

El cloroplasto: un organelo clave en la vida y en el aprovechamiento de las plantas

Patricia León y Arturo Guevara-García

Las células vegetales contienen organelos semiautónomos denominados *plástidos*. Los plástidos juegan un papel central para el desarrollo y diferenciación de las plantas albergando una variedad de vías metabólicas indispensables, entre las que destacan la fotosíntesis y la biosíntesis de isoprenoides o terpenos. Los isoprenoides constituyen una de las familias de compuestos naturales con mayor potencial de uso biotecnológico. La biosíntesis de isoprenoides en plantas se realiza por dos vías independientes, una que ocurre en el citoplasma y otra que tiene lugar en los cloroplastos. La vía cloroplástica para síntesis de isoprenoides fue descubierta hace relativamente poco tiempo y ha sido objeto de estudio de nuestro grupo de investigación por varios años. Nuestro trabajo en este campo ha sido importante no sólo para la identificación inicial de la vía, sino para la caracterización de los elementos que la regulan. Los avances, logros y perspectivas de nuestro trabajo sobre esta singular e importante vía metabólica se presentan en este capítulo.

La célula vegetal y la fotosíntesis

Entre las características más notables de las células vegetales, respecto a las células que cons-

tituyen a los animales superiores, destacan la existencia de una pared celular, a la que deben su rigidez y forma geométrica, y de estructuras subcelulares de forma ovoide y color verde, los *cloroplastos*, organelos muy distintivos presentes en citoplasma vegetal (**figura 1B**). A nivel metabólico, las células vegetales, como unidades estructurales, y las plantas, como organismos, se distinguen por su capacidad de producir esqueletos carbonados (azúcares), a través del proceso denominado *fotosíntesis* (**figura 1A**). La fotosíntesis, que consiste de la producción de materia orgánica (carbohidratos) a partir de CO_2 inorgánico empleando la energía luminosa del sol, es un proceso biológico central del que depende no sólo la sobrevivencia de las plantas sino, en última instancia, la de todos los seres vivos que habitamos el planeta. De hecho, puesto que la fotosíntesis representa la única vía de entrada de carbono a la biósfera, es innegable que los organismos fotosintéticos (productores primarios) sustentan la vida en la tierra, conformando el eslabón de inicio, de todas las cadenas alimenticias. En resumen, la fotosíntesis es la fuente inagotable de azúcares que sirven de alimento para los organismos consumidores que, como nosotros mismos, basan su metabolismo en el consumo de materia orgánica.



3
2
2

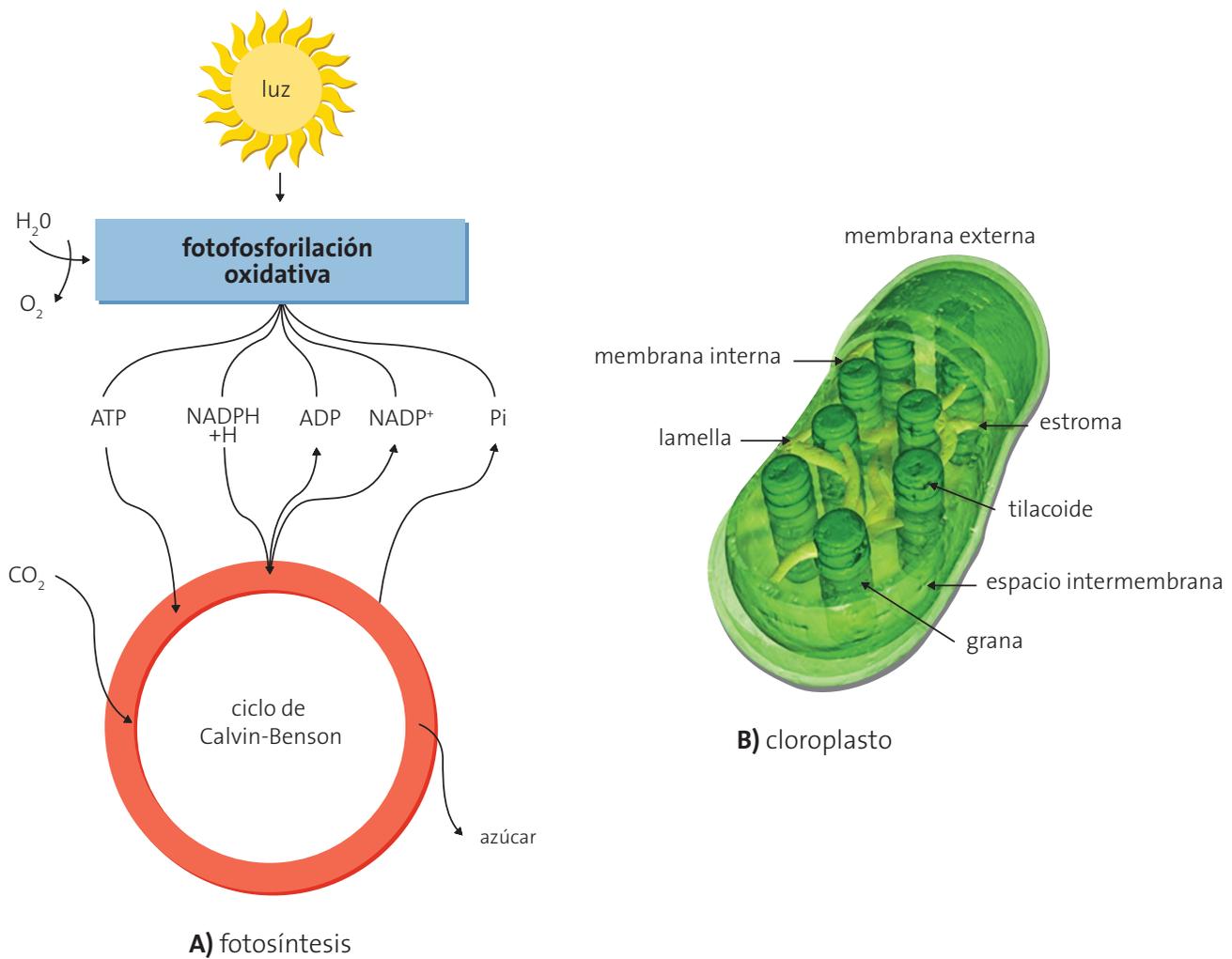


Figura 1.

Fotosíntesis y cloroplasto. A) El diagrama resume la captación de la energía luminosa proveniente del sol para, mediante la fotólisis del agua, sintetizar energía metabólica (ATP) y poder reductor (NADPH+H), que posteriormente son empleados para la fijación de CO_2 atmosférico en el ciclo de Calvin-Benson, con la subsecuente producción de azúcares (adaptado de <http://www.fai.unne.edu.ar>). B) Cloroplasto, organelo donde ocurren todas las reacciones fotosintéticas constituido por tres membranas (externa, interna y tilacoidal) y tres espacios (intermembranal, estroma y lumen del tilacoide). Las enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones responsable de la fotofosforilación oxidativa son proteínas constituyentes de la membrana tilacoidal. El ciclo de Calvin-Benson tiene lugar en el estroma, de donde los azúcares producidos son exportados al citoplasma celular para su consumo y transporte a otros órganos de la planta (adaptado de <http://www.linux.ajusco.upn.mx>).

Los plástidos, origen, tipo y función

Los cloroplastos mencionados anteriormente, en realidad son uno más de los miembros de una familia de organelos semiautónomos denominados *plástidos* presentes en plantas. En general, los plástidos desempeñan un papel central en el desarrollo de las plantas pues albergan una gran variedad de funciones y vías metabólicas indispensables, entre las que destacan la fotosíntesis, la producción y el almacenamiento de almidón y el geotropismo (o gravitropismo, “crecimiento a favor de la fuerza de gravedad”) de la raíz, por mencionar algunos.

Aunque resulta imposible demostrarlo experimentalmente, es ampliamente aceptado que los plástidos se originaron a través de un proceso de endosimbiosis de manera semejante al de la mitocondria (organelo en el cual está confinada la respiración). Se piensa que los cloroplastos provienen de la fagocitosis (introducción de materiales exógenos al interior de la célula) de una bacteria fotosintética de vida libre por una célula eucariótica primitiva que ya contenía mitocondrias. Esta teoría (endosimbiótica) para explicar el origen de plastos (y mitocondrias) es apoyada por la similitud que existe entre los genomas de estos dos organelos con los genomas bacterianos. De hecho, en base a dichas similitudes, se ha postulado que el más probable ancestro de los cloroplastos sean unas bacterias fotosintéticas del tipo azul-verdes, también conocidas como cianobacterias. Independientemente de su origen, resulta claro que la adquisición de este endosimbionte confirió una ventaja enorme a la célula receptora, convirtiéndola en un organismo autónomo en la producción de moléculas carbonadas (azúcares), que se utilizan para la biosíntesis de los distintos componentes celulares y para la generación de energía metabólica (ATP). Esta ventaja evolutiva dio lugar a una explosión demográfica de los organismos vegetales, los cuales rápidamente se expandieron por todo el planeta. Dicha expansión provocó cambios fundamentales tanto en el paisaje como en la composición atmosférica de la Tierra primitiva. En el primer caso, al convertirse las plantas en las especies dominantes, la superficie terrestre se

tornó verde. Por otro lado, y quizá el cambio más importante, la atmósfera reductora (con baja concentración de oxígeno) se tornó lenta, pero inexorablemente, en una atmósfera oxidante con un alto contenido de oxígeno (subproducto de la fotosíntesis). Dicho cambio dirigió en forma definitiva la evolución de la vida en la Tierra, hasta llegar a las actuales formas de vida.

Tipos de plástidos y su función

Si bien es muy probable que el proceso de endosimbiosis originó un organelo semejante a lo que hoy conocemos como cloroplasto, actualmente las células vegetales contienen diferentes tipos de organelos semejantes, que en su conjunto se denominan plástidos. Cada uno de estos organelos se localiza en tejidos particulares y están especializados en funciones específicas. Algunos de los plástidos más estudiados en cuanto a su estructura y función son (figura 2):

Cloroplastos. Especializados en realizar fotosíntesis. Son indudablemente los plástidos mejor estudiados. Estos organelos acumulan grandes cantidades de pigmentos vegetales, tanto clorofila (pigmento responsable del color verde de las plantas) como carotenos (pigmentos responsables de los colores amarillo a rojo en las plantas). El desarrollo y diferenciación de los cloroplastos está íntimamente ligado con el desarrollo de su membrana interna, que a través de numerosos plegamientos conforma estructuras a manera de sacos aplanados conocidas como *tilacoides*. Estos tilacoides, que se apilan en forma de monedas para constituir los grana, conforman un andamio membranal donde se incorporan múltiples proteínas y pigmentos para constituir los llamados complejos fotosintéticos. Estos complejos se encargan de realizar las reacciones que dependen de la luz y que involucran el transporte de electrones y la síntesis de energía metabólica y poder reductor (ATP y NADPH) requeridos para la fijación de CO₂ atmosférico (ciclo de Calvin-Benson) (figura 1A).

Cromoplastos. Son plástidos con una membrana interna poco desarrollada que acumulan grandes cantidades de pigmentos de rojos a

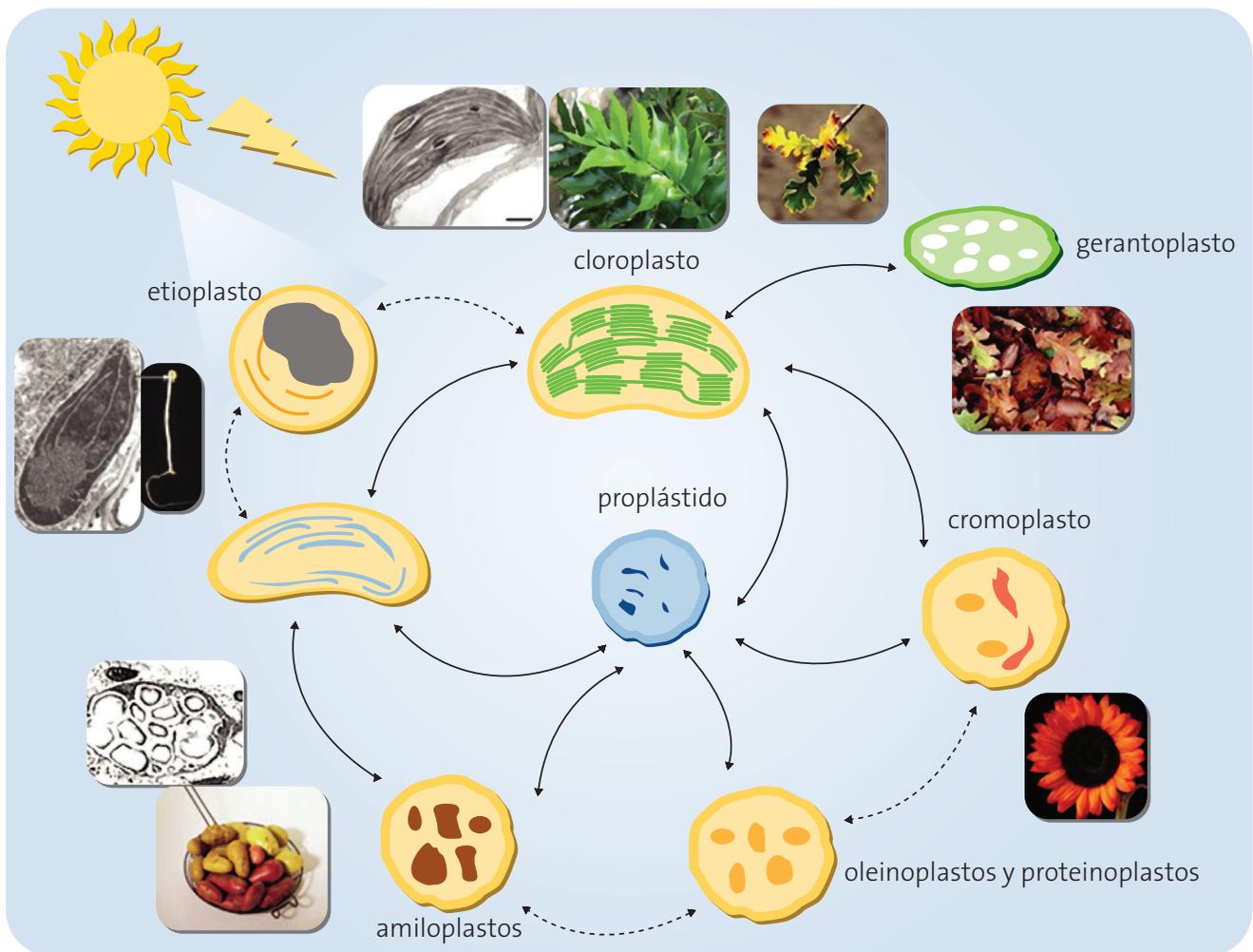


Figura 2.

Desarrollo de plástidos. El diagrama muestra que todos los plástidos provienen de un proplástido no diferenciado. La diferenciación a cada tipo de plástido depende del tejido y de señales como la luz. Durante el desarrollo del cloroplasto un proplástido pasa transitoriamente por algunos estadios donde existe diferenciación membranal parcial hasta llegar a cloroplasto maduro. En este estadio en ausencia de luz se genera un etioplasto que en presencia de luz se rediferencia a cloroplasto. Los amiloplastos y oleinoplastos son plástidos almacenadores predominantes en tubérculos y semillas. Los cromoplastos son responsables de los colores rojo a amarillo de flores y frutos. El estado de senescencia de un plástido se conoce como gerantoplasto. Las flechas indican la potencial interconversión de los diferentes plástidos con excepción del gerantoplasto, el cual es un estado terminal.

amarillos, responsables de brindar color a flores y frutos de las plantas. También, en algunos casos, estos plástidos se acumulan en tubérculos, como la zanahoria, y en hojas senescentes, ocasionando el espectacular cambio de color característico de los árboles durante el otoño.

Leucoplastos (amiloplastos, oleinoplastos y proteinoplastos). Son plástidos incoloros presentes en tubérculos y semillas, especializados en el almacenamiento de almidón, aceites y proteínas respectivamente. Los estatolitos constituyen un tipo especial de amiloplastos presentes en algunas de las células de la raíz que son indispensables para el gravitropismo de este órgano.

Etioplastos. Son plástidos presentes en las hojas de plantas crecidas en oscuridad. La membrana interna en estos organelos no está desarrollada, pero en el estoma de los etioplastos se forma una estructura reticular llamada *cuerpo prolamelar* que está formada básicamente por la acumulación de proteínas. Una característica de los etioplastos es su capacidad de rediferenciarse rápidamente a cloroplastos tras ser expuestos a la luz, aún por un tiempo muy corto.

A pesar de las diferentes funciones que desempeña cada plástido, todos se originan de un plástido común no diferenciado presente en células embrionarias y meristemáticas (células en división permanente que constituyen puntos de crecimiento continuo en la raíz y el tallo) conocido como *proplástido*. El proplástido pasa por un proceso de diferenciación particular hacia los diferentes tipos de plástidos, que están en coordinación con la función y diferenciación del tejido que los alberga. En adición al proceso de diferenciación, todos los plástidos diferenciados tienen la capacidad de rediferenciarse para convertirse en cualquier otro tipo de plástido en respuesta a diversos factores externos e internos. De hecho, por esta capacidad de rediferenciación se nombra plástidos (plásticos) a estos organelos (figura 2).

Características moleculares

Dado su origen endosimbiótico, los plástidos son organelos que contienen un genoma propio que los hace parcialmente independientes. El genoma plastídico, que está altamente conservado en diferentes especies vegetales y aún en algas, codifica para un centenar de genes involucrados tanto en funciones básicas de transcripción, traducción y replicación, como para varias proteínas de los complejos fotosintéticos. Sin embargo, debido a que durante su evolución la mayoría de los genes inicialmente codificados en el genoma del endosimbionte se han perdido y/o transferido al núcleo de la célula que los alberga, actualmente los plástidos son incapaces de sobrevivir de forma autónoma. Así, más de 90% de las proteínas estructurales, biosintéticas y regulatorias requeridas para la función y desarrollo actual de los diferentes plástidos están codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma y posteriormente importadas al organelo para realizar su función. Estas proteínas son indispensables para que los plástidos puedan realizar sus funciones, dividirse y aumentar su número a niveles que les permitan sustentar las necesidades de los diferentes tejidos de la planta. De tal manera, el proceso de diferenciación de los plástidos, junto con la regulación de la expresión de los genes plastídicos, depende tanto de proteínas codificadas por el genoma organelar, como del importe continuo, coordinado y regulado de proteínas codificadas en el núcleo.

Los cloroplastos como importantes fábricas metabólicas

Un aspecto que frecuentemente es olvidado sobre la importancia de los plástidos es que, además las funciones particulares de cada tipo, estos organelos llevan a cabo una variedad de procesos metabólicos fundamentales para la estructura y función celular. Algunos de estos procesos parecen provenir del simbiote original, pero otros parecen haber evolucionado *de novo* como resultado de una coevolución del endosimbionte y la célula vegetal que lo alberga.

gó. Entre dichos procesos destacan por su importancia:

- a) La síntesis de diferentes ácidos grasos constituyentes de membranas celulares.
- b) Biosíntesis de varios aminoácidos requeridos en la síntesis de proteínas citoplásmicas, como glutamato y glutamina.
- c) Foto-reducción de nitrógeno. De hecho, los cloroplastos son el sitio inicial de asimilación del nitrógeno para su integración posterior a diferentes rutas metabólicas.
- d) Síntesis de las bases púricas y pirimídicas que constituyen a los ácidos nucleicos.
- e) Asimilación de azufre. Este elemento mineral que es un macronutriente esencial para las plantas, se requiere predominantemente para la síntesis de aminoácidos azufrados, como metionina y cisteína, y de otros metabolitos secundarios como fitoalexinas, y vitaminas como la biotina.
- f) Síntesis de vitaminas. Varias vitaminas que actúan como cofactores de diferentes enzimas son sintetizadas exclusivamente en los plástidos. Además, estos compuestos son suplementos indispensables en la dieta de los animales, incluyendo al hombre.
- g) Biosíntesis de hormonas vegetales, como las giberelinas y el ácido abscísico, que regulan el crecimiento y muchas de las respuestas de estrés a cambios ambientales.
- h) Biosíntesis de tetrapirroles. Moléculas esenciales como cofactores de diversas proteínas entre las que se incluyen los grupos hemo (acarreadores de oxígeno), las fitocromobilinas (cromóforos) y la clorofila. Actualmente se han identificado algunos tetrapirroles que actúan como moléculas señalizadoras que regulan la expresión genética de algunos genes nucleares.
- i) Biosíntesis de metabolitos secundarios. Entre otros destaca la síntesis de compuestos pertenecientes a la familia de los isoprenoides (o terpenos). Aunque no todos los isoprenoides se sintetizan en plástidos, el número aquí es muy alto (del orden de miles); pero sobre todo destaca la importancia de sus funciones para diversos procesos vegetales.

Los isoprenoides tienen un interés adicional, ya que además de su papel central en el desarrollo y metabolismo de las plantas, muchos de estos compuestos tienen un valor comercial muy importante. El potencial económico que tienen los isoprenoides, ha generado que muchos laboratorios y compañías en el mundo dirijan sus investigaciones a entender la regulación de sus vías de síntesis para su eventual manipulación. Estas investigaciones, entre las que se cuentan varias realizadas en nuestro grupo, han generado resultados novedosos y un avance importante en el conocimiento de aspectos básicos de su regulación. Sin embargo, antes de describir aspectos más detallados de nuestros hallazgos y los de otros grupos alrededor del mundo, es necesario describir algunos de los aspectos generales de estos compuestos naturales.

Los isoprenoides

Los isoprenoides (o terpenos) forman la familia más amplia y diversa de sustancias naturales conocida (más de 40 000 compuestos diferentes). Se sintetizan en prácticamente todos los seres vivos, desde bacterias hasta humanos, siendo las plantas las que producen más del 80% (>30 000) de ellos.

Químicamente los terpenos son hidrocarburos (únicamente contienen en su estructura carbono e hidrógeno), clasificados como lípidos; es decir, sustancias insolubles en agua y solubles en distintos solventes orgánicos como la gasolina y la acetona. Entre algunos de los ejemplos de esta familia de compuestos se incluyen a la clorofila, el aceite del limón (atractivo natural de insectos, explotado industrialmente en la fabricación de aditivos de alimentos y aromas), los carotenos y la vitamina E (antioxidantes requeridos en nuestra dieta diaria), el colesterol (cuya acumulación en el interior de los vasos sanguíneos da lugar a la arteroesclerosis, una de las principales causas de muerte en los países desarrollados) y el caucho (con el que se fabrican las llantas de los automóviles).

A pesar de su gran diversidad en estructura y función, todos los isoprenoides son derivados de dos unidades isoprenicas básicas de cinco átomos de carbono conocidas como isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (figura 3). Estos dos bloques estructurales se unen en diferente número desde una sola unidad, hasta miles de ellas para producir los distintos isoprenoides. Debido al número tan importante de isoprenoides conocidos, estos compuestos han sido clasificados, de acuerdo al número de unidades isoprenicas que los forman, en base a la llamada “regla del isopreno” propuesta por Wallach en 1987. Adicionalmente, los isoprenoides sufren diversas modificaciones como ciclizaciones, oxidaciones e hidroxilaciones a través de diferentes reacciones enzimáticas con las cuales dan lugar a una gran diversidad de compuestos entre los que se tienen (figura 3):

Hemiterpenos. Conteniendo una sola unidad isoprenica de 5 carbonos (C_5). El isopreno, compuesto volátil producido en microorganismos y plantas, es considerado el único hemiterpeno, aunque algunos investigadores también consideran como hemiterpenos a sus derivados como el prenol y el ácido isovalérico que contienen oxígeno.

Monoterpenos. Formados por dos unidades isoprenicas ($C_{10}H_{16}$); entre sus derivados se incluyen la mayoría de las esencias volátiles de flores y aceites esenciales de hierbas y especies. Son de especial interés ya que frecuentemente se emplean como perfumes y saborizantes (menta). También el geraniol ($C_{10}H_{16}O$), producido en zanahorias, limón y otras plantas, es un monoterpeno, que además de sus propiedades antioxidantes ha sido utilizado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

Sesquiterpenos. Compuestos por tres unidades isoprenicas ($C_{15}H_{24}$). Dentro de este grupo se encuentran varios aceites de plantas con funciones de defensa y atrayentes para insectos. Uno de los sesquiterpenos más conocidos es el farnesol ($C_{15}H_{26}O$) que además de ser un pesticida natural y funcionar como feromona de insectos,

es explotado industrialmente como fijador en perfumes y saborizante de cigarrillos.

Diterpenos. Constituidos por cuatro unidades isoprenicas ($C_{20}H_{32}$). Entre los ejemplos de diterpenos se incluyen el taxadieno, precursor del taxol, que es uno de los anticancerígenos más utilizados. Este grupo también incluye al retinol o provitamina A y al fitol que es constituyente de la molécula de clorofila. Muchos autores consideran a la hormona vegetal gibberelina como un diterpeno.

Triterpenos. Formados por 6 unidades isoprenicas para dar la fórmula molecular de $C_{30}H_{48}$. Un representante de los triterpenos es el escualeno, ingrediente principal del aceite de hígado de tiburón. El escualeno es procesado a lanosterol, que es el precursor estructural de todos los esteroides, incluyendo al colesterol y las hormonas esteroides (estrógenos y andrógenos) que controlan la diferenciación sexual en humanos. En plantas este grupo incluye a los brasinoesteroides, que son hormonas vegetales, al fitoesterol, componente de la membrana, y a diferentes fitoalexinas con funciones de defensa.

Tetraterpenos. Con ocho unidades isoprenicas que forman compuestos de 40 carbonos. Entre los tetraterpenos biológicamente más importantes pueden mencionarse a los carotenoides, que son pigmentos esenciales para la fotosíntesis. Dentro de éstos destaca el licopeno, que proporciona el color rojo a los jitomates, y los α - y β -carotenos, responsables de la coloración de muchos frutos y flores. Actualmente los carotenos tienen un alto interés biotecnológico, ya que se usan comercialmente en la fabricación de bronceadores y cremas antioxidantes. Los carotenos son antioxidantes naturales, requeridos en la dieta humana (provitamina A) para prevenir el envejecimiento y ciertos tipos de cáncer.

Politerpenos. Que consisten de largas cadenas formadas por múltiples (en ocasiones miles) unidades isoprenicas. Entre los politerpenos destacan por su importancia el látex, empleado en la fabricación de guantes quirúrgicos y preservativos, y el hule, a través de cuya *vulcani-*

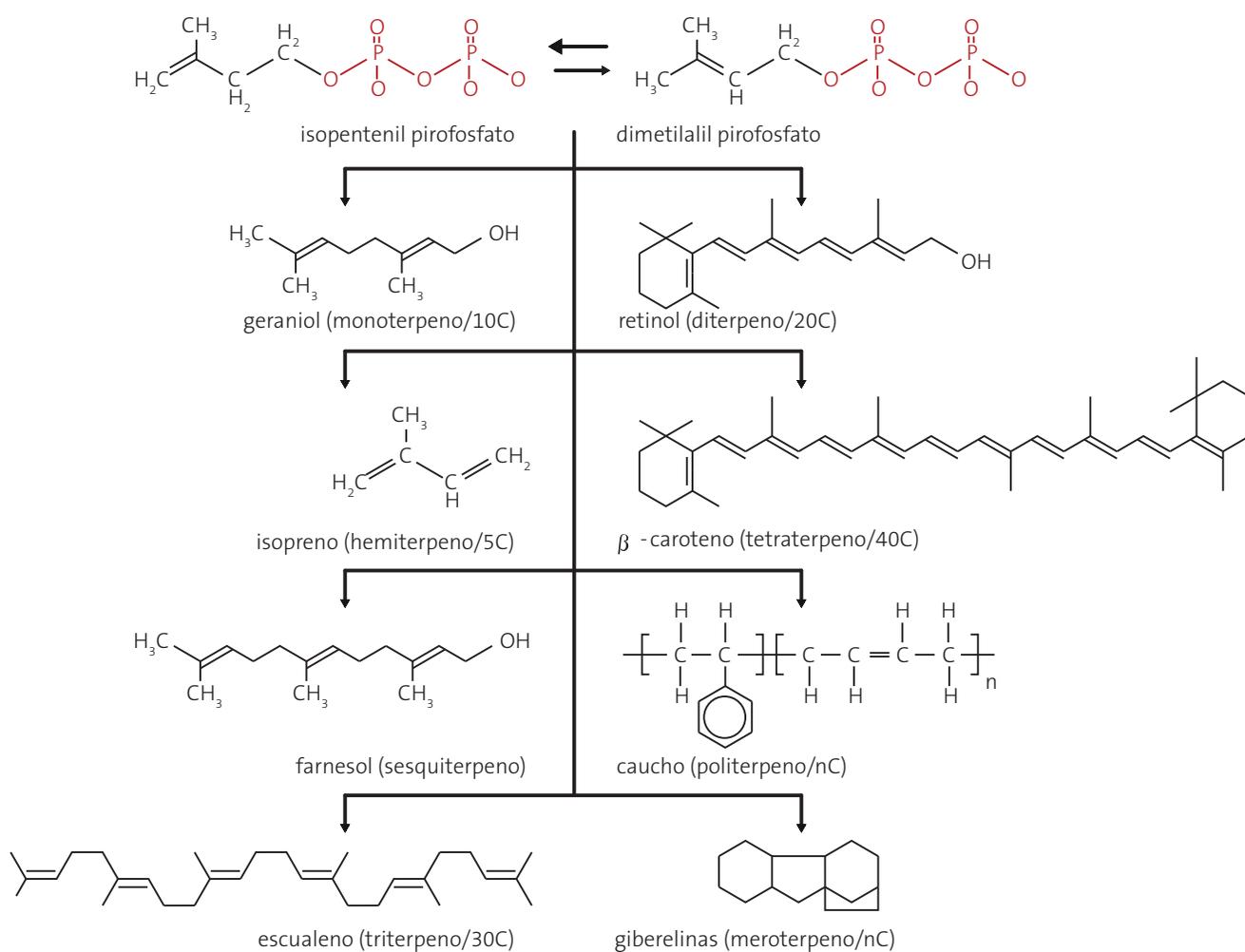


Figura 3.

Estructura química de isoprenoides. Se muestra la estructura de los precursores universales (isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato) y ejemplos representativos de cada uno de los subgrupos de compuestos isoprenoides constituidos por diferentes números de carbonos.

zación (entrecruzamiento de cadenas laterales mediado por azufre) se obtiene el caucho con el que se fabrican las llantas para automóviles.

Meroterpenos. Algunos productos naturales, entre los que se encuentran la clorofila, la provitamina A, las citocininas y las giberelinas, derivan parcialmente del isopreno y se les ha dado el nombre de meroterpenos.

En resumen, con el nombre de isoprenoides o terpenos se conoce a un grupo importante de compuestos naturales que, aunque con estructuras químicas y funciones biológicas muy diversas, proceden de la condensación de las dos unidades isoprenicas: IPP y DMAPP. La importancia biológica y biotecnológica de los terpenos ha ocasionado que sus rutas de biosíntesis sean objeto de estudio con diferentes enfoques por diversos grupos de investigación en el mundo.

Rutas de biosíntesis de isoprenoides

Como ya se mencionó, los precursores universales de todos los isoprenoides son el IPP y el DMAPP, que son producidos por todos los seres vivos (**figura 3**). Hoy en día se sabe que estos precursores pueden ser sintetizados por dos rutas metabólicas independientes cuya evolución es un ejemplo notable de convergencia, ya que no parece existir relación alguna entre las enzimas que participan en cada una de ellas. Una vía denominada *ruta mevalónica* (MVA), que opera en el citoplasma de prácticamente todos los eucariotes, y otra denominada *ruta MEP*, presente en la mayoría de las bacterias (eubacterias) y en organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores. La ruta MEP también opera en algunos protozoarios que contienen organelos derivados de plástidos del género apicoplexa, como *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Leishmania*, que son agentes causales de diversas enfermedades en humanos. Por lo tanto, algunos organismos como plantas y algas contienen ambas vías (**figura 4**).

Las dos estrategias exitosas para la síntesis de isoprenoides al parecer fueron seleccionadas independientemente durante la evolución

de los diferentes organismos. De hecho, se postula que el origen de la vía MVA proviene del grupo procariote ancestral relacionado con las arqueobacterias, quienes más tarde al parecer dieron lugar a las células eucariotes. Por su parte, la vía MEP parece tener su origen en organismos del tipo de las eubacterias, algunas de las cuales dieron origen a los plástidos.

El descubrimiento reciente y la caracterización de la vía MEP, representa uno de los mejores ejemplos de los beneficios de un análisis multidisciplinario que incluye estudios bioquímicos, moleculares, genéticos, bioinformáticos y de genómica comparativa. Para el caso particular de plantas, nuestro equipo ha hecho importantes contribuciones basadas en la caracterización de mutantes afectadas en diferentes genes de la vía. La historia del descubrimiento e importancia de la vía MEP, resaltando nuestras contribuciones al respecto, se describe en la siguiente sección. Sin embargo, como punto de comparación empezaremos por hacer una breve descripción de la ruta mevalónica que utilizan muchos organismos para la síntesis de isoprenoides.

La vía mevalónica

La vía mevalónica (MVA) (**figura 4**) fue caracterizada hace casi 50 años y durante mucho tiempo se le consideró como el único camino para la síntesis de IPP y DMAPP en todos los organismos vivos. Desde 1958 se reportó en animales y levaduras que la síntesis de IPP y DMAPP se realizaba a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) que a través de la acción de tres enzimas producen el primer intermediario comprometido de la vía, el ácido mevalónico (**figura 4**), del cual deriva su nombre. El ácido mevalónico, por la acción subsecuente de tres reacciones adicionales, es convertido a IPP. Finalmente, el IPP, por acción de la enzima IPP isomerasa (IDI), da lugar a su isómero, el DMAPP.

La vía mevalónica ha sido sujeto de extensos estudios bioquímicos, genéticos y moleculares. Entre dichos estudios destacan los realizados con la enzima HMGR, cuya actividad se ha de-

mostrado que es un paso limitante de la vía. Desafortunadamente, la caracterización bioquímica de esta enzima es limitada debido a lo difícil de su purificación. Además, dado que la HMGR está codificada por una familia de genes cuyo número varía en diferentes especies, su regulación es complicada. Por ejemplo, en papa se han reportado siete genes que codifican para isoformas de la HMGR. En *Arabidopsis* se han identificado dos genes que presentan una expresión diferencial: el gen *HMGR1*, con una expresión constitutiva, y el *HMGR2*, que se expresa primordialmente en raíces e inflorescencias. En cualquier caso, el análisis de la expresión y regulación de los genes *HMGR*, así como la caracterización de otros genes y productos de la vía MVA, es la línea de interés de diversos grupos de investigación. Baste mencionar que recientemente ha sido reportado que una mutación en el gen *HMGR* en *Drosophila melanogaster* resulta en letalidad embrionaria a causa de deformaciones en el desarrollo del corazón.

Descubrimiento de la vía MEP

Los trabajos pioneros de la síntesis de isoprenoides llevaron a concluir que la vía MVA era responsable de la biosíntesis de isoprenoides en todos los organismos vivos. Sin embargo, estudios posteriores sobre la síntesis de algunos isoprenoides específicos produjeron resultados contradictorios que sugerían la existencia de una ruta de biosíntesis diferente a la MVA. Entre dichos resultados destacan los de las síntesis de hoponoides (derivados triterpenoides que modulan la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática) y ubiquinonas en bacterias, en los que, basados en la incorporación de acetato radioactivo (^{13}C), se demostraba que el acetato no parecía ser el precursor de dichos compuestos. Por otra parte, experimentos en plantas siguiendo la incorporación de carbono radioactivo (^{14}C) proveniente de CO_2 , mevalonato y acetato en diversos isoprenoides sintetizados en plástidos, también produjeron resultados que contradecían la idea de la vía MVA como única responsable de la biosíntesis

de isoprenoides. Estos estudios mostraron que mientras que el carbono radioactivo derivado del CO_2 se incorporaba rápidamente en terpenos como los carotenoides, el fitol y la plastoquinona, que son sintetizados en el cloroplasto, el carbono proveniente de acetato o mevalonato era rápidamente incorporado en isoprenoides como la ubiquinona, el estigmasterol y el campesterol, todos ellos producidos en el citoplasma. Finalmente, estudios con cloroplastos aislados demostraron de manera inequívoca que estos organelos eran incapaces de sintetizar IPP y DMAPP a partir de ácido mevalónico. Resultados como los descritos, complementados con el uso de inhibidores específicos de la vía MVA, motivaron que en 1993 dos grupos de manera simultánea reinvestigaran cuidadosamente la biosíntesis de isoprenoides en plantas y en eubacterias. Los experimentos de ambos grupos (el de Rohmer y el de Lichtenthaler) culminaron con el descubrimiento de una vía nueva para la síntesis de isoprenoides a la que se le ha denominado MEP, en base al primer intermediario comprometido de la vía, el 2-C-metil-eritrotitol 4-fosfato (MEP) (figura 4). Estos hallazgos fueron apoyados en plantas con la caracterización genética y molecular de una mutante albina a través de la cual se identificó la primera enzima de esta vía.

Actualmente es claro que organismos como las arqueobacterias, protozoarios, hongos y animales superiores, únicamente contienen la vía MVA para la síntesis de todos sus isoprenoides. Otros, entre los que se incluyen la mayoría de las eubacterias, algunas algas y ciertos protozoarios, solamente utilizan la vía MEP. Finalmente, las plantas superiores y la mayoría de las algas hacen uso de ambas vías coordinadamente para la biosíntesis de sus isoprenoides. En este caso ambas vías operan en diferentes compartimientos celulares: la vía MVA es responsable de la síntesis de isoprenoides citoplásmicos, mientras que la vía MEP produce los isoprenoides plástidos (figura 4). Un resumen del uso de las dos diferentes rutas para la biosíntesis de isoprenoides por diferentes tipos de organismos se presenta a continuación:

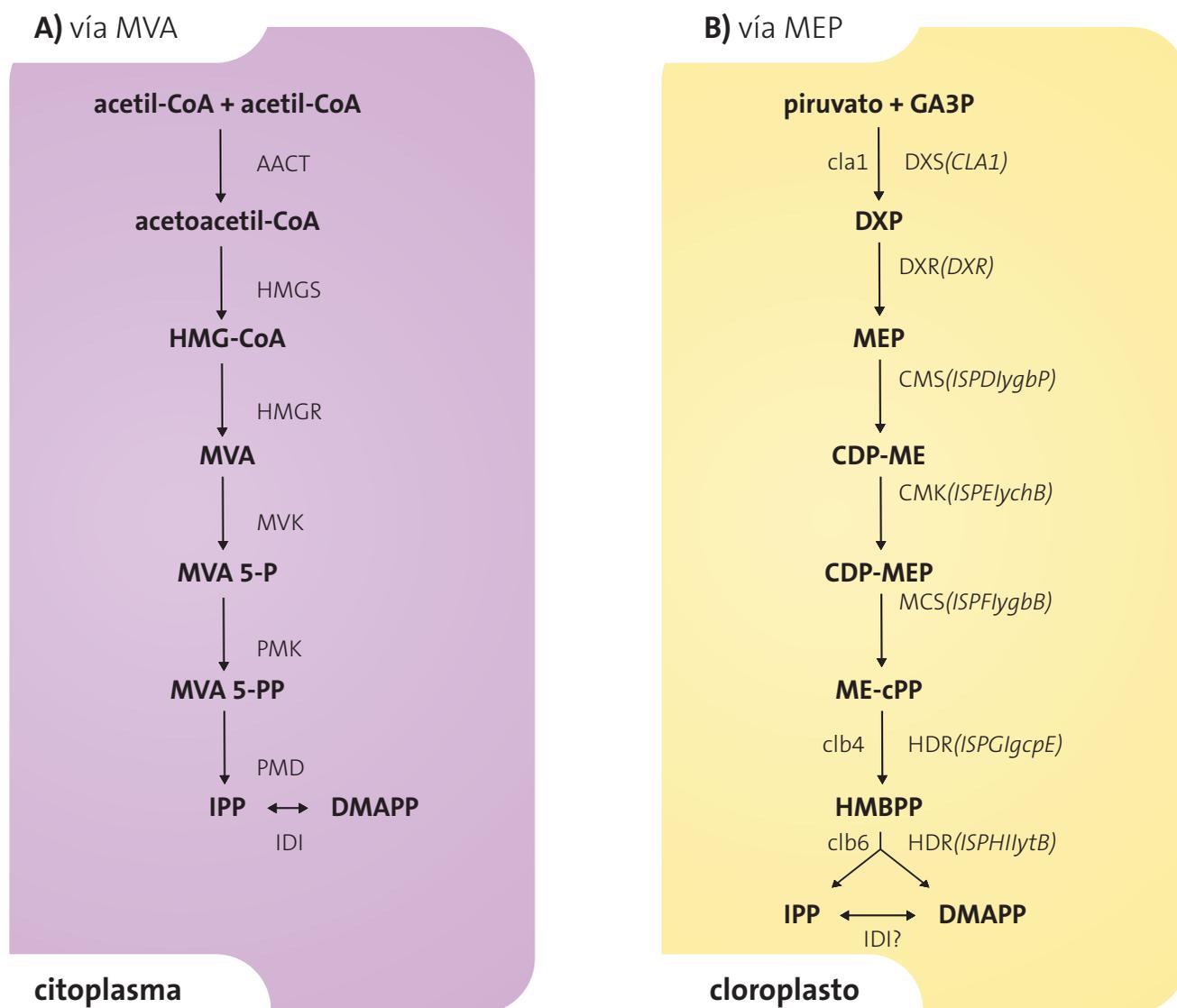


Figura 4.

Rutas de biosíntesis de isoprenoides. Se muestran los intermediarios y las enzimas que catalizan cada paso. A) Vía mevalónica (MVA): CoA (coenzima A), HMG-CoA (hidroxi metil glutaril CoA), MVA (ácido mevalónico), MVA 5-P (mevalonato 5 fosfato), MVA 5-PP (mevalonato 5 difosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), AACT (aceto acetil CoA tiolasa), HMGS (HMG-CoA sintasa), HMGR (HMG-CoA reductasa), MVK (mevalonato cinasa), PMK (fosfo mevalonato cinasa), PMD (fosfo mevalonato descarboxilasa), IDI (isopentenil pirofosfato isomerasa). B) Vía MEP: GA3P (gliceraldehído 3 fosfato), DXP (deoxi-D-xilulosa 5-fosfato), MEP (2-C-metil-eritritol 4-fosfato), CDP-ME (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol), CDP-MEP (CDP-ME 2-fosfato), ME-cPP (metil eritritol-2,4-ciclo-difosfato), HMBPP (hidroxi metil butenil difosfato), DXS (DXP sintasa), DXR (DXP reductoisomerasa), CMS (CDP-ME sintasa), CMK (CDP-ME cinasa), MCS (ME-cPP sintasa), HDR (HMBPP sintasa), HDR (HMBPP reductasa). Entre paréntesis se muestra el nombre de los genes vegetales/bacterianos correspondientes; al lado izquierdo de las flechas se indica el nombre de las mutantes de *Arabidopsis thaliana* identificadas y caracterizadas en nuestro grupo.

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

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

La identificación de todas las enzimas y genes para cada uno de los pasos de la vía MEP, así como la elucidación de sus mecanismos de reacción, se obtuvo en un lapso de aproximadamente diez años (gracias al uso de estrategias multidisciplinarias que incluyeron genética, biología molecular y genómica comparativa). Esto representa un récord en la caracterización de cualquier vía de biosíntesis conocida hasta ahora. Así, se identificaron para la ruta MEP siete genes y sus correspondientes enzimas como las responsables de la síntesis de IPP y DMAPP a partir de los precursores gliceraldehído 3-fosfato y piruvato (figura 4). Los genes correspondientes para cada una de las enzimas de la vía MEP se han aislado en diferentes especies vegetales y en bacterias. A través de la caracterización molecular de estos genes se ha avanzado de manera importante en los mecanismos de regulación de la vía, conocimiento que resulta esencial para su futura manipulación biotecnológica.

Los pasos biosintéticos de la vía MEP

Como se ve en la figura 4, el primer paso de la vía MEP es una reacción de condensación entre el piruvato y el GA3P, catalizada por la enzima DXS, la cual produce DXP. Este DXP genera MEP, a través de la enzima DXR, paso que se postula como el primer intermediario comprometido de la vía, ya que el MEP es utilizado exclusivamente

para la síntesis de IPP y DMAPP, sin divergir hacia otras rutas biosintéticas. Esto contrasta con el DXP, que al parecer también se utiliza como precursor en la síntesis de las vitaminas B6 y B1, aunque estudios recientes en plantas sugieren que síntesis de vitaminas parece provenir de una ruta biosintética no relacionada.

Posteriormente, como se muestra en la figura 4, el MEP es transformado en HMBPP por la acción subsecuente de las enzimas CMS, CMK, MCS y HDS. En el último paso de la vía, la enzima HDR convierte el HMBPP en IPP y DMAPP que son los productos finales de esta ruta biosintética. Hasta ahora en plástidos no se ha demostrado la existencia de una enzima responsable de la interconversión de IPP a DMAPP, semejante a la que existe para la vía MVA, por lo que se especula que ambos productos resultan directamente de la acción de la enzima HDR, como de hecho se sabe que ocurre en *Escherichia coli*.

Identificación y caracterización de enzimas y genes

Si bien es cierto que varios de los genes de la vía MEP se han identificado y caracterizado ya en algunos organismos, la contribución de los estudios en la bacteria *Escherichia coli* fueron centrales para la elucidación inicial de esta vía. Sin embargo, cabe mencionar que alguno de los genes, como el DXS, que codifica para la primera enzima de la vía, fue inicialmente identificado en la planta dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* por nuestro grupo de trabajo.

Desde que en 1993 se publicó la existencia de la vía MEP, varios grupos de investigación se dedicaron a la identificación de los intermediarios moleculares y de sus enzimas correspondientes tanto en bacterias como en plantas. En 1998, utilizando *E. coli* como modelo, se encontró el mecanismo de reacción de las enzimas responsables de los dos primeros pasos de la vía, la DXS y la DXR. En el transcurso de los siguientes dos años, y con el uso de técnicas de bioinformática y genómica comparativa sobre organismos cuyo genoma se encontraba total-

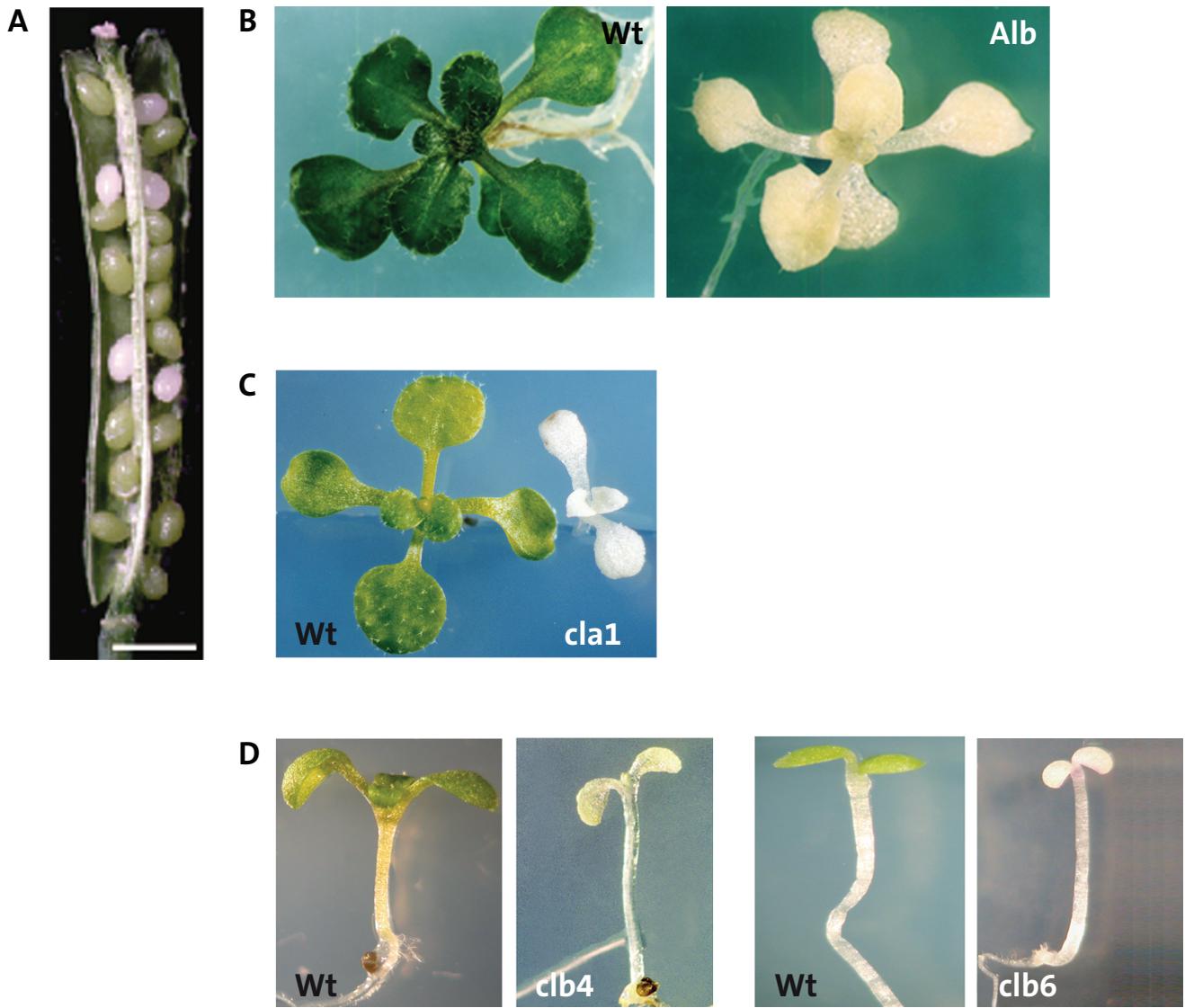


Figura 5. Mutantes albinos. A) Silicua de una planta heterociga donde segregan embriones albinos. B) Fenotipo de plantas del tipo silvestre (Wt) y albino (Alb). C) Fenotipo de la mutante cla1-1 y planta de tipo silvestre (Wt). D) Fenotipos de mutantes clb y sus correspondientes tipos silvestres.

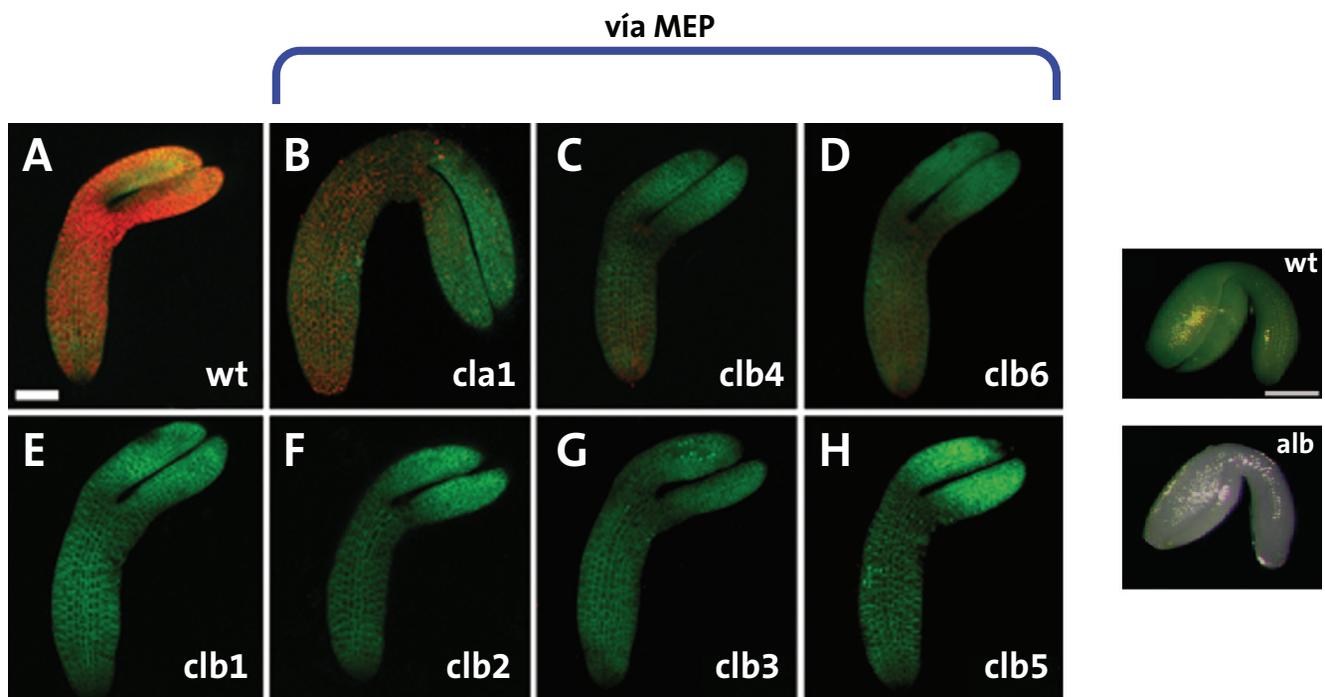


Figura 6. Acumulación de clorofila en embriones albinos. Reconstrucción por microscopía confocal de la fluorescencia de la clorofila en embriones inmaduros del tipo silvestre wt (A), en mutantes albinos cla1-1 (B) y en diferentes mutantes clb (C-H). Los niveles de clorofila se aprecian por el color rojo en los embriones. Hay dos grupos de mutantes, las que acumulan clorofila en el embrión (no-autónomas celulares) y aquellas que no acumulan clorofila a niveles detectables (autónomas celulares). Todas las no-autónomas celulares están afectadas en proteínas de la vía MEP. A la derecha se aprecian los embriones tipo silvestre (wt) y mutante (alb) sobre los cuales se realizó la microscopía.

mente secuenciado, se logró la identificación de los siguientes tres genes de la vía (denominados *ygbP*, *ygbB* y *ygbA* en bacterias). Dicho análisis se basó en la búsqueda de genes conservados en todas las eubacterias y plantas, pero ausentes en organismos donde no existe la vía MEP, como en levadura y humanos. La función bioquímica de dichos genes fue posteriormente corroborada a través de complementación de fenotipos mutantes en bacterias. Finalmente, durante los años 2001 y 2003 se identificaron y caracterizaron los dos últimos genes de la vía MEP (*gcpE* y *lytB*) y a sus proteínas correspondientes, DHS y DHR.

La vía MEP, esencial para la supervivencia de las plantas

La mayoría de las proteínas responsables tanto de la regulación como del funcionamiento de los cloroplastos son codificadas por genes nucleares. Estudios recientes basados en análisis de proteómica y genómica estiman que se requieren más de 3000 proteínas nucleares para los diversos procesos realizados en plástidos, aunque aún se desconoce la identidad y función de una cantidad importante de dichas proteínas. Por otro lado, una estrategia que ha sido utilizada con éxito para identificación y aislamiento de nuevas proteínas requeridas en el proceso de desarrollo y función de plástidos es la selección y caracterización de mutantes incapaces de acumular pigmentos. A pesar de que este tipo de mutantes son letales y mueren rápidamente después de su germinación, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* su identificación y aislamiento resulta factible a través de la selección de plantas heterocigas viables que segreguen el fenotipo mutante de carencia de pigmentos en los embriones inmaduros durante la maduración de la semilla, como se muestra en la **figura 5**. De hecho, una parte importante de la caracterización de la vía MEP en plantas superiores se realizó en nuestro grupo, como el caso de la mutante *cla1-1*, cloroplastos alterados (**figura 5C**). Esta mutante está afectada en el desarrollo del cloroplasto y presen-

ta un fenotipo albino (carencia de pigmentos). La caracterización fenotípica de *cla1-1* mostró que los cloroplastos en esta planta están básicamente no diferenciados y se asemejan a proplástidos. Asimismo, su caracterización molecular permitió identificar el gen que codifica para la primera enzima (DXS) de la vía MEP. En adición a la mutante *cla1-1*, la caracterización de otras mutantes albinas de nuestra colección (denominada *clb*, *chloroplast biogenesis*), ha permitido identificar a otros genes de la vía MEP (**figura 5D**). Tal es el caso de las mutantes *clb4* y *clb6* que afectan a los genes *DHS* y *DHR*, respectivamente (**figura 4**), con cuya caracterización se demostró la funcionalidad de dichos genes en plantas. El estudio de las mutantes *cla1-1*, *clb4* y *clb6*, también nos ha permitido mostrar que los genes de la vía MEP actúan de forma no autónoma celular, es decir, que su función puede ser parcialmente compensada en el embrión por productos provenientes del tejido materno (**figura 6**). Finalmente, la caracterización de estas mutantes también ha sido muy valiosa para el descubrimiento de varios elementos clave de regulación de esta vía, actual tema de interés de nuestro grupo.

La vía MEP en plantas está sujeta a múltiples regulaciones

En general, dentro de cualquier ruta biosintética algunas de sus enzimas limitan el flujo de la vía. De ellas dependen en gran medida los niveles de actividad y eficiencia con que trabaja la vía. En consecuencia, muchas de las enzimas “limitantes” de una vía biosintética están sujetas a diversos mecanismos de regulación que modulan sus niveles o su actividad. Estas regulaciones por ende tienen un efecto directo sobre los niveles de los productos finales generados en dicha vía. En nuestro grupo la caracterización funcional del gen *CLA1/DXS1*, a través de la manipulación de sus niveles en plantas transgénicas, permitió establecer a la enzima DXS como limitante para la síntesis de IPP y DMAPP en plantas. Adicionalmente, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* nuestros

estudios han permitido establecer los patrones de expresión, tanto de los transcritos como de las proteínas para los genes *CLA1/DXS1*, *DHS* y *DHR* en distintos tejidos, estados de desarrollo y en respuesta a señales externas, como la luz, e internas, como los niveles de azúcares. Para el caso de DXS, hemos extendido nuestro análisis a maíz, identificando los genes que codifican para dicha enzima así como su patrón de expresión. Resulta interesante mencionar que a diferencia de *Arabidopsis*, en donde al parecer un sólo gen es responsable de la expresión mayoritaria de la enzima DXS, en maíz hemos demostrado la existencia de dos genes para DXS con patrones de expresión muy diferentes y los cuales parecen contribuir conjuntamente a los niveles enzimáticos totales. Estos estudios muestran la complejidad a la que está sujeta la expresión de esta enzima limitante en diferentes plantas y también abre una interesante posibilidad para la eventual manipulación de este gen en plantas de interés comercial. Asimismo, a través de la caracterización de otras mutantes de la vía MEP, como es el caso de *clb6*, hemos podido evidenciar la importancia central que la regulación postranscripcional tiene para la acumulación de la proteína limitante DXS. Este mecanismo novedoso de regulación está conservado en varias especies vegetales, incluyendo a *Arabidopsis* y maíz, jugando muy probablemente un papel preponderante en la modulación de los niveles de esta proteína.

Para finalizar, es importante resaltar que si bien el estudio de los genes y enzimas que participan en la vía MEP en plantas es el resultado del esfuerzo de varios grupos de investigación en el mundo, nuestro grupo ha jugado un papel fundamental en la identificación, aislamiento y caracterización de tres de los siete genes que la conforman, colocándonos en una posición de vanguardia en el estudio de esta importante ruta metabólica que tiene un enorme potencial para ser manipulada con fines biotecnológicos hacia la producción de diferentes compuestos con aplicaciones médicas e industriales. ●

Bibliografía

- Estévez, J. M. *et al.*, "1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants", en *J. Biol. Chem.*, 276, 2001.
- Guevara-García, A. A. *et al.*, "characterization of the *Arabidopsis clb6* mutant illustrates the importance of post-transcriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway", en *Plant Cell*, 17, 2005.
- Gutiérrez-Nava, M. L. *et al.*, "Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development", en *Plant Physiol.*, 135, 2004.
- León, P., A. Arroyo y S. A. Mckenzie, "Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants", en *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 1998.
- Rodríguez-Concepción, M. y A. Boronat, "Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics", en *Plant Physiol.*, 130, 2002.
- Vothknecht, U.C., y P. Westhoff, "Biogenesis and origin of thylakoid membranes", en *Biochem. Biophys. Acta*, 1541, 2001.