, PDH), resulting in an E636Q change in the protein sequence [25]. Sequencing of the *aceE* gene in the remaining mutants identified a total of 4 different mutations (Table 1). In particular, the E636Q mutation was found in 2 other strains besides SX5, whereas 1 clone had a different mutation in the same residue (E636G). Two more *aceE* mutations were found: Q408R in 1 strain and L633R in 17 clones. In total, 22 out of 26 suppressor SX mutants contained mutations in the *aceE* gene, suggesting that the alteration of PDH activity might be the most common mechanism of resistance to the inhibition of DXS activity.

A mutant *ribB* gene was found in the remainder of the DXS-deficient suppressors

To identify the genetic change responsible for the bypass of DXS activity in the 4 remaining strains with no mutations in *aceE* (SX6, SX7, SX18, and SX12E), we followed a strategy similar to that previously described for SX5 [25]. We selected strain SX18 to construct a genomic library in pUC19. After amplification, DXS-defective EcAB4-2 cells were transformed with the library, and colonies able to grow without MVA were selected to isolate the incorporated plasmid and sequence the corresponding inserts. All the isolated plasmids were found to contain a mutation in the *ribB* gene, encoding 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase (DHBPS). This enzyme catalyzes the conversion of D-ribulose 5-phosphate to formate and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate, the latter serving as the biosynthetic precursor for the xylene ring of riboflavin [28]. Complete sequencing of the *ribB* gene in strains SX6, SX7 and SX12E also found mutations in this gene. In particular, a missense mutation resulting in a G108S change in DHBPS was found in SX18 and SX12E, whereas clones SX6 and SX7 harbored a D113G change (Table 1).

The identified mutations are sufficient to rescue the loss of DXS activity in EcAB4-2 cells

To confirm whether the new mutations identified in *aceE* and *ribB* were actually responsible for the suppression phenotype, wild type and mutant versions of these genes (including their promoters)

Table 1. Occurrence of identified mutations in EcAB4-2 cells.

Gene	Mutation		Occurrence (# strains)
	DNA	Protein	
<i>aceE</i>	cag > cgg	Q408R	1
	ctg > cgg	L633R	17
	gaa > caa	E636Q	3
	gaa > gga	E636G	1
<i>ribB</i>	ggt > agt	G108S	2
	gac > ggc	D113G	2

doi:10.1371/journal.pone.0043775.t001

were amplified from the parental EcAB4-2 strain and the corresponding suppressor mutants, respectively, and used to complement EcAB4-2 cells. As shown previously [25], the plasmid carrying the E636Q mutation in *aceE* rescued growth on plates without MVA, whereas the wild type gene did not complement the loss of DXS activity in EcAB4-2 (Fig. 2). The other *aceE* mutations (Q408R, L633R, and E636G) were also able to rescue MVA auxotrophy of the strain. Similarly, the two identified mutant forms of *ribB* (G108S and D113G), but not the wild type version, rescued growth of DXS-defective EcAB4-2 cells in medium without MVA (Fig. 2). These results suggest that the presence of any of the identified mutations in *aceE* or *ribB* results in altered enzymes (PDH or DHBPS, respectively) that each produce a metabolite that can ultimately be converted to isoprenoids in the absence of a functional DXS activity.

Mutant *aceE* and *ribB* genes allow the production of DXP *in vivo*

The bypass of DXS by mutant forms of PDH and DHBPS enzymes might result either from the production of DXP or an alternative substrate for DXR, or from the supply of MEP or a downstream metabolite of the pathway (Fig. 1). The latter possibility can be addressed by using a genetic strategy based on the complementation of the DXR-deficient strain EcAB4-10. Thus, the putative production of MEP or a downstream MEP pathway intermediate by the mutant enzymes would allow not only DXS-defective but also DXR-defective cells to grow in the absence of MVA (Fig. 1). However, when EcAB4-10 cells were transformed with the constructs containing mutant *aceE* and *ribB* genes, transformants could only be recovered on MVA-containing plates because none of them were able to rescue MVA auxotrophy (Fig. 2). These results confirm that the mutant PDH and DHBPS enzymes synthesize a product that enters the MEP pathway upstream of the reaction catalyzed by DXR.

To discriminate between the remaining possibilities (i.e. the mutant enzymes allow the production of either DXP or another metabolite that can be used as an alternative substrate for DXR), we investigated whether the presence of mutant versions of PDH or DHBPS resulted in the production of DXP in cells lacking both DXS and DXR activities (strain EcAB1-6). After transformation of the EcAB1-6 strain with plasmids containing wild type and mutant versions of both *aceE* and *ribB*, cells were grown in MVA-supplemented liquid medium and harvested in the exponential growth phase. HPLC-MS/MS analysis of cell extracts from controls transformed with an empty plasmid showed the presence of low but detectable levels of DXP (Fig. 3), indicating that *E. coli* cells devoid of DXS activity can still produce trace amounts of this metabolite. Levels of DXP in transformants carrying plasmids with wild type versions of *aceE* or *ribB* genes were similar to those in the negative control. By contrast, strains expressing the mutant genes showed *ca.* 20-fold higher DXP levels (Fig. 3), confirming that the corresponding mutant enzymes are able to synthesize DXP (or a metabolite that can be transformed into DXP by the cells) *in vivo*.

Discussion

In bacteria, isoprenoids play essential roles in a variety of processes that are vital for growth and survival, including cell wall and membrane biosynthesis, electron transport, and conversion of light into chemical energy [29]. Also, many microorganisms produce isoprenoid secondary metabolites of economic relevance [30]. Since the discovery of the MEP pathway in the mid 1990 s, it became more and more evident that bacteria display a wide metabolic plasticity regarding the route to produce isoprenoids.

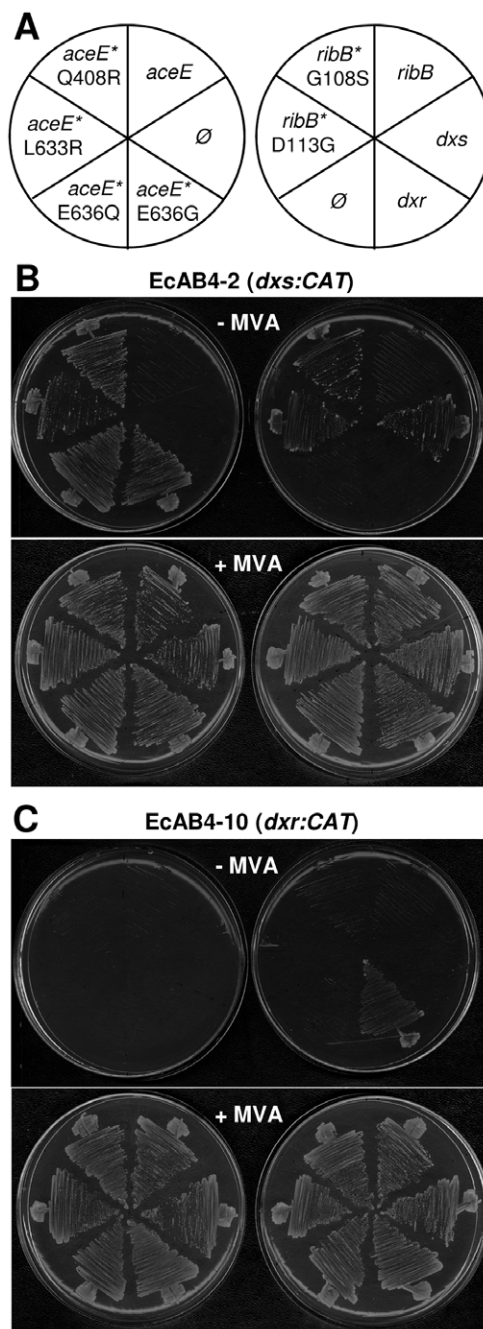


Figure 2. Complementation of *E. coli* strains defective in DXS or DXR. Cells were transformed with pCRII-TOPO constructs and plated on LB medium containing chloramphenicol (for the disruption of chromosomal *dxs* or *dxr* genes), kanamycin (for the MVA operon) and ampicillin (for the introduced plasmid). The medium was supplemented (+) or not (–) with MVA as indicated. Plates were incubated at 37°C for 20 h. (A) Position of transformants harboring plasmids with the indicated wild type or mutant (asterisks) genes or an empty vector control (Ø). (B) EcAB4-2 (*dxs::CAT*) transformants. (C) EcAB4-10 (*dxr::CAT*) transformants.

doi:10.1371/journal.pone.0043775.g002

Most bacteria only use the MEP pathway for IPP and DMAPP biosynthesis, but there are exceptions to this trend. Some bacteria synthesize their isoprenoid precursors using the MVA pathway instead of the MEP pathway, whereas there are parasitic bacteria

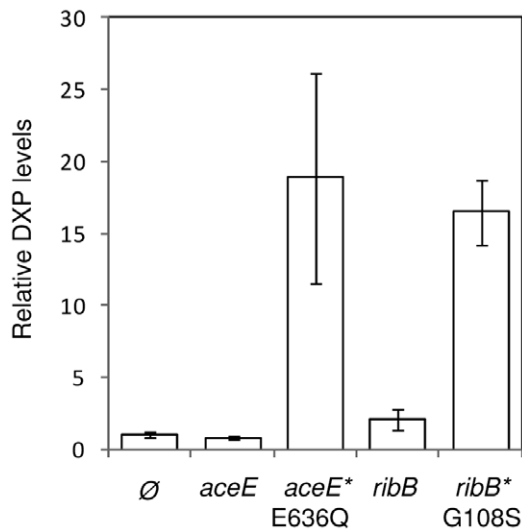


Figure 3. DXP levels in cells expressing wild type and mutant *aceE* and *ribB* genes. *E. coli* cells defective in both DXS and DXR were transformed with pCRII-TOPO constructs with the indicated wild type or mutant genes or an empty vector control (Ø). Positive transformants were grown in triplicate for 5 h with MVA, and DXP levels were measured by LC-MS. Mean and standard deviation (n=3) values are represented relative to the levels in Ø controls.
doi:10.1371/journal.pone.0043775.g003

that lack both pathways (likely because they obtain their isoprenoids from host cells) and also organisms that possess the two full pathways [3,31–34]. Most strikingly, related bacteria may use different pathways for isoprenoid biosynthesis while unrelated bacteria may use the same pathway. In addition to the MEP and MVA pathways, alternative pathways and metabolic intermediates have been proposed for isoprenoid biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, which lacks the MVA pathway and does not appear to use the canonical MEP pathway under photosynthetic conditions [35,36]. Diversity can be found also at the level of individual pathway steps, with several examples of reactions catalyzed by different classes of enzymes with no sequence, structural, or catalytic similarity [14,17,33,37]. In at least some cases, it is clear that the alternative routes to MEP pathway intermediates resulted from the recruitment of available enzymes that were not related to isoprenoid synthesis. But we still know very little about the genes and enzymes that could potentially contribute to isoprenoid biosynthesis, despite the relevance of this knowledge to both development of efficient antibiotics and metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis. Here we show that the MEP pathway intermediate DXP can be produced (although at very low levels) in the absence of a functional DXS-encoding gene, suggesting that other enzymes might produce this metabolite, perhaps as a by-product. However, such trace levels are not sufficient to support bacterial growth and survival. We also provide biochemical and genetic evidence of novel routes for efficient DXP synthesis arising from specific mutations in two *E. coli* genes, *aceE* and *ribB* (encoding PDH and DHBPS, respectively).

References

- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44: 357–429.
- Sacchettini JC, Poulter CD (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277: 1788–1789.
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ (2012) A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res* 51: 95–148.
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia plantarum* 101: 643–652.

The E636Q mutation in PDH was previously shown to rescue the deficiency of DXS but not DXR activity *in vivo* [25]. In this work, we have identified three more mutations (Q408R, L633R, and E636G) that allow PDH to catalyze an unknown reaction that eventually results in the production of DXP in the absence of endogenous DXS activity. Like DXS, PDH is a thiamine diphosphate (TPP) dependent carboligase that catalyzes the decarboxylation of pyruvate with the formation of hydroxyethyl-TPP as an intermediate. In fact, purified PDH has been shown to catalyze the formation of 1-deoxy-D-xylulose (DX) from pyruvate and D-glyceraldehyde [38,39]. DX can be phosphorylated to DXP by the kinase encoded by the *xylB* gene in *E. coli* [40]. However, our results suggest that *in vivo* the wild type PDH enzyme does not produce enough DX (or DXP, using D-glyceraldehyde 3-phosphate) to rescue the loss of DXS activity since only the mutant enzyme is able to complement the *dxs* knockout (Fig. 2) and to cause an accumulation of DXP beyond background levels (Fig. 3).

In the case of DHBPS, the proposed mechanism for the conversion of D-ribulose 5-phosphate to formate and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate involves a complex series of steps including dehydration, intramolecular rearrangement and rehydration [41]. Interestingly, the alternative route into the MEP pathway proposed in *Synechocystis* PCC 6803 appears to be stimulated by D-xylulose 5-phosphate and also by dihydroxyacetone phosphate [35,36]. We therefore speculate that either D-ribulose 5-phosphate or its isomer D-xylulose 5-phosphate might be converted to DXP by mutant G108S or D113G enzymes. We intend to further investigate the metabolic route to the DXP pathway enabled by mutant DHBPS enzymes using these and alternative substrates and considering the option that a metabolite may be generated that serves as an intermediate for DXP synthesis.

In summary, our work demonstrates that bacteria can circumvent a blockage of the MEP pathway at the level of DXS by mutation of either of two genes (*aceE* and *ribB*). Based on these results, DXS is not a good target for the development of new antibiotics, since resistance is likely to be developed very easily. On the other hand, DXP production appears to be one of the main flux-determining steps of the MEP pathway because overexpression of DXS-encoding genes has been shown to result in an enhanced production of MEP-derived isoprenoids in bacteria and plants [30,42]. We are currently investigating whether the use of mutant PDH and DHBPS enzymes could be a good strategy to overproduce DXP in metabolic engineering approaches.

Acknowledgments

We thank Anna Orozco and Rosa Rodriguez for valuable technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPG EMU SSG JK JDK AB MRC. Performed the experiments: JPG EMU SSG JK MN EEKB MRC. Analyzed the data: JPG EMU SSG JK MN EEKB JDK AB MRC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JPG EMU SSG LML JK MN EEKB. Wrote the paper: MRC.

5. Rodríguez-Concepción M, 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: 1079–1089.
6. Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem Soc Trans* 33: 785–791.
7. Rodríguez-Concepción M (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des* 10: 2391–2400.
8. Davey MS, Tyrrell JM, Howe RA, Walsh TR, Moser B et al. (2011) A promising target for treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3635–3636.
9. Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M et al. (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: 2105–2110.
10. Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA et al. (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12857–12862.
11. Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2100–2104.
12. Kuzuyama T, Takahashi S, Watanabe H, Seto H (1998) Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters* 39: 4509–4512.
13. Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9879–9884.
14. Sangari FJ, Perez-Gil J, Carretero-Paulet L, Garcia-Lobo JM, Rodríguez-Concepción M (2010) A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14081–14086.
15. Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* 282: 21573–21577.
16. Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, Huber R, Bacher A et al. (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem* 278: 18401–18407.
17. Perez-Gil J, Calisto BM, C B, Kurz T, Fita I et al. (2012) Crystal structure of the *Brucella abortus* deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase-like (DRL) enzyme involved in isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem* 287: 15803–15809.
18. Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, 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: 7913–7916.
19. Zeidler J, Schwender J, Muller C, Wiesner J, Weidemeyer C et al. (1998) Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z Naturforsch* 53c: 980–986.
20. Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M (2003) Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2030–2033.
21. Brown AC, Parish T (2008) Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiol* 8: 78.
22. Fujisaki S, Ohnuma S, Horiuchi T, Takahashi I, Tsukui S et al. (1996) Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. *Gene* 175: 83–87.
23. Campos N, Rodríguez-Concepción M, Sauret-Gueto S, Gallego F, Lois LM et al. (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.
24. Kakinuma K, Dekishima Y, Matsushima Y, Eguchi T, Misawa N et al. (2001) New approach to multiply deuterated isoprenoids using triply engineered *Escherichia coli* and its potential as a tool for mechanistic enzymology. *J Am Chem Soc* 123: 1238–1239.
25. Sauret-Güeto S, Uros EM, Ibanez E, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2006) A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett* 580: 736–740.
26. Rodríguez-Concepción M, Campos N, Maria Lois L, Maldonado C, Hoeffler JF et al. (2000) Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 473: 328–332.
27. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8: 151–156.
28. Richter G, Krieger C, Volk R, Kis K, Ritz H et al. (1997) Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *Methods Enzymol* 280: 374–382.
29. Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2012) Isoprenoid biosynthesis in prokaryotic organisms. In: Bach T, Rohmer M, Gershenzon J, editors. *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*. New York: Springer.
30. Kirby J, Keasling JD (2008) Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production. *Nat Prod Rep* 25: 656–661.
31. 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 U S A* 97: 13172–13177.
32. Boucher Y, Doolittle WF (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol* 37: 703–716.
33. Laupitz R, Hecht S, Amslinger S, Zepeck F, Kaiser J et al. (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem* 271: 2658–2669.
34. Kuzuyama T, Seto H (2003) Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* 20: 171–183.
35. Poliquin K, Ershov YV, Cunningham FX Jr., Woreta TT, Gantt RR et al. (2004) Inactivation of *sl1556* in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrates in vitro. *J Bacteriol* 186: 4685–4693.
36. Ershov YV, Gantt RR, Cunningham Jr FX Jr., Gantt E (2002) Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* 184: 5045–5051.
37. Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 932–937.
38. Schoerken U, Sprenger G.A. (1998) Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim Biophys Acta* 1385(2): 229–243.
39. Yokota A, Sasajima KI (1986) Formation of 1-deoxyketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. *Agric Biol Chem* 50: 2517–2524.
40. Wungstintaweeekul J, Herz S, Hecht S, Eisenreich W, Feicht R et al. (2001) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 268: 310–316.
41. Bacher A, Eberhardt S, Fisher M, Kis K, Richter G (2000) Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annu Rev Nutr* 20: 153–167.
42. Rodríguez-Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 5: 1–15.

Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria

Jordi Perez-Gil and Manuel Rodriguez-Concepcion*

Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

Phone, +34 935636600 ext 3222; E-mail, manuel.rodriguez@cragenomica.es

ABSTRACT

Isoprenoids are a large family of compounds synthesized by all free-living organisms. In most bacteria, the common precursors of all isoprenoids are produced by the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway. The MEP pathway is absent from archaea, fungi, and animals (including humans), which synthesize their isoprenoid precursors using the completely unrelated mevalonate (MVA) pathway. Because the MEP pathway is essential in most bacterial pathogens (as well as in the malaria parasites), it has been proposed as a promising new target for the development of novel anti-infective agents. However, bacteria show a remarkable plasticity for isoprenoid biosynthesis that should be taken into account when targeting this metabolic pathway for the development of new antibiotics. For example, a few bacteria use the MVA pathway instead of the MEP pathway, others possess the two full pathways, and some parasitic strains lack both the MVA and the MEP pathways (probably because they obtain their isoprenoids from host cells). Moreover, alternative enzymes and metabolic intermediates to those of the canonical MVA or MEP pathways exist in some organisms. Recent work has also shown that resistance to a block of the first steps of the MEP pathway can easily be developed because several enzymes unrelated to isoprenoid biosynthesis can produce pathway intermediates upon spontaneous mutations. In this review, we discuss the major advances in our knowledge of the biochemical toolbox exploited by bacteria to synthesize the universal precursors for their essential isoprenoids.

INTRODUCTION

Prokaryotes (bacteria and archaea) flourish in all habitats suitable for life on earth. In part this is because they have an astounding biochemical and metabolic diversity, particularly regarding energy-generating metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. A remarkable metabolic versatility can be found even within the same organism. For example, *Escherichia coli* can use glucose or lactose as a sole carbon source for the production of all the necessary amino acids, vitamins and nucleotides, it can produce energy by fermentation or respiration, and it can grow under aerobic or anaerobic conditions. Endosymbiotic prokaryotes that became mitochondria and plastids provided some of this metabolic diversity to eukaryotic cells. However, there are many biochemical reactions and metabolic pathways that are still exclusive of the prokaryotic world.

Isoprenoids (also known as terpenoids) are one of the groups of metabolites that are essential in all living organisms. Isoprenoids that are vital for the growth and survival of prokaryotes include those playing an indispensable role in cell wall and membrane biosynthesis (bactoprenol, hopanoids), electron transport (ubiquinone, menaquinone), or conversion of light into chemical energy (chlorophylls, bacteriochlorophylls, rhodopsins, carotenoids), among other processes [1]. Despite their remarkable diversity of structures and functions, all isoprenoids derive from a basic five-carbon precursor unit, isopentenyl diphosphate (IPP), and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). For many years, it was accepted that IPP was synthesized from acetyl-CoA through the well-known mevalonate (MVA) pathway in all organisms. However, an alternative MVA-independent pathway for the biosynthesis of IPP and DMAPP was identified in the mid 1990's in bacteria and plant plastids [2, 3]. A detailed description of the discovery and elucidation of this new pathway, currently known as the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway [4], can be found in other reviews [5-8]. It is now well established that the MEP pathway is the only one present in most eubacteria, the apicoplasts of apicomplexan protozoa, and the plastids of green algae and higher plants. By contrast, it is absent from archaea, fungi and animals, which synthesize their isoprenoids exclusively from MVA-derived precursors [9].

TWO MAJOR PATHWAYS PRODUCE THE UNIVERSAL PRECURSORS OF ALL ISOPRENOIDS

As described above, the universal precursors of all isoprenoids, IPP and DMAPP, can be synthesized by two major pathways [1]: the MVA pathway and the MEP pathway. The canonical reactions of both pathways are described in this section and summarized in Figure 1. In the first steps of the MVA pathway, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) is produced from the sequential condensation of three molecules of acetyl-CoA catalyzed by the enzymes acetoacetyl-CoA thiolase (AACT) and HMG-CoA synthase (HMGS). HMG-CoA reductase (HMGR) catalyzes the irreversible conversion of HMG-CoA into MVA in the first committed step of the pathway. Then, MVA is sequentially phosphorylated and decarboxylated to generate IPP by the enzymes mevalonate kinase (MVK), 5-phosphomevalonate kinase (PMVK) and 5-diphosphomevalonate decarboxylase (DPMD). The activity of an IPP/DMAPP isomerase enzyme (IDI) is required to form DMAPP from IPP (Figure 1).

The MEP pathway has been best characterized in *E. coli*, a model bacterium that lacks the MVA pathway [1, 8, 10]. It starts with the condensation of (hydroxyethyl)thiamin derived from pyruvate with the C1 aldehyde group of D-glyceraldehyde 3-phosphate to produce 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) in a reaction catalyzed by the enzyme DXP synthase (DXS). In the second step, DXP reductoisomerase (DXR/IspC) catalyzes the intramolecular rearrangement and reduction of DXP to produce MEP. The sequential action of the enzymes MEP cytidyltransferase (MCT/IspD), 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CMK/IspE), 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS/IspF), and 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate (HMBPP) synthase (HDS/IspG) transforms MEP into HMBPP. Finally, the enzyme HMBPP reductase (HDR/IspH) catalyzes the simultaneous formation of IPP and DMAPP in an approximate 5:1 proportion (Figure 1).

ISOPRENOID METABOLISM AS A TARGET FOR NEW ANTIBIOTICS

The MEP pathway is not present in humans but it is essential for most pathogenic bacteria and apicomplexan protozoa like the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [9]. This phylogenetic distribution makes the MEP pathway a promising new target for the development of desperately needed antibiotics against microbial pathogens that are acquiring resistance to currently available drugs [11-13]. Following the discovery of this pathway, it was proposed that the use of specific inhibitors would result in novel antimicrobial drugs with a broad spectrum activity and little toxicity to humans, since the MEP pathway enzymes were found to be highly conserved in organisms harboring the pathway but showed no homologues in mammals [9]. The specific MEP pathway inhibitor fosmidomycin (FSM) was actually proven to be effective against multidrug-resistant strains of bacteria and malaria parasites [14-16]. However, some results using *E. coli* as a model system have unveiled a diversity of mechanisms that bacteria can develop to bypass a pharmacological blockage of isoprenoid biosynthesis with this inhibitor. For example, the uptake of FSM by *E. coli* cells is an active process involving a cAMP-dependent glycerol 3-phosphate transporter [17]. The absence of this transporter in bacterial pathogens like *Mycobacterium tuberculosis* or *Brucella abortus* or its mutation in *E. coli* results in FSM resistance [17-19]. On the other hand, resistance was also achieved by upregulation of proteins that facilitate the efflux of the drug [20].

Antibiotic resistance can result not only from interfering with drug transport or mode of action but also from the use of alternative pathways or enzymes not affected by the inhibitor. In this context, future strategies to target isoprenoid enzymes for the development of new antibiotics should take into account the astonishing versatility displayed by bacteria to produce their isoprenoid products. In this review, we will summarize our current knowledge on the mechanisms available to bacteria to synthesize their essential isoprenoid precursors, IPP and DMAPP. We have classified the multiple sources of such plasticity in five major blocks: (I) differential distribution of isoprenoid pathways, (II) alternative pathways for the synthesis of isoprenoid precursors, (III) alternative enzymes catalyzing the same isoprenoid reaction, (IV) isoprenoid enzymes catalyzing other reactions, and (V) non-isoprenoid enzymes producing isoprenoid intermediates upon mutation.

I) DIFFERENTIAL DISTRIBUTION OF ISOPRENOID PATHWAYS

Although most eubacteria only use the MEP pathway for the production of their essential isoprenoid precursors, there are some exceptions [1, 9, 21, 22]. Some bacteria, including the spirochaete *Borrelia burgdorferi* and the Gram-positive cocci *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* have been confirmed to use the MVA pathway instead of the MEP pathway for IPP and DMAPP synthesis. Others, including *Listeria monocytogenes* and some *Streptomyces* strains, possess the two full pathways [6, 22-24]. For example, all *Streptomyces* use the MEP pathway to produce their essential isoprenoids but some strains can additionally use the MVA pathway for the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites [6]. On the other hand, there are bacteria that lack both isoprenoid pathways. Thus, parasitic *Rickettsia* and *Mycoplasma* bacteria have no genes for MVA or MEP pathway enzymes, most likely because these obligatory intracellular parasites obtain their isoprenoids (or its precursors) from infected host cells. Most strikingly, related bacteria may use different pathways for isoprenoid biosynthesis whereas unrelated bacteria may use the same pathway [1, 6, 9, 21-24].

II) ALTERNATIVE PATHWAYS FOR THE SYNTHESIS OF ISOPRENOID PRECURSORS

The sequenced archaeal genomes only contain genes encoding MVA pathway enzymes. However, with the exception of some *Sulfolobus* species, the genomic analyses have failed to identify the full set of MVA pathway genes in the rest of species. In particular, the genes encoding PMVK and DPMD (Figure 1) are absent in most archaea [25, 26]. In these organisms, the conversion of phosphomevalonate to IPP is achieved through the operation of an alternative route involving the

formation of isopentenyl phosphate from phosphomevalonate by phosphomevalonate decarboxylase (PMVD) and further conversion to IPP by IP kinase (IPK) [27]. Although IPK has been characterized at biochemical and structural levels [28, 29], the PMVD activity is still speculative and needs biochemical confirmation.

An alternative pathway to the canonical MEP pathway has been proposed to operate in the cyanobacterium *Synechocystis* [30, 31]. The *Synechocystis* genome contains homologs of all MEP pathway genes [32]. However, the addition of MEP pathway substrates to cells grown photoautotrophically did not stimulate isoprenoid biosynthesis whereas FSM did not block their growth despite being an effective inhibitor of *Synechocystis* DXR activity *in vitro* [33]. In contrast, some phosphorylated sugars of the pentose phosphate cycle were able to stimulate the incorporation of labeled IPP into isoprenoids in a cell-free system [30]. This process required the activity of the Sll1556 protein [31]. Collectively, these results suggest that alternate substrate pathways are used for isoprenoid biosynthesis when *Synechocystis* grows under photosynthetic conditions. Although further experimental evidence is required, the available results suggest that in this cyanobacterium the canonical (linear) MEP pathway as defined for *E. coli* is not the sole pathway by which isoprenoids are synthesized. Instead, photosynthesis-derived products of the pentose phosphate cycle serve as substrates for IPP and DMAPP synthesis, probably entering the pathway downstream of MEP via ribulose 5-phosphate and/or its stereoisomer xylulose 5-phosphate (Figure 1). An alternate route to IPP and DMAPP production from pentose phosphate cycle substrates can be metabolically advantageous for a photosynthetic organism at optimal growth conditions since it might boost the production of isoprenoids required for photosynthesis.

III) ALTERNATIVE ENZYMES CATALYZING THE SAME ISOPRENOID REACTION

There are several examples of reactions related to the biosynthesis of isoprenoid precursors that can be catalyzed by different enzymes in bacterial cells. Two types of structurally unrelated IDI enzymes showing no sequence similarity and different reaction mechanisms and cofactor requirements have been reported to catalyze the interconversion of IPP and DMAPP [34-37]. The type I enzyme (IDI-I) found in many bacteria (including *E. coli*) is similar to that found in fungi, plants, and animals, and it has been extensively characterized at structural and functional levels [38, 39]. The type II enzyme (IDI-II) was discovered in *Streptomyces* and shown to be present in archaea and some bacteria but not in plants or animals [6, 22, 34]. There is no correlation between the presence of IDI-I or IDI-II enzymes and the operation of either the MVA or the MEP pathways [1, 22]. Interestingly, there are bacteria that possess either IDI-I or IDI-II enzymes, others have both, and a large proportion of bacteria containing the MEP pathway do not contain IDI. Because IDI activity is essential to produce DMAPP in organisms that only contain the MVA pathway but it is not required in those harboring the MEP pathway, which simultaneously produces both IPP and DMAPP (Figure 1), it may not be surprising that IDI is absent from bacteria using the MEP pathway. In fact, no obvious phenotype is associated to the loss of IDI-encoding genes in bacteria with both the MEP pathway and IDI such as *E. coli* [40, 41]. It is likely, however, that the presence of IDI may serve to balance the IPP and DMAPP pools according to particular growth conditions, conferring an advantage in critical situations where optimal isoprenoid biosynthesis is absolutely required.

In the MVA pathway, the first committed step is the irreversible conversion of HMG-CoA to MVA catalyzed by HMGR (Figure 1). Two different classes of HMGR have been described based on sequence alignments and phylogenetic analyses and proposed to have arisen by divergent evolution from a common ancestor. [42]. HMGR class I (HMGR-I) enzymes are found predominantly in archaea and eukaryotes, whereas bacteria that use the MVA pathway usually possess HMGR class II (HMGR-II) enzymes. Differences between classes are most apparent around the active site and the preceding region. This feature influences the differential inhibitory effect of statins, which are excellent inhibitors of the HMGR-I enzymes but relatively poor inhibitors of HMGR-II [23]. Improved resistance to statins might actually explain the progressive substitution of the original HMGR-I enzyme by

HMGR-II proteins [21]. Although no significantly effective HMGR-II inhibitors have been reported so far, modelling and structure-based screening strategies appear as promising ways to identify novel lead compounds with high inhibitory activity against HMGR-II but not HMGR-I [43]. Drugs exclusively targeting HMGR-II could be potentially used as antibiotics targeting bacterial pathogens harbouring these enzymes (such as *S. pneumoniae*) with weak or no side effects for animal cells, which contain a HMGR-I enzyme.

Plasticity in terms of using different enzymes to catalyze the same reaction has also been reported for the first committed step of the MEP pathway [18, 44]. This step, the production of MEP by intramolecular rearrangement and NADPH-dependent reduction of DXP following a retroaldol/aldol mechanism [45, 46], is catalyzed by the enzyme DXR (Figure 1). The vast majority of bacteria with the MEP pathway have a canonical DXR protein that could be renamed as DXR-I. However, a few bacteria lacking DXR-I (including animal and human pathogens such as *Brucella* and *Bartonella*) use a different DXR-like (DRL or, as renamed here, DXR-II) enzyme to catalyze the same biochemical reaction [18]. Both DXR-I and DXR-II enzymes are found in some bacteria. On the other hand, the presence of proteins with homology to DXR-II in bacteria lacking the MEP pathway suggests that they could originally have an activity unrelated to isoprenoid metabolism. The scattered taxonomic distribution of DXR-II enzymes suggests lateral gene transfer and lineage-specific gene duplications [18]. DXR-II belongs to a family of previously uncharacterized proteins with predicted oxidoreductase features and it only shows some sequence similarity to DXR-I at the level of the NADPH-binding domain. Most interestingly, DXR-I and DXR-II enzymes show a different arrangement of their active sites [44]. This feature has led to the identification of FSM derivatives that inhibit DXR-I but had virtually no effect on DXR-II activity *in vitro*, opening the door to the design of highly specific antibiotics against only one of these two types of DXR enzymes. In particular, the design of antibiotics that selectively target pathogens using DXR-II without affecting beneficial or innocuous bacteria harboring DXR-I enzymes would be most useful.

IV) ISOPRENOID ENZYMES CATALYZING OTHER REACTIONS

The main functional and structural properties of the MEP pathway enzymes have been already established [47]. However, recent results indicate that some of these enzymes have other enzymatic activities unrelated to isoprenoid biosynthesis (Figure 1). HDR/IspH, the iron-sulphur enzyme catalyzing the $2H^+/2e^-$ reduction and deoxygenation of HMBPP to produce both IPP and DMAPP in the final step of the MEP pathway [48, 49], was recently shown to be able to catalyze the addition of water to acetylene groups to produce aldehyde and ketone products [50]. This second class of reaction was only catalyzed by the oxidized form of the enzyme. The unforeseen promiscuity of HDR/IspH can be relevant not only for chemical synthesis but also for inhibitor (antibiotic) design [50].

Another surprising discovery recently reported was that a protein similar to the MEP pathway enzyme MCT/IspD could function as a glycosyltransferase in animals [51, 52]. IspD-like proteins belong to a large family of glycosyltransferases conserved from bacteria to mammals, but their function in organisms lacking the MEP pathway remained unexplored. In two recent papers, it was shown that defective function of a human and zebrafish IspD-like protein disrupts glycosylation of α -dystroglycan and cause Walker-Warburg syndrome, a congenital muscular dystrophy accompanied by a variety of brain and eye malformations [51, 52]. This discovery has important implications for the use of MEP pathway enzymes as targets for new drugs. The MEP pathway-specific inhibitor FSM has been shown to inhibit the activity of DXR [53] but also MCT/IspD [54]. Although MCT/IspD inhibition with FSM was weak *in vitro* and it might require the activity of DXR for efficient inhibition *in vivo* [54], the possibility that FSM and other drugs directed against MCT/IspD enzymes from pathogenic bacteria could also inhibit IspD-like enzymes in human patients and cause undesired side effects should be taken into account.

V) NON-ISOPRENOID ENZYMES PRODUCING ISOPRENOID INTERMEDIATES UPON MUTATION

All the previous examples of plasticity illustrate the evolutionary ability of bacteria to develop different solutions to a particular metabolic challenge. But the adaptative capacity of bacteria to situations that compromise their survival can be surprisingly fast. This fact has profound implications for the development of new antibiotics targeting isoprenoid pathways. Recent work has shown that resistance to a blockage of the first steps of the MEP pathway can easily be developed because several enzymes unrelated to isoprenoid biosynthesis can produce pathway intermediates when mutated [55, 56]. The strategy to identify these enzymes was based on the use of *E. coli* strains engineered with a synthetic operon that allows the production of IPP and DMAPP from exogenously supplied MVA [57]. Deletion of MEP pathway genes in this background is lethal but it can be rescued by growing the engineered cells in the presence of MVA. However, it was observed that MVA auxotrophy was occasionally suppressed by spontaneous mutations in some cells lacking individual MEP pathway genes. In particular, a relatively high frequency of mutations allowing survival on media lacking MVA was observed for cells defective in DXS or DXR (6.4 and 2.4 per 10⁹ cells, respectively), whereas no suppressor mutants were found in strains with disruptions of the other MEP pathway genes [55]. These results suggested that bacteria can respond to a block of DXS or DXR activities by using other proteins that deliver DXP or MEP when mutated.

Analysis of MVA auxotrophic mutant strains led to the identification of several mutations in two genes (*aceE* and *ribB*) that could suppress an otherwise lethal loss of DXS activity in *E. coli* [55, 56]. The *aceE* gene encodes the catalytic E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex (PDH). Like DXS, PDH is a thiamine diphosphate (TPP) dependent carboligase that catalyzes the decarboxylation of pyruvate with the formation of hydroxyethyl-TPP as an intermediate. Although a wild type PDH could potentially produce DXP or its dephosphorylated precursor [58-60], only the mutant enzymes were able to produce DXP *in vivo* at levels high enough to rescue growth of DXS-deficient cells [56]. Some of the identified mutations in PDH were previously shown to cause a conformational change on the enzyme structure that facilitates its secondary carboligase activity, mimicking the DXS reaction [61]. Therefore, the mutant PDH enzymes might acquire an improved efficiency to catalyze the same reaction catalyzed by DXS (Figure 1). The *ribB* gene encodes 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate (DHBP) synthase (DHBPS). This enzyme converts ribulose 5-phosphate to formate and DHBP (the biosynthetic precursor for the xylene ring of riboflavin), a conversion that involves a complex series of dehydration, intramolecular rearrangement and rehydration steps [62]. Mutant DHBPS, but not the wild type enzyme, produces DXP (or a metabolic precursor) *in vivo* [56]. Although the mechanism by which a mutant DHBPS produces DXP remains unknown, it is interesting to note that the substrate of this enzyme (ribulose 5-phosphate) was found to be involved in the alternative pathway for IPP and DMAPP biosynthesis in *Synechocystis* [30], as described above (Figure 1). *E. coli* mutants able to grow despite lacking DXR have also been isolated but not analyzed yet, in part because these suppressor mutants show very poor growth [55, 56]. Together, the described results demonstrate that bacteria can circumvent a blockage of the MEP pathway at the level of the first and, with a lower efficiency, the second step by recruiting mutant enzymes that are not normally involved in isoprenoid biosynthesis. Based on these data, activities other than DXS and even DXR should be targeted to minimize the development of resistance mechanisms in the context of the MEP pathway as a new target for antibiotic and antimalarial agents.

CONCLUSION

The increasing prevalence of antibiotic resistance is a major threat that will require new targets and strategies. Although the MEP pathway can be a good target for the design of such new drugs to fight bacterial pathogens, special attention must be paid to the remarkable plasticity

observed in bacteria for isoprenoid biosynthesis. FSM is the only drug targeting the MEP pathway that is being tested in clinical trials. However, the fact that it targets a step that is susceptible to resistance development by relatively frequent spontaneous mutations [55], and the possibility that it may also cause undesired side effects by inhibiting a human enzyme required for proper development [51, 52, 54], suggest that other enzymes catalyzing downstream pathways might be a better choice for antibiotic development. To facilitate an effective drug design, genetic, biochemical, and crystallographic approaches should identify the most appropriate pathway enzymes to inhibit and the residues that play a relevant structural or catalytic role. Most of this work could be done in a relatively short time by taking advantage of the tools already available in *E. coli*. As an example, the use of strains carrying a synthetic operon for the transformation of MVA into IPP and DMAPP has allowed to identify point mutations in MEP pathway genes that cause a complete loss of enzyme activity [63].

A major disadvantage of using antibiotics of broad spectrum, like FSM, is their lack of selectivity and the undesired effects on innocuous or beneficial bacteria. Prolonged treatment with such antibiotics may actually result in alteration of the intestinal flora, which causes gastrointestinal and other side-effects [64-66]. In this context, the diversity in isoprenoid biosynthesis observed in bacteria represents an opportunity for the development of highly selective, narrow-range antibiotics that could specifically inhibit the growth of particular pathogens like those harboring HMGR-II or DXR-II enzymes [43, 44]. On the other hand, the rich collection of genes and proteins developed by bacteria to synthesize their isoprenoids represents a source of potential biotechnological tools. For example, the availability of unrelated enzymes catalyzing the same biochemical reactions should allow to engineer a particular organism with a heterologous enzyme able to completely elude the endogenous regulation mechanisms limiting the activity of the endogenous enzyme. It is expected that these exciting possibilities will be addressed in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS.

Financial support for our research is currently provided by grants from the European Commission (FP7 collaborative project TiMet under contract no. 245143), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovacion (BIO2011-23680, PIM2010IPO-00660 and CONSOLIDER CSD2007-00036), the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2010CL0039), and the Generalitat de Catalunya (2009SGR-26 and XRB).

REFERENCES

- 1 Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2013) Isoprenoid biosynthesis in prokaryotic organisms. In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* (Bach, T. and Rohmer, M., eds.), pp. 1-16, Springer, New York
- 2 Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**(2), 517-524
- 3 Lichtenthaler, H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 47-65
- 4 Phillips, M. A., Leon, P., Boronat, A. and Rodríguez-Concepción, M. (2008) The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci* **13**, 619-623
- 5 Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**, 1079-1089
- 6 Kuzuyama, T. and Seto, H. (2003) Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* **20**, 171-183
- 7 Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. and Rohdich, F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1401-1426
- 8 Rohmer, M. (2008) From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway. *Lipids* **43**, 1095-1107
- 9 Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W. and Croteau, R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13172-13177
- 10 Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78-84
- 11 Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J. and 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), 305-313
- 12 Rodríguez-Concepción, M. (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des* **10**, 2391-2400
- 13 Rohdich, F., Bacher, A. and Eisenreich, W. (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem Soc Trans* **33**, 785-791
- 14 Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D. and Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573-1576.
- 15 Davey, M. S., Tyrrell, J. M., Howe, R. A., Walsh, T. R., Moser, B., Toleman, M. A. and Eberl, M. (2011) A promising target for treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3635-3636
- 16 Singh, N., Cheve, G., Avery, M. A. and McCurdy, C. R. (2007) Targeting the methyl erythritol phosphate (MEP) pathway for novel antimalarial, antibacterial and herbicidal drug discovery: inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) enzyme. *Curr Pharm Des* **13**, 1161-1177

- 17 Sakamoto, Y., Furukawa, S., Ogihara, H. and Yamasaki, M. (2003) Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 2030-2033
- 18 Sangari, F. J., Perez-Gil, J., Carretero-Paulet, L., Garcia-Lobo, J. M. and Rodriguez-Concepcion, M. (2010) A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14081-14086
- 19 Brown, A. C. and Parish, T. (2008) Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiol* **8**, 78
- 20 Fujisaki, S., Ohnuma, S., Horiuchi, T., Takahashi, I., Tsukui, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Kitabatake, M. and Inokuchi, H. (1996) Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. *Gene* **175**, 83-87.
- 21 Boucher, Y. and Doolittle, W. F. (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol* **37**, 703-716
- 22 Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Zepeck, F., Kaiser, J., Richter, G., Schramek, N., Steinbacher, S., Huber, R., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. and Rohdich, F. (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem* **271**, 2658-2669
- 23 Boucher, Y., Huber, H., L'Haridon, S., Stetter, K. O. and Doolittle, W. F. (2001) Bacterial origin for the isoprenoid biosynthesis enzyme hmg-coa reductase of the archaeal orders thermoplasmatales and archaeoglobales. *Mol Biol Evol* **18**, 1378-1388.
- 24 Begley, M., Gahan, C. G., Kollas, A. K., Hintz, M., Hill, C., Jomaa, H. and Eberl, M. (2004) The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gamma delta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett* **561**, 99-104
- 25 Boucher, Y., Kamekura, M. and Doolittle, W. F. (2004) Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol Microbiol* **52**, 515-527
- 26 Lombard, J. and Moreira, D. (2011) Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* **28**, 87-99
- 27 Grochowski, L. L., Xu, H. and White, R. H. (2006) *Methanocaldococcus jannaschii* uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate. *J Bacteriol* **188**, 3192-3198
- 28 Chen, M. and Poulter, C. D. (2010) Characterization of thermophilic archaeal isopentenyl phosphate kinases. *Biochemistry* **49**, 207-217
- 29 Mabanglo, M. F., Schubert, H. L., Chen, M., Hill, C. P. and Poulter, C. D. (2010) X-ray structures of isopentenyl phosphate kinase. *ACS Chem Biol* **5**, 517-527
- 30 Ershov, Y. V., Gantt, R. R., Cunningham Jr, F. X., Jr. and Gantt, E. (2002) Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* **184**, 5045-5051
- 31 Poliquin, K., Ershov, Y. V., Cunningham, F. X., Jr., Woreta, T. T., Gantt, R. R. and Gantt, E. (2004) Inactivation of sll1556 in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrates in vitro. *J Bacteriol* **186**, 4685-4693
- 32 Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium

- Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**, 109-136
- 33 Woo, Y. H., Fernandes, R. P. and Proteau, P. J. (2006) Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Bioorg Med Chem* **14**, 2375-2385
 - 34 Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y. and Seto, H. (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 932-937
 - 35 Rothman, S. C., Johnston, J. B., Lee, S., Walker, J. R. and Poulter, C. D. (2008) Type II isopentenyl diphosphate isomerase: irreversible inactivation by covalent modification of flavin. *J Am Chem Soc* **130**, 4906-4913
 - 36 Unno, H., Yamashita, S., Ikeda, Y., Sekiguchi, S. Y., Yoshida, N., Yoshimura, T., Kusunoki, M., Nakayama, T., Nishino, T. and Hemmi, H. (2009) New role of flavin as a general acid-base catalyst with no redox function in type 2 isopentenyl-diphosphate isomerase. *J Biol Chem* **284**, 9160-9167
 - 37 Sharma, N. K., Pan, J. J. and Poulter, C. D. (2010) Type II isopentenyl diphosphate isomerase: probing the mechanism with alkyne/allene diphosphate substrate analogues. *Biochemistry* **49**, 6228-6233
 - 38 Durbecq, V., Sainz, G., Oudjama, Y., Clantin, B., Bompard-Gilles, C., Tricot, C., Caillet, J., Stalon, V., Droogmans, L. and Villeret, V. (2001) Crystal structure of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *Embo J* **20**, 1530-1537
 - 39 Wouters, J., Oudjama, Y., Ghosh, S., Stalon, V., Droogmans, L. and Oldfield, E. (2003) Structure and mechanism of action of isopentenylpyrophosphate-dimethylallylpyrophosphate isomerase. *J Am Chem Soc* **125**, 3198-3199
 - 40 Hahn, F. M., Hurlburt, A. P. and Poulter, C. D. (1999) *Escherichia coli* open reading frame 696 is idi, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol* **181**, 4499-4504
 - 41 Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Maria Lois, L., Maldonado, C., Hoeffler, J. F., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. and Boronat, A. (2000) Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **473**, 328-332
 - 42 Bochar, D. A., Stauffacher, C. V. and Rodwell, V. W. (1999) Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* **66**, 122-127
 - 43 Li, D., Gui, J., Li, Y., Feng, L., Han, X., Sun, Y., Sun, T., Chen, Z., Cao, Y., Zhang, Y., Zhou, L., Hu, X., Ren, Y. and Wan, J. (2012) Structure-Based Design and Screen of Novel Inhibitors for Class II 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase from *Streptococcus Pneumoniae*. *J Chem Inf Model*
 - 44 Perez-Gil, J., Calisto, B. M., Behrendt, C., Kurz, T., Fita, I. and Rodriguez-Concepcion, M. (2012) Crystal structure of *Brucella abortus* deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase-like (DRL) enzyme involved in isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem* **287**, 15803-15809
 - 45 Munos, J. W., Pu, X., Mansoorabadi, S. O., Kim, H. J. and Liu, H. W. (2009) A secondary kinetic isotope effect study of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-catalyzed reaction: evidence for a retroaldol-aldol rearrangement. *J Am Chem Soc* **131**, 2048-2049
 - 46 Lauw, S., Illarionova, V., Bacher, A., Rohdich, F. and Eisenreich, W. (2008) Biosynthesis of isoprenoids: studies on the mechanism of 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase. *Febs J* **275**, 4060-4073

- 47 Hunter, W. N. (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* **282**, 21573-21577
- 48 Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Grawert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A. and Arigoni, D. (2003) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1586-1591
- 49 Span, I., Grawert, T., Bacher, A., Eisenreich, W. and Groll, M. (2012) Crystal structures of mutant IspH proteins reveal a rotation of the substrate's hydroxymethyl group during catalysis. *J Mol Biol* **416**, 1-9
- 50 Span, I., Wang, K., Wang, W., Zhang, Y., Bacher, A., Eisenreich, W., Li, K., Schulz, C., Oldfield, E. and Groll, M. (2012) Discovery of acetylene hydratase activity of the iron-sulphur protein IspH. *Nat Commun* **3**, 1042
- 51 Roscioli, T., Kamsteeg, E. J., Buysse, K., Maystadt, I., van Reeuwijk, J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Riemersma, M., Pfundt, R., Vissers, L. E., Schraders, M., Altunoglu, U., Buckley, M. F., Brunner, H. G., Grisart, B., Zhou, H., Veltman, J. A., Gilissen, C., Mancini, G. M., Delree, P., Willemsen, M. A., Ramadza, D. P., Chitayat, D., Bennett, C., Sheridan, E., Peeters, E. A., Tan-Sindhunata, G. M., de Die-Smulders, C. E., Devriendt, K., Kayserili, H., El-Hashash, O. A., Stemple, D. L., Lefeber, D. J., Lin, Y. Y. and van Bokhoven, H. (2012) Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet* **44**, 581-585
- 52 Willer, T., Lee, H., Lommel, M., Yoshida-Moriguchi, T., de Bernabe, D. B., Venzke, D., Cirak, S., Schachter, H., Vajsar, J., Voit, T., Muntoni, F., Loder, A. S., Dobyns, W. B., Winder, T. L., Strahl, S., Mathews, K. D., Nelson, S. F., Moore, S. A. and Campbell, K. P. (2012) ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet* **44**, 575-580
- 53 Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S. and 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**, 7913-7916
- 54 Zhang, B., Watts, K. M., Hodge, D., Kemp, L. M., Hunstad, D. A., Hicks, L. M. and Odom, A. R. (2011) A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochemistry* **50**, 3570-3577
- 55 Sauret-Güeto, S., Uros, E. M., Ibanez, E., Boronat, A. and Rodriguez-Concepcion, M. (2006) A mutant pyruvate dehydrogenase E1 subunit allows survival of Escherichia coli strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett* **580**, 736-740
- 56 Perez-Gil, J., Uros, E. M., Sauret-Gueto, S., Lois, L. M., Kirby, J., Nishimoto, M., Baidoo, E. E., Keasling, J. D., Boronat, A. and Rodriguez-Concepcion, M. (2012) Mutations in Escherichia coli aceE and ribB genes allow survival of strains defective in the first step of the isoprenoid biosynthesis pathway. *PLoS One* **7**, e43775
- 57 Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Sauret-Gueto, S., Gallego, F., Lois, L. M. and Boronat, A. (2001) Escherichia coli engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J* **353**, 59-67
- 58 Yokota, A. and Sasajima, K. I. (1986) Formation of 1-deoxyketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2517-2524
- 59 Schoerken, U., Sprenger, G.A. (1998) Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim Biophys Acta* **1385**(2), 229-243

- 60 Wungsintaweeikul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A. and Zenk, M. H. (2001) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **268**, 310-316.
- 61 Nemeria, N., Tittmann, K., Joseph, E., Zhou, L., Vazquez-Coll, M. B., Arjunan, P., Hubner, G., Furey, W. and Jordan, F. (2005) Glutamate 636 of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase-E1 participates in active center communication and behaves as an engineered acetolactate synthase with unusual stereoselectivity. *J Biol Chem* **280**, 21473-21482
- 62 Bacher, A., Eberhardt, S., Fisher, M., Kis, K. and Richter, G. (2000) Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annu Rev Nutr* **20**, 153-167
- 63 Sauret-Güeto, S., Ramos-Valdivia, A., Ibanez, E., Boronat, A. and Rodriguez-Concepcion, M. (2003) Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 408-415
- 64 Missinou, M. A., Borrmann, S., Schindler, A., Issifou, S., Adegnika, A. A., Matsiegui, P. B., Binder, R., Lell, B., Wiesner, J., Baranek, T., Jomaa, H. and Kremsner, P. G. (2002) Fosmidomycin for malaria. *Lancet* **360**, 1941-1942
- 65 Kuemmerle, H. P., Murakawa, T., Soneoka, K. and Konishi, T. (1985) Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **23**, 515-520
- 66 Wistrom, J., Norrby, S. R., Myhre, E. B., Eriksson, S., Granstrom, G., Lagergren, L., Englund, G., Nord, C. E. and Svenungsson, B. (2001) Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* **47**, 43-50

FIGURES

Figure 1. Pathways for the biosynthesis of isoprenoid precursors in bacteria and archaea. Enzyme acronyms (in bold) are described in the text. Asterisks mark *E. coli* enzymes that produce DXP when mutated. Enzymes catalyzing other reactions besides those in the MEP pathway are between brackets. Steps catalyzed by different types of enzymes (shown between parentheses) are represented in red. The alternative pathway for IPP and DMAPP production proposed for *Synechocystis* is shown in blue. The modified version of the MVA pathway described in archaea is shown in green. GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; CDP-ME, phosphate; MEcPP, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; HMBPP, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; RP, D-ribulose 5-phosphate; XP, D-xylulose 5-phosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MVA, mevalonic acid; MVP, 5-phosphomevalonate; MVPP, 5-diphosphomevalonate; IP, isopentenyl phosphate.

