

ENSAYO

LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS A TRAVÉS DE LA VÍA DEL 2C-METIL-D-ERITRITOL-4- FOSFATO (MEP)

Angeles Cancino-Rodezno¹

RESUMEN

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado una enorme plasticidad metabólica para contender con los distintos cambios en su entorno. Dicha plasticidad se ve reflejada en la gran variedad de compuestos orgánicos que son capaces de sintetizar; uno de ellos lo constituye la vasta familia de los isoprenoides, también llamados terpenoides, que son un grupo extenso de moléculas orgánicas que presentan una enorme diversidad estructural y funcional, sin embargo, todos tienen a los isómeros isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) como precursores. Durante mucho tiempo se consideró a la ruta del Ácido Mevalónico como la vía universal para la síntesis de precursores isoprenícos; recientemente se descubrió la ruta alterna del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), la cual es exclusiva de eubacterias y otros organismos con plástidos. Las plantas poseen ambas vías metabólicas, logrando así sintetizar cerca del 80% de los isoprenoides conocidos hasta el momento. Muchos de estos compuestos son metabolitos primarios implicados en funciones básicas como la respiración y la fotosíntesis, mientras que otros actúan como metabolitos secundarios (químicos ecológicos), y adicionalmente, algunos poseen un valor comercial. En este sentido, la ingeniería genética representa una poderosa herramienta para la producción biotecnológica de éstos. La elucidación de la vía MEP significa un hallazgo notable para el entendimiento de la manipulación de la biosíntesis de isoprenoides en las plantas, sin embargo resta por entender más sobre los mecanismos de control del flujo de sus intermediarios y sus posibles conexiones con otras rutas.

Palabras clave: Biotecnología, isoprenoides, metabolitos, plantas, vía MEP, vía mevalónica.

Fecha de recepción: 06 de noviembre de 2006.

Fecha de aceptación: 14 de noviembre de 2008.

¹ Instituto de Biotecnología, UNAM. Correo electrónico: selegna@ibt.unam.mx

ABSTRACT

As sessile organisms, plants developed a huge metabolic plasticity to contrarrest their changing environment, which is exhibited in the great variety of organic compounds that they can synthesize; one of them is the broad family of isoprenoids also known as terpenoids, which is a large group of organic molecules. Despite their structural and functional diversity, all isoprenoids come from the same two precursors: isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). For a long time, the mevalonic acid pathway was thought to be the universal means to synthesize the isoprenic precursors, recently an option was discovered: the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway. This pathway is exclusive for eubacteria and organisms with plastids, including higher plants. In fact, plants use both pathways for the biosynthesis of isoprenoid precursors; about 80% of the known isoprenoids are produced by plants; their metabolic plasticity allows them to synthesize an impressive variety of compounds. Some of them act as primary metabolites, molecules involved in processes such as respiration, photosynthesis, etc., while others act as secondary metabolites (chemicals with ecological functions). Beyond their biological functions, some isoprenoids have a commercial value. In this regard, genetic engineering represents a powerful tool for directing the biotechnological production of such compounds. The elucidation of the MEP pathway has represented a quantum leap for the understanding and manipulation of isoprenoid biosynthesis in plants. However, much about the regulation mechanisms controlling the flux of intermediates through the pathway and its coordination with related metabolic routes remains to be understood.

Key words: Biotechnology, isoprenoids, metabolites, plants, MEP pathway, Mevalonic pathway.

INTRODUCCIÓN

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado una enorme plasticidad metabólica para contender con los distintos cambios en su entorno. Dicha plasticidad se ve reflejada en la gran variedad de compuestos orgánicos que son capaces de sintetizar (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004); un buen ejemplo lo constituye la vasta familia de los isoprenoides, también llamados terpenoides, que aun al ser producidos por todos los seres vivos (Sacchettini y Poulter, 1997), cerca del 80% de esta diversidad molecular es exclusiva de los organismos vegetales (Eisenreich *et al.*, 2001). Debido a su abundancia y variabilidad, los compuestos isoprenicos desempeñan múltiples funciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividades biológicas de los isoprenoides en distintos organismos.

Funciones biológicas	
Hormonas	
en insectos	Feromonas, ecdisona
en mamíferos	Testosterona, Progesterona
en plantas	Giberelinas, ácido abscísico
Estabilizadores de membrana celular	
en bacterias	Hopanoídes
en eucariotes	Esteroles
Transportadores de electrones	
en mitocondrias y bacterias púrpuras	Ubiquinona
en cloroplastos y eubacteria	Plastoquinona
Fotosíntesis	
en plantas	Fitol
	Carotenoides
Químicos ecológicos	
Toxinas de hongos	Tricodienos
Atrayentes de polinizadores en plantas	Geraniol, limoneno, carotenos
Control de parásitos en plantas	Capsidiol (Fitoalexina)

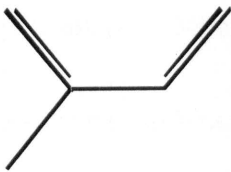
Su versatilidad funcional los convierte en excelentes candidatos para su explotación biotecnológica e industrial. Algunas aplicaciones biotecnológicas se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides.

Aplicaciones biotecnológicas	
Medicina	
Antioxidantes	α tocoferol (vitamina E)
Anticancerígenos	Taxol
Antibióticos	Pentaleno, casbeno
Industria	
Producción de polímeros	Hule (cis-1,4-polisopreno)
Producción de fragancias y saborizantes	Mentol, citrónelol
Producción agrícola	Giberelinas
Alimentación humana	β -caroteno (pro-vitamina A)
Producción de colorantes	Astaxantina

Todos los isoprenoides comparten las mismas moléculas sillares: el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP). Estas moléculas fueron descubiertas por Wallach, quien en 1914 notó que la mínima unidad en la que se podía disectar un producto isoprenoide funcional es una molécula de 5 carbonos (Cuadro 3). Esto le permitió establecer que todos los isoprenoides se generan por fusiones repetitivas de moléculas de 5 carbonos, conocidas como unidades isopreno; posteriormente, Ruzicka acuñó el término "Regla del Isopreno" para designar este fenómeno (Ruzicka, 1953). Las unidades isopreno además de tener la capacidad de fusionarse reiteradamente, pueden acoplarse a reacciones de reducción, de fosforilación y de ciclización, entre otras, y potencialmente sufrir rearrreglos de su esqueleto carbonado. Los isoprenoides se clasifican por el número de unidades de 5 carbonos que los constituyen (Barkovich y Liao, 2001), (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Composición y nomenclatura de los isoprenoides.

Unidad isopreno C ₅	Número de unidades isopreno	Nombre
	C ₅	Hemiterpeno
	C ₁₀	Monoterpeno
	C ₁₅	Sesquiterpenos
	C ₂₀	Diterpenos
	C ₄₀	Tetraterpenos
	C _{40+ n}	Politerpenos

La vía mevalónica y el descubrimiento de la vía MEP

En 1950, mediante investigaciones realizadas en animales y levaduras por Bloch, Cornforth, Lynen y su equipo de trabajo, se descubrió una ruta para la síntesis de IPP y DMAPP, que por emplear mevalonato fue denominada vía mevalónica (Bloch, 1992).

Desde entonces, una gran cantidad de investigaciones se enfocaron a dilucidar todas las reacciones de la vía del Mevalonato; en la actualidad todas las enzimas de esta ruta se han caracterizado funcionalmente y han sido identificadas como citoplasmáticas (Schulte *et al.*, 2000). El precursor inicial de esta vía es la Acetil Coenzima A (acetil-CoA); a partir de este compuesto se origina una serie de siete reacciones enzimáticas para formar el IPP y DMAPP y el listado de las enzimas involucradas en esta vía se reúnen en el Cuadro 4.

Durante mucho tiempo se asumió a la vía mevalónica como ruta universal para la síntesis de IPP, y por ende, se le consideró como precursora de todos los isoprenoides; sin embargo, varios resultados obtenidos a partir de ensayos realizados en plantas y bacterias no podían ser explicados mediante este proceso. Uno de los experimentos que dieron evidencia de la existencia de otra ruta y permitieron cuestionar al mevalonato como único precursor del IPP fue realizado con mevalonato marcado. Dicho experimento se llevó a cabo sobre células vegetales donde se encontró que el [C14]-mevalonato era incorporado pobremente en isoprenoides ubicados en plástidos, pero lo hacía de modo eficiente en isoprenoides localizados en el citoplasma (Braithwaite y Goodwin, 1960).

Estudios posteriores con varias especies de plantas mostraron que la mevinolina, un inhibidor específico de la HMG reductasa y responsable de sintetizar el mevalonato, impedía la biosíntesis de isoprenoides citoplásmicos, pero no afectaba

Cuadro 4. Sustratos y enzimas de la vía mevalónica.

Sustratos	Enzimas
Acetil -CoA	Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT)
Acetoacetil - CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS)
3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR)
Mevalonato (MVA)	mevalonato cinasa (MC)
5-Fosfomevalonato (MVP)	5-fosfomevalonato cinasa (PMC)
5-Difosfomevalonato (MVPP)	5-difosfomevalonato descarboxilasa (DPMC)

ni la formación de las clorofilas ni de los carotenoides, ambos isoprenoides plastídicos (Bach y Lichtenthaler, 1982). La interpretación que se le dio por mucho tiempo a los resultados antes mencionados fue que tanto los precursores marcados, como la mevinolina no podían penetrar en los plástidos.

Actualmente todos los resultados que parecían incongruentes son explicados a través de la existencia de una ruta independiente para la biosíntesis de IPP, de DMAPP y en consecuencia, de los isoprenoides, es decir, la vía del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Los primeros datos relevantes que condujeron al descubrimiento de la vía MEP proceden de las investigaciones referentes a la biosíntesis de los hopanoides eubacterianos (Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993). En estos experimentos hechos con isótopos radioactivos se encontró un mismo patrón de marcaje en los distintos compuestos isoprenicos analizados, estableciéndose así que los carbonos C-3 y C-5 del IPP provienen del piruvato, mientras que los carbonos C-1, C-2 y C-4 del gliceraldehído 3-fosfato (G3P). De esta manera se concluyó que ambos compuestos son los precursores iniciales de la vía MEP (Rohmer *et al.*, 1993; Rohmer *et al.*, 1996).

La vía MEP

A la fecha existe información sobre todos los pasos enzimáticos de la vía no Mevalónica que conducen hacia la formación del IPP, así como de los genes codificantes para las 7 proteínas participantes de la vía MEP (Figura 1).

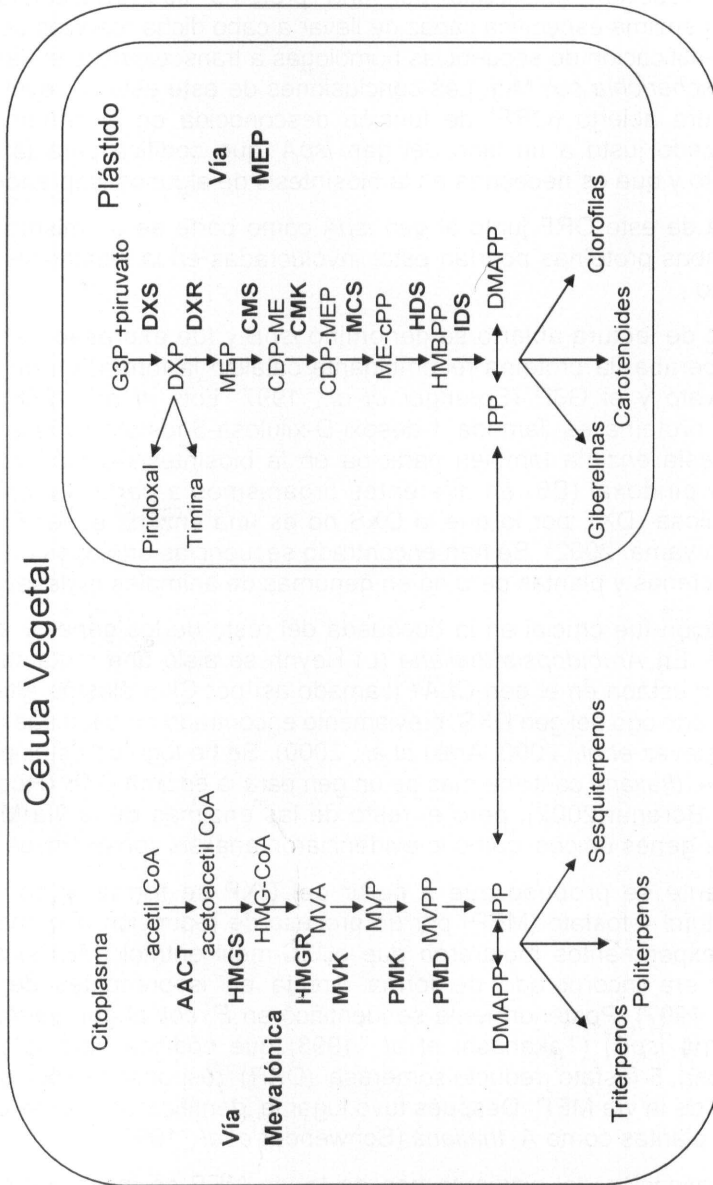


Figura 1. La vía mevalónica, sus enzimas y sustratos correspondientes, algunos productos finales y su distribución compartimentizada en la célula vegetal.

El piruvato y el G3P son transformados en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), mediante una reacción catalizada por una proteína tipo transcetolasa. La búsqueda de la enzima específica capaz de llevar a cabo dicha reacción se realizó mediante la identificación de secuencias homólogas a transcetolasas en las bases de datos de *Escherichia coli* Mig. Las conclusiones de este estudio revelaron un marco de lectura abierto (ORF) de función desconocida en el genoma de la bacteria localizado justo a un lado del gen *ispA*, que codifica para la enzima farnesil difosfato y que es necesaria en la biosíntesis de algunos isoprenoides.

La presencia de este ORF junto al gen *ispA* como parte de un mismo operón sugirió que ambas proteínas podrían estar involucradas en la biosíntesis de IPP y de su isómero.

Dicho marco de lectura abierto se denominó *ispB* y fue expresado en *E. coli* y como se esperaba, la proteína recombinante catalizó la formación del DXP a partir del piruvato y el G3P (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998). En la actualidad esta proteína es llamada 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Se sabe que esta enzima también participa en la biosíntesis de las vitaminas tiamina (B1) y piridoxal (B6) en diferentes organismos a partir del precursor 1-desoxi-D-xilulosa (DX), por lo que la DXS no es una enzima específica de la ruta MEP (Kuzuyama, 2002). Se han encontrado secuencias ortólogas de la DXS en distintas bacterias y plantas pero no en genomas de animales ni de levaduras.

Esta distribución fue crucial en la búsqueda del resto de los genes y enzimas de la vía MEP. En *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh se aisló una mutante albina, cuya afectación estaba en el gen *CLA1* (llamado así por Cloroplastos Alterados), que resultó ser ortólogo del gen DXS, previamente encontrado en bacterias (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000; Araki *et al.*, 2000). Se ha logrado establecer que el genoma de *A. thaliana* contiene más de un gen para la enzima DXS (Rodríguez-Concepción y Boronat 2002), pero el resto de las enzimas de la vía MEP son codificadas por genes únicos, como lo evidenciaron análisis consecutivos.

Posteriormente se propuso que a partir del DXP se forma el compuesto 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) por un proceso de reducción (Rohmer *et al.*, 1996). Otros experimentos mostraron que el 2C-metil eritritol (ME) sintetizado químicamente era incorporado de forma directa en isoprenoides de *E. coli* (Duvold *et al.*, 1997). Posteriormente se identificó en *E. coli* al gen *yaeM* (ahora designado como *ispC*) (Takahashi *et al.*, 1998) que codifica para la proteína desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) responsable del segundo paso catalítico de la vía MEP. Después tuvo lugar la identificación de las enzimas homólogas en plantas como *A. thaliana* (Schwender *et al.*, 1999).

Para la identificación del siguiente gen de la vía MEP se incubó el producto MEP marcado radiactivamente con extractos de *E. coli*, y se purificaron fracciones enzimáticas en las que se observó un compuesto nuevo que se producía cuando

la reacción contenía citidina trifosfato (CTP). Estos resultados condujeron a una búsqueda en la base de datos de enzimas que utilizaran la CTP y propusieron al gen *ygbP* de *E. coli*, cuya función era desconocida, como posible candidato. Además, los homólogos de *ygbP* se encontraban solamente en los genomas de eubacterias y plantas, lo que sugiere la posible participación de este gen en la vía MEP. Para confirmar esta hipótesis, el gen *ygbP* (ahora llamado *ispD*) se sobreexpresó en *E. coli*, donde la proteína recombinante purificada convirtió el compuesto MEP en presencia de la CTP en 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME) (Rohdich *et al.*, 1999). Basado en su actividad enzimática se le dio el nombre de 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (CMS); la misma proteína recombinante presenta igual función en *A. thaliana* (Rohdich *et al.*, 2000).

Con la información previa se realizaron análisis bioinformáticos para reconocer genes homólogos a *ispB*, *ispC* e *ispD* de *E. coli*. Se encontró un mismo patrón taxonómico de distribución para los genes anteriormente descritos para la vía MEP, el resultado de la comparación de genomas de eubacterias y plantas señaló un nuevo posible candidato, el gen *ychB* (ahora llamado *ispE*). El análisis de la secuencia de *ispE* mostró sitios putativos de unión para ATP. El gen *ispE* de *E. coli* fue sobre expresado para obtener la proteína recombinante 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa (CMK), capaz de realizar la fosforilación (dependiente de ATP) del compuesto CDP-ME para producir el intermediario 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-MEP) (Lüttgen *et al.*, 2000).

Para aislar las siguientes enzimas de la vía MEP se llevó a cabo la misma estrategia: búsqueda en las bases de datos de genes candidato que fueran comunes a los organismos con plástidos. Así, se identificó a *ygbB* (ahora llamado *ispF*) (Herz *et al.*, 2000). El gen *ispF* de *E. coli* fue sobreexpresado y la proteína recombinante resultó ser la 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MECS) que participa en la formación de 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) a partir del CDP-MEP. Los homólogos en plantas de la MECS mostraron péptidos putativos con señal de transporte a plástido (al igual las enzimas DXS, DXR, CMS y CMK) la cual les permite llevar a cabo su función dentro de dichos organelos (Herz *et al.*, 2000; Lüttgen *et al.*, 2000).

El gen de *E. coli* al que se nombró *gcpE* (*ispG*) fue adscrito a la vía MEP porque estaba conservado en las plantas y en las eubacterias, pero ausente en otros genomas analizados (Campos *et al.*, 2001). La correspondiente enzima convierte al intermediario ME-cPP en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMB-PP) en *E. coli* por la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa (HDS) (Wolff *et al.*, 2003). En el genoma de *A. thaliana* se identificó un gen homólogo a *ispG* capaz de complementar la mutante de *E. coli* deficiente en *ispG*. (Querol *et al.*, 2002).

Desde el inicio de su estudio en *E. coli* se asumió que el papel del entonces denominado gen *lytB* (*ispH*) podría circunscribirse a la vía MEP por su

distribución taxonómica. Estudios subsecuentes mostraron que una cepa de dicho microorganismo deficiente en *lytB* acumula grandes cantidades del compuesto HMB-PP y que la mutación en el gen *lytB* de eubacterias es letal para cianobacterias (Cunningham *et al.*, 2000). En *E coli*, *lytB* codifica para la enzima (IDS) que convierte directamente al HMBPP en una mezcla 5:1 de IPP y DMAPP (Rohdich *et al.*, 2003). Posteriormente se ratificó su función en *A. thaliana* (Hsieh y Goodman, 2005). La actividad de esta enzima ha sido identificada como responsable de la síntesis simultánea de IPP y su isómero (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000).

Distribución filogenética de las vías MEP y mevalónica

Se piensa que las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de isoprenoides fueron adquiridas por los organismos muy tempranamente en la evolución, porque son las biomoléculas más antiguas que se conocen. Los hopanoides bacterianos han sido encontrados en sedimentos fósiles de 2.5 miles de millones de años de antigüedad (Summons y Jahnke, 1990).

La historia evolutiva de las enzimas involucradas en las rutas mevalónica y MEP, así como la distribución filogenética de sus genes, sugieren que la primera tuvo su origen en las arqueobacterias, mientras que la segunda pudo tenerlo en eubacteria y, por lo tanto, la ruta MEP se heredó exclusivamente a eucariotes con plástidos, siendo las plantas los únicos organismos que incorporaron ambas rutas a su metabolismo. Hoy en día se ha logrado precisar la distribución en la naturaleza de las vías mevalónica y MEP; un esquema general se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Distribución taxonómica de las vías MEP y Mevalónica.

	Vía Mevalónica	Vía MEP
Arqueobacterias	X	
Eubacterias		X
Hongos	X	
Algas verdes		X
Animales	X	
<i>Plasmodium falciparum</i>		X
Plantas superiores	X	X

El hecho de que las enzimas de la vía MEP no tienen homología con proteínas de mamíferos resulta conveniente para el diseño de fármacos contra patógenos que poseen plástidos tales como *Plasmodium falciparum* Welch, el parásito que causa la malaria; *Toxoplasma gondii* Nicolle & Mauceaux causante de toxoplasma; *Salmonella enterica* Le Minor & Popoff y otros parásitos (Kuntz *et al.*, 2005) así como para herbicidas cuyo mecanismo carezca de toxicidad para humanos (Zeidler *et al.*, 2000; Cornish *et al.*, 2006).

Compartimentación entre las vías MEP y mevalónica en la célula vegetal

Las plantas superiores generan en los plástidos sólo una fracción del total de los isoprenoides que requieren y el resto lo forman en el citoplasma donde opera la ruta mevalónica. La síntesis de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se realiza en el citoplasma por la vía mevalónica. En contraste, los monoterpénos, diterpenos y tetraterpenos son formados exclusivamente en los plástidos por la vía MEP (Figura 1). Se ha sugerido que existe intercomunicación entre ambas rutas para el intercambio de algún(os) intermediario(s) entre ellas. Experimentos de marcaje con [C13]-mevalonato en embriones de la planta *Ginkgo biloba* L. mostraron que cerca de 98% de los ginkgolidos, que son diterpenos, fueron formados a través de la vía MEP, y entre 1 y 2 % de los restantes provienen de la vía mevalónica (Arigoni *et al.*, 1997).

Otros experimentos también han sugerido el aporte de la vía MEP hacia la vía mevalónica. La primera es la ruta principal para la biosíntesis de ent-kaureno (precursor para la biosíntesis de giberelinas) en *A. thaliana*.; también se ha demostrado una contribución parcial de la vía del mevalonato para el mismo fin (Kasahara *et al.*, 2002). Por su parte Nagata (2002) publicó que el ácido mevalónico restaura de manera parcial la producción de algunos isoprenoides plastídicos cuando la vía MEP está bloqueada; sin embargo, el drenado de una vía a la otra es mínimo. Además, recientemente se publicaron datos que sugieren que las membranas de los plástidos tienen un sistema unidireccional de vesículas para exportar IPP de manera eficiente hacia el citoplasma vegetal (Bick y Lange, 2003).

CONCLUSIONES

El estudio de la vía MEP resulta muy importante tanto por su contribución a la síntesis de isoprenoides indispensables para el desarrollo y crecimiento normal de las plantas, como por la producción de compuestos de gran interés comercial con alto potencial biotecnológico.

De la totalidad de productos isoprenicos con importancia para el hombre algunos son producidos únicamente por especies de plantas forestales, tal es el caso del antineoplásico taxol, que proviene de árboles del género *Taxus*.

El conocimiento sobre la ruta MEP ha permitido distinguir que los genes involucrados en la misma codifican enzimas sin homología con proteínas de mamíferos. Por tanto dichas proteínas son un blanco ideal para desarrollar fármacos de amplio espectro antimicrobial, así como herbicidas cuyo mecanismo carezca de toxicidad para humanos.

En la célula vegetal las proteínas de la vía mevalónica se localizan en el citoplasma y las enzimas involucradas en la vía MEP se importan desde el citoplasma hacia los plástidos donde llevan a cabo su función. Por lo tanto existe una compartimentación clara de ambas vías en las plantas.

Se han registrado resultados que apoyan la idea de que existe intercomunicación entre las rutas MEP y mevalónica dentro de la célula de las plantas; sin embargo, aún faltan por encontrar evidencias concluyentes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece enormemente a la Dra. Susana Azpiroz por sus atinadas sugerencias y recomendaciones para realizar la redacción de esta contribución a la revista Ciencia Forestal en México.

REFERENCIAS

- Araki N., K. Kusumi, K. Masamoto, Y. Niwa and K. Iba. 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.
- Arigoni, D., S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher and M. H. Zenk. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10600-10605.
- Bach, T. J. and H. K. Lichtenthaler. 1982. Mevinolin: A highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase of radish plants. *Z. Naturforsch.* 37c: 46-50.
- Barkovich, R. and J. C. Liao. 2001. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab. Eng.* 3, pp. 27-39.
- Bick, J. A. and B. M. Lange. 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.

- Bloch, K. 1992. Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. *Steroids* 57(8):378-383.
- Braithwaite, G. D. and T. W. Goodwin. 1960. Studies on carotenogenesis 25. The incorporation of (1-¹⁴C) acetate, (2-¹⁴C) acetate and ¹⁴CO₂ into lycopene by tomato slices. *Biochem. J.* 76: 1-5.
- Campos, N., M. Rodríguez-Concepción, M. Seeman, M. Rohmer and A. Boronat. 2001. Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS lett.* 488: 170-173.
- Cornish, R., J. R. Roth and C. D. Poulter. 2006. Lethal mutations in the isoprenoid pathway of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 188(4): 1444-1450.
- Cunningham Jr., F. X., T. P. Lafond and E. Gantt. 2000. Evidence of a role for *LytB* in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182(20): 5841-5848.
- Duvold, T., P. Cali, J. M. Bravo and M. Rohmer. Incorporation in 2-C-methyl-d erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron lett* 38: 6181-6184.
- Eisenreich, W., F. Rohdich and A. Bacher. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends. Plant. Sci.* 6: 78-84.
- Estévez, J. M., A. Cantero, C. Romero, H. Kawaide, L. F. Jiménez, T. Kuzuyama, H. Seto, H. Kamiya and P. León. 2000. Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 124(1): 95-104.
- Flesch, G. and M. Rohmer. 1988. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J. Biochem.* 1, 175 (2): 405-411.
- Herz, S., J. Wungsintaweeikul, C. A. Schuhr, S. Hecht, H. Lüttgen, S. Sagner, M. Fellermeier, W. Eisenreich, M. H. Zenk, A. Bacher and F. Rohdich. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2486-2490.
- Hsieh, M. H. and H. M. Goodman. 2005. The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 138(2): 641-653.
- Kasahara, H., A. Hanada, T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Kamiya and S. Yamaguchi. 2002. Roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2002 Nov 22; 277(47): 45188-45194.

- Kuntz L., D. Tritsch, C. Grosdemange-Billiard, A. Hemmerlin, A. Willem, T. J. Bach, and M. Rohmer. 2005. Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase. *Biochem J.* 386(15 Pt 1): 127–135.
- Kuzuyama T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(8):1619.
- Lois, L. M., N. Campos, S. R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer and A. Boronat. 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.* 3,95(5):2105-2110.
- Lüttgen, H., F. Rohdich, S. Herz, J. Wungsintaweekul, S. Hecht, C. A. Schuhr, M. Fellermeier, S. Sagner, M. H. Zenk and A. Bacher. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol. *Proc Natl Acad Sci* 97: 1062–1067.
- Mandel, M. A., K. A. Feldmann, L. Herrera-Estrella, M. Rocha-Sosa and P. León. 1996. CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9: 649-658.
- Nagata N., M. Suzuki, S. Yoshida and T. Muranaka. 2002. Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* 216(2):345-50.
- Querol, J., N. Campos, S. Imperial, A. Boronat and M. Rodríguez-Concepción. 2002. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS letters* 514: 343-346.
- Rodríguez-Concepción M., N. Campos, L. M. Lois, C. Maldonado, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rohmer and A. Boronat. 2000. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS lett.* 19;473(3):328-32.
- Rodríguez-Concepción M. and A. Boronat. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 130(3): 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., O. Flores, J. F. Martinez-Garcia, V. González, M. A. Phillips, A. Ferrer and A. Boronat. 2004. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell.* 16(1):144-156.
- Rohdich, F., J. Wungsintaweekul, M. Fellermeier, S. Sagner, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher and M. H. Zenk. 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* 96:11758-11763.

- Rohdich F., J. Wungsintaweeikul, W. Eisenreich, G. Richter, C. A. Schuhr, S. Hecht, M. H. Zenk and A. Bacher. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97(12):6451-6456.
- Rohdich, F., S. Hecht, A. Bacher and W. Eisenreich. 2003. Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of *ispDEFGH* genes and their cognate enzymes. Pure Appl. Chem. 75: 393-405.
- Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter and H. Sahn 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem. J. 295: 517-524.
- Rohmer, M., M. Seeman, S. Horbach, S. Bringer-Meyer and H. Sahn. 1996. Glyceraldehyde 3-phosphate and piruvate as precursors of isoprenic units in an alternativa non-mevalonic pathway for terpenoids biosynthesis. J. Amer. Soc. 118: 2564-2568.
- Ruzicka, L. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia 9: 357-367.
- Sacchettini, J. C. and C. D. Poulter. 1997. Creating isoprenoid diversity. Science 277: 1788-1789.
- Schulte A. E., R. Van der Heijden and R. Verpoorte. 2000. Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Arch Biochem Biophys. 378(2):287-298.
- Schwender J., C. Muller, J. Zeidler and H. K. Lichtenthaler. 1999. Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 455(1-2): 140-144.
- Sprenger, G. A., U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer and H. Sahn. 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. 94:12857-12862.
- Summons, R. E. and L. L. Jahnke. 1990. Identification of the methylhopanes in sediments and petroleum. Geochim. Cosmochim. Acta. 54: 247-51.
- Takahashi, S., T. Kuzuyama, H. Watanabe and H. Seto. 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 9879-9884.
- Wolff, M., M. Seemann, B. Tse Sum, Y. Frapart, D. Tritsch, A. Garcia Estrabot, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, A. Marquet and M. Rohmer. 2003. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IsrP) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. FEBS Lett. 541(1-3):115-20.
- Zeidler J., J. Schwender, C. Muller and H. K. Lichtenthaler. 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.