

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**ESTUDIO DE LA ENZIMA 10-OXOGERANIAL CICLASA DE RAÍCES
TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus***

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México

2004

Hacer Ciencia es como levantar una Catedral; unos tallan piedras lisas que servirán como cimientos o que quedarán confundidas con miles de otras en altos muros, otros hacen florear las canteras en frisos y capiteles. Algunas piedras se destacan, otras apenas se advierten, pero todas, todas forman la obra final...

Manuel Garcidueñas

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3016-N9306) y una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (89531) para Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe.

Agradezco de forma especial:

A los Drs. Víctor Manuel Loyola Vargas, Edmundo Lozoya Gloria, Renata Rivera Madrid, Magdalena Segura Nieto, María de Lourdes Miranda Ham y y Felipe Vázquez Flota por sus excelentes sugerencias y por la revisión crítica con la que enriquecieron este escrito. Con excepción de los Drs. Miranda Ham y Vázquez Flota, las demás personas formaron parte de mi comité tutorial y evaluador de los avances logrados durante los periodos semestrales en donde se discutió gran parte de este trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por la dirección y asesoría otorgada a este trabajo, gracias por su confianza.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por la aportación de sus conocimientos y la asesoría brindada durante la etapa inicial del presente trabajo, gracias por pensar un poco en mi trabajo (como preparar el 10-oxo).

A la M. en C. Miriam Monforte González por su colaboración durante el establecimiento de la metodología para detectar a la enzima.

A la QFB Fabiola Erosa Escalante, a la Dra. Marcela Gamboa y a la QFB Fátima Alejo del área de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología por su apoyo durante la realización experimental de este trabajo.

A las autoridades del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, de manera especial al Depto. de Bioquímica, por permitirme la realización del estudio de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, cuya culminación es esta tesis.

Al personal de la Biblioteca, particularmente al Lic. Sergio de Jesús Pérez, a la Lic. Ofir Pavón y al Lic. Roberto Hernandez, ya que siempre conté con su ayuda en todo lo que solicité. Asimismo, quiero hacer un agradecimiento al personal de cómputo, particularmente al Ing. Carlos Yanuario Rivero y a la Ing. Areli Ramírez, gracias por su paciencia en explicarme las dudas que sobre sistemas de cómputo ocurrí a preguntarles.

Dentro del Laboratorio "B" de la Unidad de Biología Experimental, siempre obtuve apoyo moral y fraternal de Luis Carlos Gutierrez, Miguel Herrera, Marcela Méndez, Fátima Medina, Rosi Escobedo, Rosi Galaz, Yereni Minero, Miriam Monforte, Oscar Moreno, José Narvaez, Francisco Quiroz, Víctor Suárez, Lucy, Carlos Fuentes, Blondy, Demetria, Lilia, Selene, América, Vicki, Santy, Fernando, Manuel Martínez y probablemente alguien más que se me haya olvidado; a todos ellos, agradezco sus críticas, su ayuda y sus sugerencias, nunca los olvidaré.

A las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., en especial a las Unidades de Bioquímica y Biología Molecular y de Biotecnología por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este Proyecto.

Abreviaturas

10-OC	10-oxogeranial: iridodial ciclasa
AAC	Acetoacetil CoA
AACT	Acetoacetil CoA tiolasa
AC	Acetil CoA
AE	Actividad específica
AMIs	Alcaloides monoterpeno indólicos
AVLBS	4'anhidro vinblastina sintasa
BSA	Albúmina sérica de bovino
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DTT	Ditiotreitol
DXPS	1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
G10OH	Geraniol 10-hidroxilasa
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA
HMGL	3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA liasa
HMGR	3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
HMGS	3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa
IPP	Isopentenil pirofosfato

MeJa	Metil jasmonato
MGH	3-Metilglutaconil-CoA hidratasa
MV	Mevalonato
MVC	5-Fosfomevalonato cinasa
MVPP	Mevalonato 5-pirofosfato
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCC	Reactivo de Corey, clorocromato de piridinio
PF	Peso fresco
PK	Proteín cinasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPMV	Difosfomevalonato
PPMDC	Difosfomevalonato descarboxilasa
PS	Peso seco
TCA	Ácido tricloroacético
TDC	Triptofano descarboxilasa
Tris-HCl	Tris hidroximetil aminometano, forma ácida
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SS	Estrictosidina sintasa

Contenido

Agradecimientos	i
Contenido	v
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Capítulo I	9
Antecedentes	9
Alcaloides monoterpeno indólicos	11
<i>Catharanthus roseus</i>	12
Biosíntesis de AMIs	13
Biosíntesis de secologanina	15
Biosíntesis de los AMIs	32
Biosíntesis de los primeros AMIs	38
Biosíntesis de catarantina y tabersonina	44
Biosíntesis de vindolina	44
Biosíntesis de los alcaloides diméricos	51
Compartimentalización	53
Regulación	55
Diferenciación celular	59
Conclusiones	61
Capítulo 2	95
Materiales y Métodos	95
Materiales	95
Capítulo 3	103
Resultados y Discusión	103
Capítulo 4	129
Conclusiones	129
Capítulo 5	131
Perspectivas	131

Índice de cuadros

Número	Texto	Página
Cuadro 1	Enzimas caracterizadas en la ruta de biosíntesis de los AMIs en <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Rauvolfia serpentina</i> .	64
Cuadro 2	Determination of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity in the presence of compounds interfering with its activity. The control activity was 25.84 nmoles min ⁻¹ .	110
Cuadro 3	Determination of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity in the presence of different substrates (2 mM). The activity in the presence of 10-oxogeranial was 181.8 pKat and the concentration of the cofactor was 250 µM.	113
Cuadro 4	Purification scheme for the 10-oxogeranial: iridodial cyclase from <i>C. roseus</i> transformed roots.	116

Índice de figuras

Número	Texto	Página
Figura 1	Alcaloides indólicos sintetizados a partir de la strictosidina.	12
Figura 2	Estructura de los AMLs: ajmalicina (A), catarantina (B), vindolina (C) alcaloides monoterpeneo indólicos y de los alcaloides bisindólicos vincristina (D, VCR) y vinblastina (D, VLB).	14
Figura 3	Ruta para la biosíntesis del isopentenil pirofosfato (IPP).	17
Figura 4	Biosíntesis de isoprenoides	19
Figura 5	Biosíntesis del monoterpeneo iridoide secologanina	22
Figura 6	Biosíntesis de la strictosidina, precursor universal de los alcaloides monoterpeneo indólicos	34
Figura 7	Biosíntesis de la ajmalicina y serpentina	40
Figura 8	Biosíntesis de la ajmalina	43
Figura 9	Biosíntesis de la catarantina y tabersonina	45
Figura 10	Biosíntesis de la vindolina	47
Figura 11	Biosíntesis de los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina	52
Figura 12	Compartimentalización de la biosíntesis de la vindolina y otros AMLs	54
Figura 13	Compartimentalización de la biosíntesis de los alcaloides indólicos en <i>C. roseus</i>	58
Figura 14	Compartimentalización de la biosíntesis de alcaloides en <i>C. roseus</i> . (A) Corte transversal de una hoja de <i>C. roseus</i> y (B) corte longitudinal de una raíz. E = epidermis	60
Figura 15	Reacción catalizada por la 10-oxogeranial:iridodial ciclase	107
Figura 16	Time course of the oxidation of NADPH to determinate the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity.	111
Figura 17	Relationship between enzyme activity and protein amount. See materials and methods for the details of the conditions of the reaction.	112
Figura 18	Time course of cell growth and 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity through the cell culture cycle in <i>C. roseus</i> hairy roots. Each point is the average of three independent experiments with its standard deviation	114
Figura 19	Effect of storage the extract at 4°C and -81°C on the enzymatic activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase	115
Figura 20	Superdex G-200 elution profile for <i>C. roseus</i> 10-oxogeranial: iridodial cyclase after precipitation with ammonium sulphate.	118
Figura 21	Effect of the concentration of NADPH on the activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase at different fixed concentrations of 10-oxogeranial.	119
Figura 22	Effect of the concentration of 10-oxogeranial on the activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase at different fixed concentrations of NADPH.	121

Resumen

La enzima 10-óxogeranial: iridodial ciclasa (10-OC), que cataliza la reacción de formación de iridodial a partir de 10-oxogeranial y NADPH, se encuentra presente en células de plantas, ha sido detectada en células de cultivos de células en suspensión de *Rauvolfia serpentina* y en cultivos de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. En general, no existen estudios que permitan evaluar la(s) función(es) específica(s) de la 10-OC en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos indólicos; sin embargo, su actividad es detectable y por las características de la reacción que cataliza, es probable que pueda ser un punto de regulación en esta ruta metabólica.

En este trabajo se identificó, semipurificó y caracterizó a la enzima 10-OC presente en extractos solubles de raíces transformadas de *C. roseus*. En la primera parte de este trabajo se estableció una metodología para la preparación del sustrato verdadero de la enzima, el 10-oxogeraniol. Este compuesto de origen terpénico, el cual no se encuentra comercialmente disponible se obtuvo mediante la doble oxidación química del 10-hidroxigeraniol empleando como oxidante al reactivo de Corey, (clorocromato de piridinio), en una relación 4:1 monoterpénico:oxidante, permitiendo la oxidación durante 30 minutos. Bajo estas condiciones se obtuvo al 10-oxogeraniol el cual fue purificado posteriormente por cromatografía en columna. La identidad del compuesto fue determinada por ^1H -RMN. El sustrato así obtenido permitió establecer una metodología para detectar y caracterizar a la enzima. Durante un ciclo de cultivo de células de raíces transformadas de *C. roseus*, obtenida en un curso temporal de 21 días, se observó una actividad enzimática exclusivamente soluble que se mantuvo constante ($1,200 \text{ pKat mg}^{-1}$) durante 0 a 9 días; posteriormente tuvo algunas variaciones para alcanzar después un pico máximo de actividad en el día 21 ($1,700 \text{ pKat mg}^{-1}$). Después de varios intentos, se estableció una estrategia para purificar a la enzima basada en cromatografía de exclusión por tamaño y en cromatografía de afinidad. Se alcanzaron 19.6 veces de purificación a partir del extracto crudo, teniendo como producto final en el gel SDS algunas bandas mayoritarias en el rango de 60 y 35 kDa. El pH óptimo para la reacción catalizada por la enzima semipurificada fue 7.0 y el

pI fue aproximadamente 5.4. También se hicieron algunos experimentos iniciales para caracterizar cinéticamente a la enzima, obteniéndose los valores de K_M para el 10-oxogeranial y el NADPH y que fueron 0.52 mM y 70 μ M, respectivamente. Estos resultados deben servir como antecedente para futuros trabajos para purificar totalmente a la enzima, conocer su mecanismo de reacción y para puntualizar aspectos relacionados con su función.

Abstract

The enzyme 10-oxogeranial: iridodial cyclase (10-OC) catalyzes the iridodial formation from 10-oxogeranial and NADPH, it is present in plants cells, and it has been detected in cell suspensions of *Rauvolfia serpentina* and in transformed roots of *Catharanthus roseus*. In general, there is a lack of evaluation of the specific function(s) of 10-OC in the biosynthesis of monoterpen indol alkaloids. However, its activity is detectable and based on the characteristics of the catalytic reaction, it may present a regulatory point in this metabolic route.

In this work, 10-OC was identified, semipurified and characterized in soluble extracts of *C. roseus* hairy roots. In the first part of this study, a methodology was settled for the preparation of the authentic enzyme substrate, the 10-oxogeranial, made up of terpenic origin, which is not commercially available. This compound was obtained by means of the double chemical oxidation of the 10-hydroxigeraniol using the Corey's reagent, piridin chlorocromate, as the oxidizer in a 4:1 monoterpene:oxidizer ratio and allowing the oxidation for 30 minutes. Under such conditions the 10-oxogeranial was obtained which was later purified by chromatography in column. The identity of this compound was determined by ^1H -RMN. The obtention of the substrate allowed the establishment of a methodology to detect and characterize the enzyme. During a 21 d cycle of culture, activity was observed exclusively in the soluble fraction and stayed constant (1,200 pKat mg⁻¹) during 0-9 d. Later on, it had some variations to reach a maximum peak of activity at day 21 (1,700 pKat mg⁻¹). After several intents, a protocol to purify the enzyme, based on site exclusion and affinity chromatography was developed. A 19.6-fold of purification was reached starting from the raw extract, having a final product in the SDS gel composed of some major bands in the 35 and 60 kDa range. The optimum pH for the reaction driven by the semipurified enzyme was 7.0 and the pI was approximately 5.4. Some initial experiments were made to kinetically characterize the enzyme. The K_m values for 10-oxogeranial and NADPH were 0.52 mM and 70 μM respectively. These results should be a good antecedent for future

works oriented towards the total enzyme purification, the enzymatic reaction mechanism and to remark aspects related with its function.

Introducción

Desde la antigüedad el hombre ha empleado vegetales para fines tan diversos como la alimentación, la salud (drogas tradicionales y quimioterapéutica moderna), la vivienda, etc. (Loyola-Vargas y Hernández-Sotomayor, 1997; Lozoya y Gómez, 1997). Para ello, rutinariamente se cultivan diversas especies de plantas. En muchas ocasiones el cultivo de especies vegetales en el campo es un proceso lento, expuesto a condiciones variables de climas y suelos, así como al ataque de plagas y de enfermedades que influyen tanto en el rendimiento del grano y los frutos, como en la capacidad de producción de metabolitos primarios y secundarios de las plantas (Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990; 1995; Loyola-Vargas et al., 1990). En otras especies vegetales que son obtenidas directamente de la flora natural los niveles de estos metabolitos pueden ser mayores y esto ha llevado a su explotación en forma indiscriminada, redundando en una disminución gradual de los recursos.

El cultivo de tejidos vegetales, (CTV), es el cultivo aséptico de tejidos, órganos o células vegetales que se mantienen bajo condiciones *in vitro* para su proliferación, crecimiento y regeneración de plantas (Street, 1977).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han desarrollado para una gran variedad de especies. Inicialmente los cultivos de tejidos de plantas fueron desarrollados como un modelo experimental para estudiar los procesos de diferenciación celular. En la actualidad son además empleados para el estudio de la bioquímica y fisiología de plantas (Loyola-Vargas, 1984).

El CTV también ha sido empleado como modelo para el estudio del metabolismo secundario, ya que pueden acumular algunos de los compuestos característicos de la planta original. Entre los productos obtenidos se tienen fármacos, fragancias, colorantes, aceites y pesticidas. La mayoría de estos productos son complejos en su estructura química y representan el o los productos terminales de largas rutas metabólicas (Alfermann, 1999; Chartrain et al., 2000; De Luca y St-Pierre, 2000).

El desarrollo de las técnicas de CTV, la puesta en el mercado de algunos compuestos obtenidos por esta técnica y el desarrollo de la ingeniería metabólica, ha aumentado el interés por elucidar las vías de biosíntesis de compuestos de interés comercial como es el caso de algunos alcaloides, pigmentos y terpenos.

Los avances realizados en el CTV para producir metabolitos secundarios a gran escala ha sido considerables (De Luca y St-Pierre, 2000; DiCosmo y Misawa, 1996; Flores et al., 1999; Loyola-Vargas y Hernández-Sotomayor, 2003; Taylor, 1998); en el caso de células vegetales se han establecido procesos industriales para la obtención de shikonina, berberina, ácido rosmarínico (Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990; 1995) y para la producción de biomasa de ginseng (Scragg, 1990). Sin embargo, con frecuencia ocurren alteraciones importantes en los niveles de producción.

Es de considerar que los cultivos de células desdiferenciadas son inestables aún cuando se trate de la misma línea celular y de condiciones de cultivo idénticas. Entre los factores que parecen influir para estos cambios son los fitorreguladores (Scragg et al., 1990; Vázquez-Flota et al., 1994), el régimen de luz (Wang et al., 2001; Zhao et al., 2001), la temperatura (Bailey y Nicholson, 1990; Choi et al., 2000), el pH del medio de cultivo (Hagendoorn et al., 1994; Sáenz-Carbonell et al., 1993), la aireación y la agitación (Scragg et al., 1989). Asimismo, influyen la fuente del material vegetal y sus características genéticas (Deus-Neumann y Zenk, 1984).

Por otra parte, el modelo más utilizado para realizar estudios de regulación metabólica es el CTV (Van der Heijden et al., 1989; Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 1994) debido principalmente a que este modelo es más fácil de manejar, a la posibilidad de manipularlo bajo condiciones controladas y a que los cultivos pueden ser inducidos a sobreexpresar los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de un metabolito en particular, llevando a su mayor acumulación.

Debido a que *Catharanthus roseus* es capaz de sintetizar alcaloides indólicos monoméricos y diméricos de alto valor agregado, entre los cuales la vindolina, la ajmalicina, la vincristina y la vinblastina son desde el punto de vista comercial los más significativos (Svoboda y Blake, 1975; Taylor y Farnsworth, 1975), esta planta, sobre la que se ha desarrollado una gran cantidad de estudios sobre regulación metabólica y

transducción de señales, representa un modelo experimental muy importante en la biotecnología vegetal, particularmente debido a que la biosíntesis de alcaloides monoterpénicos indólicos que realiza como parte de su metabolismo secundario involucra diferentes pasos en varios organelos, muchos de los cuales no han sido dilucidados. Aún más, la mayoría de las enzimas que participan en esta ruta metabólica no han sido caracterizadas y se desconocen los pasos en donde es regulada la vía.

Varios factores modulan la síntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*; por ejemplo, el nivel de organización celular (Moreno-Valenzuela et al., 1998) y la edad del cultivo. Kurz et al., (1985) determinaron al estudiar 200 líneas celulares de *C. roseus* que existe una importante variación en su capacidad biosintética, tanto en la cantidad (0.1-1.5% de peso seco) como en el tipo de alcaloides, señalando incluso que el 6% de las líneas no producían ningún tipo de alcaloide. Se ha observado que los callos derivados de plántulas prácticamente no producen vinblastina; sin embargo, al regenerar brotes a partir de los callos, la acumulación de alcaloides puede ser similar al de la planta original (Datta y Srivastava, 1997). Por otro lado, otro grupo canadiense (Constabel et al., 1981) determinó que la variación en el espectro de alcaloides fue mínima cuando se compararon entre sí líneas celulares iniciadas a partir de la misma planta.

La vindolina, uno de los precursores de los alcaloides indólicos diméricos, es sintetizada únicamente en los brotes derivados de callos (Datta y Srivastava, 1997), mientras que los callos no la producen (Constabel et al., 1982). También se ha enfatizado la posibilidad de la obtención de cultivos seleccionados altamente productores de alcaloides (Zenk et al., 1977). Al analizar y comparar el contenido de los alcaloides de plantas completas con el de brotes, raíces y cultivos de células en suspensión, el patrón de alcaloides en raíces y cultivos en suspensión fue similar al determinado en hojas y tallos, particularmente el de la catarantina, la cual se encuentra en todos los tejidos a diferencia de la vinblastina y la vincristina que no fueron detectadas ni en los brotes ni en las células en suspensión (Endo et al., 1987). En el Centro de Investigación Científica de Yucatán se han cuantificado los niveles de alcaloides en cultivos con diferente grado de diferenciación (Monforte-Gonzalez y Loyola-Vargas, datos no publicados), remarcando la importancia del grado de

diferenciación sobre la cantidad de alcaloides que pueden producir estos cultivos. La caracterización de la geraniol 10-hidroxilasa, una enzima de la familia de las P-450 oxidorreductasas, dio a conocer algunos aspectos sobresalientes de la enzima y remarcó su importancia como un probable punto de regulación en la síntesis de los alcaloides monoterpeno indólicos (Canto-Canché y Loyola-Vargas, 2000; 2001).

Las investigaciones mencionadas en los párrafos anteriores puntualizan la necesidad de conocer con precisión la ruta metabólica de obtención de este grupo de alcaloides y, entre otros factores, cuál o cuáles son las enzimas que catalizan las reacciones biosintéticas claves que pudieran representar puntos de regulación, esto es con el fin de implementar estrategias para aumentar la producción de los alcaloides monoterpeno indólicos en esta especie.

Este trabajo estuvo encaminado al conocimiento y la caracterización de la función que la enzima 10-oxogeranial: iridodial ciclasa desempeña en esta ruta metabólica empleando como modelo experimental raíces transformadas de *C. roseus*. Para alcanzar este objetivo se implementaron metodologías que permitieron preparar el sustrato de la enzima, detectar su actividad enzimática, semipurificarla y caracterizarla tanto en el extracto enzimático crudo como en la etapa de mayor grado de pureza alcanzada.

REFERENCIAS

- Alfermann A. W., Progress and problems with production of natural products in plant cell cultures, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 35: 167-168, (1999).
- Bailey C. M. and H. Nicholson, Optimal temperature control for a structured model of plant cell culture, *Biotechnol. Bioeng.*, 35: 252-259, (1990).
- Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Non-coordinated response of cytochrome P450-dependent geraniol 10-hydroxylase and NADPH: Cyt C (P-450) reductase in *Catharanthus roseus* hairy roots under different conditions, *Phyton*, 66: 183-190, (2000).

Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 37: 622-628, (2001).

Chartrain M., P. M. Salmon, D. K. Robinson and B. C. Buckland, Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals, *Curr. Opi. Biotechnol.*, 11: 209-214, (2000).

Choi H. K., S. I. Kim, J. S. Son, S. S. Hong, H. S. Lee and H. J. Lee, Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*, *Enzyme Microb. Technol.*, 27: 593-598, (2000).

Constabel F., P. Gaudet-LaPrairie, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots, *Plant Cell Rep.*, 1: 139-142, (1982).

Constabel F., S. Rambold, K. B. Chatson, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. VI. Variation in alkaloid spectra of cell lines derived from one single leaf, *Plant Cell Rep.*, 1: 3-5, (1981).

Datta A. and P. S. Srivastava, Variation in vinblastine production by *Catharanthus roseus* during *in vivo* and *in vitro* differentiation, *Phytochemistry*, 46: 135-137, (1997).

De Luca V. and B. St-Pierre, The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, *Trends Plant Sci.*, 5: 168-173, (2000).

Deus-Neumann B. and M. H. Zenk, Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, *Planta Med.*, 50: 427-431, (1984).

DiCosmo F. and M. Misawa, Plant cell culture secondary metabolism, CRC Press, Boca Raton, pp 1-232, (1996).

Endo T., A. E. Goodbody and M. Misawa, Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*, *Planta Med.*, 53: 479-482, (1987).

Flores H. E., J. M. Vivanco and V. M. Loyola-Vargas, "Radicle" biochemistry: the biology of root-specific metabolism, *Trends Plant Sci.*, 4: 220-226, (1999).

Hagendoorn M. J. M., A. M. Wagner, G. Segers, L. H. W. Van der Plas, A. Oostdam and H. S. Van Walraven, Cytoplasmic acidification and secondary metabolite production in different plant cell suspensions. A comparative study, *Plant Physiol.*, 106: 723-730, (1994).

Kurz W. G. W., K. B. Chatson, and F. Constabel, Biosynthesis and accumulation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* cultivars, in: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, (Neumann K.-H., W. Barz and E. Reinhard, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, 143-153, (1985).

Loyola-Vargas V. M., El uso de cultivo de tejidos en estudios metabólicos, in: Cuadernos de Posgrado. No. 11. Bioquímica Vegetal, (Loyola-Vargas V. M., ed.), Facultad de Química, UNAM, México, D. F., 103-115, (1984).

Loyola-Vargas V. M. and S. M. T. Hernández-Sotomayor, Plant roots in agriculture and medicine: the uses of radical biology, in: (Flores H. E., J. P. Lynch and D. Eissenstat, eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 283-296, (1997).

Loyola-Vargas V. M. and S. M. T. Hernández-Sotomayor, Hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: A model for primary and secondary metabolic studies, in: Plant Genetic Engineering Vol. 1: Applications and Limitations, (Singh R.P. and P. K. Jaiwal, eds.), Sci Tech Publishing LLC, Houston, 297-315, (2003).

Loyola-Vargas V. M. and M. L. Miranda-Ham, Aspects about the obtention of secondary metabolites from plant tissue culture, in: Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives, (Loyola-Vargas V. M., ed.), CICY, Mérida, Yucatán, 31-79, (1990).

Loyola-Vargas V. M. and M. L. Miranda-Ham, Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance, *Rec. Advan. Phytochem.*, 29: 217-248, (1995).

Loyola-Vargas V. M., M. L. Robert, and L. J. Reyes, Obtención de productos secundarios por cultivo de tejidos, in: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales, (Rosell C. H. and A. V. M. Villalobos, eds.), FAO, Roma, 73-81, (1990).

Lozoya X. and E.Gómez, Fitofármacos, Farmasa Schwabe/IMSS, México, pp 1-180, (1997).

Moreno-Valenzuela O. A., R. M. Galaz-Avalos, Y. Minero-García and V. M. Loyola-Vargas, Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root, *Plant Cell Rep.*, 18: 99-104, (1998).

Sáenz-Carbonell L., I. E. Maldonado-Mendoza, V. Moreno, R. Ciau-Uitz, M. López-Meyer, C. Oropeza and V. M. Loyola-Vargas, Effect of the medium pH on the release of secondary metabolites from roots of *Datura stramonium*, *Catharanthus roseus* and *Tagetes Patula* cultured *in vitro*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38: 257-267, (1993).

Scragg A. H., Fermentation systems for plant cells, in: Secondary Products from Plant Tissue Culture, (Charlwood B. V. and M. J. C. Rhodes, eds.), Oxford University Press, Oxford, 243-263, (1990).

Scragg A. H., S. Ashton, A. York, P. Bond, G. Stepan-Sarkissian and D. Grey, Growth of *Catharanthus roseus* suspensions for maximum biomass and alkaloid accumulation, *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 292-298, (1990).

Scragg A. H., P. A. Bond, F. Leckie, R. Cresswell, M. W. Fowler, and E. J. Allan, Growth and product formation by plant cell suspensions cultivated in bioreactors, in: Bioreactors and biotransformations, (Moody G. W. and P. B. Baker, eds.), Elsevier applied Sci. Pub., New York, 12-25, (1989).

Street H.E., Plant Tissue and Cell Culture, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp 1-614, (1977).

Svoboda G. H. and D. A. Blake, The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, in: The *Catharanthus* Alkaloids, (Taylor W. I. and N. R. Farnsworth, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 45-83, (1975).

Taylor C. B., Factories of the future? metabolic engineering in plant cells, *The Plant Cell*, 10: 641-644, (1998).

Taylor W.I. and N.R.Farnsworth, The *Catharanthus* Alkaloids, Marcel Dekker Inc., New York, pp 1-323, (1975).

Van der Heijden R., R. Verpoorte and H. J. G. Ten Hoopen, Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 18: 231-280, (1989).

Vázquez-Flota F. and V. M. Loyola-Vargas, A *Catharanthus roseus* salt tolerant line. I. Selection and characterization, *J. Plant Physiol.*, 144: 116-120, (1994).

Vázquez-Flota F., M. L. Miranda-Ham and V. M. Loyola-Vargas, Nitrogen source and the effect of growth regulators on ammonium assimilation enzymes in tissue culture of *Canavalia ensiformis* (L.) DC, *Phyton*, 55: 51-57, (1994).

Wang Y. C., H. X. Zhang, B. Zhao and X. F. Yuan, Improved growth of *Artemisia annua* L hairy roots and artemisinin production under red light conditions, *Biotechnol. Lett.*, 23: 1971-1973, (2001).

Zenk M. H., H. El-Shagi, H. Arens, J. Stöckigt, E. W. Weiler, and B. Deus, Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, in: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*, (Barz W., E. Reinhard and M. H. Zenk, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 27-43, (1977).

Zhao J., W. H. Zhu and Q. Hu, Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures, *Plant Growth Regul.*, 33: 43-49, (2001).

Capítulo I

Antecedentes

La biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Víctor M. Loyola-Vargas, Patricia G. Sánchez-Iturbe, Blondy Canto-Canché, Luis C. Gutiérrez-Pacheco, Rosa M. Galaz-Ávalos y O. Moreno-Valenzuela. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP 97200. *Autor para correspondencia, correo electrónico: vmlyola@cicy.mx

Publicado en la Revista de la Sociedad Química de México, 48: 67 – 94, (2004)

Resumen

Los alcaloides son uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos. Este grupo incluye alrededor de 12,000 productos, entre los cuales se encuentran los alcaloides indólicos, alcaloides derivados del triptofano que conforman alrededor de la cuarta parte de todos ellos. Los alcaloides se han reportado en varias familias vegetales, pero principalmente en las Apocinaceae, Loganiaceae y Rubiaceae, todas del orden Gentianales. Entre los alcaloides más importantes se tiene a los de tipo bisindólico como la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin, y a la vincristina empleada en el tratamiento de la leucemia; además de los alcaloides monoterpénico indólicos ajmalicina y serpentina utilizados como agentes antihipertensivos contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral. La complejidad de los procesos genéticos, catalíticos y de transporte en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénico indólicos, es actualmente uno de los retos intelectuales más estimulantes en el área de los metabolitos secundarios. Si bien se requieren más de 50 pasos metabólicos para sintetizar los alcaloides más importantes producidos por *C. roseus*, hasta ahora solamente se han determinado y caracterizado, en algún grado, 20 de las enzimas

requeridas. Falta aún por elucidar un importante número de pasos metabólicos, para después purificar las correspondientes enzimas e intentar clonar sus genes. También es necesario elucidar los diversos aspectos de la regulación de la biosíntesis de los alcaloides, tanto en el nivel celular como en el molecular, pero sobre todo determinar cuál es su función en las plantas que los producen. En esta revisión se presenta un análisis del estado actual que guarda el conocimiento en las rutas de biosíntesis de los alcaloides monoterpeno indólicos en *C. roseus*.

Abstract

Alkaloids are one of most diverse groups of secondary metabolites found in living organisms. This group includes around 12,000 products, among them we can find indole alkaloids, which are derived from tryptophan and comprise around 25% of all alkaloids. These types of alkaloids are present in several plants families, mainly Apocynaceae, Loganiaceae and Rubiaceae, all of them from the Gentiales order. The most economically important alkaloids are the bisindolics vinblastine, used for treating Hodgkin's disease, and vincristine, used for children's leukemia. Furthermore, the monoterpene alkaloids ajmalicine and serpentine are utilized as antihypertensive agents against cardiac arrhythmias and the improvement of the brain's blood circulation. The complexity of the genetic, catalytic and transport processes of the monoterpene indole alkaloid biosynthesis are actually one of the more stimulating intellectual challenges in plant secondary metabolism field. More than 50 metabolic steps are required to synthesize the most important alkaloids in *Catharanthus roseus*. Until now only 20 of the 50 enzymes required for their biosynthesis have been determined and characterized. Hence, there is still an important number of enzymes that need to be characterized and their genes to be isolated and cloned. It is also fundamental to elucidate the regulatory aspects of their biosynthesis, both at the cellular and the molecular level, in order to address the question of their function in the plants producing them. In this review, an analysis of the state of the art related to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloids is presented.

Introducción

Los alcaloides son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos. Si bien los alcaloides han sido aislados tradicionalmente de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen (De Luca y St-Pierre, 2000), actualmente se ha reportado la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos (Roberts y Wink, 1998). Una gran cantidad de alcaloides han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos aún son prominentes fármacos hoy en día (Schmeller y Wink, 1998).

Los cerca de 12,000 alcaloides se agrupan de acuerdo con su origen biogénico (De Luca y St-Pierre, 2000). Con base en esta clasificación se tienen cuatro grupos: 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos aminados y 4) alcaloides policétidos.

Entre los alcaloides derivados del triptofano se encuentran los alcaloides indólicos, mismos que pueden ser reagrupados en monoterpenos o indol terpenos (iridoides). Dentro del grupo de alcaloides indólicos existen numerosos subgrupos, los cuales dependen del modo de ciclización después de la remoción del residuo de glucosa de la estrictosidina (Figura 1). En este caso se pueden reconocer 8 subgrupos: corinante, aspidosperma, iboga, estricnano, plumerano, eburnano, valesiacontamano y aparicino (Kutchan et al., 1991).

Alcaloides monoterpeno indólicos

Los alcaloides monoterpeno indólicos (AMIs) conforman una familia de más de 3,000 miembros, de los cuales sólo en algunos casos se conoce su efecto fisiológico en los mamíferos (Geerlings et al., 2000; Kutchan, 1995). Este tipo de alcaloides se han encontrado en varias familias vegetales, pero principalmente en las Apocinaceae, Loganiaceae, Nissaceae y Rubiaceae, todas del orden Gentianales. Entre las plantas más conocidas y estudiadas que producen AMIs se tienen a *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata* y *Rauvolfia serpentina* (Cordell, 1999; Waterman, 1998).

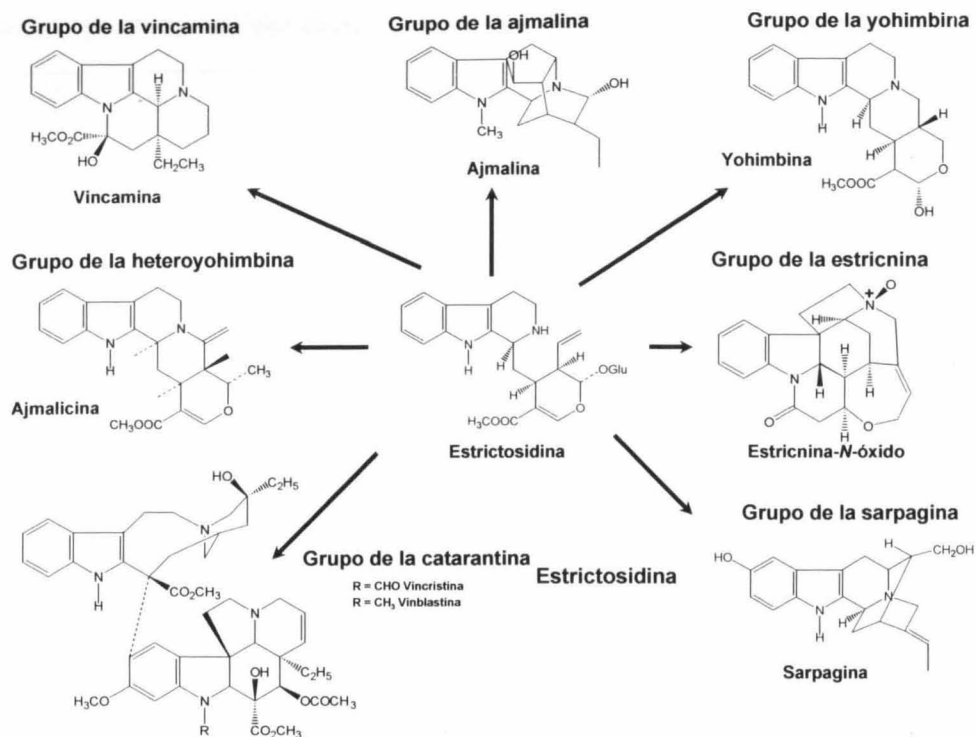


Figura 1. Alcaloides indólicos sintetizados a partir de la estrictosidina (Kutchan et al., 1991; Roberts, 1998).

CATHARANTHUS ROSEUS

Catharanthus roseus (L.) G. Don, es una planta perenne de la familia de las Apocinaceas de distribución pantropical originaria de Madagascar, que ha sido cultivada con fines ornamentales gracias a que durante la mayor parte del año presenta flores de color rosa o blanco (Svoboda y Blake, 1975). Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional como agente hipoglucémico (Singh et al., 2001); el interés por esta planta se debe a que sigue siendo una fuente importante de agentes quimioterapéuticos (Schmeller y Wink, 1998; Svoboda y Blake, 1975) y a que produce una gran variedad de AMIs (Svoboda y Blake, 1975; Van der Heijden et al., 1989), la mayoría de los cuales poseen actividad farmacológica. Entre los alcaloides más importantes producidos por *C. roseus* están los del tipo bisindólico que incluyen a la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin (Schmeller y Wink, 1998), y

a la vincristina empleada en el tratamiento de la leucemia (Schmeller y Wink, 1998); esta planta también produce los agentes antihipertensivos ajmalicina y serpentina (Shanks et al., 1998) utilizados contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral (Moreno et al., 1995; Schmeller y Wink, 1998). Actualmente el costo de la vinblastina en el mercado es de aproximadamente un millón de dólares por kilogramo; teniéndose una producción anual de 12 Kg. Por otra parte, la vincristina alcanza un costo de 3.5 millones de dólares por kilogramo y su producción anual es de 1 kilogramo. El alto costo de estos alcaloides se debe a que se encuentran en concentraciones muy bajas en la planta (alrededor de 0.0005% PS) y a que su extracción se lleva a cabo en presencia de otros 200 alcaloides con propiedades químicas y físicas similares (De Luca y Laflamme, 2001; Scott, 1979).

Esta problemática planteó la necesidad de encontrar fuentes alternas para la obtención de alcaloides bisindólicos. Al principio de la década de los ochentas se pensaba que el cultivo de tejidos vegetales podría ser la alternativa; sin embargo, hasta ahora, y después de un gran esfuerzo de investigación, los alcaloides de importancia farmacológica de *C. roseus* sólo han sido obtenidos en concentraciones muy bajas (De Luca et al., 1998; Moreno et al., 1995; Van der Heijden et al., 1989; Verpoorte et al., 1993). Entre las principales causas de la falta de éxito para la obtención de alcaloides y otros productos de importancia económica a partir de cultivo de tejidos vegetales, se encuentra la falta de conocimiento de las vías de biosíntesis y degradación de estos productos.

BIOSÍNTESIS DE AMIS

La biosíntesis de los AMIs producidos por *C. roseus* (Figura 2) es extremadamente compleja y requiere la conjunción de dos vías metabólicas: la vía indólica y la vía terpénica (De Luca, 1993; Meijer et al., 1993c).

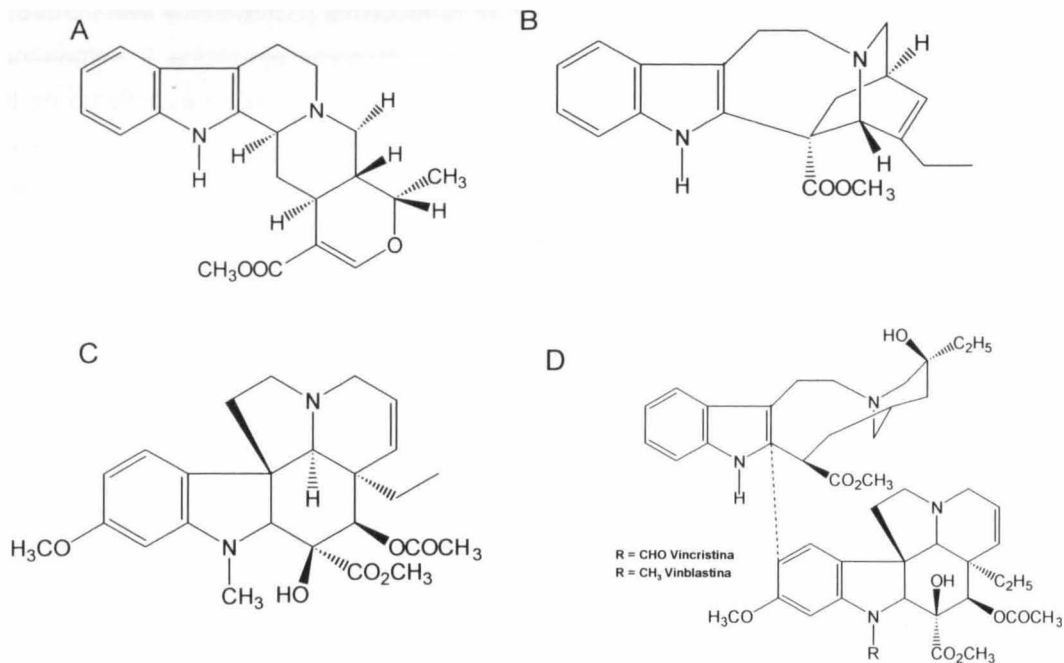


Figura 2. Estructura de los AMIs: ajmalicina (A), catarantina (B), vindolina (C) alcaloides monoterpeno indólicos y de los alcaloides bisindólicos vincristina (D, VCR) y vinblastina (D, VLB).

La enzima L-aminoácido-aromático carboxi-liasas (EC 4.1.1.28)¹ (nc = triptófano descarboxilasa) cataliza la conversión de L-triptófano a L-triptamina, el derivado indólico de los AMIs, y de esta manera deriva triptófano hacia el metabolismo secundario. La triptamina y la secologanina, el precursor monoterpeno-glucoiridoide, son condensados en estrictosidina, un glucoalcaloide precursor de todos los alcaloides aislados de *C. roseus*. La enzima que cataliza la condensación de la triptamina y de la secologanina es la 3- α (S)-estrictosidina triptamina-liasas (EC 4.3.3.2) (nc = estrictosidina sintasa).

¹ La primera vez que se nombra una enzima se da el nombre sistemático y el número asignado por la Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) y entre paréntesis se da el nombre común; a partir de la segunda vez que se nombra la enzima, y en los pies de las figuras se utiliza el nombre común.

Los precursores inmediatos de los AMLs, triptamina y secologanina, requieren a su vez precursores provenientes del metabolismo primario. En las plantas, al igual que en los microorganismos, los precursores de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano provienen de la vía metabólica del ácido shikímico (Berg et al., 1995; Mathews et al., 2000).

Biosíntesis de secologanina

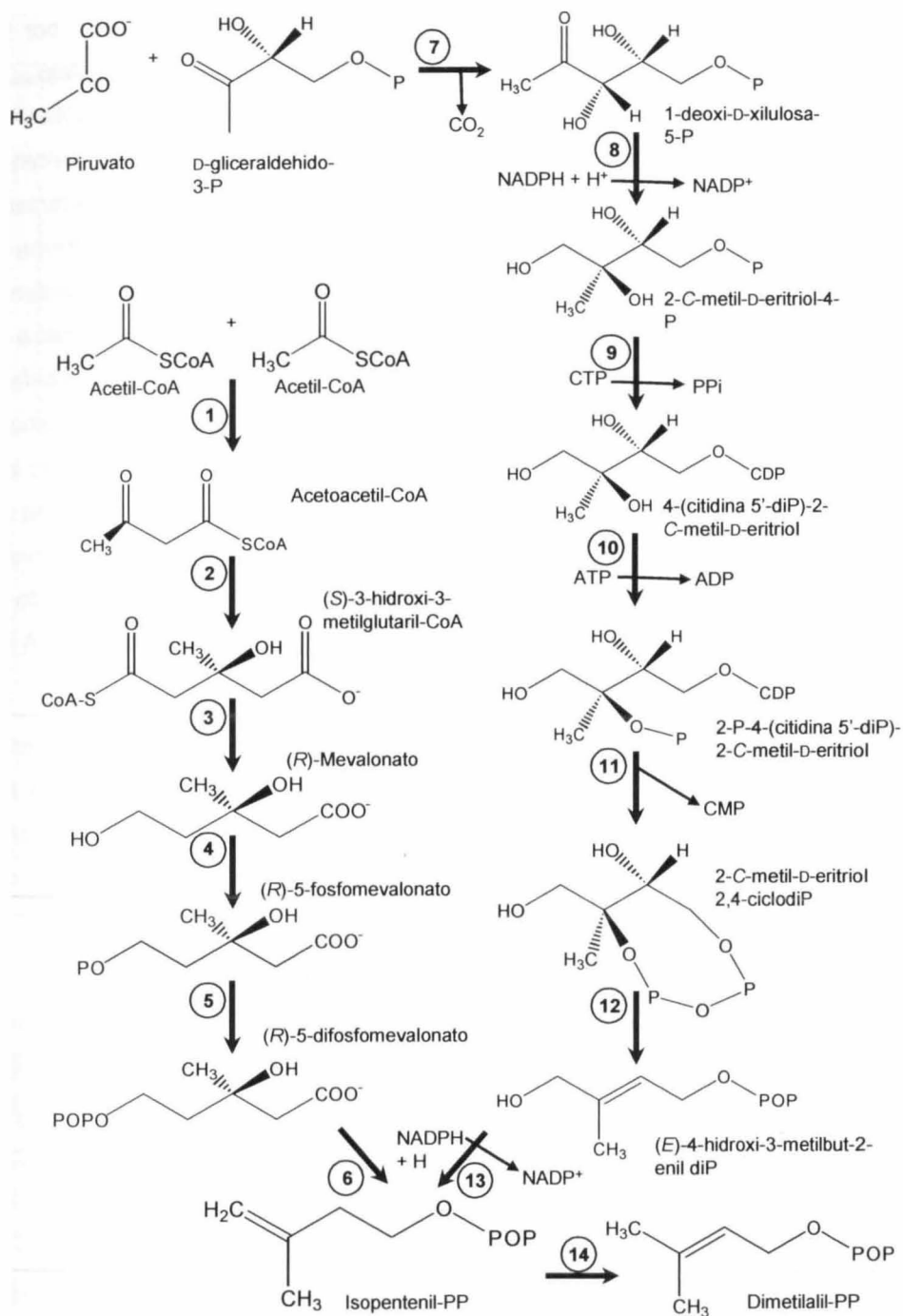
La vía del mevalonato que da lugar a la biosíntesis de la secologanina, es una ruta mucho más compleja y ramificada que la vía del ácido shikímico. Las plantas poseen dos rutas independientes de biosíntesis del isopentenil pirofosfato para la formación de isoprenoides que funcionan en compartimientos celulares diferentes: 1) la ruta clásica del acetato/mevalonato para la biosíntesis de terpenoides en el citoplasma, y 2) la ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato en los plástidos (Figura 3) (Lange et al., 2000; Lichtenthaler, 2001).

El conocimiento de la ruta metabólica del mevalonato está basada en las investigaciones realizadas sobre la biosíntesis de los esteroides, principalmente en mamíferos y levaduras (Gray, 1987). En las plantas, estos mecanismos son similares; sin embargo, la cantidad de productos finales que sintetizan los vegetales a partir de esta molécula, es mucho mayor.

La vía del mevalonato se inicia con la conjugación de dos moléculas de acetil-CoA por la acetil-CoA:acetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9) (nc = acetil-CoA C-acetiltransferasa) (Reacción 1, Figura 3). En el siguiente paso la acetil-CoA:acetoacetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.3.10) (nc = hidroximetilglutaril-CoA sintasa) une al acetoacetil-CoA con otra molécula de acetil-CoA para formar la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (Reacción 2, Figura 3), la cual es reducida a (R)-mevalonato por la enzima (R)-mevalonato:NADP oxidorreductasa-CoA (CoA-acetilante) (EC 1.1.1.34) (nc = hidroximetilglutaril-CoA reductasa, HMGR) (Reacción 3, Figura 3). El (R)-mevalonato es fosforilado dos veces, primero por la ATP:(R)-mevalonato-5-fosfotransferasa (EC 2.7.1.36) (nc = mevalonato cinasa) (Reacción 4, Figura 3) y luego por la ATP:(R)-5-fosfomevalonato fosfotransferasa (EC 2.7.4.2) (nc = fosfomevalonato

cinasa) (Reacción 5, Figura 3) para obtener (*R*)-5-difosfomevalonato. Por último, el (*R*)-5-difosfomevalonato es descarboxilado por la ATP:(*R*)-5-difosfomevalonato carboxilasa (deshidratante) (EC 4.1.1.33) (nc = difosfomevalonato descarboxilasa) a isopentenil pirofosfato (IPP) (Reacción 6, Figura 3).

Figura 3. Ruta para la biosíntesis del isopentenil pirofosfato (IPP). Los números dentro del círculo indican las enzimas: acetil-CoA C-acetiltransferasa (1); 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (2); 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (3); mevalonato cinasa (4); 5-fosfomevalonato cinasa (5); difosfomevalonato descarboxilasa (6); 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (7); 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (8); 2-C-metil-D-eritriol 4-fosfato citidiltransferasa (9); 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritriol cinasa (10); 2-C-metil-D-eritriol 2,4-ciclodifosfato sintasa (11); 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa (12); 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (13), isopentenil difosfato isomerasa (14) (Adam y Zapp, 1998; Agranoff et al., 1960; Arigoni et al., 1997; Bloch et al., 1959; Durr y Rudney, 1960; Lange et al., 2000; Lichtenthaler, 2001; McCaskill y Croteau, 1998; Rudney, 1957; Stern et al., 1960; Tchen, 1958).



El IPP es convertido a su isómero reactivo, el dimetilalil difosfato (DMAPP), por la isopentenil-difosfato Δ^3 - Δ^2 isomerasa (EC 5.3.3.2) (nc = isopentenil-difosfato $\square$ -isomerasa) (Reacción 14, Figura 3; reacción 1, Figura 4). La condensación del DMAPP con una molécula de IPP es llevada a cabo por la dimetilalil-difosfato:isopentenil-difosfato dimetilalil*trans*transferasa (EC 2.5.1.1) (nc = dimetilalil*trans* transferasa) (Reacción 2, Figura 4) y genera el geranil-difosfato (GPP), iniciándose de esta forma la biosíntesis de los monoterpenos; posteriormente la geranil-difosfato:isopentenil-difosfato geranil*trans*transferasa (EC 2.5.1.10) (nc = geranil*trans*transferasa) cataliza la unión del GPP a una molécula de IPP para producir *trans*, *trans*-farnesil difosfato (Reacción 3, Figura 4) y dirigirse a la biosíntesis de los sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos, entre otros (Gershenzon y Croteau, 1990) (Figura 4). A diferencia de los animales, en las plantas algunas de las enzimas descritas para esta parte de la ruta se encuentran formando complejos multienzimáticos; en rábano (*Raphanus sativus*) (Bach et al., 1994) y en *C. roseus* (Van der Heijden et al., 1994a) se ha detectado la existencia de una enzima membranal que presenta la actividad de acetoacetyl-CoA C-acetyltransferasa y de hidroximetilglutaril-CoA sintasa juntas.

Hasta principios de la década de los noventa se creía que todos los isoprenoides eran biosintetizados a partir de mevalonato (Bach, 1995; Chappell, 1995a; Chappell et al., 1995; Chappell, 1995b) y que la enzima HMGR podría representar un paso limitante para la biosíntesis de los isoprenoides vegetales, como ocurre para la biosíntesis del colesterol en los animales (Goldstein y Brown, 1990).

También se pensaba que el IPP se biosintetizaba exclusivamente en el citosol y se metabolizaba ahí mismo, o se transportaba a los plástidos. Sin embargo, Heintze et al. (1994), observaron que los plástidos de trigo son capaces de biosintetizar carotenos a partir de $[^{14}\text{C}]$ -acetato, lo que sugiere que en ellos también se lleva a cabo la biosíntesis de IPP. Como se creía que la HMGR tendría que estar involucrada (y ésta se localiza en el retículo endoplásmico) se propuso la existencia de una HMGR plastídica. Sin embargo, este no fue el caso, lo que se obtuvo fue una nueva ruta metabólica para la síntesis del IPP plastídico (Lichtenthaler et al., 1997; Schwender et al., 1996).

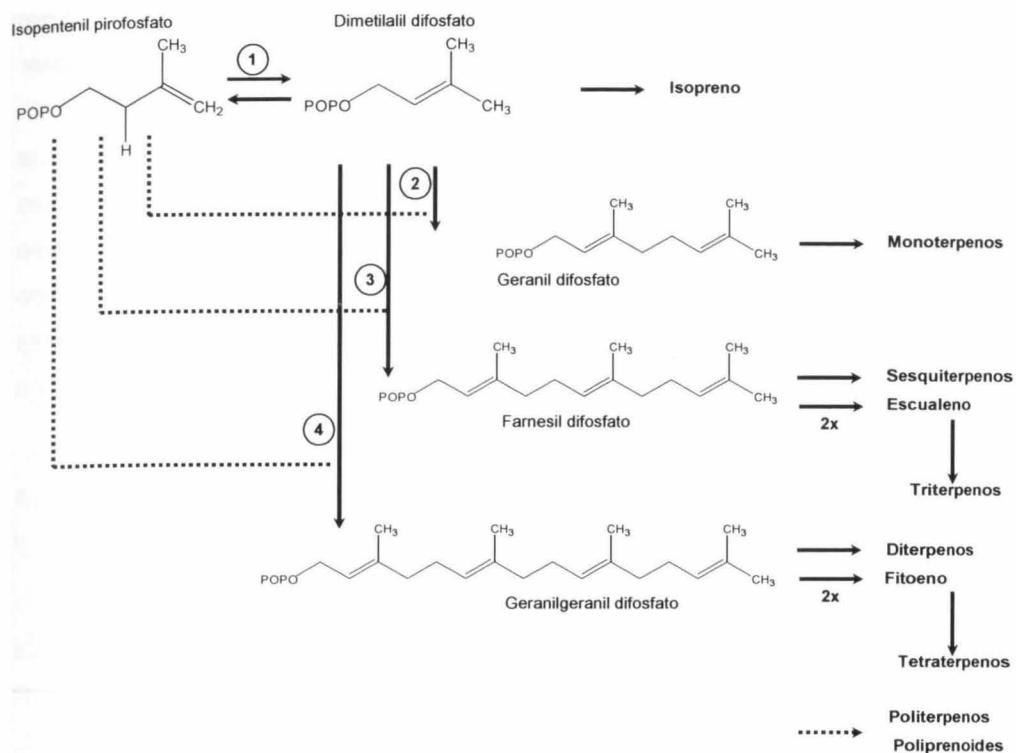


Figura 4. Biosíntesis de isoprenoides.

Los números dentro del círculo indican las enzimas: isopentenil-difosfato D-isomerasa (1), dimetilaliltransferasa (2); geraniltransferasa (3); farnesiltransferasa (4) (Agranoff et al., 1960; Banthorpe et al., 1976; Reed y Rilling, 1975).

La ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa, descubierta en *Escherichia coli* por Rohmer et al. (1993), se inicia con la condensación entre el piruvato y el gliceraldehído-3-P para dar la 1-desoxi-D-xilulosa-5-P, en una reacción dependiente de tiamina y catalizada por la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (EC 2.2.1.7) (Lichtenthaler, 1999) (Reacción 7, Figura 3). Esta enzima fue aislada por primera vez en plantas de *Mentha x piperita* y tiene una masa molecular de 71 kDa (Lange et al., 1998). En las plantas, esta vía alterna de biosíntesis genera el IPP en los plástidos para la biosíntesis de isoprenoides, (Adam y Zapp, 1998; Lange et al., 1998; Lichtenthaler, 1999; McCaskill y Croteau, 1998).

De acuerdo con Contin et al. (1998), la secologanina proviene principalmente de la vía alterna de biosíntesis del IPP, aunque los datos de la literatura sugieren que la vía del mevalonato también participa en la biosíntesis de este monoterpeno, si bien en menor grado. En nuestro laboratorio hemos determinado que raíces transformadas de *C. roseus*, llevando la HMGR de hámster truncada sin el dominio por el cual se une a la membrana, son capaces de modificar la biosíntesis de alcaloides y de esteroides (Ayora-Talavera et al., 2002). En el caso con menor actividad de la enzima soluble se obtuvo un aumento en la biosíntesis de ajmalicina y de catarantina al mismo tiempo que disminuyó la biosíntesis de campesterol. Cuando la actividad de la HMGR soluble fue máxima, no se detectó catarantina y los niveles de campesterol y serpentina aumentaron (Ayora-Talavera et al., 2002).

La coexistencia de ambas vías también se ha propuesto para la biosíntesis de otros terpenos como el β -caroteno, el fitol y la luteína en *C. roseus* (Arigoni et al., 1997) y para los sesquiterpenos de *Matricaria recutita* (Adam y Zapp, 1998).

En *C. roseus* sólo se han determinado algunas de las enzimas que se requieren para la biosíntesis de la secologanina (Figura 5); las enzimas mejor conocidas son la HMGR (Reacción 3, Figura 3), enzima que biosintetiza al mevalonato (Van der Heijden et al., 1989); la geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, Figura 5), determinada, aislada y purificada de suspensiones celulares (Canto-Canché y Loyola-Vargas, 2000; Canto-Canché y Loyola-Vargas, 2001; Meijer et al., 1993a); la enzima NADPH:citocromo P-450 reductasa, reconocida como un componente de la geraniol 10-hidroxilasa, fue purificada hasta homogeneidad por cromatografía de intercambio iónico (Madyastha y Coscia, 1979a); una monoterpeno-alcohol oxido-reductasa no específica soluble que funciona en presencia de NAD(P)^+ (Reacción 4, Figura 5), capaz de catalizar la oxidación del 10-hidroxigeraniol a los correspondientes aldehídos (Madyastha y Coscia, 1979b).

Recientemente nuestro grupo ha sido capaz de determinar en raíces transformadas de *C. roseus* y utilizando el verdadero sustrato de la 10-oxogeraniol:iridodial ciclasa, la enzima que cataliza la primera ciclización en la vía de biosíntesis de la secologanina (Reacción 5, Figura 5) (Sánchez-Iturbe et al., 2004). También se ha determinado a la

(S)-adenosil-L-metionina-ácido logánico-metiltransferasa, en semillas de *C. roseus*; esta enzima cataliza la formación de loganina a partir de ácido logánico o del ácido secologánico y de la (S)-adenosil-L-metionina (Reacción 6, Figura 5) (Madyastha et al., 1973). Recientemente se ha determinado la secologanina sintasa (Reacción 7, Figura 5), una proteína de la familia de las P450 (Irmmler et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). No todas las enzimas han sido purificadas y únicamente la geraniol 10-hidroxilasa se ha visto que es inhibida por uno de los alcaloides producidos por *C. roseus*, la catarantina.

En general se sabe muy poco sobre la biosíntesis de la secologanina. La ruta se ha postulado a partir de experimentos llevados a cabo con trazadores *in vivo* administrando glucosa, mevalonato, geraniol u otros precursores intermedios marcados con ^3H ó ^{14}C . Para ello se han empleado suspensiones celulares de *C. roseus*, *Rauvolfia serpentina*, *Gardenia jasminoides*, *Teucrium marum* y *Nepetia cataria*, así como plantas de diversas especies del género *Lonicera* (Contin et al., 1998).

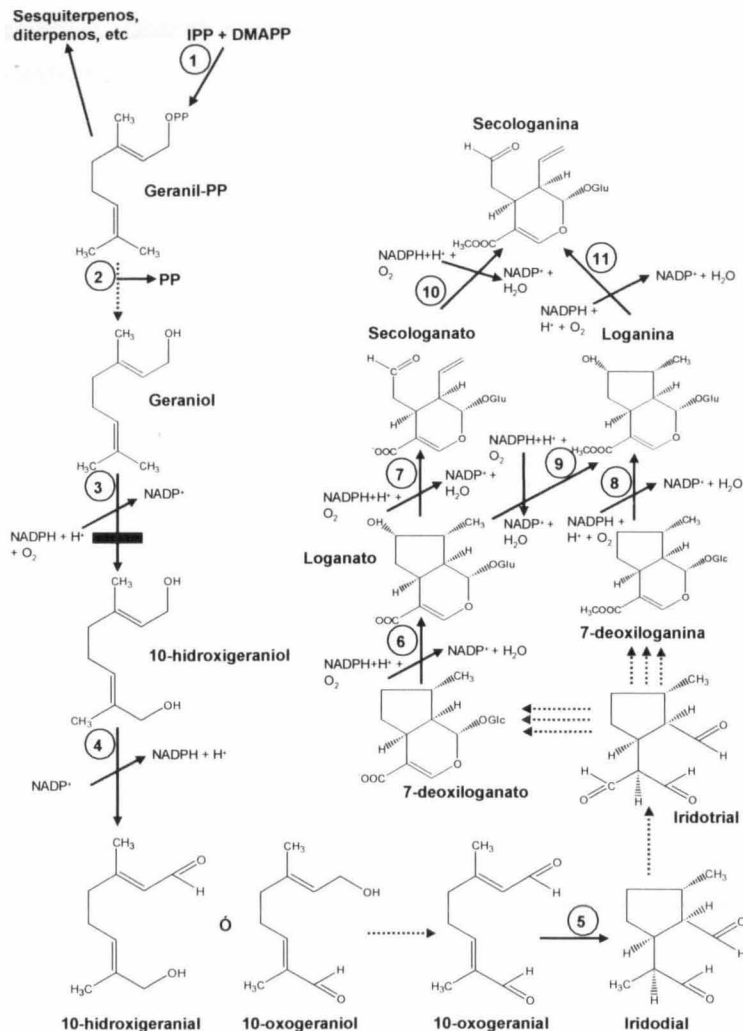


Figura 5. Biosíntesis del monoterpene iridoide secologanina. Los números encerrados en los círculos corresponden a las enzimas: geraniol pirofosfato sintasa (1); fosfatasa (¿desconocida?) (2); geraniol 10-hidroxilasa (3); NADP⁺:monoterpene oxidorreductasa (4); 10-oxogeraniol: iridodial ciclaza (5); 7-desoxiloganina, NADPH:oxígeno oxidorreductasa (7α-hidrolaza) (6 y 8); S-denosil-L-metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (7 y 10); y

loganina:oxígeno oxidoreductasa (9 y 11). Al principio de la vía se señala la posición de la fosfatasa específica para el geranil pirofosfato, propuesta por el grupo del Dr. R. Verpoorte (Meijer, 1993), pero cuya existencia no ha podido ser demostrada hasta el momento. Las flechas punteadas indican pasos no caracterizados o probables. Varias flechas en el mismo paso indican que probablemente se trata de varios pasos metabólicos. ■ Paso inhibido por la catarantina. Diagrama basado en De Luca (1993), Gershenzon y Croteau (1990) y Meijer (1993c).

El primer producto que se compromete en los esqueletos hidrocarbonados hacia la biosíntesis del monoterpeno es el geraniol. Se ha propuesto que entre éste y la secologanina existen al menos 11 pasos enzimáticos, de los cuales únicamente se conocen seis: la geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, Figura 5), la NADP⁺:monoterpenooxidoreductasa (Reacción 4, Figura 5), la 10-oxogeranial:iridodial ciclase (Reacción 5, Figura 5), la 7-desoxiloganina,NADPH:oxígeno oxidoreductasa (7 α -hidrolasa) (EC 1.14.13.74) (Reacciones 6 y 8, Figura 5), la (S)-adenosil-L- metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.50) (Reacciones 7 y 10, Figura 5), la loganina:oxígeno oxidoreductasa (EC 1.3.3.9) (Reacciones 9 y 11, Figura 5). La mayoría de estas enzimas se han caracterizado de manera superficial por lo que se sabe poco sobre ellas.

Se ha propuesto que el primer paso de regulación en la biosíntesis de la secologanina se encuentra al nivel de la oxigenación del geraniol. La reacción es catalizada por la enzima geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, Figura 5) y se ha sugerido que esta enzima es la que compromete los esqueletos carbonados a la biosíntesis de la secologanina. Algunas observaciones que apoyan el hecho de que esta enzima pudiera representar un punto de control son: que su actividad es inducida en condiciones en las que se produce un aumento en el contenido de alcaloides e, inversamente, la adición de fosfatos, que provoca una disminución en el contenido de alcaloides, inhibe su actividad (Schiel et al., 1987). Además, otras condiciones que provocan un aumento o una disminución en el contenido de alcaloides también correlacionan con la actividad de la geraniol 10-hidroxilasa (Meijer et al., 1993a).

Finalmente, esta enzima es inhibida por la catarantina ($K_i=1$ mM) (McFarlane et al., 1975), lo cual pudiera tener un significado fisiológico al acumularse este alcaloide en el mismo organelo, e inhibirla por producto final (Meijer et al., 1993c).

Como se mencionó con anterioridad sólo se conocen algunas de las enzimas de la ruta de biosíntesis de la secologanina, a continuación se hace un análisis de las enzimas que mejor se conocen.

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. Mientras que en células animales y en levaduras participan dos enzimas en la biosíntesis de la hidroximetilglutaril-CoA [la acetil-CoA C-acetiltrans transferasa (EC 2.3.1.9) (Reacción 1, Figura 3) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (EC 2.3.3.109 (Reacción 2, Figura 3)], en las plantas parece ser que es una sola enzima la encargada de ambas reacciones. Aún cuando el equilibrio de la reacción de la tiolasa está orientado hacia la formación de la acetil-CoA, más que hacia la biosíntesis de la acetoacetil-CoA. La razón de lo anterior reside en el mecanismo de la reacción, pues incluye una condensación tipo Claisen, en la que una de las dos moléculas de acetil-CoA actúa como un carbanión que luego se adiciona nucleofílicamente sobre la otra molécula de acetil-CoA; si bien la eliminación del protón en el α metilo del acetilo, para convertirlo en carbanión, es energéticamente desfavorable, la reacción general de biosíntesis de la hidroximetilglutaril-CoA logra llevarse a cabo, de manera termodinámicamente favorable, debido a que la reacción de condensación aldólica, que realiza la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (Reacción 2, Figura 3), se combina con la que realiza la acetil-CoA C-acetil transferasa (Reacción 1, Figura 3) (Bach y Weber, 1989; McGarvey y Croteau, 1995).

La hidroximetilglutaril-CoA puede seguir tres caminos diferentes una vez que ha sido sintetizada: a) puede interactuar con la enzima hidroximetilglutaril-CoA liasa (EC 4.1.3.4), para contribuir a la formación de cuerpos cetónicos en las mitocondrias de las células animales [aunque se ha detectado su presencia en plantas (Bach y Weber, 1989; Van der Heijden y Verpoorte, 1995), aún no se conoce con certeza su papel dentro de la fisiología vegetal y permanece como un área no explorada]; b) puede servir como sustrato de la 3-metilglutaconil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.18), para formar 3-hidroxi-3-metilglutaconato (reacción involucrada en el catabolismo de la leucina; la 3-

metilglutaconil-CoA hidratasa ha sido purificada de hepatocitos de oveja y semipurificada de *C. roseus* (Van der Heijden et al., 1994b)); y c) la HMGR (EC 1.1.1.34) puede convertirla en mevalonato con la ayuda del poder reductor de dos moléculas de NADPH.

La localización de la enzima HMGR se complica por el hecho de que el origen del IPP depende del tipo de tejido y del estadio de desarrollo, e. g., un estudio con cloroplastos en desarrollo de cebada, demostró que mientras que los cloroplastos de tejidos juveniles son capaces de biosintetizar isopentenil pirofosfato, aquellos pertenecientes a tejidos de hoja madura, dependen de la importación de IPP desde el citosol (Heintze et al., 1990); por otro lado, en tricomas glandulares aislados de pimienta, la formación de isopentenil pirofosfato en el citosol es bloqueada a nivel de la HMGR en el momento en que la acumulación de aceite es más rápida, por lo que la biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos recae exclusivamente en el isopentenil pirofosfato derivado de plástidos (McCaskill y Croteau, 1995).

Se sabe que la biosíntesis de isoprenoides se reparte en tres compartimentos subcelulares semiautónomos: el citosol/retículo endoplásmico para la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos; los plástidos para la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (así como para las porciones prenilo de la clorofila, las plastoquinonas y los tocoferoles); y la mitocondria (y/o el aparato de Golgi) para la biosíntesis de ubiquinona (McGarvey y Croteau, 1995). Para explicar los eventos anteriores se han propuesto recientemente una serie de modelos; en uno de ellos Chappell, sugiere que existen canales metabólicos regulados de manera independiente dedicados a la producción de tipos específicos de isoprenoides (Chappell, 1995b).

Mientras que en las células de los mamíferos la HMGR es una enzima codificada por un solo gen, en las plantas la enzima se presenta como múltiples isoenzimas y es codificada por una familia pequeña de genes. Miembros de esa familia de genes son expresados diferencialmente durante el desarrollo de la planta o en respuesta a factores ambientales, y distintas isoformas de la enzima pueden ser críticas en la

dirección de los intermediarios de la vía hacia isoprenoides específicos (Chappell, 1995b; Enjuto et al., 1994; Weissenborn et al., 1995).

La HMGR de las plantas es una enzima que está estrechamente regulada por fitocromo (de manera post-transduccional) (Budde y Chollet, 1988), fitohormonas, mecanismos de retroalimentación y factores proteicos endógenos (Bach, 1987); además, existen evidencias de que la HMGR de plantas está regulada por fosforilación reversible, al parecer mediante una cascada de dos ciclos. De hecho, ya se han encontrado algunas cinasas que actúan sobre la HMGR (Ball et al., 1994; Barker et al., 1996; Dale et al., 1995; Douglas et al., 1997; Huber et al., 1994).

Chappell divide los mecanismos de regulación de la biosíntesis de isoprenos en finos y gruesos, y propone que el aumento en la transcripción de la enzima está mediado por una disminución de los oxisteroles citosólicos que interactúan con factores en *trans*, y que éstos a su vez, se unen a los elementos reguladores, los cuales se encuentran presentes en el promotor del gen de la HMGR (Chappell, 1995a). A este respecto, recientemente se encontró que el promotor del gen *Hmgr2* de jitomate, posee un elemento regulador positivo en el interior de la región 5'UTR y uno más que consiste en un rizo localizado corriente arriba del codón de inicio (Daraselia et al., 1996). El incremento en la eficiencia traduccional del ARNm de la HMGR resulta, en parte, del procesamiento del ARNm de manera alternada, que se da en células sometidas a bajas concentraciones de mevalonato. Daraselia, también sugiere que el extremo amino terminal, el cual se encuentra insertado en la membrana, es el responsable de la regulación de la degradación de la enzima (Daraselia et al., 1996).

La HMGR de mamíferos se inactiva por una fosforilación reversible, que parece no estar relacionada con el mecanismo de control por retroalimentación pero sí con la actividad de una cinasa dependiente de AMP (Weissenborn et al., 1995). Con respecto a las modificaciones post-traduccionales, en un estudio reciente se demostró que los metabolitos no esteroideos derivados del mevalonato y sintetizados entre el escualeno y el lanosterol, disminuyen la biosíntesis de la HMGR en células de hámster tratadas con lovastatina (un inhibidor de la HMGR), con TMD (4,4,10- β -trimetil-*trans*-decal-3 β -ol, inhibidor de la escualeno ciclasa) y con mevalonato. La regulación se da a nivel

transduccional y, por lo tanto, aumenta la degradación de la enzima (Peffley y Gayen, 1997). Se tienen evidencias de que los inhibidores de la HMGR provocan la aparición de mecanismos regulatorios presentes de manera implícita (Peffley y Gayen, 1997). Lopez et al. (1997), han demostrado que los inhibidores son capaces de revelar mecanismos de regulación transcripcional, controlados por el colesterol de la dieta y que los mecanismos de degradación de la enzima son controlados por el farnesol.

Hampton et al. (1996), hacen una propuesta interesante estableciendo dos categorías para regular la actividad de la HMGR: a) inhibición por retroalimentación, y b) regulación cruzada. La regulación por retroalimentación implica que la actividad de la enzima disminuye en respuesta a los productos provenientes de la vía del mevalonato. En mamíferos, la regulación se logra a través de una modulación coordinada de la biosíntesis y degradación de la proteína, por ejemplo cuando el flujo de la ruta es disminuido, los procesos de transcripción y traducción de la HMGR aumentan y la velocidad de degradación disminuye; el dominio amino terminal que se ancla en la membrana es tanto necesario como suficiente para mediar la degradación regulada de la HMGR. Por otra parte, entre los mecanismos de regulación cruzada se tiene la fosforilación por una cinasa dependiente de AMP. Un estudio reciente sobre la regulación por fosforilación, en extractos de hoja de *Spinacea oleracea* L., demostró la capacidad de las proteína-cinasas para activar y desactivar, mediante fosforilación, tanto a la nitrato reductasa como a la HMGR1 de *Arabidopsis thaliana*. La proteína cinasa fosforiló más rápidamente a la HMGR1, haciéndolo además en la serina 577, y apoyando la propuesta hecha por Dale et al. (1995), en el sentido de que este residuo es el punto de regulación de la fosforilación (Douglas et al., 1997). Este hallazgo traerá como consecuencia replanteamientos acerca de cómo se ven las interrelaciones entre la asimilación del nitrato y el metabolismo de la sacarosa y de los isoprenoides. Mientras que en los mamíferos las citocinas aumentan los niveles de ARNm de la HMGR, en las plantas, el daño causado por patógenos dispara, la mayoría de las veces, la inducción de algunas isoenzimas de la HMGR y la represión de otras (Choi et al., 1992). También se sabe que las isoenzimas de HMGR están reguladas por desarrollo, como sucede en jitomate, en el cual las isoenzimas son sintetizadas en tejidos específicos (Narita y Gruissem, 1989). El mismo evento se ha observado en

tubérculos de *Solanum tuberosum* L., en donde los miembros de la familia de la HMGR se expresan, de acuerdo al estadio de desarrollo, mediante la producción de isoformas específicas para la biosíntesis de productos finales diferentes en tejidos particulares (Korth et al., 2000). En resumen, la regulación de la HMGR se da en los siguientes niveles: por retroalimentación, en la transcripción, en la traducción de su ARNm, en la modificación covalente por fosforilación y en la degradación de la enzima.

La HMGR ha demostrado ser una enzima difícil de purificar. Sólo ha sido purificada de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul et al., 1990), *S. tuberosum* (Kondo y Oba, 1986), *R. sativus* (Bach et al., 1986), *Zea mays* (Bach et al., 1990) y *A. thaliana* (Dale et al., 1995); y se ha semipurificado de *Parthenium argentatum* (Reddy y Das, 1986); *N. cataria* (Arebalo y Mitchell, 1984), y *C. roseus* (Galaz-Avalos, 1996; Gutiérrez-Pacheco, 2000).

Bach et al. (1986), establecieron una metodología para purificar HMGR de membranas aisladas a partir de plántulas etioladas de *R. sativus* basada en la extracción de la enzima por medio de detergentes. Estos autores caracterizaron a la enzima molecular y cinéticamente; determinaron que tiene una masa molecular de 180 kDa, con 4 subunidades de 45 kDa cada una y que se trata de una proteína ligeramente ácida, con un *pI* de 5.9. Por otro lado, Kondo y Oba (1986), desarrollaron una metodología para purificar HMGR a partir de tejidos de *S. tuberosum*, logrando solubilizar la enzima utilizando la digestión con tripsina en lugar de detergentes; con este procedimiento obtuvieron un porcentaje de recuperación del 1.8%, con una actividad específica de 7,910 nmoles de mevalonato formados min^{-1} mg de prot^{-1} e identificando que la enzima está constituida por dos subunidades de 55 kDa y una masa molecular total de 110 kDa. En tanto que las HMGR de aves y mamíferos presentan estructuras monoméricas de entre 90 y 97 kDa (Chin et al., 1984), en *Pseudomonas mevalonii* (Brown y Rodwell, 1980) y en levaduras la enzima es tetramérica con una masa molecular de 260 a 280 kDa (Learned y Fink, 1989; Qureshi et al., 1976).

Se han determinado diferentes valores de K_m para la hidroximetilglutaril-CoA, tanto para la fracción membranal como para la fracción citosólica para la enzima de semillas de *Pisum sativum*. Para la primera se determinó un valor de 0.385 μM y de 80 μM para

la segunda, lo que sugiere la existencia de isoenzimas en la célula (Wong et al., 1982). El valor de 27 μM de la K_m para el NADPH y de 1.5 μM para la K_m de la hidroximetilglutaril-CoA de la HMGR en *R. sativus*, es ligeramente menor que el determinado para la enzima de mamíferos y levaduras (Rogers et al., 1983). Una afinidad elevada hacia el NADPH, como se ha visto en *R. sativus*, podría permitir la regulación de la actividad de HMGR *in vivo* a través de un cambio rápido en la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Bach et al., 1986).

Recientemente Dale et al. (1995), lograron expresar en *E. coli*, en una forma catalíticamente activa, el dominio catalítico de la HMGR1 de *A. thaliana* y lo purificaron. La alta eficiencia del sistema de expresión bacteriano, aunado a la simplicidad del protocolo de purificación, resultó en la obtención de grandes cantidades de la enzima pura (cerca de 5 mg L^{-1} de cultivo), con una actividad específica final de 17 U mg prot^{-1} ; lo anterior, expresado en pkat mg prot^{-1} , da un valor de 2.82×10^8 , siendo ésta la actividad específica más elevada reportada hasta la fecha para cualquier HMGR purificada a partir de tejidos vegetales. Los valores de las K_m para el NADPH y la hidroximetilglutaril-CoA fueron de $71 \pm 7 \mu\text{M}$ y $8.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$, respectivamente. En este mismo modelo se comprobó que la HMGR1 de *A. thaliana* es inactivada por fosforilación en la serina 577. Por otra parte, Galaz-Ávalos detectó dos picos de actividad al eluir extractos de raíces transformadas de *C. roseus* a través de una columna de intercambio aniónico. Estos componentes presentaron actividades específicas de 284.61 y 210.58 pkat mg prot^{-1} y poseen una masa molecular cercana a los 200 kDa (Galaz-Avalos, 1996).

Geraniol 10-hidroxilasa. La geraniol 10-hidroxilasa es una monooxigenasa de la familia de las proteínas P450 (Meehan y Coscia, 1973) y se encuentra localizada en las membranas de las vacuolas (Madyastha et al., 1977). Esta enzima cataliza la hidroxilación del geraniol en la posición 10 y requiere O_2 y NADPH (Reacción 3, Figura 5) (Meehan y Coscia, 1973). Los electrones del NADPH son transferidos al grupo hemo de la monooxigenasa a través de la NADPH: citocromo P450 reductasa (Donaldson y Luster, 1991). Esta flavoproteína es absolutamente necesaria para que la monooxigenasa realice su catálisis y está formada por dos componentes: la citocromo

P-450 reductasa NADPH dependiente y el citocromo P-450, con actividad propia de geraniol 10-hidroxilasa (Meijer et al., 1993b). El primer componente es una flavoproteína membranal que ha sido purificada a homogeneidad, su masa molecular es de aproximadamente 78 kDa y tiene como cofactores al FMN y al FAD (Madyastha et al., 1976; Madyastha et al., 1977; Madyastha y Coscia, 1979a; Madyastha y Coscia, 1979b). El segundo componente es una proteína de masa molecular de 56 kDa que ha sido purificada aparentemente a homogeneidad; acepta únicamente al geraniol como sustrato y no al geraniol-P o al nerol-P, lo cual podría considerarse como evidencia de que existe una desfosforilación previa durante la ruta metabólica (Meijer et al., 1993a). Esta enzima tiene como inhibidor no competitivo reversible a la catarantina ($K_i = 1$ mM), es estimulada por DTT y es inhibida por CO, aunque esta inhibición es revertida por la luz (Madyastha et al., 1976; Madyastha y Coscia, 1979b; Meehan y Coscia, 1973). El ADNc de la citocromo P-450 reductasa que codifica para un péptido de 78.9 kDa, ha sido clonado empleando como sonda regiones altamente conservadas entre estas proteínas (Meijer et al., 1993b); sin embargo, cuando este ADNc se empleó para transformar *Nicotiana tabacum* y *A. thaliana*, la proteína expresada no tuvo actividad detectable de geraniol 10-hidroxilasa. Los anticuerpos generados contra la proteína que codifica el ADNc cruzaron con la proteína purificada por la Dra. Meijer (Vetter et al., 1992).

Monoterpenoacíclica de alcoholes primarios: NADP⁺ oxidorreductasa. Se ha establecido que esta enzima juega un papel importante en la biosíntesis de la secologanina (De Luca et al., 1998), y cataliza la oxidación reversible del 10-hidroxigeraniol en presencia de NADP⁺, para producir 10-oxogeraniol ó 10-hidroxigeranial (Reacción 4, Figura 5); al parecer ésta es una enzima inespecífica en cuanto al grupo OH que es capaz de oxidar (Uesato et al., 1986). Se ha purificado de células de *R. serpentina*, su masa molecular es de 44 kDa y su *pI* es de 5.4. Es inactivada por iodoacetamida y por N-etilmaleimida, lo que sugiere que requiere grupos SH para su actividad (Ikeda et al., 1991). El valor de la K_m para el NADP⁺ y el NADPH es de 25 y 5.5 μ M, respectivamente, teniendo nerol (oxidación) o neral (reducción) como sustrato. Esta enzima no utiliza NAD⁺ ni NADH como cofactores y puede aceptar

alcoholes alílicos primarios con cadenas mayores a seis carbonos como sustratos; sin embargo, no acepta alcoholes secundarios, ni etanol (De Luca et al., 1998).

10-oxogeranial: iridodial ciclasa. Esta enzima cataliza la reacción de formación de iridodial a partir de 10-oxogeranial y utiliza NADPH como agente reductor (Reacción 5, Figura 5). Esta enzima ha sido semipurificada 440 veces de *R. serpentina* (Uesato et al., 1986; Uesato et al., 1987) y parece ser un homotetrámero con una masa molecular de 118 kDa y un pH óptimo de 7.0. Nuestro grupo la ha semipurificado de raíces transformadas de *C. roseus* (Sánchez-Iturbe et al., 2004).

7-desoxi:loganina, NADPH:oxígeno oxidorreductasa [7- α -hidroxilante] (EC 1.14.13.74). Esta enzima puede utilizar como sustrato tanto al 7-desoxiloganato como a la 7-desoxiloganina (Reacciones 6 y 8, Figura 5). La reacción es inhibida por monóxido de carbono, así como por diversos inhibidores de las proteínas citocromo P450, indicando que esta enzima pertenece a la familia de los citocromos P450. La K_m para la 7-desoxiloganina y el NADPH es de 170 y 18 μM , respectivamente (Katano et al., 2001).

Loganina:oxígeno oxidorreductasa (EC 1.3.3.9). Esta enzima cataliza el último paso de la biosíntesis de secologanina a partir de loganina, que involucra una ruptura oxidativa del anillo del metilciclopentano de la loganina (Reacción 11, Figura 5). La enzima también reconoce como sustrato al ácido logánico (Reacción 7, Figura 5). Es un miembro de la familia de proteínas citocromo P450 y se encuentra presente en la fracción microsomal de suspensiones celulares de *C. roseus*, así como en la epidermis de sus hojas (Irmeler et al., 2000). También ha sido determinada en suspensiones celulares de *Lonicera japonica* (Yamamoto et al., 1999; Yamamoto et al., 2000).

S-adenosil-L-metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.50). Esta enzima cataliza la O-metilación del grupo carbonilo del ácido logánico. Puede catalizar la transferencia del grupo metilo de la (S)-adenosil-L-metionina indistintamente al ácido logánico (Reacción 9, Figura 5) o al ácido secologánico (Reacción 10, Figura 5), pero no acepta al ácido 7-desoxilogánico como sustrato; lo anterior indica que en la biosíntesis de la secologanina, la hidroxilación antecede a la metilación. Esta enzima ha sido purificada parcialmente a partir de plántulas etioladas de *C. roseus*; los valores

de K_m para la (S)-adenosil-L-metionina y para el ácido logánico son de 0.06 y 12.5 mM, respectivamente (Meijer et al., 1993c).

Biosíntesis de los AMIs

La mayoría de las investigaciones para caracterizar a las enzimas de la ruta de biosíntesis de los AMIs han sido realizadas tomando en cuenta la enorme complejidad de la ruta. Para una revisión profunda sobre el tema se puede recurrir a las excelentes revisiones que sobre el tema han realizado De Luca (1993; 2000) y Meijer et al. (1993c). La lista de las enzimas que han sido estudiadas en menor o mayor grado incluye a la triptofano descarboxilasa, la geraniol 10-hidroxilasa, la NADPH-citocromo P450 reductasa, la oxidorreductasa NADP⁺-dependiente, la 10-oxogeranial: iridodial ciclasa, la secologanina sintasa, la SAM-loganato O-metiltransferasa, la 7-desoxiloganina 7-hidroxilasa, la estrictosidina sintasa, la estrictosidina- β -D-glucosidasa, la catenamina reductasa, la tabersonina 16-hidroxilasa, la S-adenosil-L-metionina:16-hidroxitabersonina-16-O-metiltransferasa, la S-adenosil-L-metionina:16-metoxi 2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferasa, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa, la acetilCoA:4-O-desacetilvindolina-4-O-acetiltransferasa, la tabersonina 17-hidroxilasa y la minovincinina 19-O-acetiltransferasa (Cuadro 1).

El precursor indólico triptamina se sintetiza a partir del triptofano (Reacción 1, Figura 6), en una reacción catalizada por la enzima L-aminoácido aromático carboxi-liasa (EC 4.1.1.28) (Nombre común: triptofano descarboxilasa, TDC) que emplea como cofactor al piridoxal fosfato; esta reacción también puede emplear como sustrato al 5-hidroxitriptofano. Los dos precursores, la secologanina y la triptamina, son condensadas para producir la estrictosidina-O-glucosa, en una reacción catalizada por la 3- α (S)-estrictosidina triptamina-liasa (EC 4.3.3.2) (Nombre común: estrictosidina sintasa, SS) (Reacción 2, Figura 6) (Stöckigt y Zenk, 1977a). El producto de esta reacción, la 3 α (S) estrictosidina, es desglucosilado por la estrictosidina β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.105) para formar finalmente la molécula de estrictosidina aglicona (Reacción 3, Figura 6), precursor de los aproximadamente 200 alcaloides indólicos de *C. roseus*, incluyendo a la vindolina y la catarantina (Stöckigt et al., 1976; Stöckigt y Zenk, 1977b). La estrictosidina aglicona se convierte en 4,21-

didehidrogeissoschizina, en forma espontánea, la cual puede ser transformada en catenamina, precursor directo de la ajmalicina y la serpentina (Stöckigt et al., 1977), o puede ser reducida enzimáticamente a geissoschizina (Reacción 4, Figura 6).

Por catalizar pasos cruciales de la biosíntesis de los AMIs, las enzimas TDC y SS han sido ampliamente estudiadas (De Luca y Cutler, 1987; Stevens et al., 1993). La TDC se ha purificado tanto de células en suspensión (Fernandez et al., 1989) como de raíces transformadas de *C. roseus* (Islas-Flores et al., 1994). La TDC es una enzima citoplásmica formada por dos subunidades idénticas de 55 kDa, tiene una masa molecular aproximada de 110 kDa, un *pI* de 5.9, un pH óptimo de 8.5 y es modulada por diversos factores; se ha determinado que la actividad de la TDC aumenta en cultivos de *C. roseus* como respuesta a la adición de homogenados fúngicos (Pasquali et al., 1992) o de enzimas hidrolíticas (Moreno-Valenzuela, 1999). En el primer caso, se sabe que el aumento de su actividad se debe al incremento en la transcripción del gen y en la traducción del mensajero. Por otra parte, contrario al efecto del homogenado fúngico, las auxinas provocan represión de la expresión de la TDC (Goddijn et al., 1992).

El valor de K_m para triptofano de la TDC es de 75 μM y de 13 μM para el 5-hidroxitriptofano; el D-triptofano resulta ser un inhibidor no competitivo y la triptamina (producto de la reacción) es un inhibidor competitivo (Islas-Flores et al., 1994; Noé et al., 1984).

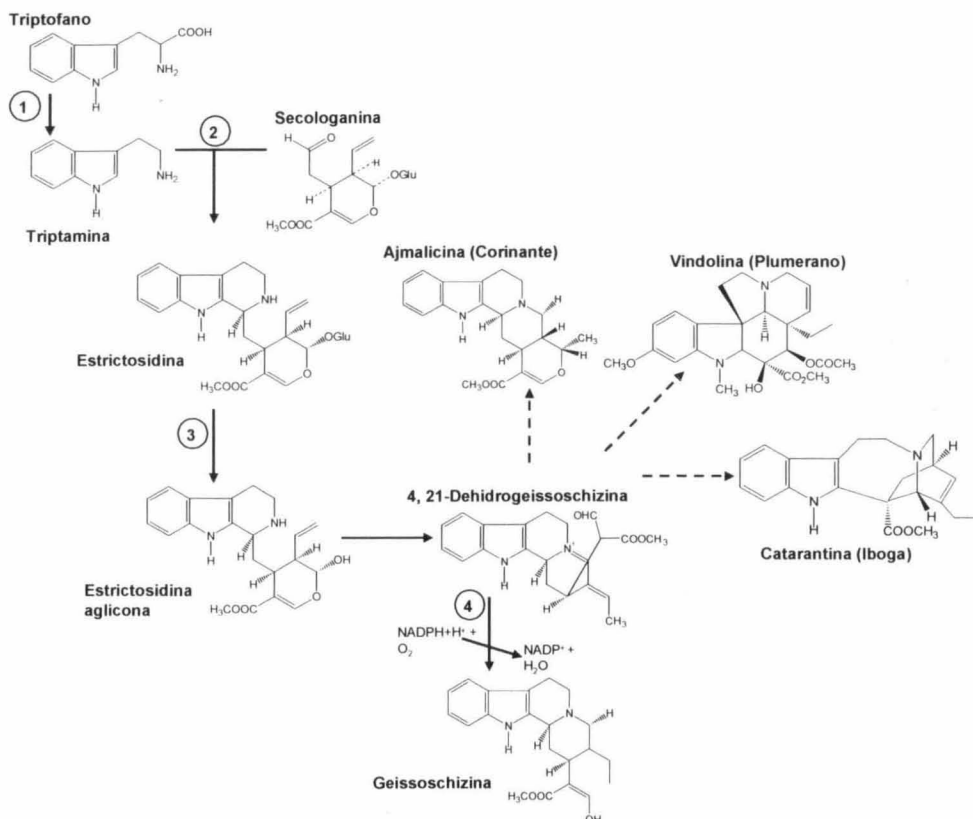


Figura 6. Biosíntesis de la estrictosidina, precursor universal de los alcaloides monoterpénico indólicos.

Los números indican la posición en la vía de las enzimas: Tryptofano decarboxilasa (1); estrictosidina sintasa (2); estrictosidina glucosidasa (3); geissoschizina deshidrogenasa (4). Las flechas cortadas indican varios pasos metabólicos (De Luca, 1993; Meijer et al., 1993c; Sundberg y Smith, 2002; Verpoorte et al., 1997).

La TDC, además de estar regulada por factores externos (ataques fúngicos, etc.), está también sujeta a regulación tejida específica y por desarrollo. En plántulas de *C. roseus* provenientes de semillas germinadas *in vitro*, bajo condiciones de oscuridad, su actividad es transitoria; comienza a detectarse a los 3 días, alcanza su máximo a los 5 días y luego declina (De Luca et al., 1988). En general en las plántulas, su actividad es mayor en las partes aéreas (siendo mayor en hojas jóvenes que en las maduras); mientras que en la planta adulta su actividad es mayor en las raíces (Pasquali et al., 1992).

A pesar de que la TDC deriva el triptofano al metabolismo secundario, la sobreexpresión del gen de la TDC en *C. roseus* no conlleva a una mayor producción de AMIs, a pesar de que ocurre un aumento en la cantidad de la proteína con actividad de TDC y en la producción de triptamina (Moreno et al., 1995). La sobresíntesis de triptamina, ya sea por medios bioquímicos o moleculares, no se ve reflejada en una mayor biosíntesis de alcaloides (Meijer et al., 1993c; Morris et al., 1985; Van der Heijden et al., 1989). Este resultado sugiere que la enzima TDC no es el único punto de regulación en la biosíntesis de estos metabolitos, confirmándose lo anterior en múltiples trabajos realizados con células en suspensión (Eilert et al., 1987a; Knobloch y Berlin, 1983; Mérillon et al., 1989). Por otra parte, y como era de esperarse, la actividad de la TDC puede disminuir sin afectar el contenido total de los AMIs. Moreno-Valenzuela et al. (1998), desdiferenciaron un cultivo de raíces transformadas a células en suspensión, y posteriormente las rediferenciaron a raíces. Durante este proceso, la actividad de la TDC se vio muy alterada. En el paso de raíces a células, la actividad de la TDC disminuyó en un orden de magnitud o más y los AMIs disminuyeron de 10 a 2 mg g⁻¹ PS durante este proceso. En las raíces rediferenciadas se encontró un nivel de actividad de TDC similar a la detectada en las células en suspensión, en tanto que la producción de los alcaloides se recuperó hasta en un 90% respecto a la producción inicial. Estos datos sugieren que no se requieren niveles elevados de actividad de TDC para producir los AMIs. Este resultado ha sido recientemente comprobado empleando cultivos transgénicos que sobreexpresan la actividad de TDC (Whitmer et al., 2002b).

Se ha aislado y caracterizado una clona genómica de la TDC a partir del genoma de *C. roseus*. El gen para esta enzima se encuentra presente en una sola copia (Goddijn et

al., 1993). La cuantificación de los niveles de TDC en plántulas y en suspensiones celulares muestran que tanto la expresión del gen como la actividad enzimática son inducibles en forma transitoria, sugiriendo que la actividad de la TDC está regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (De Luca et al., 1986; Eilert et al., 1987a; Knobloch et al., 1981; Pasquali et al., 1992).

La otra enzima, la SS, cataliza la condensación estereoespecífica de la secologanina con la triptamina para producir la 3- α (S)-estrictosidina. La enzima es altamente específica para sus dos sustratos, i. e. no acepta al ácido secologánico ni al triptofano como sustratos, pero muestra una ligera actividad con análogos sustituidos en las posiciones 5, 6 ó 7 de la triptamina. Hasta ahora no se tienen indicios de que esta enzima sea inhibida por alguno de los alcaloides, productos finales de esta ruta metabólica (Mizukami et al., 1979; Treimer y Zenk, 1979a; Treimer y Zenk, 1979b).

La SS fue purificada a finales de los setentas y se caracterizó como una enzima soluble de masa molecular entre 35 y 38 kDa (Mizukami et al., 1979). Diez años más tarde se reportó la identificación de cuatro diferentes formas de SS en células en suspensión y hojas de *C. roseus* (Pfizner y Zenk, 1989). Recientemente, De Waal et al. (1995), determinaron que el número de SSs es mayor; estos investigadores purificaron seis diferentes SSs, distinguibles por electroforesis empleando geles de alta concentración (20% de acrilamida). En *C. roseus* se han detectado siete isoenzimas de la SS, cuatro de las cuales pueden ser separadas por sus actividades catalíticas (diferente valor de K_m) y por su *pI* (entre 4.3 y 4.8). Pfizer y Zenk (1989), sugieren que por tratarse de una enzima glucosilada hay diferencias entre isoenzimas en la cadena hidrocarbonada. Por otra parte, se tienen evidencias de que la ocurrencia de isoformas no está relacionada con el estadio de desarrollo ni con alguna regulación tejido-específica, ya que se encontró que las isoformas se expresan tanto en células en suspensión, como en hojas, tallos y raíces (De Waal et al., 1995). Estos datos sugieren que las diferentes isoformas se deben a glucosilaciones de la proteína original, aunque no se han caracterizado los tipos de carbohidratos presentes (De Waal et al., 1995). Hasta el momento no se conocen las funciones, en la planta, de las diferentes isoformas de SS.

A diferencia de la TDC que muestra regulación tejido específica, la SS presenta niveles de actividad similares en los diferentes órganos de la planta (De Luca et al., 1988), y su actividad no se altera cuando los cultivos *in vitro* de *C. roseus* son transferidos al "medio de producción de alcaloides" (8% de sacarosa) (Knobloch et al., 1981). Esta enzima tampoco parece estar regulada por el proceso de desarrollo (De Luca et al., 1988), por lo que pareciera no estar sujeta a mecanismos de regulación. Sin embargo, durante el proceso descrito por Moreno-Valenzuela et al. (1998), sobre la dediferenciación-rediferenciación de raíces transformadas de *C. roseus*, la actividad de la SS disminuyó en un 60% cuando las raíces se dediferenciaron a células en suspensión. La actividad de la SS sólo se recuperó a la mitad, en tanto que el patrón de isoformas cambió, cuando las células se rediferenciaron a raíces, por lo que no es claro aún si esta enzima es regulada por el proceso de desarrollo (Moreno-Valenzuela et al., 1998).

Existen evidencias que sugieren que la SS no constituye un paso limitante en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en plántulas de *C. roseus*; se ha encontrado que al transferir un cultivo de células en suspensión de *C. roseus*, de un medio de mantenimiento a uno de inducción para producir alcaloides, el aumento en la acumulación de alcaloides no correlaciona con un incremento en la actividad de la SS; sin embargo, en callos de *C. roseus* transformados con el gen de la SS se observó una correlación directa entre el aumento de la actividad enzimática y la acumulación de alcaloides (Canel et al., 1998; Kutchan, 1993). Resultados similares se han obtenido en *Cinchona ledgeriana* (Aerts et al., 1990; Aerts et al., 1994) y en plántulas de *C. roseus* (Aerts et al., 1994). Lo anterior sugiere la posibilidad de que la SS es un punto de regulación de esta ruta metabólica; sin embargo, la información es poco precisa y en ocasiones contradictoria, lo cual puntualiza la necesidad de profundizar en las investigaciones que permitan establecer su papel real en la biosíntesis de los AMIs.

La SS es codificada por un solo gen, sugiriendo que las isoformas son el resultado de modificaciones postraduccionales de un precursor simple (McKnight et al., 1990; Pasquali et al., 1999); esta enzima fue la primera del metabolismo de los AMIs en ser clonada, primero de *R. serpentina* (Kutchan et al., 1988) y luego de *C. roseus* (McKnight et al., 1990). El mensajero para la SS presenta una región que codifica para

un péptido señal de 31 aminoácidos que la dirige a la vacuola (Pasquali et al., 1992), lo cual apoya diversos ensayos que sugieren que se trata de una enzima vacuolar (McKnight et al., 1991; Stevens et al., 1993).

Doireau et al. (1987), y Stevens et al. (1992), han medido la actividad de la TDC y de la SS, así como las concentraciones de triptamina en cultivos de células de *C. roseus* y de otras especies. Estos autores observaron que existe una acumulación de triptamina a pesar de haber una elevada actividad de SS; estos resultados apoyan la hipótesis de que la limitante para la biosíntesis de estrictosidina y sus múltiples derivados es el contenido del precursor terpénico secologanina. Los resultados de nuestro grupo de trabajo (Moreno-Valenzuela et al., 1998), también sugieren que los principales puntos de regulación para la producción de la estrictosidina se ubican en alguna(s) enzima(s) que participan en la biosíntesis de la secologanina.

BIOSÍNTESIS DE LOS PRIMEROS AMIS

Después de la síntesis de estrictosidina el siguiente paso en la biosíntesis de los AMIs es la desglucosilación de la estrictosidina por la estrictosidina β -D-glucohidrolasa (EC 3.2.1.105) para producir estrictosidina-aglicona (Reacción 3, Figura 6), un producto inestable que después de varios rearrreglos, que aún no se conocen con precisión, se convierte en 4,21-didehidrogeissoschizina, la cual a su vez es reducida a geissoschizina por la geissoschizina: NADP 4,21 oxidorreductasa (EC 1.3.1.36) (Reacción 4, Figura 6) (Pfitzner y Stöckigt, 1982).

La estrictosidina β -D-glucohidrolasa es una glucoproteína localizada en el retículo endoplásmico (Geerlings et al., 2000); es altamente específica para la estrictosidina o su derivado 10-metoxi y en su forma nativa parece encontrarse en forma de agregados, en los cuales cada subunidad de 63 kDa se une a las otras por interacciones hidrofóbicas (Luijendijk et al., 1998).

Se ha demostrado que la estrictosidina β -D-glucohidrolasa se encuentra codificada por un solo gen que ha sido clonado recientemente y se expresa en diferentes niveles en flores, tallos, hojas y raíces, lo que sugiere una regulación tejido específica; además, la actividad enzimática cuantificada en cada órgano es proporcional al nivel de ARNm

detectado (Geerlings et al., 2000). Su expresión es inducida por metil jasmonato (MeJa), y en los cultivos que acumulan AMIs la actividad de esta enzima es elevada (Stevens et al., 1992), de ahí que se le considere un paso clave en la biosíntesis de estos compuestos.

Por otra parte, la información sobre la geissoschizina: NADP 4,21 oxidorreductasa es escasa, sólo se tiene el reporte de una purificación parcial a partir de células en suspensión de *C. roseus* y en comparación con otras enzimas de esta vía su actividad específica es muy baja (Pfitzner y Stöckigt, 1982).

A partir de la 4, 21-didehidrogeissoschizina la ruta de biosíntesis que lleva a la biosíntesis de ajmalicina, catarantina y tabersonina se encuentra poco documentada.

La ruta biosintética hacia la producción de ajmalicina comienza cuando la 4, 21-didehidrogeissoschizina es convertida en catenamina (Reacción 1, Figura 7) por la catenamina sintasa (Meijer et al., 1993c). La catenamina es reducida a ajmalicina por la catenamina reductasa (Reacción 2, Figura 7). Las enzimas involucradas en esta parte de la vía se han estudiado muy poco y sólo se sabe que la catenamina reductasa es dependiente de NADPH (Felix et al., 1981). Hasta ahora se han separado dos isoenzimas, una de las cuales interviene en la biosíntesis de la ajmalicina y la otra convierte la forma iminium de la catenamina en tetrahidroalstonina (Meijer et al., 1993c). Se desconoce cómo se regulan estas dos enzimas.

La catenamina reductasa (Reacción 2, Figura 7), que cataliza la reducción de la catenamina a ajmalicina, tiene un pH óptimo de 6.6 y una masa molecular de 81 kDa. La caracterización de la enzima tetrahidroalstonina sintasa (Reacción 4, Figura 7), la cual cataliza la formación de tetrahidroalstonina a partir de la forma iminium de la catenamina, muestra que ambas enzimas poseen el mismo pH óptimo y la misma masa molecular. La forma parcialmente purificada de la tetrahidroalstonina sintasa muestra una K_m de 62 μM para la catenamina y utiliza al NADPH pero no al NADH como cofactor (Hemscheidt y Zenk, 1985).

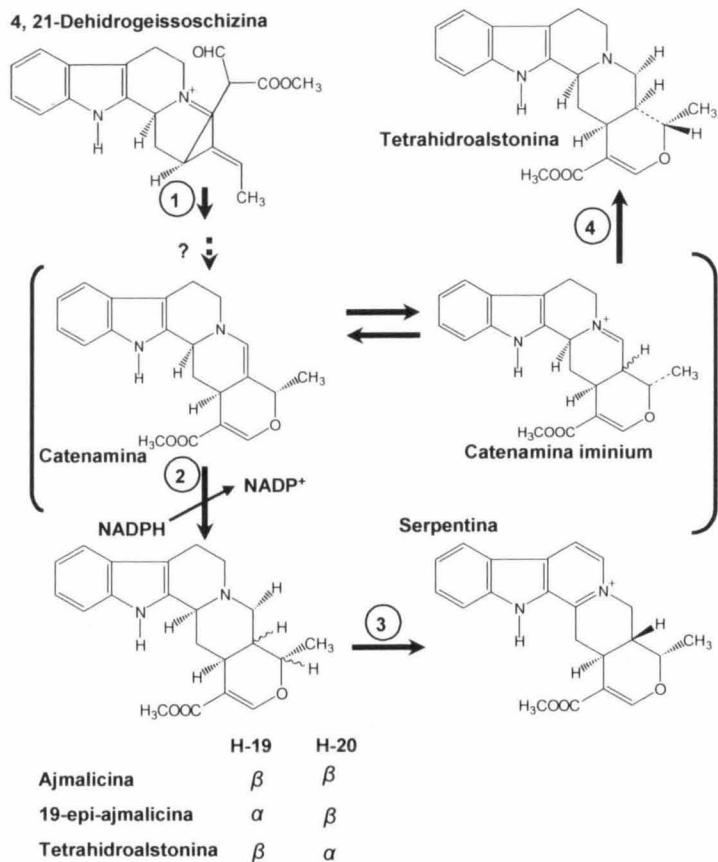


Figura 7. Biosíntesis de la ajmalicina y serpentina.

Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: catenamina sintasa (1), catenamina reductasa (2); peroxidasa inespecífica (3), y tetrahidroalstonina sintasa (4). Las flechas cortadas indican varios pasos metabólicos. Existe la posibilidad de que la ruta no inicie con la 4,21-dehidrogeissoschizina, sino que inicie con la 20,21-aldehído de dehidrocorinanteína. (Roberts, 1998; Sundberg y Smith, 2002; Verpoorte et al., 1997).

La ajmalicina es oxidada a serpentina por peroxidasas básicas que se encuentran dentro de las vacuolas (Blom et al., 1991) y se sabe que su producción esta fuertemente influida por la luz (Loyola-Vargas et al., 1992). Hasta ahora no se han purificado estas peroxidasas básicas ni tampoco se tienen datos sobre su

especificidad, pues la ajmalicina en presencia de peroxidasa de rábano es oxidada a serpentina. Apparently esta conversión permite a las células vegetales mantener la ajmalicina almacenada dentro la vacuola. En células en suspensión de *C. roseus* la oxidación de la ajmalicina parece estar regulada por luz, pues en su presencia los cultivos producen una gran cantidad de serpentina mientras que los cultivados en oscuridad sólo acumulan ajmalicina (Blom et al., 1991; Loyola-Vargas et al., 1992).

De Luca (1993), ha sugerido que la reducción de la geissoschizina por la geissoschizina NADP⁺ 4,21 oxidorreductasa es reversible (Reacción 4, Figura 6) y que la ramificación de la vía puede ocurrir a partir de una modificación diferente a la ciclización de la catenamina; este último producto se reduce para formar ajmalicina, en tanto que la forma iminium también se reduce para formar tetrahidroalstonina (Reacción 4, Figura 7) (Hemscheidt y Zenk, 1985).

Mientras que la catarantina se ha detectado en la mayoría de los cultivos *in vitro* (Drapeau et al., 1987; Hong et al., 1997; Lee y Shuler, 2000; Zhao et al., 2001c), la vindolina hasta hace poco tiempo sólo se había determinado en el nivel de trazas (Misawa y Goodbody, 1996; O'Keefe et al., 1997). Recientemente se ha reportado la selección de una línea de callos de *C. roseus* capaz de acumular hasta 0.45 mg⁻¹ g de PS de vindolina en cultivos de callos incubados con luz (Zhao et al., 2001b).

La biosíntesis y acumulación de vindolina está asociada a la luz y al estadio de desarrollo de la planta, en tanto que la expresión de las enzimas para su biosíntesis es órgano-específica, (De Luca et al., 1986; De Luca et al., 1988; De Luca et al., 1989; De Luca, 1993; De Luca y Cutler, 1987; De Luca y St-Pierre, 2000; Fahn et al., 1985a; Fahn et al., 1985b; Vázquez-Flota et al., 1997; Vázquez-Flota et al., 2002; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a).

La 4, 21-didehidrogeissoschizina representa también el precursor de inicio de biosíntesis de la ajmalina, esta es una molécula altamente compleja y que contiene nueve carbonos quirales (Dogru et al., 2000). La biosíntesis de la ajmalina involucra cerca de 10 pasos enzimáticos (Figura 8). El primer paso metabólica que deriva 4,21-didehidrogeissoschizina a la biosíntesis de ajmalina es la oxidación de este compuesto a geissoschizina, en una reacción catalizada por la geissoschizina deshidrogenasa (EC

1.3.1.36) (Reacción 1, Figura 8), la cual adiciona, de forma estereoespífica, un hidrógeno en el carbono 21 en la posición $\square$. La enzima ha sido purificada 35 veces de suspensiones celulares de *C. roseus*; la enzima requiere un pH óptimo de 7.6, y el valor de su K_m para geissoschizina y para NADP⁺ es de 83 μ M y 77 nM, respectivamente (Pfitzner y Stöckigt, 1982).

La polineuridina aldehído esterasa (EC 3.1.1.78) cataliza la conversión del aldehído polinueridina a 16-*epi*-vellosimina (Reacción 3, Figura 8) (Dogru et al., 2000). Produce un precursor inmediato para la biosíntesis del esqueleto ajmalano que conduce a la biosíntesis de ajmalina; esta enzima ha sido purificada recientemente 423 veces a homogeneidad a partir de suspensiones celulares de *R. serpentina*, posee una masa molecular de 30 kDa y un *pI* de 5.9; ha sido clonada mediante el escrutinio de una biblioteca de ADNc. La enzima pura tiene una actividad específica de 160.8 nkat mg prot.⁻¹, es altamente específica para la polineuridina aldehído como sustrato para el cual tiene una K_m de 0.83 mM y pertenece a la familia de las α/β -hidrolasas (Dogru et al., 2000).

El siguiente paso en la ruta de biosíntesis de la ajmalina, es la biosíntesis de vinorina y es catalizada por la acil-CoA:16-epivellosimina O-acetiltransferasa (ciclizante) (nombre común: vinorina sintasa) (EC 2.3.1.160) (Reacción 4, Figura 8). Esta enzima ha sido purificada 160 veces de suspensiones celulares de *R. serpentina*. Entre sus propiedades más interesantes se encuentra su elevado pH (8.5), temperatura óptima de 35°C, un *pI* de 4.4 y una masa molecular de 31 kDa. La K_m para sus sustratos 16-*epi*-vellosimina y acetil-CoA es de 19.4 y 64 μ M, respectivamente, y al igual que otras enzimas de la ruta de biosíntesis de la ajmalina es altamente específica para sus sustratos (Pfitzner et al., 1986).

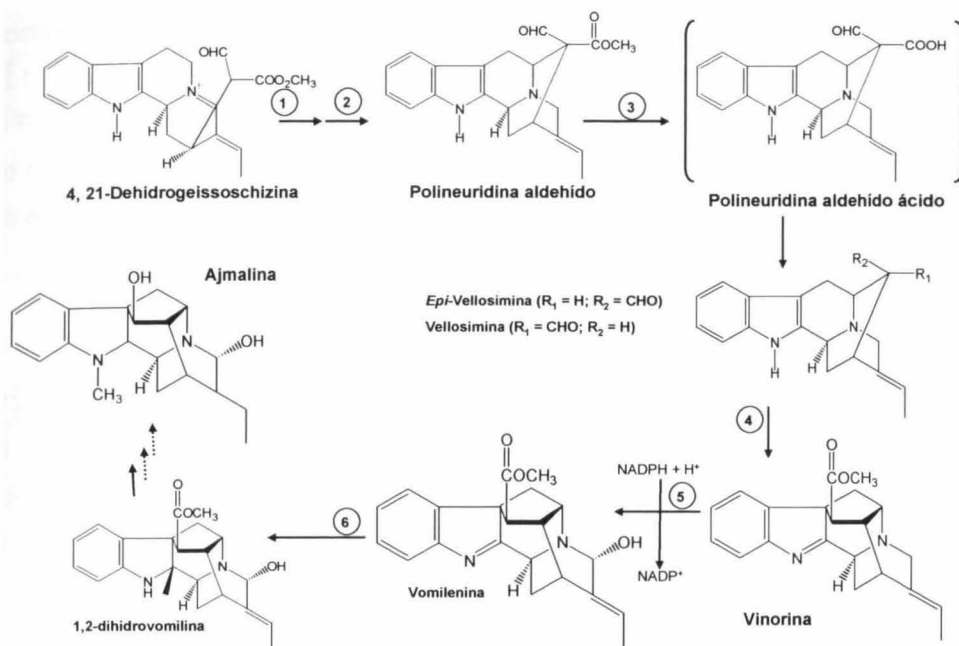


Figura 8. Biosíntesis de la ajmalina.

Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: geissoschizina deshidrogenasa (1), vomilelina reductasa (2), polineuridina aldehído esterasa (3), vinorina sintasa (4), vinorina hidroxilasa (5); 1,2-dihidrovomilenina:NADP⁺ oxidoreductasa (6). Las flechas punteadas indican que no se conocen las enzimas que catalizan dicha transformación. Varias flechas indican varios pasos metabólicos (Dogru et al., 2000). (von Schumann et al., 2002).

La vinorina es hidroxilada a vomilenina por la vinorina, NADPH:oxígeno oxidoreductasa (21 α -hidrolizante)(EC 1.14.13.75) (Reacción 5, Figura 8). La enzima es completamente dependiente de NADPH y oxígeno molecular, se encuentra localizada en la fracción microsomal y es inhibida por los inhibidores típicos de las proteínas citocromo P450, por lo que seguramente se trata de una citocromo P450 monooxigenasa. La enzima tiene un pH óptimo de 8.3, y su K_m para el NADPH y la vinorina es de 3 y 26 μM , respectivamente (Falkenhagen y Stöckigt, 1995).

El último paso conocido de la biosíntesis de ajmalina es la saturación del doble enlace de la indolmina de la vomilenina en forma estereoespecífica para producir la 2 β (R)-1,2-dihidrovomilenina por medio de la 1,2-dihidrovomilenina:NADP⁺ oxidorreductasa (EC 1.5.1.32) (Reacción 6, Figura 8). La enzima que cataliza la reacción de reducción es dependiente de NADPH y ha sido aislada recientemente de suspensiones celulares de *R. serpentina*; tiene una masa molecular de 43 kDa (von Schumann et al., 2002).

Biosíntesis de catarantina y tabersonina

La biosíntesis de la catarantina así como la de la tabersonina inicia en el 20, 21-aldehído de dehidrocorinanteína y procede posiblemente vía catenamina to estemmadenina y dehidrosecodina, el precursor de los alcaloides con esqueletos *iboga* o *Aspidosperma* (Figura 9) (Sundberg y Smith, 2002). No se conoce nada acerca de la naturaleza de las enzimas involucradas en la conversión de la catenamina a catarantina y tabersonina.

Biosíntesis de vindolina

Las suspensiones celulares de *C. roseus* poseen la capacidad de sintetizar catarantina y tabersonina (Moreno et al., 1995; Verpoorte et al., 1993) y de transformar tabersonina en 16-metoxitabersonina (St-Pierre y De Luca, 1995), pero no poseen la actividad enzimática necesaria para la biosíntesis de vindolina (De Carolis et al., 1990; De Luca y Cutler, 1987; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). Por esta razón, una gran cantidad de trabajos se han canalizado al estudio de las enzimas y los mecanismos de regulación involucrados en la biosíntesis de vindolina.

Vázquez-Flota et al. (1994), han determinado que cultivos de raíces transformadas retados con MeJa aumentan la producción de catarantina. Estos resultados sugieren que probablemente algunas de las enzimas que están participando en la biosíntesis de este alcaloide estén sujetas a regulación y pueden ser utilizados para el estudio de la ruta de biosíntesis de la catarantina (Figura 9).

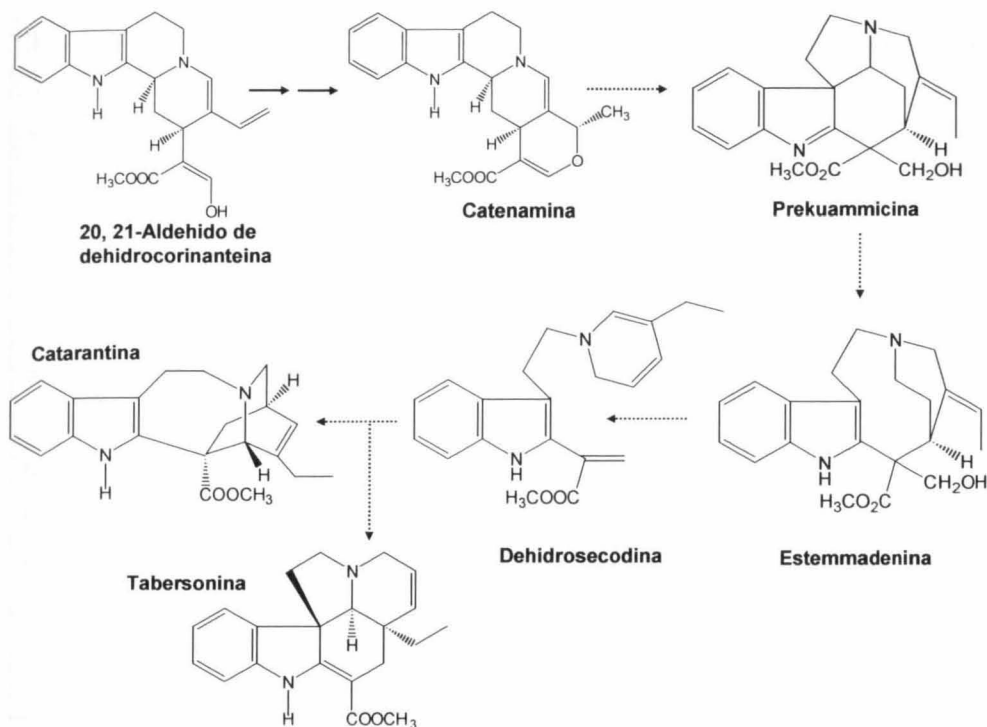


Figura 9. Biosíntesis de la catarantina y tabersonina.

Las flechas punteadas indican pasos metabólicos y enzimas desconocidas. Las flechas continuas indican varios pasos metabólicos (Sundberg y Smith, 2002).

La biosíntesis de vindolina a partir de la tabersonina consta de seis pasos enzimáticos (Figura 10) catalizados por la tabersonina NADPH:oxígeno oxidorreductasa (16-hidroxilante) (EC 1.14.13.73) (nombre común: tabersonina 16-hidroxilasa), la S-adenosil-L-metionina:11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.94) (nombre común: 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa), una hidroxilasa no caracterizada, la S-adenosil-L-metionina:16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.99) (nombre común: 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa), la desacetoxivindolina,2-oxoglutarato:oxígeno oxidorreductasa (4β-hidroxilante) (EC 1.14.11.20) (nombre

común: desacetoxivindolina-4-hidroxilasa), y la acetilCoA:17-O-desacetilvindolina 17-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.107) (nombre común: 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa) (De Carolis et al., 1990; De Carolis y De Luca, 1993; De Luca et al., 1986; De Luca et al., 1992; De Luca y Cutler, 1987; Fahn et al., 1985a; Fahn et al., 1985b; St-Pierre y De Luca, 1995; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a).

Los resultados reportados sugieren que la ruta de biosíntesis de la vindolina está regulada por los procesos de desarrollo y restringida a las partes aéreas, principalmente en hojas jóvenes de plantas adultas y en los cotiledones de plántulas en desarrollo, pues es en estos tejidos en los que se han detectado los mayores niveles de ARNm y la actividad más elevada de estas enzimas (Figura 12) (De Luca et al., 1985; St-Pierre y De Luca, 1995; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). Esta presencia va disminuyendo con la edad y con el tipo de órgano, siendo ya poco preponderante en hojas adultas, tallos, raíces y yemas florales. En cultivos celulares de *C. roseus* se ha detectado actividad de tabersonina 16-hidroxilasa y de 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa pero no de 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa (De Luca y Cutler, 1987; St-Pierre y De Luca, 1995; Vázquez-Flota et al., 2002).

La regulación de esta vía ocurre por medio de un mecanismo complejo y a diferentes niveles. Esta regulación comprende desde factores que afectan la presencia de estas enzimas en los niveles transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, hasta su localización dentro de la célula, del tipo de célula y, como se mencionó con anterioridad, la edad del tejido.

En plántulas de *C. roseus* se ha reportado que las enzimas tabersonina 16-hidroxilasa, (16-metoxi-2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina N-metiltransferasa, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa, alcanzan su máxima actividad seis días después de la imbibición (De Luca et al., 1986). Cuando estas plántulas son tratadas con luz, las enzimas tabersonina 16-hidroxilasa y desacetoxivindolina-4-hidroxilasa aumentan su actividad seis veces, en tanto que la 17-O-desacetilvindolina-17-O-acetiltransferasa lo hacen 10 veces (De Carolis et al.,

1990; De Luca et al., 1988; St-Pierre y De Luca, 1995). Este efecto de la luz sobre la actividad de las enzimas desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina-17-O-acetiltransferasa, es mediado por fitocromo ya que son activadas por un pulso de luz roja (660 nm) y esta activación es revertida por un pulso de luz roja lejana (710 nm) (Aerts y De Luca, 1992; Vázquez-Flota y De Luca, 1998b). La 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina-*N*-metiltransferasa es la única enzima de esta vía cuya actividad no es afectada por la luz (De Luca et al., 1988).

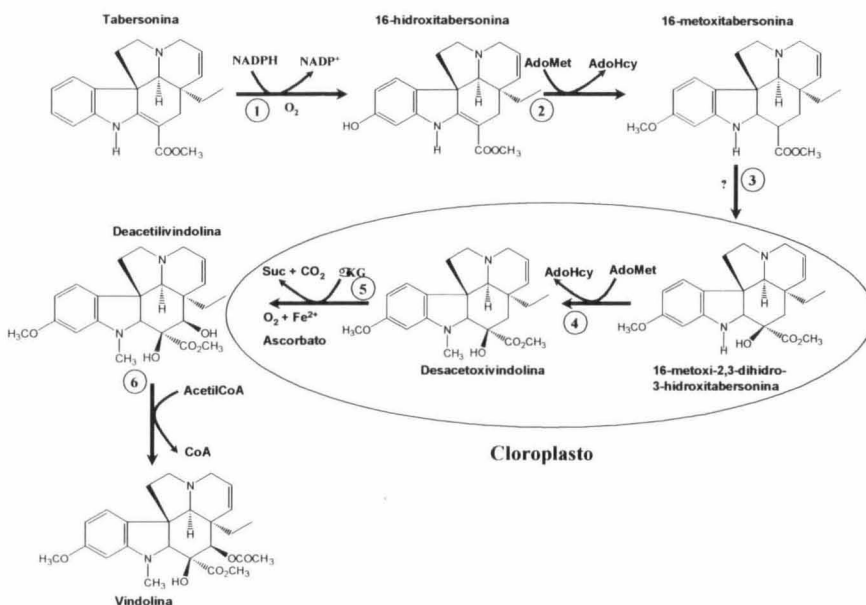


Figura 10. Biosíntesis de la vindolina. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: tabersonina 16-hidroxilasa (1), 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa (2), hidroxilasa no caracterizada (3), 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina *N*-metiltransferasa (4), desacetoxivindolina 4-hidroxilasa (5), 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa (6). (De Carolis et al., 1990; De Carolis y De Luca, 1993; De Luca et al., 1986; De Luca et al., 1992; De Luca et al., 1998; De Luca y Cutler, 1987; Fahn et al., 1985a; Fahn et al., 1985b; Laflamme et al., 2001; Roberts, 1998; Schröder et al., 1999; St-Pierre y De Luca, 1995; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a; Vázquez-Flota et al., 2000b).

De todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de la vindolina, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa es la más interesante. En plántulas de *C. roseus* los transcritos del gen *D4h* y la proteína misma ya se encuentran presentes en la oscuridad. Al exponer las plántulas a la luz, la actividad enzimática de la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y los niveles de los transcritos del gen *D4h* se elevan significativamente. Los resultados reportados sugieren que este aumento en la actividad se debe a una isoenzima de *pI* 4.7, inactiva en la oscuridad, y la cual, en presencia de la luz, sufre una modificación post-traducciona que la torna más ácida y activa (Vázquez-Flota et al., 1997; Vázquez-Flota y De Luca, 1998b). De manera coordinada la luz también induce la transcripción del gen *Dat* y su producto, la 17-O-desacetilvindolina-17-O-acetiltransferasa, eleva su actividad enzimática (St-Pierre et al., 1998).

La TDC y la SS en estas plántulas exhiben un pico de actividad en todos los tejidos a los 5 días después de la imbibición y ninguna de las dos es estimulada por luz (De Luca et al., 1986; De Luca et al., 1988). Por otro lado, el MeJa induce la acumulación de vindolina y eleva las actividades enzimáticas de la TDC, la SS, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y la 17-O-desacetoxivindolina-17-O-acetiltransferasa (Aerts et al., 1994).

Tabersonina NADPH:oxígeno oxidorreductasa (16-hidroxilante) (EC 1.14.13.73).

Esta enzima es una monooxigenasa P450 localizada en el retículo endoplásmico que requiere NADPH, O₂ y tabersonina para llevar a cabo su función (Reacción 1, Figura 10). Esta enzima es inhibida por CO, clotrimazol, miconazol y por citocromo C (St-Pierre y De Luca, 1995).

S-adenosil-L-metionina:11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.94). Esta metiltransferasa ha sido determinada tanto en cultivos celulares de *C. roseus* (Fahn et al., 1985b), como en plantas de la misma especie (De Luca et al., 1986). La enzima requiere (S)-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilos y es altamente específica para la 16-hidroxitabersonina (Reacción 2, Figura 10).

S-adenosil-L-metionina:16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina

N-

metiltransferasa (EC 2.1.1.99). Esta enzima se encuentra localizada en los tilacoides de los cloroplastos (De Luca y Cutler, 1987), requiere (S)-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo (Reacción 4, Figura 10) y es altamente específica para su sustrato, la 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina (De Luca et al., 1987). La enzima ha sido parcialmente purificada tiene una masa molecular aparente de 60 kDa y es absolutamente dependiente de la presencia de un doble enlace en la posición 2 (Dethier y De Luca, 1993).

Desacetoxivindolina,2-oxoglutarato:oxígeno oxidorreductasa (4- α -hidroxilante (EC 1.14.11.20).

Esta enzima es una dioxigenasa α -cetoglutarato dependiente y cataliza, en el citoplasma, la adición de O₂ a la desacetoxivindolina y al α -cetoglutarato produciendo deacetilvindolina, succinato y CO₂; esta es la penúltima reacción de biosíntesis de la vindolina (Reacción 5, Figura 10) (De Carolis et al., 1990; De Carolis y De Luca, 1993; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). Esta enzima es altamente específica, únicamente hidroxila el C-4 de la desacetoxivindolina para formar la desacetilvindolina; la adición de ácido ascórbico y iones ferrosos aumentan su actividad. La enzima, purificada a homogeneidad aparente a partir de hojas jóvenes de *C. roseus*, es un monómero con una masa molecular de aproximadamente 45 kDa, y posee tres isoformas con *pI* de 4.6, 4.7 y 4.8.

La cinética de interacción del sustrato con la enzima y los estudios de inhibición del producto, sugieren que la reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo Ter-Ter ordenado. En este mecanismo, el primer sustrato es el α -cetoglutarato, seguido por el O₂ y al final la desacetoxivindolina; los valores de *K_m* para el α -cetoglutarato, el O₂ y la desacetoxivindolina son de 45, 45 y 0.03 μ M, respectivamente (De Carolis et al., 1990; De Carolis y De Luca, 1993; De Carolis y De Luca, 1994a; De Carolis y De Luca, 1994b).

Si bien esta enzima se encuentra en el nivel de trazas en plántulas etioladas de *C. roseus*, su actividad aumenta sustancialmente con la presencia de la luz y con ella, la biosíntesis de vindolina (Vázquez-Flota y De Luca, 1998a; Vázquez-Flota et al., 2000b). Las plántulas etioladas comienzan a acumular cantidades importantes de

transcritos de la hidroxilasa y de la proteína, pero prácticamente no hay actividad durante los diferentes estadios del desarrollo. Por el contrario, el tratamiento con luz produce un aumento importante en la actividad de la enzima, pero el aumento en los niveles del transcrito y de la proteína es muy pequeño. Estos datos sugieren que el punto de regulación por luz en la hidroxilasa se encuentra en el nivel post-traducciona (Vázquez-Flota y De Luca, 1998a; Vázquez-Flota et al., 2000b).

Usando oligonucleótidos degenerados para el escrutinio de una genoteca de ADNc de plántulas de *C. roseus* se obtuvieron 3 clonas, de las cuales dos representan alelos dimórficos cuyas secuencias difieren únicamente en el extremo 3' no traducido (Vázquez-Flota et al., 1997).

AcetilCoA:17-O-desacetilvindolina 17-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.107). El último paso en la biosíntesis de la vindolina es catalizado por la 17-desacetilvindolina-O-acetiltransferasa dependiente de acetil-CoA (Reacción 6, Figura 10) (De Luca et al., 1985; Fahn et al., 1985a). La aparición de la enzima se encuentra regulada por desarrollo en plántulas de *C. roseus* y la actividad enzimática aparece sólo después de un tratamiento con luz de las plántulas etioladas (De Luca et al., 1985).

Esta acetiltransferasa es una enzima dimérica que ha sido purificada a homogeneidad y tiene una masa molecular de 32/21 kDa (Power et al., 1990) o 26/20 kDa (Fahn y Stöckigt, 1990). La enzima pura está formada por cinco isoformas con *pI* en el rango de 4.3 y 5.4 (Fahn y Stöckigt, 1990; Power et al., 1990). Los valores de K_m para la acetil-CoA y para la desacetilvindolina son de 5.4 y 6.5 μM y de 0.7 y 1.3 μM , para las enzimas parcialmente purificadas (De Luca et al., 1985) y purificadas a homogeneidad, respectivamente (Fahn y Stöckigt, 1990; Power et al., 1990). Los estudios de inhibición muestran que la CoA es un poderoso inhibidor competitivo de la desacetilvindolina (K_i = 8 μM) (De Luca et al., 1985) similar a la tabersonina (50% de inhibición a 45 μM) (Fahn y Stöckigt, 1990); mientras que la enzima no es inhibida significativamente por la vindolina hasta concentraciones de 2 mM (De Luca et al., 1985; Fahn y Stöckigt, 1990).

El uso de oligonucleótidos degenerados para las regiones codificantes de los extremos amino y carboxilo terminales y la amplificación posterior de su producto por PCR

permitió obtener una sonda con la cual se realizó el escrutinio de una biblioteca de ADN genómico de *C. roseus*. Con lo anterior se obtuvo una clona que codifica para una proteína de 439 aminoácidos con la masa molecular predicha de 49,890 Da. La clona, conteniendo una extensión de seis histidinas en el amino terminal, se expresó en *E. coli* mostrando niveles elevados de actividad. La actividad de la enzima recombinante es completamente dependiente de la presencia de desacetilvindolina o de acetil-CoA. El análisis por "Western blot" de la proteína recombinante de la de hojas de *C. roseus*, rinde una sola banda de 50 kDa de masa molecular, lo que sugiere que el heterodímero aislado durante la purificación es probablemente un artefacto de la técnica empleada (De Luca et al., 1998).

Si bien aún no se ha llevado a cabo la determinación cinética de las enzimas de la biosíntesis de la vindolina, existe suficiente evidencia para decir que los pasos limitantes de esta ruta son las dos reacciones de hidroxilación (Reacciones 1 y 5, Figura 10) (De Luca et al., 1998).

BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES DIMÉRICOS

La biosíntesis de los alcaloides bisindólicos se inicia con la condensación de la catarantina y la vindolina, para formar la 3',4'-anhidrovindblastina, el precursor de la vindblastina, la vincristina, la leurosina y la catarina (Figura 11). Esta reacción, al igual que la oxidación posterior, parece ser llevada a cabo por peroxidasas inespecíficas, lo que parece indicar que la limitante de la biosíntesis de este tipo de alcaloides resulta ser la disponibilidad de los precursores monoméricos (Endo et al., 1988; Kutney et al., 1981; Kutney et al., 1988; Misawa et al., 1988; Smith et al., 2003). Sin embargo, recientemente se ha purificado una enzima que cataliza específicamente dicho paso y ha sido denominada α -3', 4'-anhidrovindblastina sintasa (AVLBS) (Reacción 1, Figura 11). Esta enzima, dependiente de H_2O_2 , que ha sido purificada a homogeneidad aparente (192 veces) a partir de hojas de *C. roseus*, tiene una masa molecular de 45.4 kDa y un pH óptimo de 6.5, si bien también presenta una actividad sustancial en el rango de pH de 4 – 5, el cual es el rango de pH comúnmente determinado en las vacuolas. Además de su actividad de AVLBS la enzima pura tiene actividad de peroxidasa. Su espectro visible de absorbancia muestra máximos de absorción a 404,

501 y 633 nm sugiriendo que se trata de una proteína con hierro en un grupo hemo y que pertenece a la familia de las peroxidasas (Sottomayor et al., 1998).

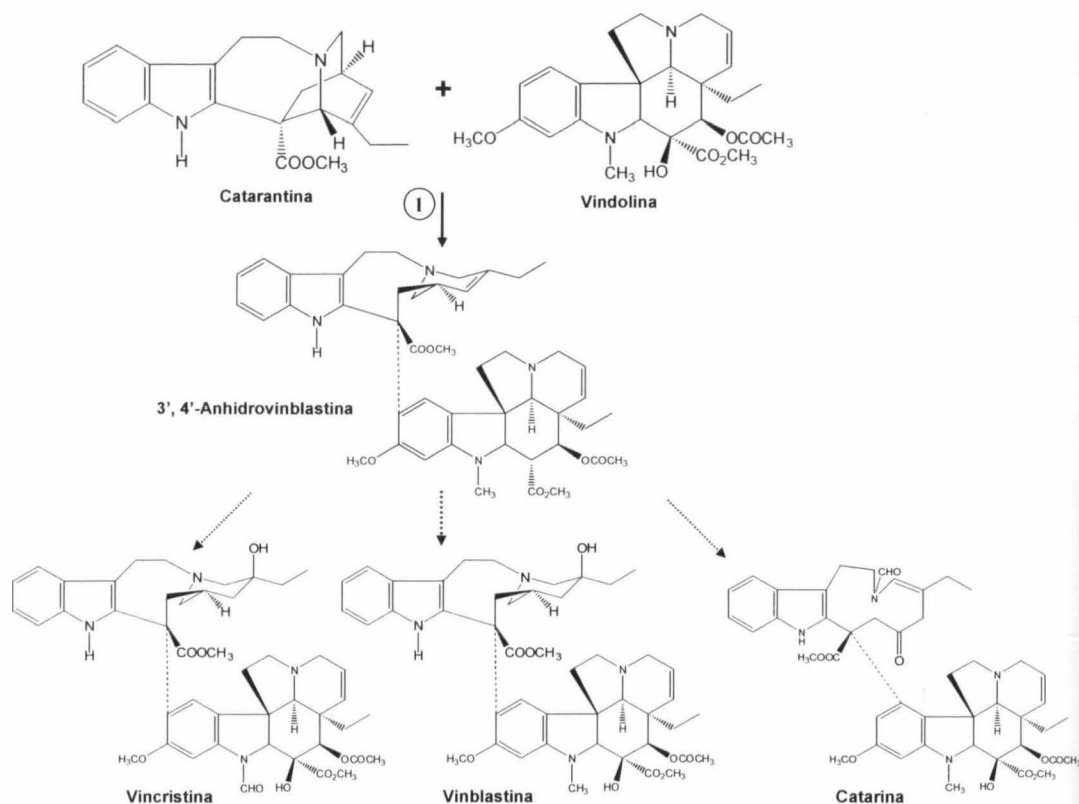


Figura 11. Biosíntesis de los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina.

Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: a-3',4'-anhidrovinblastina sintasa (1). (Endo et al., 1988; Kutney et al., 1981; Kutney et al., 1988; Misawa et al., 1988; Smith et al., 2003; Sottomayor et al., 1998; Verpoorte et al., 1997). Las flechas punteadas indican que las enzimas correspondientes no han sido caracterizadas y/o se desconocen los pasos metabólicos.

COMPARTAMENTALIZACIÓN

La biosíntesis de los AMIs es un proceso altamente compartimentalizado. La compartimentalización, y la localización en diferentes células de las distintas enzimas involucradas en esta vía metabólica, se pueden considerar como otro mecanismo de regulación, ya que esta ubicación requiere el transporte de los diferentes metabolitos de un punto a otro para su conversión. Prácticamente todos los compartimentos de la célula y diferentes tipos celulares intervienen en el proceso, e. g. el mensajero para la SS presenta una región que codifica para un péptido señal de 31 aminoácidos que lo dirige a la vacuola (McKnight et al., 1991; Pasquali et al., 1992); lo anterior apoya diversos ensayos que sugieren que se trata de una enzima vacuolar (McKnight et al., 1991; Stevens et al., 1993). Por otra parte, las enzimas estrictosidina glucosidasa y tabersonina 16-hidroxilasa se localizan en el retículo endoplásmico (Geerlings et al., 2000; St-Pierre y De Luca, 1995).

Las reacciones catalizadas por las enzimas TDC, 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa se llevan a cabo en el citoplasma (De Luca y Cutler, 1987; St-Pierre y De Luca, 1995; Vázquez-Flota et al., 1997); la reacción mediada por la enzima AVLBS se realiza en la vacuola (Sottomayor et al., 1996). La 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa se encuentra en los tilacoides de los cloroplastos (Figura 13) (De Luca y Cutler, 1987).

Los ARNm para la TDC y la SS se localizan en las células de la epidermis de los tallos, hojas y yemas florales, así como en las células corticales y del protoderma alrededor del meristemo apical de la raíz (St-Pierre et al., 1999). En las raíces, la actividad enzimática de la TDC se encuentra localizada en el citoplasma y en la región apoplástica de las células meristemáticas, así como en las células de la epidermis de la cápside de la raíz (Moreno-Valenzuela et al., 2003).

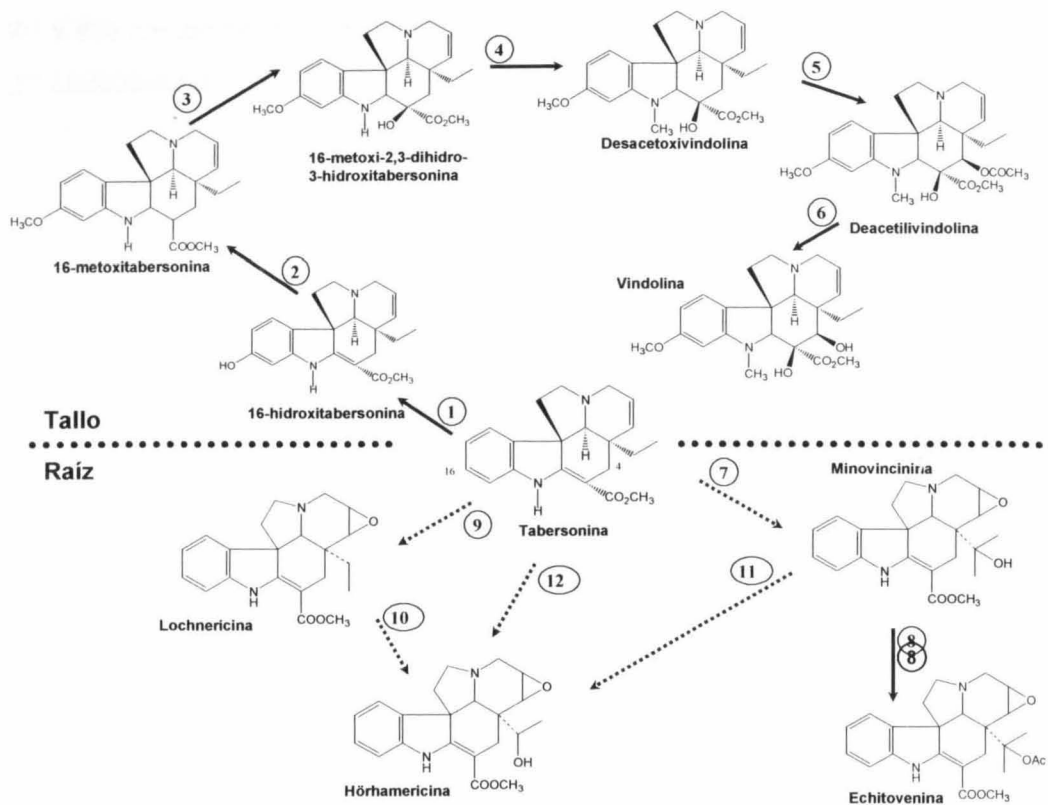


Figura 12. Compartimentalización de la biosíntesis de la vindolina y otros AMLs. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: tabersonina 16-hidroxilasa (1), (S)-adenosil-L-metionina-16-hidroxitabersonina-O-metiltransferasa (2), hidroxilasa no caracterizada (3), S-adenosil-L-metionina: 2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferasa (4), desacetoxivindolina 4-hidroxilasa (5), acetil CoA: desacetilvindolina 4-O-acetiltransferasa (6), Tabersonina 19-hidroxilasa (7) y (10), minovincinina 19-O-acetiltransferasa (8), hidroxilasas (9) y (11) (De Luca et al., 1998; Kutney et al., 1980; Laflamme et al., 2001; Schröder et al., 1999; Shanks et al., 1998; Vázquez-Flota et al., 2000b).

Los ARNm de la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y la 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa se localizan sólo en los idioblastos y en las células laticíferas de las hojas, tallos y yemas florales (St-Pierre et al., 1999). Lo anterior sugiere mecanismos de translocación de los intermediarios de una célula a otra, para la biosíntesis de estos

metabolitos (St-Pierre et al., 1999). Más importante aún es el hecho de que los primeros pasos en la biosíntesis de la vindolina se llevan a cabo en compartimientos celulares diferentes a los de los últimos pasos (Vázquez-Flota et al., 2000b).

La tabersonina da origen a productos finales que se encuentran en tejidos diferentes en la planta (Figura 12) (Laflamme et al., 2001). En este caso, el ARNm para la minovincinina 19-O-acetiltransferasa (Reacción 8, Figura 12) sólo se expresa en las células corticales de los meristemos radiculares; puesto que la TDC y la SS también se expresan en los mismos tipos de célula, se puede inferir que en ellas se lleva a cabo la biosíntesis de la tabersonina y de sus derivados.

REGULACIÓN

Investigaciones realizadas con la fracción indólica, empleando células en suspensión de *C. roseus*, sugieren que no existe relación directa entre los valores de máxima actividad de la enzima TDC y la producción de alcaloides (Merillon et al., 1986; Moreno-Valenzuela et al., 1998; Whitmer et al., 2002a); los datos de Eilert et al. (1987b), empleando inductores de origen fúngico, también apoyan esta última conclusión. Sin embargo, también se ha reportado que variando la concentración de nutrimentos se observa una correlación positiva entre la actividad de la enzima TDC y la acumulación de alcaloides (1981). Es posible que la discrepancia entre resultados se deba a la clona en estudio (Toivonen, 1992).

La adición de geraniol, 10-hidroxigeraniol y secologanina, precursores de la parte terpénica de la vía, aumenta los niveles de alcaloides, particularmente de tabersonina, en cultivos de células en suspensión, lo que parece indicar que la producción de alcaloides puede resultar limitada por una o más etapas de la ruta terpénica (Doireau et al., 1987; Facchini y DiCosmo, 1991; Merillon et al., 1986; Morgan y Shanks, 2000; Schiel et al., 1987; Shanks et al., 1998). Esta conclusión no puede ser generalizada, ya que existen evidencias contradictorias como el aumento en la producción de alcaloides mediante la adición de triptamina al medio de cultivo (1982). Por otra parte, la adición de mevalonato no tiene efecto en la biosíntesis de los AMIs (Shanks et al., 1998); sin embargo, es importante tomar en cuenta que recientemente se ha demostrado que los

resultados dependen fundamentalmente de dos factores: la concentración de los productos adicionados y la etapa en la que se encuentra el cultivo receptor. Mientras que bajas concentraciones de triptofano en la etapa temprana de la fase estacionaria produce un aumento en la biosíntesis de alcaloides, la adición de diversos precursores en la etapa tardía del ciclo de cultivo no produce ningún efecto (Morgan y Shanks, 2000).

Se han utilizado líneas de *C. roseus* en suspensión celular que sobreexpresan a la TDC y a la SS para realizar experimentos de adición de precursores (Whitmer et al., 1998; Whitmer et al., 2002a; Whitmer et al., 2002b). En general, la adición de secologanina al momento de la inoculación produce un aumento importante en la cantidad de los AMIs; en tanto que la adición, junto con la loganina, de triptofano o triptamina, produce un aumento aún mayor en la biosíntesis de los AMIs en estas líneas transgénicas.

La adición de efectores externos como homogenados fúngicos, cambio del pH del medio de cultivo, etc., también modifican, en algunos casos sustancialmente, la biosíntesis de AMIs (Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1991; Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1997; Godoy-Hernández et al., 2000; Moreno-Valenzuela et al., 1999; Sáenz-Carbonell et al., 1993; Vázquez-Flota et al., 1994; Vázquez-Flota et al., 2000a; Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 1994; Zhao et al., 2001d).

Mientras que la adición de pectinasa aumenta los niveles de tabersonina 2.5 veces, la adición de quitina eleva los niveles de ajmalicina en 50%, y la adición de ácido jasmónico aumenta los niveles de lochnericina y horthammericina, pero no los de tabersonina (Shanks et al., 1998). La adición tanto de homogenizados de micelios fúngicos, como de filtrados provenientes de cultivos de hongos aumentan de forma importante la acumulación de diferentes AMIs (Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1991; Vázquez-Flota et al., 1994; Zhao et al., 2001d).

Existen otros factores medioambientales que también modifican de manera importante la biosíntesis de los AMIs; entre éstos los extremos osmótico y salino son de los más importantes (Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1991; Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 1994; Zhao et al., 2001a). La adición de KCl, NaCl, manitol y sorbitol

incrementan la acumulación de AMIs. Cuando conjuntamente se utiliza alguno de estos efectores y se adicionan precursores de la biosíntesis de AMIs como triptamina y triptofano, la producción de los AMIs mejora sustancialmente (Zhao et al., 2001a).

La biosíntesis de la catarantina y de la vindolina se encuentra diferencialmente regulada. La biosíntesis de la vindolina es regulada en cuatro diferentes niveles: tisular, celular, por desarrollo y el medio ambiente, en tanto que la de la catarantina no lo es.

La localización tejido-específica de las enzimas para la biosíntesis de los AMIs, la regulación ontogénica de la biosíntesis de vindolina como resultado de la expresión coordinada de las enzimas involucradas en el proceso, así como la presencia de alcaloides específicos en los tejidos de la raíz y en la parte aérea de las plantas confirman que las rutas de biosíntesis son expresadas de una forma tejido-específica. Durante el desarrollo de la plántula, las actividades de la TDC y la SS son expresadas 36 – 48 horas antes que las de la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa (De Luca et al., 1988). La activación de estas dos últimas enzimas coincide con la transformación cuantitativa de la tabersonina en vindolina y requiere la participación de la luz (Aerts y De Luca, 1992; Balsevich et al., 1986; De Luca et al., 1988; Vázquez-Flota y De Luca, 1998a; Vázquez-Flota et al., 2000b). También se ha determinado que existe un gradiente basipétalo de expresión de las enzimas TDC, SS, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa, lo que sugiere que la expresión de biosíntesis de la vindolina ocurre transitoriamente durante el desarrollo temprano de la hoja, el tallo y la raíz (De Luca y St-Pierre, 2000; St-Pierre et al., 1999) .

La luz juega un papel central en la regulación de la biosíntesis de algunos alcaloides. En particular, la luz activa algunos de los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de la vindolina. La luz no participa en la formación de los idioblastos ni de las células laticíferas, por lo que aún está por determinarse cómo ocurre la activación por la luz de las enzimas que llevan a cabo la inducción de la biosíntesis de los AMIs (Vázquez-Flota et al., 2000b).

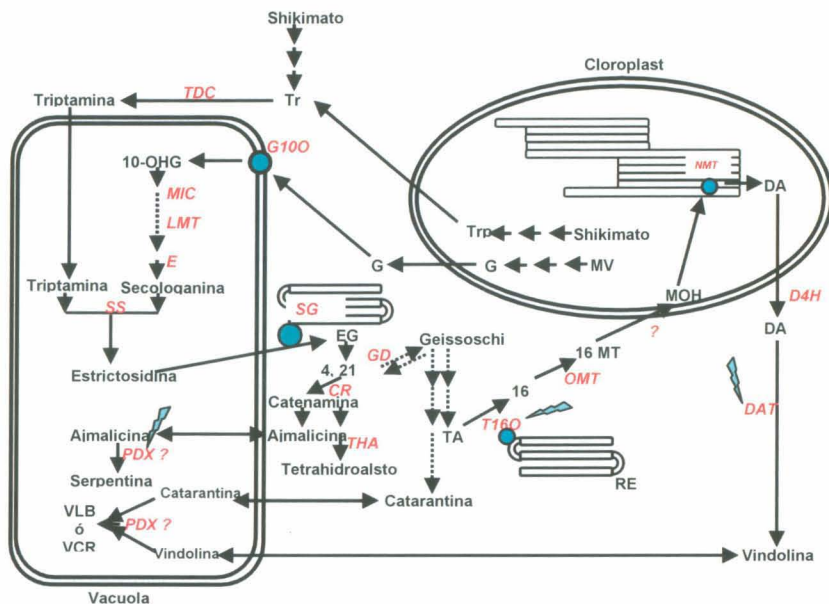


Figura 13. Compartimentalización de la biosíntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*. Redibujado de Meijer *et al.* (1993c) y Verpoorte *et al.* (2000). En la figura se muestra que todos los pasos se llevan a cabo en una sola célula, lo cual no es el caso. Los rayos indican enzimas que se sabe son reguladas por luz. Las flechas punteadas se refieren a reacciones que no están del todo caracterizadas. Trp = triptófano; G = geraniol; MV = mevalonato; DAV = desacetilvindolina; MOH = 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina; 16 MT = 16-metoxitabersonina; 16-OHT = 16-hidroxitabersonina; TAB = tabersonina; EG = Estrictosidina glicona; DG = Estrictosidina aglicona; 10-OHG = 10-hidroxi-geraniol; VLB = vinblastina; VCR = vincristina; G10OH = geraniol 10-hidroxilasa; MIC = monoterpeno (iridodial) ciclasa; LMT = (S)-adenosil-L-metionina:ácido logánico metil transferasa; ES = estrictosidina sintasa; PDX = peroxidasa básica; SG = estrictosidina glucosidasa; CR = catenamina reductasa; THA = tetrahidroalstonina sintasa; GDH = geizssoschizina deshidrogenasa; T16OH = tabersonina 16-hidroxilasa; OMT = 11-O-dimetil-17-O-desacetilvindolina O-metiltransferasa; NMT = 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina N-metiltransferasa; D4H = desacetilvindolina-4-hidroxilasa; DAT = 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa. Los signos de interrogación denotan enzimas que aún se desconocen o que existen reportes contradictorios por el momento. Para una visión global de las diferentes células que intervienen en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus* ver la figura 14.

En suma, la catarantina es biosintetizada a lo largo de todos los tejidos de la planta, en tanto que la vindolina es biosintetizada sólo en las partes aéreas. Las reacciones catalizadas por la TDC y la SS se encuentran localizadas en la epidermis superior e inferior de las hojas y en el protoderma de la raíz y en las células corticales alrededor del meristemo apical. La desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y la 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa se encuentran en los idioblastos y en las células laticíferas (Figura 14). Es posible que la raíz biosintetice catarantina y tabersonina y que éstas sean transportadas vía xilema a las células laticíferas asociadas a las traqueidas. Estas últimas células pueden convertir tabersonina en vindolina y ésta acoplarse con catarantina para formar los alcaloides bisindólicos.

DIFERENCIACIÓN CELULAR

El proceso de desarrollo produce, además de la morfogénesis, la especialización bioquímica de la células dando como resultado la biosíntesis y/o acumulación de metabolitos secundarios tales como alcaloides de diferente origen biosintético (Facchini, 2001; Facchini y De Luca, 1995; Flores y Filner, 1985; Hashimoto y Yamada, 1994; Moreno-Valenzuela et al., 1998; Robinson, 1974; Robinson, 1981). Se ha determinado que el contenido de hiosciamina, alcaloide derivado del tropano, en raíces transformadas de *Hyoscyamus muticus* es similar al determinado en las raíces de plantas completas. Sin embargo, cuando las raíces son desdiferenciadas a callo, el contenido del alcaloide disminuye al nivel de trazas; cuando los callos son rediferenciados a raíces, el contenido de alcaloides vuelve a los niveles originales; este protocolo se puede repetir infinidad de veces con el mismo resultado (Flores y Filner, 1985).

En otros procesos también se ha determinado que existe una correlación directa entre la diferenciación celular y la biosíntesis de metabolitos secundarios, e. g. la de monoterpenos en las glándulas epidérmicas de *Mentha piperita* (Dörnenburg y Knorr, 1995). En *C. roseus* se ha propuesto que la presencia de células laticíferas son esenciales para la producción de alcaloides monoterpeno indólicos (De Luca et al.,

1986); así, la vindolina, una de las dos unidades monoméricas de los alcaloides bisindólicos, se biosintetiza en brotes pero no en los callos (Constabel et al., 1982). Se han obtenido resultados similares para el caso de la vinblastina, ya que este producto se acumula en brotes regenerados a partir de callos de *C. roseus* pero no en callos o en suspensiones celulares (Datta y Srivastava, 1997; Endo et al., 1987). La catarantina, por otra parte, se produce prácticamente en toda la planta (Balsevich y Bishop, 1989; Deus-Neumann et al., 1987; Westekemper et al., 1980).

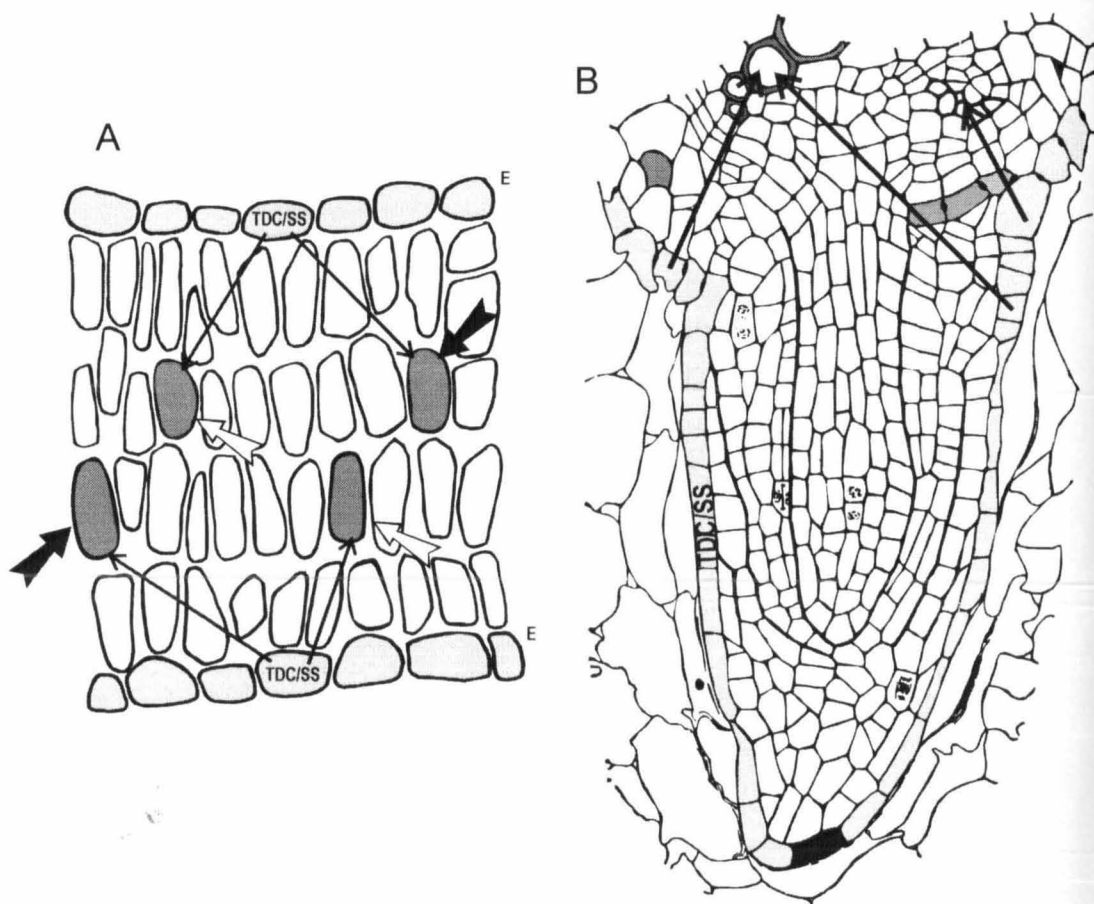


Figura 14. Compartimentalización de la biosíntesis de alcaloides en *C. roseus*. (A) Corte transversal de una hoja de *C. roseus* y (B) corte longitudinal de una raíz. E = epidermis. Las flechas llenas señalan idioblastos y las flechas vacías señalan células laticíferas.

CONCLUSIONES

Un problema importante a considerar en el estudio del metabolismo secundario en general, y en particular en el de *C. roseus*, es el hecho de que no se ha utilizado un solo modelo. En el caso de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos indólicos, las enzimas estudiadas han sido aisladas de diferentes tejidos, y si bien es importante analizar la diversidad existente para estructurar un modelo para confrontarlo con la realidad, también lo es el poder tener una ruta biosintética completa en un solo modelo.

Se ha determinado que los niveles de alcaloides totales en las raíces en cultivo son de aproximadamente un orden de magnitud mayor que en las células en suspensión, confirmando con esto que la diferenciación celular juega un papel importante en la biosíntesis de los alcaloides (Ciau-Uitz et al., 1994). Las raíces transformadas de *C. roseus* poseen la capacidad de biosintetizar y acumular alcaloides indólicos en cantidades similares a los de las raíces de las plantas (Bhadra et al., 1990; Bhadra et al., 1993; Ciau-Uitz et al., 1994; Parr et al., 1988; Toivonen et al., 1989), además de biosintetizar alcaloides que no habían sido reportados con anterioridad como la *O*-acetilvalesamina (Toivonen et al., 1989) y la 19(*S*)-epimisilina (Peraza-Sánchez et al., 1998).

La elucidación de la ruta de biosíntesis que lleva a los productos naturales, sólo puede alcanzarse mediante la purificación de cada una de las enzimas. El conocimiento que se tiene hoy en día de la biosíntesis de los AMIs es aún fragmentado. Por otro lado, ya se conoce con bastante profundidad la ruta de biosíntesis de vindolina a partir de tabersonina, incluyendo la clonación de algunos de los genes que codifican para las enzimas requeridas (De Luca et al., 1998), pero aún no se conoce exactamente la biosíntesis de la secologanina, la ajmalicina, la tabersonina, la catarantina y de varios de los intermediarios de la ruta de los AMIs, aunque sabemos que la luz y el estadio de desarrollo regulan la actividad y expresión de algunas de las enzimas.

Se sabe que la biosíntesis de la vindolina y de la catarantina son reguladas diferencialmente; la biosíntesis de la primera se encuentra bajo un control celular (participan el cloroplasto, el citoplasma, el retículo endoplásmico y la vacuola), de desarrollo (los alcaloides se biosintetizan preferentemente en los tejidos jóvenes), de tejido (participan por lo menos tres tipos de células) y medio ambiental (luz) más estricto que la de la catarantina. También sabemos que el uso de efectores que producen un aumento en el contenido de alcaloides en las células, provoca un incremento en la actividad de algunas de las enzimas o en los niveles de expresión de algunos de los genes que las codifican.

Sin embargo, lo más importante es el hecho de que se cuenta hoy en día con modelos experimentales tales como plántulas, cultivos celulares y raíces transformadas de *C. roseus*, así como con herramientas tales como anticuerpos, sondas moleculares y particularmente con las nuevas metodologías provenientes de la proteómica.

Recientemente se han planteado algunas de las preguntas que faltan por resolver: ¿cuál es el número de pasos de la vía que se llevan a cabo en la epidermis o en los ápices radicales?; si la biosíntesis de los alcaloides en las raíces y en la epidermis obedece a diferentes papeles biológicos y funciones ecológicas de los productos finales; ¿qué clase de tejidos produce intermediarios específicos para la biosíntesis de la vindolina?; ¿cómo son movilizados los intermediarios en las células laticíferas y en los idioblastos?; ¿para qué se requiere un sistema tan sofisticado de biosíntesis?; ¿qué alcaloides se acumulan en las células laticíferas, los idioblastos, la epidermis y las raíces?.

Otra pregunta central para entender la biosíntesis de los AMIs es por qué los efectores externos aumentan selectivamente la biosíntesis de sólo uno de los alcaloides y no la de todos, aunque ya se ha propuesto la existencia de canales metabólicos para explicar estos resultados, y los de diferenciación celular (Moreno-Valenzuela et al., 1998). También es importante determinar si existen transportadores específicos para el movimiento de los diferentes alcaloides entre los diferentes compartimientos celulares y los diferentes tejidos. Por otra parte, se debe evaluar el hecho de que varias de las

enzimas involucradas en la biosíntesis de los productos naturales tienen homología con proteínas relacionadas con patogenicidad.

La complejidad de los procesos genéticos, catalíticos y de transporte de la biosíntesis de los AMIs es uno de los retos intelectuales más estimulantes en el área de los metabolitos secundarios actualmente. Si bien se requieren más de 50 pasos metabólicos para sintetizar los alcaloides más importantes de *C. roseus*, solamente se han determinado y caracterizado en algún grado alrededor de 20 de las enzimas requeridas (Cuadro 1), por lo que aún falta por elucidar un número importante de pasos metabólicos, purificar las enzimas correspondientes y clonar sus genes. También es necesario conocer los diversos aspectos de su regulación, tanto en el nivel celular como en el molecular, pero sobre todo determinar cuál es la función de los AMIs en las plantas que los producen.

Agradecimientos

Los autores agradecen la revisión realizada por dos anónimos evaluadores, y cuyos comentarios y observaciones mejoraron sustancialmente el presente trabajo. Para la nomenclatura de las enzimas se utilizaron las reglas de la Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

Cuadro 1. Enzimas caracterizadas en la ruta de biosíntesis de los AMIs en *Catharanthus roseus* y *Rauvolfia serpentina*. Modificado de Meijer et al., (1993c). AH = aparente homogeneidad; P = parcial; Pur = purificación. Los espacios vacíos indican que dichos parámetros no han sido determinados. Las referencias se citan a lo largo del texto.

Enzima	Abreviatura	Masa molecular $\times 10^{-3}$ Da	Sustratos y K_m	Localización	Pur	Clonación	Tejido
Triptofano descarboxilasa	TDC	56	Trp 75 μ M	Citoplasma	AH	Sí	Epidermis hojas > raíz <i>C. roseus</i>
Geraniol 10-hidroxisilasa	G10OH	56; 63	Geraniol 5.5 μ M	Membrana vacuola	AH	Si	Plántulas <i>C. roseus</i>
NADPH: citocromo P-450 reductasa		79	Citocromo P-450 ^a	Membrana vacuola	AH	Sí	Plántulas <i>C. roseus</i>
10-oxogeraniol:iridodial ciclasa	10-OC		10 oxogeraniol; NADPH	¿Vacuola?	P		Raíces transformadas <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
SAM: ácido logánico metil transferasa	LAMT		SAM 0.06 mM; ácido logánico 12.5 mM		P		Plántulas <i>C. roseus</i>
7-desoxiloganina 7-hidroxisilasa	DL7H		O ₂ , NADPH 18 μ M, 7-desoxiloganina 170 μ M	Microsomas		Si	Cultivo de tejidos <i>L. japonica</i> y <i>C. roseus</i>

Secologanina sintasa	SS		O ₂ , NADPH, loganina	Retículo endoplásmico		Sí	Hoja <i>C. roseus</i> y cultivo de tejidos <i>L. japonica</i>
Estrictosidina sintasa	ES	39	Triptamina 0.9 – 2 mM; 5.8 mM; secologanina 30 μ M ^b ; 2.6 mM	Vacuola	AH	Sí	Epidermis hojas, yemas florales, cultivo de tejidos <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
Estrictosidina β -D-glucosidasa	SG	63; 230; 450	Estrictosidina 0.1 – 0.2 mM	Retículo endoplásmico	AH	Si	Hoja>raíz>tallo>flor Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
Geissoschizina deshidrogenasa	GD		Geissoschizina 83 μ M, NADP ⁺ 77 nM		35x		Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
Polineuridina aldehído esterasa	PNAE		Aldehído de polineuridina		AH	Si	Cultivo de tejidos <i>R. serpentina</i>
Catenamina sintasa	CS		4, 21-geissoschizina				
Catenamina reductasa	CR		Catenamina				

Tetrahidroalstonina sintasa		81	Catenamina imonium 62 μM		P		
Peroxidasa		15	Catenamina + vindolina	Vacuola	P		
Peroxidasa		37	Ajmalicina	Vacuola	P		
Tabersonina 16-hidroxilasa	T16OH		O ₂ , NADPH 14 μM y tabersonina 11 μM	Retículo endoplásmico			Hojas jóvenes y cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
SAM 16-hidroxitabersonina O-metil-transferasa	OMT		16-hidroxitabersonina	Retículo endoplásmico	P		Plántulas <i>C. roseus</i>
SAM: 16-metoxi-2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metil-transferasa	NMT		16-metoxi-2, 3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina	Membranas de los tilacoides	P		Plántulas <i>C. roseus</i>
Desacetoxivindolina 4-hidroxilasa	D4H	45	O ₂ , 2-oxoglutarato Desacetilvindolina	Citoplasma	P	Si	Idioblastos/laticíferas hoja, tallo y flores <i>C. roseus</i>
AcetilCoA:	DAT	54 (33+22)	AcetilCoA 6.5 μM	Citoplasma	AH	Si	Idioblastos/laticífera

desacetilvindolina 4-O-acetiltransferasa			Deacetilvindolina 1.3 μM				hoja, tallo y flores <i>C. roseus</i>
Minovincinina 19-O-acetiltransferasa	MAT		Minovincinina			Si	Células corticales raíz <i>C. roseus</i>
Anhidrovinblastina sintasa (peroxidasa)		45	Vindolina y catarantina	Vacuola	AH		Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
Vinorina sintasa	VS	31	16- <i>epi</i> -vellosimina 19.4 μM Acetil-CoA 64 μM		AH		Cultivo de tejidos <i>R. serpentina</i>
Vomilenina reductasa	VR	43	Vomilenina y NADPH		20.6		Cultivo de tejidos <i>R. serpentina</i>
Vinorina hidroxilasa	VH		O ₂ , NADPH 3 μM , vinorina 26 μM	Microsomal			Cultivo de tejidos <i>R. serpentina</i>

*En el caso de que se presenten varios valores para la K_m , se refiere al hecho de que éstos han sido determinados por diferentes autores.

^aEn ensayos *in vitro* también puede reducir al sustrato artificial citocromo c (K_m 7.8 μM) con NADPH (K_m 5.7 μM) como el donador de electrones.

^bEl valor de K_m de 30 μM es para todas las isoenzimas ensayadas (De Waal et al., 1995).

REFERENCIAS

- Adam K. P. and J. Zapp, Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes, *Phytochemistry*, 48: 953-959, (1998).
- Aerts R. J. and V. De Luca, Phytochrome is involved in the light-regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus*, *Plant Physiol.*, 100: 1029-1032, (1992).
- Aerts R. J., D. Gisi, E. De Carolis, V. De Luca and T. W. Baumann, Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloid in *Catharanthus* and *Cinchona* seedling, *Plant J.*, 5: 635-643, (1994).
- Aerts R. J., T. Van der Leer, R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedlings, *J. Plant Physiol.*, 136: 86-91, (1990).
- Agranoff B. W., H. Eggerer, U. Henning and F. Lynen, Biosynthesis of terpenes. VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase, *J. Biol. Chem.*, 235: 326-332, (1960).
- Arebalo R. E. and E. D. Mitchell, Cellular distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and mevalonate kinase in leaves of *Nepeta cataria*, *Phytochemistry*, 23: 13-18, (1984).
- Arigoni D., S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher and M. H. Zenk, Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 94: 10600-10605, (1997).
- Ayora-Talavera T., J. Chappell, E. Lozoya-Gloria and V. M. Loyola-Vargas, Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 97: 135-145, (2002).
- Bach J. and T. Weber, Enzymatic synthesis of mevalonic acid in plants, in: *Biological Role of Plant Lipids*, (Biacs P. A., K. Orliz and T. Kremmer, eds.), Plenum Pub. Corp., New York & London, 279-282, (1989).
- Bach T. J., Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 25: 163-178, (1987).

Bach T. J., Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. A review, *Lipids*, 30: 191-202, (1995).

Bach T. J., V. Raudot, K.-U. Vollack, T. Weber and S. Zeiler, Further studies on the enzymatic conversion of acetyl-coenzyme A into 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in radish, *Plant Physiol. Biochem.*, 32: 775-783, (1994).

Bach T. J., D. H. Rogers and H. Rudney, Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings, *Eur. J. Biochem.*, 154: 103-111, (1986).

Bach T. J., T. Weber and A. Motel, Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants, *Rec. Advan. Phytochem.*, 24: 1-82, (1990).

Ball K. L., S. Dale, J. Weekes and D. G. Hardie, Biochemical characterization of two forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase from cauliflower (*Brassica oleracea*), *Eur. J. Biochem.*, 219: 743-750, (1994).

Balsevich J. and G. Bishop, Distribution of catharanthine, vindoline and 3'-4'-anhydrovinblastine in the aerial parts of some *Catharanthus roseus* plants and the significance thereof in relation to alkaloid production in cultured cells, in: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (Kurz W. G. W., ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 149-153, (1989).

Balsevich J., V. De Luca and W. G. W. Kurz, Altered alkaloid pattern in dark grown seedlings of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of 4-desacetoxyvindoline⁺: a novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline, *Heterocycles*, 24: 2415-2421, (1986).

Banthorpe D. V., G. A. Bucknall, H. J. Doonan, S. Doonan and M. G. Rowan, Biosynthesis of geraniol and nerol in cell-free extracts of *Tanacetum vulgare*, *Phytochemistry*, 15: 91-100, (1976).

Barker J. H. A., S. P. Slocombe, K. L. Ball, D. G. Hardie, P. R. Shewry and N. G. Halford, Evidence that barley 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase kinase

is a member of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase family, *Plant Physiol.*, 112: 1141-1149, (1996).

Berg J.M., J.L.Tymoczko, and L.Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, pp 1-974, (1995).

Bhadra R., C. Ho, S. Rosi, and J. V. Shanks, Establishment and cultivation of hairy root lines of *Catharanthus roseus*, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 26: Pt.2 69A (1990). (Abstract)

Bhadra R., S. Vani and J. V. Shanks, Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 581-592, (1993).

Bloch K., S. Chaykin, A. H. Phillips and A. de Waard, Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate, *J. Biol. Chem.*, 234: 2595-2604, (1959).

Blom T. J. M., M. Sierra, T. B. Van Vliet, M. E. I. Franke-van Dijk, P. De Koning, F. Van Iren, R. Verpoorte and K. R. Libbenga, Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine, *Planta*, 183: 170-177, (1991).

Brown W. E. and V. W. Rodwell, *Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes*, (Jeffery J., ed.), Birkhauser Verlag, Basel, 232-272, (1980).

Budde R. J. A. and R. Chollet, Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation, *Physiol. Plant.*, 72: 435-439, (1988).

Canel C., M. I. Lopes-Cardoso, S. Whitmer, L. Van der Fits, G. Pasquali, R. Van der Heijden, J. H. C. Hoge and R. Verpoorte, Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*, *Planta*, 205: 414-419, (1998).

Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Non-coordinated response of cytochrome P450-dependent geraniol 10-hydroxylase and NADPH: Cyt C (P-450) reductase in *Catharanthus roseus* hairy roots under different conditions, *Phyton*, 66: 183-190, (2000).

Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*, In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant, 37: 622-628, (2001).

Chappell J., Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 46: 521-547, (1995a).

Chappell J., The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism, Plant Physiol., 107: 1-6, (1995b).

Chappell J., F. Wolf, J. Proulx, R. Cuellar and C. Saunders, Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants?, Plant Physiol., 109: 1337-1343, (1995).

Chin D. J., G. Gil, D. W. Russell, L. Liscum, K. L. Luskey, S. K. Basu, H. Okayama, P. Berg, J. L. Goldstein and M. S. Brown, Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum, Nature, 308: 613-617, (1984).

Choi D., B. L. Ward and R. M. Bostock, Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid, The Plant Cell, 4: 1333-1344, (1992).

Ciau-Uitz R., M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chí, L. M. Pacheco and V. M. Loyola-Vargas, Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*, In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant, 30P: 84-88, (1994).

Constabel F., P. Gaudet-LaPrairie, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots, Plant Cell Rep., 1: 139-142, (1982).

Contin A., R. Van der Heijden, A. W. Lefeber and R. Verpoorte, The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture, FEBS Lett., 434: 413-416, (1998).

Cordell G. A., The monoterpene alkaloids, in: The Alkaloids, (Cordell G. A., ed.), Academic Press, San Diego, 261-376, (1999).

Dale S., M. Arró, B. Becerra, N. G. Morrice, A. Boronat, D. G. Hardie and A. Ferrer, 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, (1995).

Daraselia N. D., S. Tarchevskaya and J. O. Narita, The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression, Plant Physiol., 112: 727-733, (1996).

Datta A. and P. S. Srivastava, Variation in vinblastine production by *Catharanthus roseus* during in vivo and in vitro differentiation, Phytochemistry, 46: 135-137, (1997).

De Carolis E., F. Chan, J. Balsevich and V. De Luca, Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second-to-last step in vindoline biosynthesis, Plant Physiol., 94: 1323-1329, (1990).

De Carolis E. and V. De Luca, Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*, J. Biol. Chem., 268: 5504-5511, (1993).

De Carolis E. and V. De Luca, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization, Phytochemistry, 36: 1093-1107, (1994a).

De Carolis E. and V. De Luca, A novel 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis: Characterization, purification and kinetic properties, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 38: 281-287, (1994b).

De Luca V., Enzymology of indole alkaloid biosynthesis, in: Methods in Plant Biochemistry Vol. 9, (Lea P. J., ed.), Academic Press Limited, London, 345-368, (1993).

De Luca V., R. J. Aerts, S. Chavadej, E. De Carolis, and A.-M. Alarco, The biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*, in: Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants, (Singh B. K., H. E. Flores and J. C. Shannon, eds.), American Society of Plant Physiology, Rockville, 275-284, (1992).

De Luca V., J. Balsevich and W. G. W. Kurz, Acetyl coenzyme A: deacetylvindoline O-acetyltransferase, a novel enzyme from *Catharanthus*, J. Plant Physiol., 121: 417-428, (1985).

De Luca V., J. Balsevich, R. T. Tyler, U. Eilert, B. D. Panchuk and W. G. W. Kurz, Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*, J. Plant Physiol., 125: 147-156, (1986).

De Luca V., J. Balsevich, R. T. Tyler and W. G. W. Kurz, Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus* plants, Plant Cell Rep., 6: 458-461, (1987).

De Luca V., N. Brisson, and W. G. W. Kurz, Regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*: Molecular cloning of the first and the last steps in biosynthesis, in: Primary and Secondary Metabolism of Plants Cell Cultures II, (Kurz W. G. W., ed.), Springer Verlag, Berlin, 154-161, (1989).

De Luca V. and A. J. Cutler, Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, Plant Physiol., 85: 1099-1102, (1987).

De Luca V., A. J. Fernández, D. Campbell and W. G. W. Kurz, Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, Plant Physiol., 86: 447-450, (1988).

De Luca V. and P. Laflamme, The expanding universe of alkaloid biosynthesis, Curr. Opi. Plant Biol., 4: 225-233, (2001).

De Luca V. and B. St-Pierre, The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, Trends Plant Sci., 5: 168-173, (2000).

De Luca V., B. St-Pierre, F. Vázquez-Flota, and D. Laflamme, Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: the establishment of a model system, in: Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development, (Lo Chiavo F., R. L. Last, G. Morelli and N. V. Raikhel, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 171-187, (1998).

De Waal A., A. H. Meijer and R. Verpoorte, Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: Purification and characterization of multiple forms, *Biochem. J.*, 306: 571-580, (1995).

Dethier M. and V. De Luca, Partial purification of an N-methyltransferase involved in vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry*, 32: 673-678, (1993).

Deus-Neumann B., J. Stöckigt and M. H. Zenk, Radioimmunoassay for the quantitative determination of catharanthine, *Planta Med.*, 53: 184-188, (1987).

Dogru E., H. Warzecha, F. Seibel, S. Haebel, F. Lottspeich and J. Stöckigt, The gene encoding polynuride aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the a/b hydroxylase super family, *Eur. J. Biochem.*, 267: 1397-1406, (2000).

Doireau P., J. M. Mérillon, A. Guillot, M. Rideau, J. C. Chénieux and M. Brillard, Time-course studies on indole alkaloid accumulation and changes in tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities: a comparison in three strains of *Catharanthus roseus* cells, *Planta Med.*, 53: 364-367, (1987).

Donaldson R. P. and D. G. Luster, Multiple forms of plant cytochromes P-450, *Plant Physiol.*, 96: 669-674, (1991).

Dörnenburg H. and D. Knorr, Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 674-684, (1995).

Douglas P., E. Pigaglio, A. Ferrer, N. G. Halfords and C. MacKintosh, Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are regulated by reversible phosphorylation and/or Ca^{2+} ions, *Biochem. J.*, 325: 101-109, (1997).

Drapeau D., H. W. Blanch and C. R. Wilke, Ajmalicine, serpentine, and catharanthine accumulation in *Catharanthus roseus* bioreactor cultures, *Planta Med.*, 53: 373-376, (1987).

Durr I. F. and H. Rudney, The reduction of b-hydroxy-b-methylglutaryl coenzyme A to mevalonic acid, *J. Biol. Chem.*, 235: 2572-2578, (1960).

Eilert U., V. De Luca, F. Constabel and W. G. W. Kurz, Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, Arch. Biochem. Biophys., 254: 491-497, (1987a).

Eilert U., W. G. W. Kurz, and F. Constabel, Alkaloid accumulation in plant cell cultures upon treatment with elicitors, in: Plant Biology. Vol. 3. Plant Tissue and Cell Culture, (Green C. E., D. A. Somers, W. P. Hackett and D. D. Biesboer, eds.), Alan R. Liss, Co., New York, 213-219, (1987b).

Endo T., A. E. Goodbody and M. Misawa, Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*, Planta Med., 53: 479-482, (1987).

Endo T., A. E. Goodbody, J. Vukovic and M. Misawa, Enzymes from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures that couple vindoline and catharanthine to form 3',4'-anhydrovinblastine, Phytochemistry, 27: 2147-2149, (1988).

Enjuto M., L. Balcells, N. Campos, C. Caelles, M. Arró and A. Boronat, Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91: 927-931, (1994).

Facchini P. J., Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 52: 29-66, (2001).

Facchini P. J. and V. De Luca, Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy, The Plant Cell, 7: 1811-1821, (1995).

Facchini P. J. and F. DiCosmo, Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don immobilized by adhesion to glass fibres, Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 382-392, (1991).

Fahn W., H. Gundlach, B. Deus-Neumann and J. Stöckigt, Late enzymes of vindoline biosynthesis. Acetyl-CoA:17-O-acetyl-transferase, Plant Cell Rep., 4: 333-336, (1985a).

- Fahn W., E. LauBermair, B. Deus-Neumann and J. Stöckigt, Late enzymes of vindoline biosynthesis. S-adenosyl-L-methionine:11-O-demethyl-17-O-deacetylvindoline 11-O-methyltransferase and unspecific acetyltransferase, *Plant Cell Rep.*, 4: 337-340, (1985b).
- Fahn W. and J. Stöckigt, Purification of acetyl-CoA: 17-O-deacetylvindoline 17-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus* leaves, *Plant Cell Rep.*, 8: 613-616, (1990).
- Falkenhagen H. and J. Stöckigt, Enzymatic biosynthesis of vomilenine, a key intermediate of the ajmaline pathway, catalyzed by a novel cytochrome P450-dependent enzyme from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*, *Z. Naturforsch. [C]*, 50: 45-53, (1995).
- Felix H., P. Brodelius and K. Mosbach, Enzyme activities of the primary and secondary metabolism of simultaneously permeabilized and immobilized plant cells, *Anal. Biochem.*, 116: 462-470, (1981).
- Fernandez J. A., W. G. W. Kurz and V. De Luca, Conformation-dependent inactivation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*, *Biochem. Cell Biol.*, 67: 730-734, (1989).
- Flores H. E. and P. Filner, Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae, in: *Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, (Neumann K. H., W. Barz and E. Reinhard, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, 174-186, (1985).
- Galaz-Avalos R.M., Estudio sobre la enzima 3-hidroxi-3metil glutaril CoA reductasa en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, ITM/CICY, Mérida, pp 1-53, (1996).
- Geerlings A., M. M. L. Ibañez, J. Memelink, R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Molecular cloning and analysis of strictosidine b-d-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, *J. Biol. Chem.*, 275: 3051-3056, (2000).
- Gershenzon J. and R. Croteau, Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants, *Rec. Advan. Phytochem.*, 24: 99-160, (1990).

Goddijn O. J. M., R. J. De Kam, A. Zanetti, R. A. Schilperoort and J. H. C. Hoge, Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*, Plant Mol. Biol., 18: 1113-1120, (1992).

Goddijn O. J. M., P. M. Van der Duyn Schouten, R. A. Schilperoort and J. H. C. Hoge, A chimaeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells, Plant Mol. Biol., 22: 907-912, (1993).

Godoy-Hernández G. and V. M. Loyola-Vargas, Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, Plant Cell Rep., 10: 537-540, (1991).

Godoy-Hernández G. and V. M. Loyola-Vargas, Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension culture, Plant Cell Rep., 16: 287-290, (1997).

Godoy-Hernández G. C., F. A. Vázquez-Flota and V. M. Loyola-Vargas, The exposure to trans-cinnamic acid of osmotically stressed *Catharanthus roseus* cells cultured in a 14-L bioreactor increases alkaloid accumulation, Biotechnol. Lett., 22: 921-925, (2000).

Goldstein J. L. and M. S. Brown, Regulation of the mevalonate pathway, Nature, 343: 425-430, (1990).

Gray J. C., Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants, in: Advances in Botanical Research Vol. 14, (Callow J. A., ed.), Academic Press, New York, 25-91, (1987).

Gutiérrez-Pacheco L.C., Establecimiento de protocolos de solubilización con detergente y purificación por cromatografía de afinidad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, CICY, Mérida, pp 1-106, (2000).

Hampton R., D. Dimster-Denk and J. Rine, The biology of HMG-CoA reductase: The pros of contra-regulation, Trends Biochem. Sci., 21: 140-145, (1996).

Hashimoto T. and Y. Yamada, Alkaloid biogenesis: molecular aspects, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45: 257-285, (1994).

Heintze A., J. Gorlach, C. Leuchner, P. Hope, P. Hagelstein, D. Schulze-Siebert and G. Schultz, Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to a division of labor stage, *Plant Physiol.*, 93: 1121-1127, (1990).

Heintze A., A. Riedel, S. Aydogdu and G. Schultz, Formation of chloroplast isoprenoids from pyruvate and acetate by chloroplasts from young spinach plants. Evidence for a mevalonate pathway in immature chloroplasts, *Plant Physiol. Biochem.*, 32: 791-797, (1994).

Hemscheidt T. and M. H. Zenk, Partial purification and characterization of a NADPH dependent tetrahydroalstonine synthase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.*, 4: 216-219, (1985).

Hong J., J. Lee, H. Lee, D. Kim and B. Hwang, Enhancement of catharanthine production by the addition of paper pulp waste liquors to *Catharanthus roseus* in chemostat cultivation, *Biotechnol. Lett.*, 19: 967-969, (1997).

Huber S. C., J. L. Huber and R. W. McMichael, Jr., Control of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation, *Int. Rev. Cytol.*, 149: 47-98, (1994).

Ikeda H., N. Esaki, S. Nakai, K. Hashimoto, S. Uesato, K. Soda and T. Fujita, Acyclic monoterpene primary alcohol: NADP super(+)oxidoreductase of *Rauwolfia serpentina* cells: The key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols, *J. Biochem. (Tokyo)*, 109: 341-347, (1991).

Irmiler S., G. Schröder, B. St-Pierre, N. P. Crouch, M. Hotze, J. Schmidt, D. Strack, U. Matern and J. Schröder, Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase, *Plant J.*, 24: 797-804, (2000).

Islas-Flores I. R., V. M. Loyola-Vargas and M. L. Miranda-Ham, Tryptophan decarboxylase activity in transformed roots from *Catharanthus roseus* and its relationship to tryptamine, ajmalicine, and catharanthine accumulation during the culture cycle, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 30P: 81-83, (1994).

Katano N., H. Yamamoto, R. Iio and K. Inoue, 7-Deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures, *Phytochemistry*, 58: 53-58, (2001).

Knobloch K.-H. and J. Berlin, Effects of media constituents on the formation of secondary products in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Adv. Biotechnol.*, 1: 129-133, (1981).

Knobloch K.-H. and J. Berlin, Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. I. Comparison of enzyme activities and product accumulation, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2: 333-340, (1983).

Knobloch K.-H., B. Hansen and J. Berlin, Medium-induced formation of indole alkaloids and concomitant changes of interrelated enzyme activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Z. Naturforsch. [C]*, 36c: 40-43, (1981).

Kondo K. and K. Oba, Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from potato tubers, *J. Biochem.*, 100: 967-974, (1986).

Korth K. L., D. A. W. Jaggard and R. A. Dixon, Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato, *Plant J.*, 23: 507-516, (2000).

Kutchan T. M., Strictosidine: From alkaloid to enzyme to gene, *Phytochemistry*, 32: 493-506, (1993).

Kutchan T. M., Alkaloid biosynthesis--The basis for metabolic engineering of medicinal plants, *The Plant Cell*, 7: 1059-1070, (1995).

Kutchan T. M., H. Dittrich, D. Bracher and M. H. Zenk, Enzymology and molecular biology of alkaloid biosynthesis, *Tetrahedron*, 47: 5945-5954, (1991).

Kutchan T. M., N. Hampp, F. Lottspeich, K. Beyreuther and M. H. Zenk, The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*, *FEBS Lett.*, 237: 40-44, (1988).

Kutney J. P., B. Aweryn, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. IX.

Biotransformation studies with 3',4'-dehydrovinblastine, *Heterocycles*, 16: 1169-1171, (1981).

Kutney J. P., C. A. Boulet and L. S. L. Choi, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. XV. Synthesis of bisindole alkaloids by use of immobilized enzyme systems, *Heterocycles*, 27: 621-628, (1988).

Kutney J. P., L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleight, K. L. Stuart, B. R. Worth, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures: Isolation and characterization of alkaloids from one cell line, *Phytochemistry*, 19: 2589-2595, (1980).

Laflamme P., B. St-Pierre and V. De Luca, Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root-specific minovincinine-19-hydroxy-O-acetyltransferase, *Plant Physiol.*, 125: 189-198, (2001).

Lange B. M., T. Rujan, W. Martin and R. Croteau, Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97: 13172-13177, (2000).

Lange B. M., M. R. Wildung, D. McCaskill and R. Croteau, A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95: 2100-2104, (1998).

Learned R. M. and G. R. Fink, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 2779-2783, (1989).

Lee C. W. T. and M. L. Shuler, The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 67: 61-71, (2000).

Lichtenthaler H. K., The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 47-65, (1999).

Lichtenthaler H. K., Discovery of the two parallel pathways for isoprenoid biosynthesis in plants, in: Discoveries in Plant Biology, (Kung S.-D. and S.-F. Yang, eds.), London, 141-161, (2001).

Lichtenthaler H. K., M. Rohmer, J. Schwender, A. Disch, and M. Seemann, A novel mevalonate-independent pathway for the biosynthesis of carotenoids, phytol and prenyl chain of plastoquinone-9 in green algae and higher plants, in: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids, (Williams J. P., M. U. Khan and N. W. Lem, eds.), Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, 177-179, (1997).

Lopez D., C. M. Chambers and G. C. Ness, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors unmask cryptic regulatory mechanisms, Arch. Biochem. Biophys., 343: 118-122, (1997).

Loyola-Vargas V. M., M. Méndez-Zeel, M. Monforte-González and M. L. Miranda-Ham, Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus*, J. Plant Physiol., 140: 213-217, (1992).

Luijendijk T. J. C., L. H. Stevens and R. Verpoorte, Purification and characterisation of strictosidine b-D-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, Plant Physiol. Biochem., 36: 419-425, (1998).

Madyastha K. M. and C. J. Coscia, Detergent-solubilized NADPH-cytochrome C (P-450) reductase from the higher plant, *Catharanthus roseus*, J. Biol. Chem., 254: 2419-2427, (1979a).

Madyastha K. M. and C. J. Coscia, Enzymology of indole alkaloid biosynthesis, Rec. Advan. Phytochem., 13: 85-129, (1979b).

Madyastha K. M., R. Guarnaccia, C. Baxter and C. J. Coscia, S-Adenosyl-L-methionine: loganic acid methyltransferase. A carboxyl alkylating enzyme from *Vinca rosea*, J. Biol. Chem., 248: 2497-2501, (1973).

Madyastha K. M., T. D. Meehan and C. J. Coscia, Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*, Biochemistry, 15: 1097-1102, (1976).

Madyastha K. M., J. E. Ridgway, J. G. Dwyer and C. J. Coscia, Subcellular localization of a cytochrome P-450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*, J. Cell Biol., 72: 302-313, (1977).

Mathews C.K., K.E. Van Holde, and K.G. Ahern, Biochemistry, Addison Wesley Longman, San Francisco, pp 1-1186, (2000).

McCaskill D. and R. Croteau, Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate, Planta, 197: 49-56, (1995).

McCaskill D. and R. Croteau, Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, Trends Biotechnol., 16: 349-355, (1998).

McFarlane J., K. M. Madyastha and C. J. Coscia, Regulation of secondary metabolism in higher plants. Effect of alkaloids on cytochrome P-450 dependent monooxygenase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 66: 1363-1369, (1975).

McGarvey D. J. and R. Croteau, Terpenoid metabolism, The Plant Cell, 7: 1015-1026, (1995).

McKnight T. D., D. R. Bergey, R. J. Burnett and C. L. Nessler, Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants, Planta, 185: 148-152, (1991).

McKnight T. D., C. A. Roessner, R. Devagupta, A. I. Scott and C. L. Nessler, Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*, Nucleic Acids Res., 18: 4939, (1990).

Meehan T. D. and C. J. Coscia, Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 53: 1043-1048, (1973).

Meijer A.H., Cytochrome P-450 and secondary metabolism in *Catharanthus roseus*, Faculteit der godgeleerdheid, Gravenhage, pp 1-151, (1993).

Meijer A. H., A. De Waal and R. Verpoorte, Purification of the cytochrome P-450 enzyme geraniol 10-hydroxylase from cell cultures of *Catharanthus roseus*, J. Chromatogr., 635: 237-249, (1993a).

Meijer A. H., M. I. Lopes-Cardoso, R. Verpoorte and J. H. C. Hoge, Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzymes essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants, Plant J., 4: 47-60, (1993b).

Meijer A. H., R. Verpoorte and J. H. C. Hoge, Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, J. Plant Res., 3: 145-164, (1993c).

Mérillon J. M., L. Ouelhazi, P. Doireau, J. C. Chenieux and M. Rideau, Metabolic changes and alkaloid production in habituated and non-habituated cells of *Catharanthus roseus* grown in hormone-free medium. Comparing hormone-deprived non-habituated cells with habituated cells, J. Plant Physiol., 134: 54-60, (1989).

Merillon J. M., K. G. Ramawat, J. C. Chenieux, and M. Rideau, Hormonal autotrophy and production of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures, in: VI International Congress Plant Tissue and Cell Culture, (Somers D. A., ed.), International Association for Plant Tissue Culture, Minneapolis, 370 (1986).

Misawa M., T. Endo, A. E. Goodbody, J. Vukovic, C. S. Chapple, L. S. L. Choi and J. P. Kutney, Synthesis of dimeric indole alkaloids by cell free extracts from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, Phytochemistry, 27: 1355-1359, (1988).

Misawa M. and A. E. Goodbody, Production of antitumor compounds by plant cell cultures, in: Plant Cell Culture Secondary Metabolism Toward Industrial Application, (DiCosmo F. and M. Misawa, eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 123-138, (1996).

Mizukami H., H. Nordlov, S.-L. Lee and A. I. Scott, Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* cultured cells, Biochemistry, 18: 3760-3763, (1979).

Moreno P. R. H., R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. 2. Updating from 1988 to 1993, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42: 1-25, (1995).

Moreno-Valenzuela O.A., Regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, pp 1-94, (1999).

Moreno-Valenzuela O. A., R. M. Galaz-Avalos, Y. Minero-García and V. M. Loyola-Vargas, Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root, *Plant Cell Rep.*, 18: 99-104, (1998).

Moreno-Valenzuela O. A., Y. Minero-García, L. Brito-Argáez, E. Carbajal-Mora, O. Echeverría, G. Vázquez-Nin and V. M. Loyola-Vargas, Immunocytolocalization of tryptophan decarboxylase in *Catharanthus roseus* hairy roots, *Mol. Biotechnol.*, 23: 11-18, (2003).

Moreno-Valenzuela O. A., M. Monforte-González, J. A. Muñoz-Sánchez, M. Méndez-Zeel, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor, Effect of macerozyme on secondary metabolism plant product production and phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* hairy roots, *J. Plant Physiol.*, 155: 447-452, (1999).

Morgan J. A. and J. V. Shanks, Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures, *J. Biotechnol.*, 79: 137-145, (2000).

Morris P., A. H. Scragg, N. J. Smart, and A. Stafford, Secondary product formation by cell suspension cultures, in: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, (Dixon R. A., ed.), IRL Press, Oxford, 127-167, (1985).

Narita J. O. and W. Gruissem, Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening, *The Plant Cell*, 1: 181-190, (1989).

Noé W., C. Mollenschott and J. Berlin, Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein, *Plant Mol. Biol.*, 3: 281-288, (1984).

O'Keefe B. R., G. B. Mahady, J. J. Gills, C. W. W. Beecher and A. B. Schilling, Stable vindoline production in transformed cell cultures of *Catharanthus roseus*, J. Nat. Prod., 60: 261-264, (1997).

Parr A. J., A. C. J. Peerless, J. D. Hamill, N. J. Walton, R. J. Robins and M. J. C. Rhodes, Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*, Plant Cell Rep., 7: 309-312, (1988).

Pasquali G., A. S. Erven, P. B. Ouwerkerk, F. L. Menke and J. Memelink, The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF, Plant Mol. Biol., 39: 1299-1310, (1999).

Pasquali G., O. J. M. Goddijn, A. De Waal, R. Verpoorte, R. A. Schilperoort, J. H. C. Hoge and J. Memelink, Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors, Plant Mol. Biol., 18: 1121-1131, (1992).

Peffley D. M. and A. K. Gayen, Inhibition of squalene synthase but not squalene cyclase prevents mevalonate-mediated suppression of 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis at a posttranscriptional level, Arch. Biochem. Biophys., 337: 251-260, (1997).

Peraza-Sánchez S. R., M. M. Gamboa-Angulo, C. Erosa-López, I. Ramírez-Erosa, F. Escalante-Erosa, L. M. Peña-Rodríguez and V. M. Loyola-Vargas, Production of 19(S)-epimisiline by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*, Nat. Prod. Lett., 11: 217-224, (1998).

Pfützner A., L. Polz and J. Stöckigt, Properties of vinorine synthase - the *Rauwolfia* enzyme involved in the formation of the ajmaline skeleton, Z. Naturforsch. [C], 41: 103-114, (1986).

Pfützner A. and J. Stöckigt, Partial purification and characterization of geissoschizine dehydrogenase from suspension cultures of *Catharanthus roseus*, Phytochemistry, 21: 1585-1588, (1982).

- Pfützner U. and M. H. Zenk, Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Planta Med.*, 55: 525-530, (1989).
- Power R., W. G. W. Kurz and V. De Luca, Purification and characterization of acetylcoenzyme A: Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 279: 370-376, (1990).
- Qureshi N., R. E. Dugan, W. W. Cleland and J. W. Porter, Kinetic analysis of the individual reductive steps catalyzed by beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-coenzyme A reductase obtained from yeast, *Biochemistry*, 15: 4191-4197, (1976).
- Reddy A. R. and V. S. R. Das, Partial purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase from the leaves of guayule (*Parthenium argentatum*), *Phytochemistry*, 25: 2471-2474, (1986).
- Reed B. C. and H. C. Rilling, Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver, *Biochemistry*, 14: 50-54, (1975).
- Roberts M. F., Enzymology of alkaloids biosynthesis, in: *Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, (Roberts M. F. and M. Wink, eds.), Plenum Press, New York, 109-146, (1998).
- Roberts M. F. and M. Wink, Introduction, in: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*, (Roberts M. F. and M. Wink, eds.), Plenum Press, New York and London, 1-7, (1998).
- Robinson T., Metabolism and function of alkaloids in plants, *Science*, 184: 430-435, (1974).
- Robinson T., *The Biochemistry of Alkaloids*, Springer-Verlag, pp 1-11, (1981).
- Rogers D. H., S. R. Panini, and H. Rudney, Properties of HMGCoA reductase and its mechanism of action, in: *3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase*, (Sabine J. R., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 57-75, (1983).
- Rohmer M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter and H. Sahm, Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, *Biochem. J.*, 295: 517-524, (1993).

Rudney H., The biosynthesis of b-hydroxy-b-methylglutaric acid, J. Biol. Chem., 227: 363-377, (1957).

Sáenz-Carbonell L., J. M. Santamaría, M. A. Villanueva, V. M. Loyola-Vargas and C. Oropeza, Changes in the alkaloid content of plants of *Catharanthus roseus* L. (Don) as a result of water stress and treatment with abscisic acid, J. Plant Physiol., 142: 244-247, (1993).

Sánchez-Iturbe P., R.M.Galaz-Avalos, and V.M.Loyola-Vargas, Determination and partial purification of a monoterpene cyclase from *Catharanthus roseus* hairy roots, (2004). (En prensa)

Schiel O., L. Witte and J. Berlin, Geraniol-10-hydroxylase activity and its relation to monoterpene indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, Z. Naturforsch. [C], 42c: 1075-1081, (1987).

Schmeller T. and M. Wink, Utilization of alkaloids in modern medicine, in: Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, (Roberts M. F. and M. Wink, eds.), Plenum Press, New York, 435-459, (1998).

Schröder G., E. Unterbusch, M. Kaltenbach, J. Schmidt, D. Strack, V. De Luca and J. Schröder, Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase, FEBS Lett., 458: 97-102, (1999).

Schwender J., M. Seemann, H. K. Lichtenthaler and M. Rohmer, Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*, Biochem. J., 316: 73-80, (1996).

Scott I. A., Biosynthesis of indole alkaloids, Acc. Chem. Res., 3: 151, (1979).

Shanks J. V., R. Bhadra, J. Morgan, S. Rijhwani and S. Vani, Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for metabolic engineering, Biotechnol. Bioeng., 58: 333-338, (1998).

- Singh S. N., P. Vats, S. Suri, R. Shyam, M. M. L. Kumria, S. Ranganathan and K. Sridharan, Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.*, 76: 269-277, (2001).
- Smith J. I., E. Amouzou, A. Yamaguchi, S. McLean and F. DiCosmo, Peroxidase from bioreactor cultivated *Catharanthus roseus* cell cultures mediates biosynthesis of a-3',4'-anhydrovinblastine, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10: 568-575, (2003).
- Sottomayor M., M. C. De Pinto, R. Salema, F. DiCosmo, M. A. Pedreño and A. R. Barcelo, The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of a-3',4'-anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L) G. Don leaves, *Plant Cell Environ.*, 19: 761-767, (1996).
- Sottomayor M., M. López-Serrano, F. DiCosmo and A. R. Barceló, Purification and characterization of a-3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L) G. Don, *FEBS Lett.*, 428: 299-303, (1998).
- St-Pierre B. and V. De Luca, A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*, *Plant Physiol.*, 109: 131-139, (1995).
- St-Pierre B., P. Laflamme, A. M. Alarco and V. De Luca, The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer, *Plant J.*, 14: 703-713, (1998).
- St-Pierre B., F. A. Vázquez-Flota and V. De Luca, Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate, *The Plant Cell*, 11: 887-900, (1999).
- Stern J. R., G. I. Drummond, M. J. Coon and A. del Campillo, Enzymes of ketone body metabolism. I. Purification of an acetoacetate-synthesizing enzyme from ox liver, *J. Biol. Chem.*, 235: 313-317, (1960).
- Stevens L. H., T. J. M. Blom and R. Verpoorte, Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension

cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*, Plant Cell Rep., 12: 573-576, (1993).

Stevens L. H., J. Schripsema, E. J. M. Pennings and R. Verpoorte, Activities of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in suspension cultures of *Catharanthus*, *Cinchona* and *Tabernaemontana* species, Plant Physiol. Biochem., 30: 675-681, (1992).

Stöckigt J., H.-P. Husson, Ch. Kan-fan and M. H. Zenk, Cathenamine, a central intermediate in the cell free biosynthesis of ajmalicine and related indole alkaloids, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 164-166, (1977).

Stöckigt J., J. F. Treimer and M. H. Zenk, Synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids by cell free extracts of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, FEBS Lett., 70: 267-270, (1976).

Stöckigt J. and M. H. Zenk, Isovincoside (strictosidine), the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids, FEBS Lett., 79: 233-237, (1977a).

Stöckigt J. and M. H. Zenk, Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 646-648, (1977b).

Sundberg R. J. and S. Q. Smith, The iboga alkaloids and their role as precursors of anti-neoplastic bisindole *Catharanthus* alkaloids, in: The Alkaloids, (Cordell G. A., ed.), Academic Press, San Diego, 281-376, (2002).

Svoboda G. H. and D. A. Blake, The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, in: The *Catharanthus Alkaloids*, (Taylor W. I. and N. R. Farnsworth, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 45-83, (1975).

Tchen T. T., Mevalonic kinase: Purification and properties, J. Biol. Chem., 233: 1100-1103, (1958).

Toivonen L., Utilization of *Catharanthus roseus* hairy root and cell suspension cultures in plant biotechnology, Helsinki University of Technology, Helsinki, pp 1-93, (1992).

Toivonen L., J. Balsevich and W. G. W. Kurz, Indole alkaloids from hairy root cultures of *Catharanthus roseus*, Phytochem. Soc. Newsletter, 29: 22, (1989).

Treimer J. F. and M. H. Zenk, Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation, Eur. J. Biochem., 101: 225-233, (1979a).

Treimer J. F. and M. H. Zenk, Strictosidine synthase from cell cultures of Apocynaceae plants, FEBS Lett., 97: 159-162, (1979b).

Uesato S., H. Ikeda, T. Fujita, H. Inouye and M. H. Zenk, Elucidation of iridodial formation mechanism partial purification and characterization of the novel monoterpene cyclase from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures, Tetrahedron Lett., 28: 4431-4434, (1987).

Uesato S., Y. Ogawa, H. Inouya, K. Saiki and M. H. Zenk, Synthesis of iridodial by cell free extracts from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures, Tetrahedron Lett., 13: 2893-2896, (1986).

Van der Heijden R., V. De Boer-Hlupá, R. Verpoorte and J. A. Duine, Enzymes involved in the metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A in *Catharanthus roseus*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 38: 345-349, (1994a).

Van der Heijden R. and R. Verpoorte, Metabolic enzymes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in *Catharanthus roseus*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 43: 85-88, (1995).

Van der Heijden R., R. Verpoorte and J. A. Duine, Biosynthesis of 3S-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a in *Catharanthus roseus*: acetoacetyl-CoA thiolase and HMG-CoA synthase show similar chromatographic behaviour, Plant Physiol. Biochem., 32: 807-812, (1994b).

Van der Heijden R., R. Verpoorte and H. J. G. Ten Hoopen, Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 18: 231-280, (1989).

Vázquez-Flota F., E. De Carolis, A. M. Alarco and V. De Luca, Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline- 4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent

dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, Plant Mol. Biol., 34: 935-948, (1997).

Vázquez-Flota F. and V. De Luca, Developmental and light regulation of desacetoxylvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Evidence of a multilevel regulatory mechanism, Plant Physiol., 117: 1351-1361, (1998a).

Vázquez-Flota F., V. De Luca, M. R. Carrillo-Pech, A. Canto-Flick and M. L. Miranda-Ham, Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, Mol. Biotechnol., 22: 1-8, (2002).

Vázquez-Flota F. and V. M. Loyola-Vargas, A *Catharanthus roseus* salt tolerant line. II. Alkaloid production, J. Plant Physiol., 144: 613-616, (1994).

Vázquez-Flota F., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, Y. Minero-García and V. M. Loyola-Vargas, Effects of nitrogen source on alkaloid metabolism in callus cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G Don, Phyton, 66: 155-164, (2000a).

Vázquez-Flota F., O. A. Moreno-Valenzuela, M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello and V. M. Loyola-Vargas, Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Medium optimization and elicitation, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 38: 273-279, (1994).

Vázquez-Flota F. A. and V. De Luca, Jasmonate modulates development- and light-regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, Phytochemistry, 49: 395-402, (1998b).

Vázquez-Flota F. A., B. St-Pierre and V. De Luca, Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings, Phytochemistry, 55: 531-536, (2000b).

Verpoorte R., R. Van der Heijden and J. Memelink, Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production, Transg. Res., 9: 323-343, (2000).

Verpoorte R., R. Van der Heijden, and P. R. H. Moreno, Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells, in: The Alkaloids, (Cordell G. A., ed.), Academic Press, San Diego, 221-299, (1997).

Verpoorte R., R. Van der Heijden, J. Schripsema, J. H. C. Hoge and H. J. G. Ten Hoopen, Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects, J. Nat. Prod., 56: 186-207, (1993).

Vetter H.-P., U. Mangold, G. Schröder, F.-J. Marner, D. Werck-Reichhart and J. Schröder, Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P-450 protein from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.), Plant Physiol., 100: 998-1007, (1992).

von Schumann G., S. Gao and J. Stöckigt, Vomilenina reductase a novel enzyme catalyzing a crucial step in the biosynthesis of the therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline, Bioorg. Med. Chem., 10: 1913-1918, (2002).

Waterman P. G., Chemical taxonomy of alkaloids, in: Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, (Roberts M. F. and M. Wink, eds.), Plenum Press, New York, 87-107, (1998).

Weissenborn D. L., C. J. Denbow, M. Laine, S. S. Lång, Z. Yang, X. Yu and C. L. Cramer, HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway, Physiol. Plant., 93: 393-400, (1995).

Westekemper P., U. Wiczorek, F. Gueritte, N. Langlois, P. Potier and M. H. Zenk, Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloid vindoline in *Catharanthus*, Planta Med., 39: 24-37, (1980).

Whitmer S., C. Canel, D. Hallard, C. Gonçalves and R. Verpoorte, Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*, Plant Physiol., 116: 853-857, (1998).

Whitmer S., R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a strictosidine synthase over-expressing transgenic cell line S1 of *Catharanthus roseus*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 69: 85-93, (2002a).

Whitmer S., R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*, J. Biotechnol., 96: 193-203, (2002b).

Wititsuwannakul R., D. Wititsuwannakul and P. Suwanmanee, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*, *Phytochemistry*, 29: 1401-1403, (1990).

Wong R. J., D. K. McCormack and D. W. Russell, Plastid 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase has distinctive kinetic and regulatory features: properties of the enzyme and positive phytochrome control of activity in pea seedlings, *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 631-638, (1982).

Yamamoto H., N. Katano, A. Ooi and K. Inoue, Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450, *Phytochemistry*, 53: 7-12, (2000).

Yamamoto H., N. Katano, Y. Ooi and K. Inoue, Transformation of loganin and 7-deoxyloganin into secologanin by *Lonicera japonica* cell suspension cultures, *Phytochemistry*, 50: 417-422, (1999).

Zenk M. H. and B. Deus, Natural product synthesis by plant cell cultures, in: *Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, (Fujiwara A., ed.), The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Japan, 391-394, (1982).

Zhao J., Q. Hu, Y. Q. Guo and W. H. Zhu, Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 693-698, (2001a).

Zhao J., W. H. Zhu and Q. Hu, Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures, *Plant Growth Regul.*, 33: 43-49, (2001b).

Zhao J., W. H. Zhu and Q. Hu, Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors, *Enzyme Microb. Technol.*, 28: 673-681, (2001c).

Zhao J., W. H. Zhu and Q. Hu, Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture, *Enzyme Microb. Technol.*, 28: 666-672, (2001d).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Objetivo General

Purificar y caracterizar a la enzima 10-OC de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

Objetivos específicos

Sintetizar el sustrato de la enzima mediante la oxidación química del 10-hidroxigeraniol.

Establecer un método para medir la actividad de la 10-OC *in vitro*, utilizando el sustrato verdadero previamente preparado, en raíces transformadas de *C. roseus*.

Medir los niveles de actividad de la 10-OC, durante un ciclo de cultivo de raíces transformadas de *C. roseus*.

Desarrollar un protocolo para purificar a la enzima 10-OC de raíces transformadas de *C. roseus*.

Determinar el pH óptimo, especificidad de sustrato, termoestabilidad y obtención de los valores de V_{max} y K_m de la enzima, tanto para el NADPH como para el 10-oxogeraniol.

Materiales

Cultivo celular. La línea J1 de raíces transformadas de *C. roseus* fue obtenida por infección de hojas de *C. roseus* con *Agrobacterium rhizogenes* cepa 1855 pBI 121.1 (Ciau-Uitz et al., 1994) y mantenida en medio B₅ (Gamborg et al., 1968) a la mitad de su fuerza iónica y subcultivada cada 21 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL

conteniendo 100 mL de medio, suplementado con 3% de sacarosa; el pH fue ajustado a 5.7 previamente a la esterilización por autoclave. El inóculo inicial fue 0.5 g PF en 100 mL de medio por matraz. Los matraces fueron incubados en la oscuridad en un orbitador a 100 rpm y 25°C.

Reactivos. El 10-hidroxigeraniol, geraniol, Reactive azul-4 agarosa, medio B₅, Tris, sulfato de amonio, acrilamida, bis-acrilamida, ajmalina, vincamina y vincristina fueron adquiridos de Sigma (St. Louis); la catarantina y la vindolina de los Laboratorios Ely Lilly, en tanto que la secologanina y el iridodial se obtuvieron de Research Institute for Medicinal Plants (Hungría). La sílica gel Sephadex G-25, Sephadex G-100 Superdex 75 y Superdex S-200 fueron de Pharmacia (Uppsala, Sweden), los estándares para la electroforesis fueron adquiridos de Bio-Rad (Mississauga, ON).

Síntesis química del 10-oxogeranial. La preparación del 10-oxogeranial, sustrato de la enzima 10-oxogeranial: iridodial ciclasa, se realizó aplicando el método de Corey y Suggs (1975). En 10 ml de CH₂Cl₂ se disolvieron 4 mmoles de 10-hidroxigeraniol y un mmol de cloro cromato de piridinio (PCC) hasta homogeneidad. La agitación se continuó hasta que se completó la oxidación. Después de terminada la oxidación, se adicionaron 5 volúmenes de éter anhidro, para lavar la mezcla, la cual fue agitada y después se dejó sedimentar. El sedimento, de color negro, se lavó 2 veces más. Se recuperó la fracción orgánica y se filtró a través de un embudo de vidrio poroso empacado con sílica gel y después se eliminó el disolvente a presión reducida. Posteriormente, el compuesto 10-oxogeranial fue purificado mediante filtración a través de una columna tipo flash de 20 cm de largo por uno de diámetro empacada con sílica gel, en 2 capas: en el fondo de la columna 2.1 cm de sílica gel de 230-400 mallas (60 Å, Aldrich) previamente humedecida con el mismo sistema de elusión, y en la parte superior 2 cm de sílica gel de 70-230 mallas (60 Å, Aldrich) (cabeza); la "cabeza" fue preparada mezclando directamente la muestra con la sílica gel (70-230 mallas) y 6 mL de diclorometano grado HPLC, desolventizada y después empacada. Después de empacar ambas capas, se eluyó con un litro de una mezcla hexano-acetona-metanol 80:18:2 (v/v) y se recuperaron fracciones de 20 mL (total de fracciones 50+30). La identidad del producto fue evaluada rutinariamente por TLC (hexano:acetona 7:3, ácido fosfomolibdico como revelador) y por RMN protónica. Las fracciones fueron

desolventizadas a presión reducida y el 10-oxogeranial fue almacenado en una atmósfera libre de oxígeno y protegido de la luz (Clark et al., 1978).

Resonancia magnética nuclear protónica. La RMN protónica se llevó a cabo en un aparato Varian EM 360. Los detalles espectrales fueron: ^1H MNR (90 MHz, CDCl_3): δ 10 (^1H , d, $J = 5.9$ Hz, H-8), 9.12 (^1H , s, $J = 2.99$ Hz, H-1), 5.88 (^1H , d, $J = 5.99$ Hz, H-7), 2.23 (^1H , s, $J = 2.99$ Hz, H-10), 1.54 (^1H , s, $J = 2.99$ Hz, H-9), 6.4 (^1H , d, $J = 5.99$ Hz, H-2).

Identificación del 10-oxogeranial. La identificación de la estructura del 10-oxogeranial fue realizada y definida por la determinación de su espectro de RMN protónica (90 MHz) con TMS como estándar interno, así como por cromatografía de capa fina con 10-hidroxigeraniol como compuesto de referencia, usando n-hexano:acetona (7:3) como disolvente de elusión.

Cromatografía de placa delgada. Esta técnica se empleó para dar seguimiento a la producción del 10-oxogeranial. Se utilizaron cromatofolios de aluminio de 5 x 5 cm (EM Merck DC Alufolien) con una capa de gel de sílice 0.25 mm con indicador fluorescente. El revelado de las placas se llevó a cabo con una solución de ácido fosfomolibdico (20 g de ácido fosfomolibdico y 2.5 g de sulfato sérico en 500 ml de H_2SO_4 al 5%) seguido por un calentamiento a 110-140°C.

Extracto enzimático. Todas las etapas fueron realizadas a 4°C. Las raíces transformadas de 21 días de edad (aproximadamente 0.54 Kg) fueron cosechadas, y rápidamente congeladas con nitrógeno líquido, molidas hasta un polvo fino y homogeneizadas con un equipo "Waring blender" con canasta de acero inoxidable durante 1.5 minutos a la velocidad máxima en el amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, pH 7, EDTA 2.5 mM, DTT 5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, leupeptina 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y sacarosa 250 mM) (relación 1:2 p/v). El extracto fue pasado a través de una gasa para remover los restos de tejidos y centrifugado a 10,000 x g por 30 minutos. El sobrenadante (proteína: 2-3.5 mg/mL) fue nuevamente centrifugado a 100,000 x g durante una hora; de esta centrifugación se recuperó el sobrenadante se le midió el volumen y fue empleado para determinar la actividad enzimática y para purificar la enzima 10 oxogeranial: iridodial ciclasa (0.9-1.1 mg mL^{-1}). La concentración de

proteína de las muestras fue determinada por el método de Peterson (1977), usando albúmina de suero bovino como estándar.

Actividad enzimática. La ciclización oxidativa del 10-oxogeranial fue medida *in vitro*, tanto en la fracción membranal como en la soluble, mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm. La mezcla de reacción contenía: 2 mM 10-oxogeranial, 5 mM DTT, extracto enzimático en cantidades variables (5 - 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína), 0.25 mM β -NADPH y amortiguador Tris-HCl 20 mM en cantidad suficiente para alcanzar el volumen de 1.4 mL. Cada mezcla de reacción fue preparada e incubada durante 2 minutos a 25°C, la adición del β -NADPH marcó el inicio de la reacción. Se determinaron las condiciones de cinética cero, con el fin de que la actividad enzimática fuera lineal con respecto al tiempo y a la concentración de proteína. La actividad de la enzima fue expresada en pKat (un picokatal es la actividad enzimática que es capaz de convertir un picomol de sustrato en producto por segundo, bajo las condiciones de ensayo). Las actividades específicas fueron expresadas como pKat mg^{-1} de proteína. En algunos experimentos, se probaron el geraniol y el 10-hidroxigeraniol como sustratos y el NADPH como cofactor respectivamente, en las mismas condiciones de ensayo ya señaladas.

Efecto de la temperatura. La termoestabilidad de la enzima fue determinada por incubación de una preparación enzimática cruda en 20 mM de amortiguador Tris-HCl a pH 7.5, a 4°C durante un periodo de 0 a 42 horas. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 42 horas. También se probó el mantener a la enzima a -81°C por 0, 1, 7 y 30 días; las muestras fueron descongeladas lentamente y ensayadas para determinar la actividad bajo las condiciones ya mencionadas. Los datos fueron graficados para mostrar los cambios en actividad a los tiempos de incubación y temperatura probados.

Efecto de agentes alquilantes sobre la actividad enzimática. El uso de agentes alquilantes permite determinar si una enzima requiere grupos sulfhidrilos para que mantenga su actividad; por ello se investigó el efecto de bloquear dichos grupos mediante la adición de los siguientes agentes alquilantes: ácido 2,3,5, triiodobenzoico (TIB), ácido iodoacético (AIA) y ácido p-cloromercuribenzoico (p-CMB) a la preparación

de la enzima en las concentraciones de 0 y 5 mM, en presencia y ausencia de DTT 5 mM. La mezcla de reacción fue incubada a 25°C durante 30 minutos y después se determinó la actividad enzimática. Las actividades fueron expresadas como porcentajes relacionados con los testigos del experimento.

Purificación de la enzima. A menos que se señale otra cosa, todas las etapas de purificación y extracción fueron realizadas sin interrupción a 4°C ó en un baño de hielo.

Fraccionamiento con sulfato de amonio. El extracto enzimático fue llevado al 35% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en polvo, agitado por 30 minutos y centrifugado a 10,000 x g por 20 minutos. La pastilla fue desechada y el sobrenadante, conteniendo la actividad de la enzima 10-oxogeranial: iridodial ciclasa, fue llevado al 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agitado por 30 minutos y centrifugado a 10,000 x g por 40 minutos. Se colectó la pastilla y se resuspendió en la menor cantidad posible del amortiguador B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptina y 100 mM NaCl). La suspensión resultante fue clarificada por filtración a través de una membrana (45 μm), previamente humedecida con el amortiguador B.

Cromatografía Superdex S-200. La muestra (proteína 2.7 mg mL^{-1}), previamente degasificada, fue aplicada a una columna de filtración en gel grado preparativo HiLoad 26/60 Superdex S-200 (Pharmacia) de 2.6 x 60 cm equilibrada con el amortiguador B y acoplada a un FPLC. La velocidad de cargado y elución fue de 0.5 mL min^{-1} y el tamaño de cada fracción fue de 3 mL.

Cromatografía en Reactive Azul-4-agarosa. Los picos de las fracciones eluidas de la columna de Superdex S-200 y que contenían a la 10-OC (aprox. 0.05 mg/ml de proteína) fueron reunidas en un mismo lote y aplicados a una minicolumna (0.9 cm x 6.2 cm) de afinidad (Reactive Azul-4-agarosa, Sigma, con afinidad por oxidorreductasas NADPH y/o NADH dependientes) previamente equilibrada con amortiguador C (amortiguador B sin el NaCl). La muestra aplicada equivale al 30% de su capacidad ligante. La columna fue lavada con el amortiguador C hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzara los niveles de la línea base. La elución de la 10-OC de la columna fue realizada a una velocidad de 0.1 mL min^{-1} con un gradiente lineal de 0 a 1.5 mM KCl en el amortiguador C; se recolectaron fracciones de 1 mL; las

fracciones que contenían la actividad de la 10-OC fueron identificadas por el ensayo enzimático y reunidas, para ser aplicadas posteriormente a una columna de filtración en gel (Superdex 75). La minicolumna de Reactive Azul-4-agarosa fue rutinariamente regenerada de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante.

Cromatografía en Superdex 75. Las fracciones que contenían la actividad de la 10-OC eluidas de la columna de afinidad fueron reunidas y se aplicaron a una columna de filtración en gel Superdex 75 (HR 10/30), equilibrada y eluida con amortiguador B a una velocidad de 0.3 ml/min, se recuperaron fracciones de 1 mL. Las fracciones con actividad de 10-OC se reunieron en una sola muestra para su análisis posterior. La resina de Superdex 75 fue obtenida de Pharmacia, hidratada y empacada en nuestro laboratorio, usando las referencias proporcionadas por el fabricante. La elusión de la proteína fue monitoreada en todas las etapas cromatográficas midiendo la absorbancia a 280 nm.

Estimación de la masa molecular. La masa aparente de la 10-OC fue determinada por cromatografía en columna de Superdex 75 (HR 10/30) y SDS-PAGE. La enzima parcialmente purificada fue aplicada a una columna de Superdex 75 previamente calibrada con las siguientes proteínas de referencia: alcohol deshidrogenasa (150,000 daltones), albúmina de suero bovino (66,000 daltones), anhidrasa carbónica (29,000 daltones), citocromo C (12,400 daltones) y aprotinina (6,500 daltones). La masa molecular aparente de la enzima fue estimada con base en su volumen de elusión.

Electroforesis. La electroforesis se realizó con un equipo Mini-protean II (Bio-Rad) siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). La pureza de cada una de las fracciones obtenidas en las diferentes etapas cromatográficas fue ensayada por SDS-PAGE usando geles de acrilamida al 10% de concentración, corridos a 40 mA, revelados con tinción de plata amoniacal (Wray et al., 1981). Los geles nativos fueron revelados con tinción de azul de Coomassie R-250 usando reactivos de Pharmacia.

Electroenfoque. La separación de las muestras por electroenfoque se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Robertson et al., (1987). Brevemente, se corrieron geles de poliacrilamida al 4% usando el rango de pH de 3 a

10, a una fuerza constante de 200 volts por 2 horas y continuado a 400 volts por otras 2 horas, a 5°C.

pH óptimo. Se utilizaron tres diferentes amortiguadores para determinar el pH óptimo: amortiguador de citrato 100 mM (pH 3.5, 4.5 y 5.5), amortiguador de fosfato 25 mM (pH 6.5, 6.8, 7.0, 7.3 y 8), y amortiguador de glicina-NaOH 100 mM (pH 9 y 10). Para determinar el pH óptimo de la actividad enzimática, la proteína purificada fue medida en los diferentes amortiguadores, variando el pH desde 3.5 hasta 10. La actividad enzimática a un pH dado fue determinada mezclando la solución proteica con la enzima con los demás componentes del ensayo enzimático en las mismas condiciones establecidas previamente y a cada uno de los pHs analizados.

Determinación de los parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos de la 10-OC fueron determinados variando la concentración del 10-oxogeranial en los niveles 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 mM y del β -NADPH: 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.35 mM, los demás parámetros de la reacción se mantuvieron constantes.

REFERENCIAS

- Ciau-Uitz R., M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chí, L. M. Pacheco and V. M. Loyola-Vargas, Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*, In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant, 30P: 84-88, (1994).
- Clark S. W., M. Kahn and A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, J. Org. Chem., 43: 2923-2925, (1978).
- Corey E. J. and J. W. Suggs, Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds, Tetrahedron Lett., 31: 2647-2650, (1975).
- Gamborg O. L., R. A. Miller and K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res., 50: 151-158, (1968).
- Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685, (1970).

Peterson G. L., A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.*, 83: 346-356, (1977).

Robertson E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy and H. C. Reeves, Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system, *Anal. Biochem.*, 167: 290-294, (1987).

Wray W., T. Bouliskas, V. P. Wray and R. Hancock, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 118: 197-203, (1981).

Capítulo 3

Resultados y Discusión

Determination and partial purification of 10-oxogeranial: iridodial cyclase an enzyme catalyzing the synthesis of iridodial from *Catharanthus roseus* hairy roots. Patricia G. Sánchez-Iturbe, Rosa M. Galaz-Ávalos & Víctor M. Loyola-Vargas*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México. *Author for correspondence Fax: (999)-9813900; e-mail: vmloyola@cicy.mx

This paper is in press in the Phyton journal

Abstract

The enzyme 10-oxogeranial: iridodial cyclase, catalyzes the formation of iridodial starting from 10-oxogeranial and NADPH. It was isolated, semipurified and characterized from soluble extracts of *Catharanthus roseus* hairy roots. In the first part of this study, a methodology for the preparation of the true substrate of the enzyme, the iridodial, was settled; it was obtained by means of the double chemical oxidation of the 10-hydroxigeraniol using the Corey's reagent as oxidizer. A protocol to measure the enzyme was established following the oxidation of the NADPH at 340 nm. The 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity was followed during 21 days of the growth cycle. The purification procedure included several chromatographic steps.

The determinate molecular mass was 66 kDa. The optimum pH for the semipurified enzyme was 7 and its pI was 5.4. The determination of the initial velocity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase in the presence of NADPH as the fixed-variable substrate at different concentrations of 10-oxogeranial follows the typical Michaelis-Mentel equation. The calculation of the K_m using the double reciprocal method yield a value for the K_m for NADPH and 10-oxogeranial of 70 μM and 0.52 mM, respectively.

Key words: Iridodial, *Catharanthus roseus*, hairy roots, indole alkaloids.

Introduction

Alkaloids are one of the most diverse groups of secondary metabolites founded in living organisms. Actually, more than 12,000 alkaloids have been described and many of them have a function in defense against herbivores and pathogens (Facchini, 2001). Alkaloids have been traditionally isolated from plants (De Luca y St-Pierre, 2000), however, they can also be isolated from mammals, frogs, insects, marine invertebrates and microorganism (Kutchan, 1995). A large amount of these compounds are currently used in medicine (Schmeller y Wink, 1998).

According to their biogenetic origin they are classified as 1) alkaloids derivate from amino acids, 2) purine alkaloids, 3) aminated terpenoids, 4) steroidal alkaloids and 5) polyketides alkaloids. In the first group are the tryptophan derivate alkaloids, among of which the indole alkaloids are grouped. Terpenoid indole alkaloids (TIAs) are a family of compounds with more than 3,000 members and only for a few of them their physiological effects in mammals are known (Facchini, 2001; Geerlings et al., 2000; Kutchan, 1995). Those compounds are founded in several plant families such as Apocynaceae, Loganiaceae, Nissaceae and Rubiaceae. Among the most studied species that produce alkaloids are *C. roseus*, *Tabernaemantana divaricata* and *Rauvolfia serpentine*.

C. roseus (L.) G. Don is a perennial plant from the Apocynaceae family, from Madagascar (Svoboda y Blake, 1975). This plant has been used in traditional medicine as a hypoglycemic agent (Singh et al., 2001), is a source of different chemotherapeutic agents with anticancerigen activity (Svoboda y Blake, 1975; Van der Heijden et al., 1989).

Among the most important compounds in this plant are the bisindole alkaloids like vinblastine, used for Hodgkin disease, and vincristine used for the treatment of leukemia (Schmeller y Wink, 1998). It also produces the antihypertensive agents

ajmalicine and serpentine (Shanks et al., 1998) used against cardiac arrhythmia and to improve brain circulation (Moreno et al., 1995; Schmeller y Wink, 1998). The biosynthesis of these alkaloids is extremely complex and requires the conjunction of two metabolic pathways: the indole and the terpenoid pathway (De Luca, 1993; Meijer et al., 1993b).

There are two metabolic pathways in plants for the synthesis of mevalonic acid to produce isoprenoids. These two pathways take place in different compartments: 1) in the cytosol takes place through the classical route acetate/ mevalonic acid for the biosynthesis of sterols and sesquiterpenes, and 2) in plastids the route of the 1-deoxy-D-xilulose-5-phosphate (Lange et al., 2000; Lichtenthaler, 2001).

According to Contin et al., (1998), secologanine is produced mainly from the alternative route of the isopentenyl pyrophosphate synthesis. Although, some data support the hypothesis that the cytosolic pathway also participate in its biosynthesis. In our group, using *C. roseus* transformed roots, we founded that when these roots were transformed with a hamster HMGR-truncated gene lacking the membrane binding domain, show differences in the alkaloid and sterol biosynthesis content (Ayora-Talavera et al., 2002). When HMGR activity was assayed, the clone that presented the minor soluble enzymatic activity had an increase in the synthesis of ajmalicine and catharanthine, with a concomitant decrease of the campesterol content. In the clone that presents higher HMGR enzymatic activity the levels of campesterol increased, as well as the serpentine content with no changes in catharanthine (Ayora-Talavera et al., 2002).

In *C. roseus* only a few of the enzymes required for the secologanine synthesis have been determinate. The most well known enzymes are: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (Van der Heijden et al., 1989), geraniol 10-hydroxylase (Canto-Canché y Loyola-Vargas, 2000; Canto-Canché y Loyola-Vargas, 2001; Meijer et al., 1993a); NADPH:cytochrome P-450 reductase (Madyastha y Coscia, 1979a); a non specific monoterpene-alcohol oxide-reductase (Madyastha y Coscia, 1979b), S-adenosil-L-methionine-acid loganic-methyltransferase (Madyastha et al., 1973) and secologanine synthase (Irmiler et al., 2000; Yamamoto et al., 2000).

Regarding the enzyme monoterpene acyclic of primary alcohols: NADP⁺ oxidoreductase, it has been shown that this enzyme plays an important role on the secologanin synthesis (De Luca et al., 1998), catalyzing the reversible oxidation of 10-hydroxygeraniol in the presence of NADP⁺, to produce 10-oxogeraniol or 10-hydroxygeranial. There are evidences that this enzyme may be unspecific for the hydroxyl group that is able of oxide (Uesato et al., 1986). It has been purified from *R. serpentine* cells; its molecular mass is 44 kDa with a pI of 5.4. It is inactive by iodoacetamide and *N*-ethylmaleimide, which suggest that it requires SH groups for its activity (Ikeda et al., 1991). K_m values for NADP⁺ and NADPH is 25 and 5.5 μ M respectively, using nerol (oxidation) or neral (reduction) as a substrate. It does not uses NAD⁺ or NADH as cofactors, however, it may accept allylic primary alcohols with chains larger than 6 carbons; secondary alcohols, as well as ethanol are not accepted as substrates (De Luca et al., 1998).

The enzyme 10-oxogeranial: iridodial cyclase catalyses the production of iridodial from 10-oxogeranial using NADPH as the reductor agent (Figure 15). This enzyme has been purified 440 fold from *R. serpentine* (Uesato et al., 1986; Uesato et al., 1987) and it seems to form a heterotetramer with a molecular mass of 118 kDa with an optimal activity at pH 7.0. However, the enzyme was not measured directly (Uesato et al., 1986; Uesato et al., 1987). These authors used labeled geraniol (the substrate of the geraniol-10-hydroxylase) as substrate. In this paper we report, for the first time, the measurement of the enzyme activity using 10-oxogeranial, its true substrate, and the partial purification of this 10-oxogeranial: iridodial cyclase.



Iridodial

buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7, EDTA 2.5 mM, DTT 5 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, leupeptine $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and sucrose 250 mM). The extract was passed through a gauze to remove tissue debris and centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min. The supernatant (protein: 2-3.5 mg mL^{-1}) was centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h, and the supernatant (1 mg mL^{-1}) was used for enzyme purification and enzyme activity. Protein concentration was determined by Peterson (1977) methodology, using bovine serum albumin as standard. All the steps were performed at 4°C .

Enzyme activity. The oxidative reaction of 10-oxogeranial was performed in vitro, by measuring the decrease of absorbance at 340 nm of NADPH. The reaction mixture contained: 2 mM 10-oxogeranial, 5 mM DTT, 0.25 mM β -NADPH, Tris-HCl 20 mM and protein extract into a final volume of 1.4 ml. The reaction was incubated for 2 min at 25°C .

Enzyme purification. The protein extract was saturated at 35% with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (powder), stirred for 30 min and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min. The supernatant, was saturated until 70% with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, stirred for 30 min and centrifuged at $10,000 \times g$ for 40 min. The pellet was suspended in buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptine and 100 mM NaCl). The resultant suspension was clarified by filtration in a membrane ($45 \mu\text{m}$). The degasified sample was applied to a gel filtration column HiLoad 26/60 Superdex S-200 (Pharmacia; $2.6 \times 60 \text{ cm}$) connected to a FPLC. The elution flux was 0.5 mL/min and 3 ml fractions were collected. The fractions with the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity were pulled and applied into an affinity column ($0.9 \text{ cm} \times 6.2 \text{ cm}$; Reactive Blue-4-agarose, Sigma) previously equilibrated with buffer C (buffer B without NaCl) the sample applied was equivalent to the 30% of their binding capacity. The column was washed with buffer C until absorbance at 280 nm reached the base line. The elution of the enzyme was performed at 0.1 mL min^{-1} flux rate with a lineal gradient between 0 and 1.5 mM KCl in buffer C; one ml fractions were collected and the fraction containing the enzyme activity was applied into a gel filtration column (Superdex 75). The fraction containing enzyme activity was eluted and applied into a filtration gel Superdex 75 (HR 10/30), the elution was performed with buffer B at flux rate of 0.3 mL min^{-1} , and one ml fractions were collected. The molecular mass was calculated in a Superdex 75 column. SDS-PAGE

was carried out according to Laemmli (1970) and silver stained (Wray et al., 1981). Electrofocusing was developed according to Robertson et al., (1987). Polyacrylamide gels 4% were carried out using a pH range from 3 to 10 at 200 V for 2 h and then 400 V for another 2 h, at 5°C.

Glycosylation pattern. For the glycoproteins detection, SDS-PAGE (10%) was performed in a Miniprotean (Biorad) at 100 V for 2 h. Proteins were transferred to Nylon membrane (Byodine, Gibco) for 5 h at 50 V using a transfer buffer (methanol, glycine and SDS) and stained with concanavaline according to Clegg (1982).

Results and Discussion

Substrate synthesis. In order to measured enzyme activity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase, the 10-oxogeranial was synthesized. The 10-hydroxygeraniol was oxidized using the Corey's reactive. The oxidation was completed after 5 h. The oxidation of the 10-hydroxygeraniol was followed by TLC using hexane:acetone (7:3, v/v) as solvent; the identification of the samples was made using true standards. The 10-oxogeranial was identified by ^1H NMR by comparison of the spectra. This showed the typical double signal for no aromatic aldehyde groups at 10 δ ppm and those for methyl groups joined to double bonds at 1.54 and 2.33 ppm, as well two signals for the allylic protons close to oxygen atoms at 5.88 and 6.4 ppm. The yield of the processes was 87%.

Determination of the enzyme activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase. We initiated with 50 g of *C. roseus* hairy roots. The sample was extracted as was mentioned in materials and methods. The homogenate was centrifuged at 100,000 x g during one hour. To measure the enzyme activity, 25 μg of membranal or soluble protein were employed. The enzyme activity was followed by the oxidation of the NADPH at 340 nm. No membranal activity could be determined. The soluble fraction showed a specific activity of 19.45 nKat mg prot $^{-1}$. The cytosolic localization for the 10-oxogeranial: iridodial cyclase is compatible with the pathway previously suggested (De Luca et al., 1992; Loyola-Vargas et al., 2004; Meijer et al., 1993b).

Different amounts of proteins were used in order to determinate the initial velocity of the enzyme as a function of time (Figure 16). The enzyme activity was dependent of the concentration of protein and was lineal until 200 µg of protein (Figure 17). In the absence of substrate (Figure 16, inverted open triangles), when the extract was heated at 90°C by 10 min or treated with trypsin no activity was found as expected for a reaction catalyzed by a protein (Table 2).

In general, the enzymes catalyzing the oxide-reduction reactions are very sensitive to reagents that react with thiols groups. The p-CMB and the acids 2,3,5-triodobenzoic and iodoacetic inhibited the activity of the enzyme by 100, 70 and 33% respectively (Table 2), suggesting that this enzyme requires sulfhydryl groups for its activity. This was confirmed when the same experiment was carried out in the presence of DTT, an agent which is able to protect the sulfhydryl groups. In the presence of this protecting agent the decrease in the activity in the presence of the inhibitors was less than half that in its absence (Table 2).

Table 2. Determination of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity in the presence of compounds interfering with its activity. The control activity was 25.84 nmoles min⁻¹.

Condition (1 mM)	Inhibition (%) Without DTT	Inhibition (%) With DTT
p-CMB	100.0	9.0
2,3,5-triodobenzoic acid	70.9	32.0
2,3,5-triiodoacetic acid	33.5	16.0
Heating (90°C, 10 min)	98.0	100.0
Trypsine	100.0	100.0

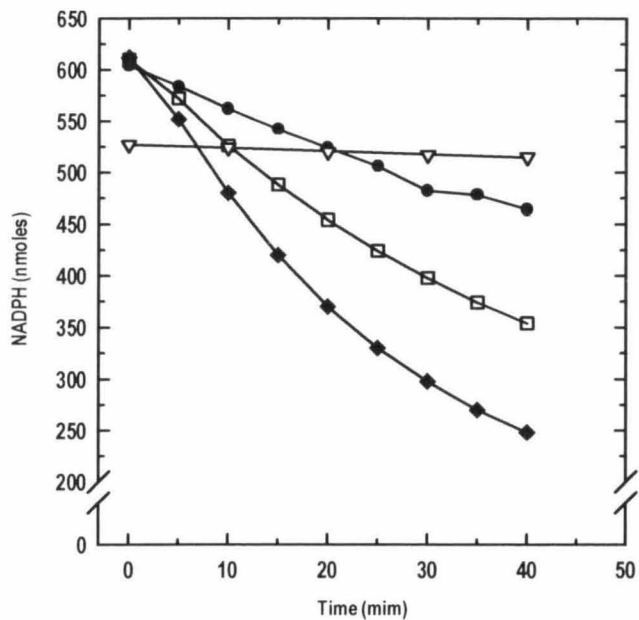


Figure 16. Time course of the oxidation of NADPH to determinate the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity; (▽) reaction in the absence of 10-hydroxygeranial (control). (●) 157.4µg protein. (□) 314.7 µg protein. (◆) 472.0 µg protein.

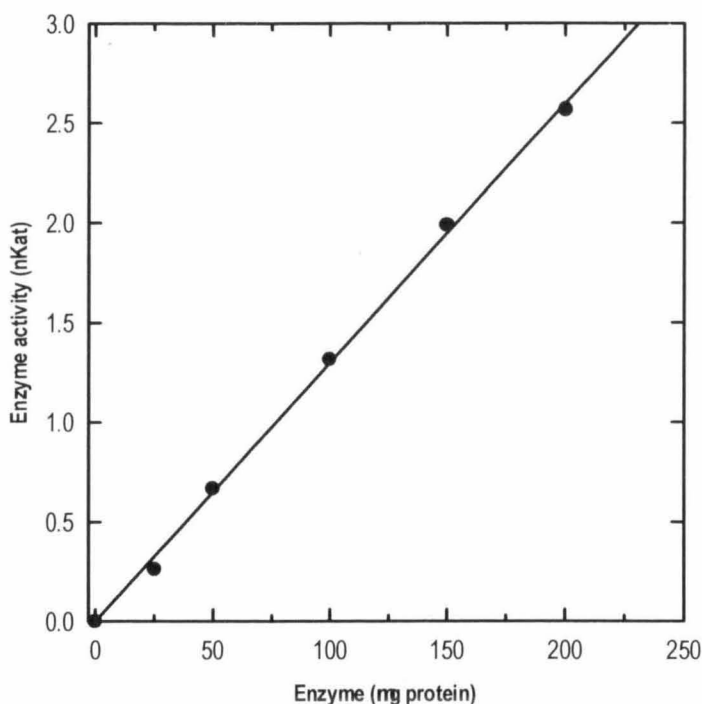


Figure 17. Relationship between enzyme activity and protein amount. See materials and methods for the details of the conditions of the reaction.

Some 10-oxogeranial: iridodial cyclase are able to use different substrates (Uesato et al., 1987); in the case of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase and under the used conditions, geraniol and 10-hydroxygeraniol were used as substrate by the enzyme at 53% and 45%, respectively, of the enzyme activity in the presence of 10-oxogeranial (Table 2). On the other hand, the enzyme activity in the presence of NADH as cofactor was only one third of the activity in presence of NADPH. The enzyme from *R. serpentine* is able to use NADH at 53% of that found with NADPH (1987). In the case of acyclic monoterpene cyclase from *Nepeta racemosa* the requirement of NADPH is absolute (Hallahan et al., 1995).

Table 3. Determination of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity in the presence of different substrates (2 mM). The activity in the presence of 10-oxogeranial was 181.8 pKat and the concentration of the cofactor was 250 μ M.

Substrate	Activity (%)
10-oxogeranial/ β -NADPH	100.0
10-hidroxygeraniol/ β -NADPH	53.3
Geraniol/ β -NADPH	45.2
10-oxogeranial/ β -NADH	33.7

Additionally to the different assays used to demonstrate that we were measuring the enzyme, we identified the product of the reaction as iridodial. The reaction mixture of several hundred of determinations was pull together and extracted with ethyl acetate three times, these extracts were pull together and applied on the top of a flash column (20 x 1 cm); aliquots of 2.5 ml were collected. Each fraction was applied to a chromatographic plate and developed with hexane:ethyl acetate (85:15) together with an iridodial standard. We were able to identify a compound with the same R_f as the iridodial standard into the aliquot 10.

Determination of the enzyme activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase through the culture cycle. The enzyme activity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase was measured through the culture cycle in the soluble fraction of *C. roseus* hairy roots. For this experiment 0.5 g of *C. roseus* hairy roots were subcultured in 100 ml of B₅ medium in 250 ml Erlenmeyer. The growth and enzyme activity were measured every 3 days (Figure 18). The growth followed the characteristic sigmoidal curve of these types of cultures. The lag phase lasted 3-4 days; the exponential phase initiated at day 5 and followed for 7 days. The lineal phase ended at day 25 when the culture reach the stationary phase.

During the first 18 days of growth, the 10-oxogeranial: iridodial cyclase maintained the same levels of enzyme activity through the culture cycle (1,200 pKat mg protein⁻¹). Around day 21 the activity increased sharply and reached 1,750 pKat mg protein⁻¹; later on, the activity decreased until 400 pKat mg protein⁻¹ (Figure 18). The maxima activity

of the enzyme coincides with the lineal phase of the growth of the roots, and the decrease with the stationary phase. This differential development of the activity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase through the culture cycle, is very similar to other enzymes involved in the secondary metabolites (Brodelius, 1990; Collu et al., 2002; Islas-Flores et al., 1994; Kitamura et al., 1992; Luckner y Diettrich, 1990; Luijendijk et al., 1996).

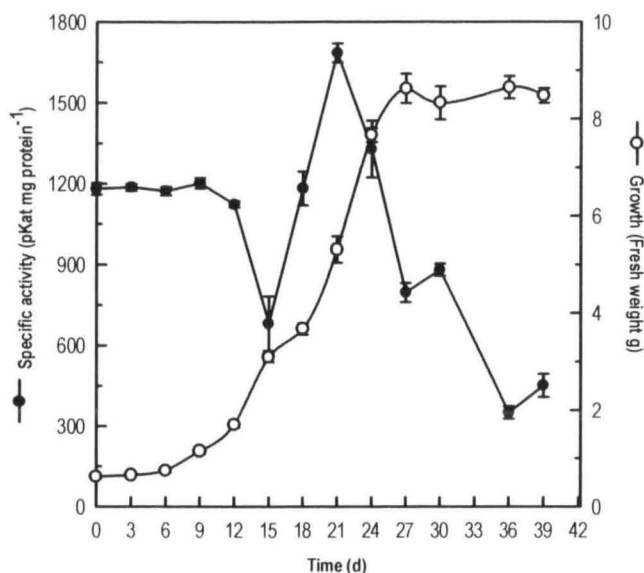


Figure 18. Time course of cell growth and 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity through the cell culture cycle in *C. roseus* hairy roots. Each point is the average of three independent experiments with its standard deviation.

The peak of maxima activity coincide with those determined for other enzymes involved in the alkaloid biosynthesis in *C. roseus* hairy roots (Islas-Flores et al., 1994) and before the accumulation of alkaloids, such as ajmalicine, during the stationary phase (Ciau-Uitz et al., 1994; Toivonen et al., 1989).

Purification of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase. The enzyme was purified from *C. roseus* hairy roots 21 days old. The purification of this type of enzymes has been very

difficult because the enzyme activity is very low, the presence of substances interfering with the stability of the enzymes, the presence of other enzymes using some of the same substrates and the instability of the enzymes. At the beginning of the purification protocol the most important parameter to know is the stability of the enzyme (Deutscher, 1990). In some cases and under different store conditions enzymes can be instable when they are keep to 4°C (De Carolis y De Luca, 1993; Rajaonarivony et al., 1992).

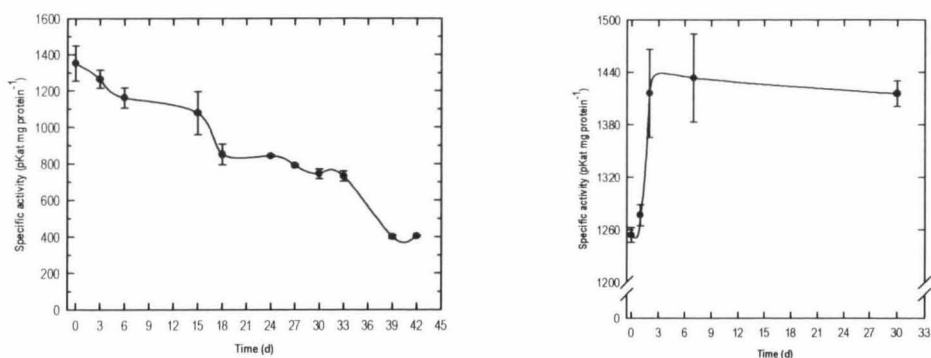


Figure 19 (left panel) Effect of storage the extract at 4°C on the enzymatic activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase. (right panel) Effect of keeping the extract at -81°C on the enzymatic activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase.

In order to determinate the stability of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase, after the extraction the samples were divided in aliquots of one milliliter and separated in three sets. One was keeping at 4°C, the second was stored at -81°C and the third was frozen with liquid nitrogen and then stored at -81°C for a month. The enzyme activity of the samples stored a 4°C was measured every 3 hours during the first 42 hours of storage. The enzymatic activity decreased continuously during the first 18 hours, it keeps stable for 15 hours and then decreased again (Figure 19). It is possible that the sample contains two isoenzymes for the 10-oxogeranial: iridodial cyclase; other explanation could be that the enzyme is forming dimmers or trimmers, which maintain the enzymatic activity, and the association is loss with time.

When the enzyme was stored at -81°C the activity increased by 30% after the first 48 hours. Later on the activity was kept without change for a month (Figure 19). The

increase in the activity could be due to the presence of an inhibitor, which is unstable and degraded during the storage.

The monoterpene cyclase has been partially purified from cellular cultures of *R. serpentine* using a three chromatographic steps (Uesato et al., 1987). During this research the 10-oxogeranial: iridodial cyclase was purified from 500 g of *C. roseus* hairy roots by precipitation with ammonium sulphate and four different chromatographic steps (Table 4).

Table 4. Purification scheme for the 10-oxogeranial: iridodial cyclase from *C. roseus* transformed roots.

Step of purification	Volume (mL)	Protein (mg)	Activity (pKat)	Specific activity (pKat/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	166	175.9	7,100	47.2	100	1
Soluble fraction	163	142.1	12,074	85.0	170	1.8
Ammonium sulphate 35-70%	10.7	27.2	1,412	88.4	19.9	1.9
Superdex S-200 (P)	30	5.6	1,010	64.74	137.16	1.37
	35	7.1	1,335	88.95	188.07	1.88
Blue-4-agarose	.025	0.71	3,320	79.79	164	1.64
	0.25	0.57	3,000	100.60	213.13	2.11
Superdex 75A	0.5	0.185	9,743	388	137.2	8.2
	0.5	0.064	5,500	925.3	77.5	19.6

Since previously was determined that the 10-oxogeranial: iridodial cyclase is not present in the membranes, the separation between the membranal and soluble fractions was used as the first purification step. The roots were extracted was mentioned in materials and methods in the presence of the extraction buffer (Tris-HCl 50 mM, sucrose 250 mM, EDTA 2.5 mM, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 1 μ M, pH 7.5) 1:2 (w/v). The purification protocol was initiated with 176 mg of protein, a total activity of 7,000 nkatal and a specific activity of 47 pkatal mg protein⁻¹ (Table 4). The separation of the membranal protein eliminated 30 mg of protein and the total activity

increased 70%, probably due to the elimination of an inhibitor associated with the membrane. The same phenomenon has been observed previously when the crude extract was storage at -81°C (Figure 19). This step yielded 1.8-fold purification.

The fractionation of the protein with ammonium sulphate between 35 – 70% eliminates the 85% of the protein; however, also introduce a very important loss of the activity (Table 4). The fraction from ammonium sulphate fractionation was suspended in 10.7 ml of buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 1 μM , pH 7.5), filtered and loaded in a filtration gel column (Superdex G-200, 25 x 600 mm). Two peaks showing 10-oxogeranial: iridodial cyclase activity and molecular mass of 66 (peak A) and 40 (peak B) kDa were eluted from this column (Figure 20). It is possible that the smallest peak be a degradation product from the 60 kDa peak.

Each peak with enzymatic activity from the Superdex column was loaded, separately, to a blue-4-agarose affinity column (5 x 10 mm). The protein with the activity, as expected was attached to the column and was eluted with a KCl gradient. The peak A was eluted at a conductivity of 75 mS (Figure 20), instead the peak B was eluted at 15 mS (data not shown). The use of this type of column yielded the higher increase in the degree of purification. The total activity recovered after the use of these columns was higher than 6,000 pkatal. The recovery of higher activity after the use of this type of column suggests that the protein is more stable forming associations or that an inhibitor has been removed.

In each case the fractions with the enzymatic activity were pulled together and loaded onto a Superdex G-75 column (10 x 100 mm) (Figure 20). The fractions with the 10-oxogeranial: iridodial cyclase were pulled and used for the characterization of the enzyme. After the use of these columns the peaks A and B were purified 8 and 19-folds with a specific activity of 388 y 925 pkatal mg protein⁻¹, respectively. The electrophoresis in 10% acrylamide SDS gels of peaks A and B showed two major bands with molecular mass of 66 y 40 kDa respectively.

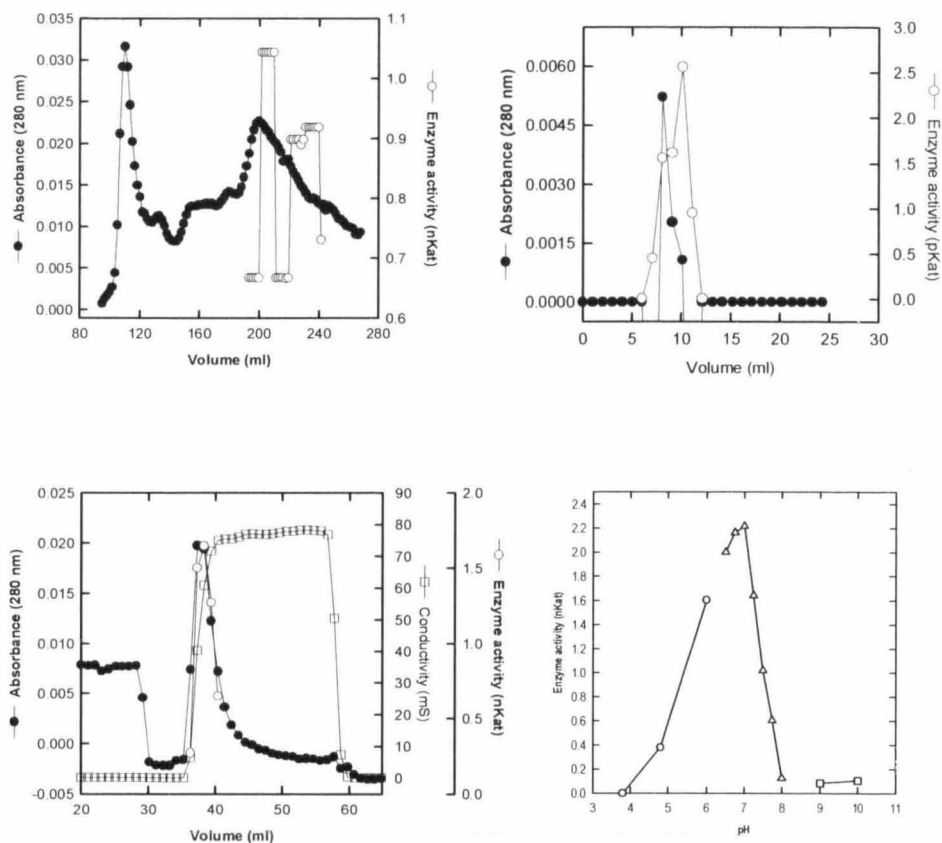


Figure 20 (upper left panel). Superdex G-200 elution profile for *C. roseus* 10-oxogeranial: iridodial cyclase after precipitation with ammonium sulphate. (upper right panel). Blue-4-agarose Superdex elution profile for *C. roseus* 10-oxogeranial: iridodial cyclase peak A after elution from Superdex G-200. (bottom left panel). Superdex G-75 elution profile for *C. roseus* 10-oxogeranial: iridodial cyclase peak B after elution from Blue-4-agarose Superdex. (bottom right panel). pH profile for the catalytic activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase. (○) citrate buffer 0.1 M; (Δ) phosphate buffer 0.1 M; (□) glycine buffer 0.1 M.

With the semipurified enzyme some of its properties were determined. The molecular mass was determined using a gel filtration Superdex G-75 HR column (25 x 600 mm) calibrated with different mass molecular weight markers. The molecular mass for peak A was 66 kDa. This molecular mass is lower than those determined by Uesato et al., (1987) (Uesato et al., 1987) for the *R. serpentina* enzyme, who determined a molecular mass of 118 kDa for the complete enzyme and 4 subunits.

To determine the optimal pH for the reaction catalyzed by the 10-oxogeranial: iridodial cyclase three different buffer systems were used: citrate (pH 3.8 – 6), phosphate (pH 6.5 – 8) and glycine (pH 9 – 10). The optimum pH was 7.0 (Figure 20). This pH was the same that the optimum pH determinate for *R. serpentina* enzyme (Uesato et al., 1987), with the only difference that the range of the optimum pH was wider for the *R. serpentina* preparation, probably due to the grade of purity of the enzyme used for the assay.

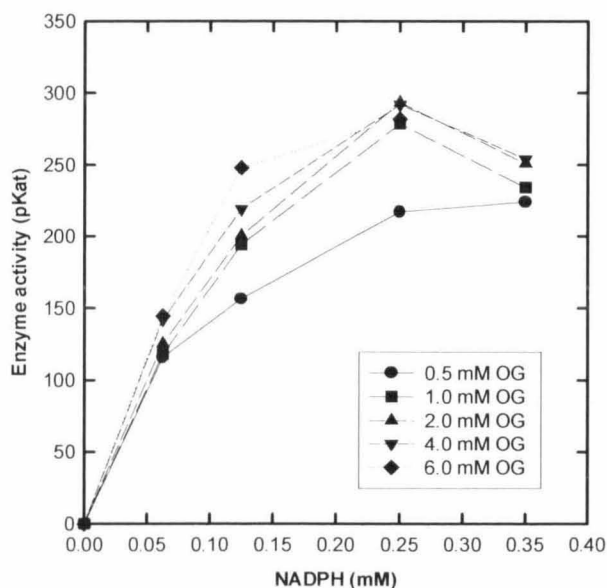


Figure 21. Effect of the concentration of NADPH on the activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase at different fixed concentrations of 10-oxogeranial.

The determination of the apparent K_m for the substrates of the enzyme was carried out using different substrate concentrations of one of them, and maintaining the concentration of the second substrate constant at each of the different concentrations used, and evaluating the velocity of the reaction.

The determination of the initial velocity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase was made using first the 10-oxogeranial as the fixed-variable substrate at different concentrations of β -NADPH (Figure 21). The development of the reaction follows the typical Michaelis-Mentel equation; nevertheless, concentrations higher than 250 μ M of β -NADPH are inhibitory for the enzyme. The determination of the initial velocity of the 10-oxogeranial: iridodial cyclase in the presence of β -NADPH as the fixed-variable substrate at different concentrations of 10-oxogeranial is showed in the figure 22. The development of the reaction follows the typical Michaelis-Mentel equation. The calculation of the K_m using the double reciprocal method yield a value for the K_m for β -NADPH and 10-oxogeranial of 70 μ M and 0.52 mM, respectively.

These K_m determinations are the first reported in the literature for the 10-oxogeranial: iridodial cyclase. Comparing these kinetic parameters with other cyclases it is possible to say that they are in the appropriate range. For example, Hallahan et al., (1995) purified and characterized a monoterpene-NADP⁺-oxidoreductase from *N. racemosa*, which can use different monoterpenes as substrates; the K_m for geraniol, nerol and 10-hydroxygeraniol was 30, 6 and 95 μ M, respectively. Similar results were obtained for an oxidoreductase isolated from *R. serpentina* (Ikeda et al., 1991). The value for the K_m for NADPH is almost the same that those determinate for the monoterpene-NADP⁺-oxidoreductase from *N. racemosa* (Hallahan et al., 1995).

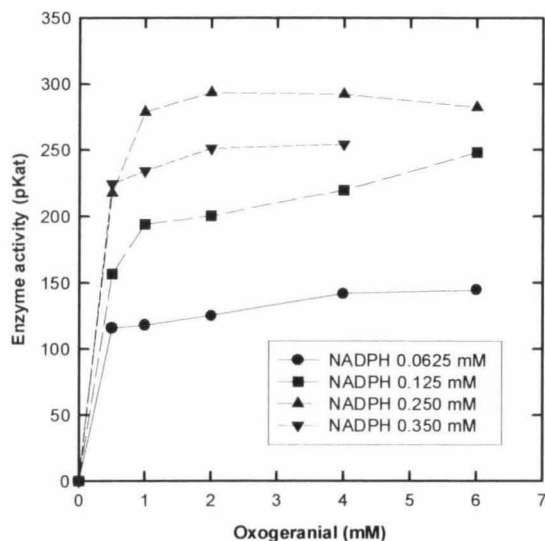


Figure 22. Effect of the concentration of 10-oxogeranial on the activity of 10-oxogeranial: iridodial cyclase at different fixed concentrations of NADPH.

In summary, we semipurified, from *C. roseus* hairy roots, the enzyme 10-oxogeranial: iridodial cyclase which is able to catalyze the conversion of 10-oxogeranial into iridodial using β -NADPH as reductor. The data presented support the hypothesis that this enzyme is present in two forms, with different molecular mass, and an optimum activity at pH 7.

Acknowledgements

The authors are indebted to Enrique Castaño for critical reading of the English manuscript and Dr. Luis M. Peña for his help to synthesize 10-oxogeranial. Supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (grants 4023N) and a post-graduate scholarship to PSI.

REFERENCIAS

- Ayora-Talavera T., J. Chappell, E. Lozoya-Gloria and V. M. Loyola-Vargas, Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 97: 135-145, (2002).
- Brodellius P. E., The use of elicitation to study the regulation and enzymology of secondary metabolism, in: *Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives*, (Loyola-Vargas V. M., ed.), CICY, Merida, Yucatan, 91-109, (1990).
- Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Non-coordinated response of cytochrome P450-dependent geraniol 10-hydroxylase and NADPH: Cyt C (P-450) reductase in *Catharanthus roseus* hairy roots under different conditions, *Phyton*, 66: 183-190, (2000).
- Canto-Canché B. and V. M. Loyola-Vargas, Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 37: 622-628, (2001).
- Ciau-Uitz R., M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chí, L. M. Pacheco and V. M. Loyola-Vargas, Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 30P: 84-88, (1994).
- Clegg J. C. S., Glycoprotein detection in nitrocellulose transfers of electrophoretically separated protein mixtures using Concanavalin A and peroxidase: application to arenavirus and flavivirus proteins, *Anal. Biochem.*, 127: 389-394, (1982).
- Collu G., A. Alonso-García, R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures, *Plant Sci.*, 162: 165-172, (2002).
- Contin A., R. Van der Heijden, A. W. Lefeber and R. Verpoorte, The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture, *FEBS Lett.*, 434: 413-416, (1998).

Corey E. J. and J. W. Suggs, Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds, *Tetrahedron Lett.*, 31: 2647-2650, (1975).

De Carolis E. and V. De Luca, Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*, *J. Biol. Chem.*, 268: 5504-5511, (1993).

De Luca V., Enzymology of indole alkaloid biosynthesis, in: *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 9, (Lea P. J., ed.), Academic Press Limited, London, 345-368, (1993).

De Luca V., R. J. Aerts, S. Chavadej, E. De Carolis, and A.-M. Alarco, The biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*, in: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*, (Singh B. K., H. E. Flores and J. C. Shannon, eds.), American Society of Plant Physiology, Rockville, 275-284, (1992).

De Luca V. and B. St-Pierre, The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, *Trends Plant Sci.*, 5: 168-173, (2000).

De Luca V., B. St-Pierre, F. Vázquez-Flota, and D. Laflamme, Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: the establishment of a model system, in: *Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development*, (Lo Chiavo F., R. L. Last, G. Morelli and N. V. Raikhel, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 171-187, (1998).

Deutscher M. P., Maintaining protein stability, in: *Methods in enzymology* Vol. 182. Guide to protein purification, (Deutscher M. P., ed.), Academic Press, Inc., San Diego, 83-89, (1990).

Facchini P. J., Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 29-66, (2001).

Gamborg O. L., R. A. Miller and K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158, (1968).

Geerlings A., M. M. L. Ibañez, J. Memelink, R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Molecular cloning and analysis of strictosidine b-d-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, J. Biol. Chem., 275: 3051-3056, (2000).

Hallahan D. L., J. M. West, R. M. Wallsgrove, D. W. M. Smiley, G. W. Dawson, J. A. Pickett and J. G. C. Hamilton, Purification and characterization of an acyclic monoterpene primary alcohol: NADP⁺ oxidoreductase from catmint (*Nepeta racemosa*), Arch. Biochem. Biophys., 318: 105-112, (1995).

Ikeda H., N. Esaki, S. Nakai, K. Hashimoto, S. Uesato, K. Soda and T. Fujita, Acyclic monoterpene primary alcohol: NADP super(+)oxidoreductase of *Rauwolfia serpentina* cells: The key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols, J. Biochem. (Tokyo), 109: 341-347, (1991).

Irmiler S., G. Schröder, B. St-Pierre, N. P. Crouch, M. Hotze, J. Schmidt, D. Strack, U. Matern and J. Schröder, Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase, Plant J., 24: 797-804, (2000).

Islas-Flores I. R., V. M. Loyola-Vargas and M. L. Miranda-Ham, Tryptophan decarboxylase activity in transformed roots from *Catharanthus roseus* and its relationship to tryptamine, ajmalicine, and catharanthine accumulation during the culture cycle, In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant, 30P: 81-83, (1994).

Kitamura Y., M. Sato and H. Miura, Differences of atropine esterase activity between intact roots and cultured roots of various tropane alkaloid-producing plants, Phytochemistry, 31: 1191-1194, (1992).

Kutchan T. M., Alkaloid biosynthesis--The basis for metabolic engineering of medicinal plants, The Plant Cell, 7: 1059-1070, (1995).

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685, (1970).

Lange B. M., T. Rujan, W. Martin and R. Croteau, Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97: 13172-13177, (2000).

Lichtenthaler H. K., Discovery of the two parallel pathways for isoprenoid biosynthesis in plants, in: *Discoveries in Plant Biology*, (Kung S.-D. and S.-F. Yang, eds.), London, 141-161, (2001).

Loyola-Vargas V.M., P. Sánchez-Iturbe, B. Canto-Canché, L.C. Gutiérrez-Pacheco, R.M. Galaz-Avalos, and O. Moreno-Valenzuela, La biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 48: 67 - 94, (2004).

Luckner M. and B. Dietrich, Principles regulating formation and activity of secondary metabolic enzymes on plant tissue and cell cultures, in: *Progress in plant cellular and molecular biology*, (Nijkamp H. J. J., L. H. W. Van der Plas and J. Van Aartrijk, eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 744-753, (1990).

Luijendijk T. J. C., A. Nowak and R. Verpoorte, Strictosidine glucosidase from suspension cultured cells of *Tabernaemontana divaricata*, *Phytochemistry*, 41: 1451-1456, (1996).

Madyastha K. M., R. Guarnaccia, C. Baxter and C. J. Coscia, S-Adenosyl-L-methionine: loganic acid methyltransferase. A carboxyl alkylating enzyme from *Vinca rosea*, *J. Biol. Chem.*, 248: 2497-2501, (1973).

Madyastha K. M. and C. J. Coscia, Detergent-solubilized NADPH-cytochrome C (P-450) reductase from the higher plant, *Catharanthus roseus*, *J. Biol. Chem.*, 254: 2419-2427, (1979a).

Madyastha K. M. and C. J. Coscia, Enzymology of indole alkaloid biosynthesis, *Rec. Advan. Phytochem.*, 13: 85-129, (1979b).

Meijer A. H., A. De Waal and R. Verpoorte, Purification of the cytochrome P-450 enzyme geraniol 10-hydroxylase from cell cultures of *Catharanthus roseus*, *J. Chromatogr.*, 635: 237-249, (1993a).

Meijer A. H., R. Verpoorte and J. H. C. Hoge, Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, J. Plant Res., 3: 145-164, (1993b).

Mommsen T., El Mundo de los Césares, Fondo de Cultura Económica, México, pp 1-766, (1945).

Moreno P. R. H., R. Van der Heijden and R. Verpoorte, Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. 2. Updating from 1988 to 1993, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 42: 1-25, (1995).

Peterson G. L., A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, Anal. Biochem., 83: 346-356, (1977).

Rajaonarivony J. I. M., J. Gershenzon and R. Croteau, Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*), Arch. Biochem. Biophys., 296: 49-57, (1992).

Robertson E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy and H. C. Reeves, Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrilamide minigel system, Anal. Biochem., 167: 290-294, (1987).

Schmeller T. and M. Wink, Utilization of alkaloids in modern medicine, in: Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, (Roberts M. F. and M. Wink, eds.), Plenum Press, New York, 435-459, (1998).

Shanks J. V., R. Bhadra, J. Morgan, S. Rijhwani and S. Vani, Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for metabolic engineering, Biotechnol. Bioeng., 58: 333-338, (1998).

Singh S. N., P. Vats, S. Suri, R. Shyam, M. M. L. Kumria, S. Ranganathan and K. Sridharan, Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats, J. Ethnopharmacol., 76: 269-277, (2001).

Svoboda G. H. and D. A. Blake, The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, in: The *Catharanthus* Alkaloids, (Taylor W. I. and N. R. Farnsworth, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 45-83, (1975).

Toivonen L., J. Balsevich and W. G. W. Kurz, Indole alkaloids from hairy root cultures of *Catharanthus roseus*, *Phytochem. Soc. Newsletter*, 29: 22, (1989).

Uesato S., H. Ikeda, T. Fujita, H. Inouye and M. H. Zenk, Elucidation of iridodial formation mechanism partial purification and characterization of the novel monoterpene cyclase from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures, *Tetrahedron Lett.*, 28: 4431-4434, (1987).

Uesato S., Y. Ogawa, H. Inouya, K. Saiki and M. H. Zenk, Synthesis of iridodial by cell free extracts from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures, *Tetrahedron Lett.*, 13: 2893-2896, (1986).

Van der Heijden R., R. Verpoorte and H. J. G. Ten Hoopen, Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 18: 231-280, (1989).

Wray W., T. Boulikas, V. P. Wray and R. Hancock, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 118: 197-203, (1981).

Yamamoto H., N. Katano, A. Ooi and K. Inoue, Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450, *Phytochemistry*, 53: 7-12, (2000).

Capítulo 4

Conclusiones

El cultivo establecido de raíces transformadas de *C. roseus*, que ha sido caracterizado ampliamente en otros proyectos de investigación realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del CICY, permitió entre otras ventajas, la posibilidad de contar con un aporte constante de material biológico con el que se realizó este trabajo, del que derivan las siguientes conclusiones:

Se obtuvo el 10-oxogeranial, sustrato verdadero de la enzima 10-oxogeranial:iridodial ciclasa por síntesis química a partir del 10-hidroxigeraniol, mediante la doble oxidación de este monoterpeno, aplicando el reactivo clorocromato de piridinio (PCC).

La actividad de la enzima 10-oxogeranial: iridodial ciclasa es específica para el oxogeranial y el NADPH, y se determinó en extractos solubles de las células de la línea J-1 de raíces transformadas de *C. roseus*. Al medir la actividad, a lo largo de un ciclo de cultivo durante 21 días, se encontró un pico máximo de actividad al finalizar la fase exponencial.

Se obtuvo una metodología para purificar a la enzima 10-oxogeranial: iridodial ciclasa. El protocolo establecido para la purificación parcial de esta enzima presente en los extractos solubles de las células de las raíces transformadas de *C. roseus*, permite obtener 19.6 veces de purificación, partiendo del extracto crudo. Con este protocolo se pueden obtener 2 proteínas con actividad de 10-oxogeranial: iridodial ciclasa, con masas moleculares de 60 y 35 kDa, determinados por la técnica de SDS-PAGE.

La caracterización de las proteínas semipurificadas incluyó la determinación del punto isoelectrico y pH de actividad óptima, siendo estos parámetros de 5.1 y 7 respectivamente. Además, la enzima muestra elevada especificidad por el 10-oxogeranial y es inhibida por reactivos que reaccionan con grupos tiol.

Capítulo 5

Perspectivas

Este trabajo abre las posibilidades para el estudio bioquímico y molecular de un paso crucial en la síntesis de la secologanina, uno de los dos precursores en la biosíntesis de los alcaloides monoterpeno indólicos de *C. roseus*. Entre las futuras acciones que deberán seguirse se tienen:

La purificación a homogeneidad de la 10-oxogeranial: iridodial ciclasa de *C. roseus*; lo anterior con el propósito de determinar sus verdaderos parámetros cinéticos y de secuenciar la parte amino terminal de la proteína. Con ello se podrían diseñar oligonucleótidos específicos que podrían emplearse para obtener su gen y poder estudiar la región del promotor y determinar el tipo de regulación al que está sometido su expresión.

Con relación a la caracterización de la enzima, es importante determinar si la actividad de esta enzima es modulada por alguno de los alcaloides producidos por esta vía de síntesis.

Los reguladores del crecimiento modifican el metabolismo secundario, y en cultivos celulares afectan tanto el desarrollo como la producción de metabolitos secundarios (El Sayed y Verpoorte, 2002), por lo que para determinar cuál es el papel que esta enzima está jugando en la ruta de biosíntesis de los alcaloides monoterpeno indólicos se debe determinar si su actividad es influida por 2,4-D, salicilato o jasmonato, compuestos que actúan como moléculas señalizadoras para la expresión de genes de defensa (Reymond y Farmer, 1998), lo que a su vez produce un aumento en el contenido de diferentes tipos de alcaloides (Rijhwani y Shanks, 1998).

La obtención del ADNc o del gen permitirá el estudio de su localización en los tejidos de la planta. Hasta ahora sólo unas pocas enzimas se han estudiado de esta forma; sin embargo, han proporcionado información muy valiosa sobre su localización

intracelular y tisular (Facchini, 2001; St-Pierre et al., 1999) y han permitido elaborar un modelo de la síntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*.

REFERENCIAS

El Sayed M. and R. Verpoorte, Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 68: 265-270, (2002).

Facchini P. J., Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 29-66, (2001).

Reymond P. and E. E. Farmer, Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 404-441, (1998).

Rijhwani S. K. and J. V. Shanks, Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures, *Biotechnol. Progress*, 14: 442-449, (1998).

St-Pierre B., F. A. Vázquez-Flota and V. De Luca, Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate, *The Plant Cell*, 11: 887-900, (1999).