



Cultivos celulares de *Taxus* spp., una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis

Karla Ramírez Estrada

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

**Cultivos celulares de *Taxus* spp., una eficaz herramienta
biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de
estudios básicos sobre su biosíntesis.**



KARLA RAMÍREZ ESTRADA

2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

CULTIVOS CELULARES DE *Taxus spp.*, UNA EFICAZ HERRAMIENTA
BIOTECNOLÓGICA PARA LA PRODUCCIÓN DE TAXANOS Y EL
DESARROLLO DE ESTUDIOS BÁSICOS SOBRE SU BIOSÍNTESIS

Memoria presentada por Karla Ramírez Estrada para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona

Dr. Javier Palazón Barandela
Director

Dra. Lidia Teresa Osuna Torres
Directora

Karla Ramírez Estrada
Doctoranda

Dr. Javier Palazón Barandela
Tutor

KARLA RAMÍREZ ESTRADA 2015

A mis padres Magda y Carlos, a mi hermano Alan
A Rafa, mi compañero de vida, por tomar mi mano y compartir esta
gran travesía

“If I have seen further than others, it is by standing upon the
shoulders of giants.”

Isaac Newton

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización de éste trabajo: al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México), al Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2011-29856-CO2-01, BIO2014-51861-R), a la Generalitat de Catalunya (2009-SGR2170, 2014-SGR215), y al COST Action Plant Engine (FA1006)

Agradecer a los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona por los servicios prestados, especialmente a Alberto, David, Esther, Eva y Ramón que siempre tuvieron la disposición de ayudar y enseñar; a los servicios del Centre de Reserca en Agrigenomica (CRAG), en especial a Montse por su paciencia en el microscopio.

Muy especialmente a mis directores de tesis el Dr. Javier Palazón y la Dra. Lidia Osuna gracias por su apoyo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por ser mis guías durante todo este tiempo y contribuir a mi formación como científica y mejorar personalmente. Gracias por depositar su confianza en mí y darme todas las herramientas necesarias para poder continuar en este camino.

Por su inestimable ayuda a la Dra. Teresa Altabella, gracias por aceptarme en su grupo de investigación, por su dedicación, por compartir sus conocimientos y por guiarme en todo momento.

Igualmente quiero agradecer a la Dra. Rosa M^a Cusidó, la Dra Elisabeth Moyano y la Dra. Mercé Bonfil con quienes siempre he podido contar, gracias por orientarme, ayudarme y aconsejarme cuando lo he necesitado.

A todos los profesores del departamento, por su amabilidad y disposición a prestar ayuda en cualquier momento.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Miriam, Oscar, Ana, Rafa, Lili, Diego y Raúl, muchas gracias por su apoyo y desinteresada ayuda durante todo este tiempo; en especial a los que estuvieron conmigo durante los años

del doctorado, gracias por todas esas maravillosas experiencias que hemos compartido y que nos han hecho crecer juntos; atesoro cada momento vivido con ustedes.

A todos los estudiantes con quienes he tenido la oportunidad de compartir un trocito de sus respectivos trabajos: cada uno ha dejado una huella muy especial: Ana Belén, Lucie, Kristina, Mohamad, Nadia, Maryam, Suellen, Ana Luisa, David M. Said, Xavi, Victor, Marta, María, Aida, Arif, Burham, Ali, Fran, Farnoosh, Adrián, Andrea, Sara, Hajar, Erum, Virginie, David C., Waqas, Ozçag y Carmen. Gracias por permitirme conocer tantas culturas y puntos de vista diferentes, por su amistad y cariño inigualables.

A los compañeros del departamento, algunos que también fueron compañeros de piso, por todos los momentos dentro y fuera del ambiente laboral que hemos podido recopilar: Naty, Laura, Jean, Ying, Luciana, Carmelina, Carito, Paty, Olivia, Lucy, Gaby, Javier, Kosta, Miren, Xavi, Martha y Ambra. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar, por su amistad y por hacer el día a día más ameno y divertido.

A los chicos del CRAG: Joan, Nobahar, Alex, Julio, Idalia, Karel, Carmen y Francesc, gracias por su amistad, por hacerme más fácil mi estancia en el centro y por permitirme ser una más del grupo.

A las personitas fuera del ambiente del laboratorio: a mis compañeras de danza, Cova, Mariona, Elena, Ester, Marika, las Irenes, Cris y Sophie, siempre hay una sonrisa contagiosa en sus rostros, gracias por oír mis quejas y hacerme olvidar el trabajo un ratito. A mis amigos y compañeros de piso; Dany y Kata, quienes no han dejado de apoyarme y ayudarme desde comenzamos a compartir piso; gracias por estar ahí, por compartir y aligerar esta última etapa del camino.

A mis raíces; que me hacen fuerte, estable y que siempre han sido mi soporte; gracias familia por que han estado a mi lado en todo momento, aun a la distancia, a mis Padres Carlos y Magda, a mi hermano Alan gracias por apoyarme en esta difícil senda, por confiar en mi y alimentar mis sueños. A mi segunda familia, los Vidal-Limón, mis suegros Heriberto y Pilar, mis cuñados

Ena y Abraham que sin su apoyo esta aventura no habría sido posible, gracias por estar ahí y por esa confianza en el camino que elegimos.

A mi esposo, mi compañero de viaje, mi incondicional amigo, gracias por tomar mi mano en esta travesía, por ser mi soporte en los momentos difíciles y compartir los éxitos y las alegrías, gracias por estar aquí, a mi lado siempre sin esperar nada a cambio, por sacar siempre lo mejor de mi y regalarme los abrazos, besos y sonrisas que hagan falta. Sin ti no lo hubiese logrado.

A todos y cada uno de los que han compartido conmigo esta sin igual experiencia, gracias por contribuir en su singular manera, pues con ello he crecido tanto en el aspecto profesional como el personal, realmente lo valoro.

Palabras clave

- Ciclodextrinas
- Coronatina
- Cultivos celulares elicitados
- Paclitaxel
- Taxol
- Taxanos
- *Taxus globosa*
- *Taxus media*
- β -fenilalanina
- β -fenilalanina CoA ligasa

Resumen

Los cultivos de células vegetales pueden constituir plataformas biotecnológicas ecológicas para la producción de metabolitos secundarios de plantas con actividad farmacológica, así como un excelente sistema para ampliar el conocimiento del metabolismo secundario. El taxol y taxanos relacionados son metabolitos secundarios vegetales con una notable actividad anticancerígena. A pesar de la importancia de estos compuestos, su producción biotecnológica todavía necesita ser optimizada y aún se desconocen algunos aspectos de su biosíntesis. En este trabajo hemos estudiado la respuesta a la acción de la β -metil-ciclodextrina (CD) y coronatina (CORO) de dos cultivos celulares de *Taxus* (*T. media* y *T. globosa*) con el fin de encontrar alternativas para la producción de taxanos; también hemos caracterizado el gen *TB768*, que previamente fue seleccionado a partir de un estudio de cDNA-AFLP, como candidato a codificar para una enzima implicada en la biosíntesis de taxol. La producción de taxanos, fue mayor en las líneas celulares de *T. media* que en *T. globosa* e incrementó significativamente por la adición simultánea de los elicitores CD y CORO, correlacionando con la expresión de los genes conocidos de la biosíntesis de taxol. El análisis funcional del gen *TB768* demostró, confirmando las predicciones *in silico*, que este gen codifica para una acil-CoA ligasa citoplasmática, capaz de convertir la β -fenilalanina en su éster de CoA, un precursor de la cadena lateral del taxol. De esta forma la nueva proteína caracterizada, β -fenilalanina CoA ligasa (TBPCCL), estaría implicada en una de las últimas etapas de la ruta biosintética de taxanos. Estos estudios contribuyen a la creación de nuevos y mejores sistemas de producción sostenible de taxol y taxanos relacionados; mediante sistemas de elicitación o de ingeniería metabólica.

Abstract

Plant cell cultures constitute eco-friendly biotechnological platforms for the production of plant secondary metabolites with pharmacological activities, as well as a suitable system for extending our knowledge of secondary metabolism. Taxol and related taxanes are plant secondary metabolites with a remarkable anticancer activity. Despite the importance of these phytochemicals, their biotechnological production still requires optimization and several aspects of their biosynthesis remain unknown. In this work, we studied the response of two *Taxus* cell cultures (*T. media* and *T. globosa*) to the addition of β -methyl cyclodextrin (CD) and coronatine (CORO) with the aim of finding alternative systems for taxane production; we also characterized the *TB768* gene, which a previous cDNA-AFLP analysis revealed to be a putative candidate for encoding a taxol biosynthetic enzyme. Taxane production was higher in the *T. media* than the *T. globosa* cell line, and was significantly enhanced by the simultaneous addition of both elicitors (CD and CORO); the expression of known taxol biosynthetic genes was correlated with the improved taxane production. Confirming *in silico* predictions, functional analysis of the *TB768* gene showed that it encodes a cytoplasmic acyl-CoA ligase able to convert β -phenylalanine into its respective CoA ester derivative, a precursor of the taxol lateral chain. Therefore, this newly characterized enzyme, β -phenylalanine CoA ligase (TBPCCL), must be involved in one of the last steps of the taxane biosynthetic pathway. These studies are a contribution to the establishment of sustainable taxol production systems by elicitation or metabolic engineering approaches.

Índice

1. Presentación y Objetivos	19
2. Introducción	25
2.1. Los taxanos, un potente grupo de compuestos con acción antitumoral	28
2.1.1. Taxol y sus análogos.....	30
2.2. Estado actual del conocimiento sobre la biosíntesis de taxanos.	34
2.3. Fuentes naturales de taxanos	39
2.4. Producción biotecnológica de taxanos.....	45
2.4.1. Estudios empíricos	45
2.4.2. Estudios racionales	49
2.4.3. Aplicación de las tecnologías “ómicas” y la Ingeniería Metabólica a la mejora de la producción de taxanos.	55
3. Materiales y Métodos	65
3.1. Material vegetal	67
3.2. Medios de cultivo utilizados.....	68
3.3. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de <i>T. globosa</i>	69
3.4. Estudio del curso de crecimiento de las líneas celulares de <i>T. globosa</i>	71
3.5. Elicitación de las suspensiones celulares de <i>T. globosa</i> y <i>T. media</i>	72
3.6. Extracción y cuantificación por HPLC de taxanos.....	74
3.7. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	75
3.8. Análisis <i>in silico</i> del gen candidato <i>TB768</i>	76

3.9. Clonación del gen <i>TB768</i>	77
3.10. Expresión del gen <i>TB768</i> en <i>E. coli</i>	78
3.11. Expresión del gen <i>TB768</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	80
3.12. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad CoA ligasa	81
3.13. Aproximación bioinformática de la localización subcelular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de taxanos	83
3.14. Localización subcelular de la proteína codificada por el gen <i>TB768</i>	83
3.15. Análisis estadístico	84
4. Resultados y su Discusión	85
4.1. “Biofactorías Vegetales” para la producción de taxanos. Una aproximación racional al estudio de nuevas fuentes	87
4.1.1. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de <i>T. globosa</i>	89
4.1.2. Producción de biomasa de las líneas celulares de <i>T. globosa</i>	91
4.1.3. Contenido de taxanos en las suspensiones celulares de <i>Taxus globosa</i> no elicidadas	93
4.1.4. Efecto de la elicitación con CORO y CD en los cultivos celulares de <i>T. media</i> y <i>T. globosa</i>	96
4.1.5. Producción de taxanos en los cultivos de <i>T. media</i> y <i>T. globosa</i> elicitados con CORO y CD	98
4.1.6. Cambios en el perfil de expresión de los genes involucrados en la síntesis de taxanos en cultivos celulares de <i>T. media</i> y <i>T. globosa</i> elicitados con CORO y CD	107

4.2. “Biofactorías Vegetales” una potente herramienta para caracterizar nuevos genes/enzimas implicados en la biosíntesis de taxanos.....	115
4.2.1. Expresión y análisis funcional del gen <i>TB768</i>	123
4.2.1.1. Análisis <i>in-silico</i> del gen candidato <i>TB768</i>	124
4.2.1.2. Expresión de la proteína recombinante del gen <i>TB768</i>	128
4.2.1.3. Análisis funcional de la proteína codificada por el gen <i>TB768</i>	131
4.2.2. Localización subcelular de la biosíntesis de taxanos.....	136
4.2.2.1. TBPCCL es una enzima citosólica	140
5. Conclusiones	147
6. Bibliografía	153
7. Anexos	177

Abreviaturas

ABA, ácido abscísico

ACCs, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa

2,4D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ATP, adenosin trifosfato

AMP, adenosin monofosfato

B5, medio de cultivo de Gamborg

BAP, bencilaminopurina

BAPT, baccatina III: 3-amino,13-fenilpropanoil transferasa

BIII, baccatina III

Brev, brevifolina

CCETs cultivos celulares elicitados de *Taxus* spp.

CCTs, cultivos celulares de *Taxus* spp.

CD, β -ciclodextrina metilada al azar

cDNA SSH, cDNA suppression subtractive hybridization

cDNA-AFLP, cDNA-amplified fragment length polymorphism

CF, cefalomanina

CLSM, confocal laser scanning microscopy

CoA, coenzima A

CORO, coronatina

CrEL, cremophor EL®

4CL, 4-cumarato CoA ligasa

CytP450, citocromo P450

DAB, 10-deacetilbaccatina III

DAF, diacetato de fluoresceína

DBAT, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetiltransferasa

DBTNBT, N-benzoyl transferasa

DE, desviación estandar

DHA, ácido docosahexaenoico

DMAPP, difosfato de dimetilalilo

DT, 10-deacetiltaxol

Dx, docetaxel

FDA, food and drug administration

FRAP, fluorescence recovery after photobleaching

GA3, ácido giberélico

GGPP, difosfato de geranylgeranilo

GGPPS, GGPP sintasa

HPLC, high performance liquid chromatography

HPLC-MS/MS, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

IP, yoduro de propido

IPP, difosfato de isopentenilo

IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

JA-Ile, jasmonato de isoleucina

Kin, quinetina

LEP, taxol en liposomas

MC, medio de crecimiento

MeJA, jasmonato de metilo

MP, medio de producción

MRM, molecular reaction monitoring

MSA, multiple sequence alignment

MSV, metabolitos secundarios vegetales

NAA, ácido naftalenacético

NSCLC, non-small-cell lung carcinoma

PAM, fenilalanina aminomutasa

PCR, polymerase chain reaction

PEG, polietilenglicol

PF, peso fresco

P-gp, glicoproteína-P

Pic, picloram

PS, peso seco

Px, paclitaxel

qRT-PCR, real time polymerase chain reaction

RT retro-trascriptasa

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SSH, PCR suppression subtractive hybridization

T10 β OH, taxano-10 β -hidroxilasa

T13 α OH, taxadieno-13 α -hidroxilasa

T14 β OH, taxano -14 β -hidroxilasa

T1 β OH, taxano-1 β -hidroxilasa

T2 α OH, taxano-2 α -hidroxilasa

T5 α OH, taxadieno-5 α -hidroxilasa:

T7 β OH, taxano-7 β -hidroxilasa

T9 α OH, taxano-9 α - hidroxilasa

Tags, etiquetas de genes

TAT, taxadieno-5 α -ol-O-acetil transferasa

TBPCCL, β -fenilalanina CoA ligasa

TBT, taxano-2 α -O-benzoil transferasa

TS, taxadieno sintasa

TR, tiempo de retención

Tx, taxol

UPLC, ultra performance liquid chromatography

WPM, woody plant medium

YFP, yellow fluorescent protein

Numero de accesoión GeneBank de los genes candidatos

TB768: KM593667

TB506: KP178208

TB331: KP178206

TB574: KP178209

TB224: KP178204

TB328: KP178205

TB596: KP178210

TB812: KP178213

TB047: KP178200

TB739: KP178212

TB212: KP178203

TB645: KP178211

TB493: KP178207

TB195: KP178202

TB115: KP178201.

Índice de figuras


Figura 1. Aspecto de las plantaciones de <i>Taxus chinensis</i> , en el parque natural de Da Huan, región de Yunnan (China).....	30
Figura 2. Representación esquemática de la biosíntesis de paclitaxel. GGPPS; Geranilgeranil difosfato sintasa; TS taxadieno sintasa; T5 α OH, taxadieno 5 α -hidrolasa; TAT, taxadieno-5 α -ol-O-acetiltransferasa; T13 α OH, taxadieno 13 α -hidroxilasa; T10 β OH, taxano 10 β -hidroxilasa; T1 β OH, taxano 1 β -hidroxilasa; T9 α OH, taxano 9 α -hidroxilasa; OTC, taxano-2 α -O-benzoil transferasa; DBAT, deacetilbaccatinIII-10-O-acetiltransferasa; PAM, fenilamino mutasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoil transferasa; T2' α OH, taxano 2' α -hidroxilasa; DBTNBT, debenzoil N-benzoil transferasa. *Genes conocidos.....	37
Figura 3. Distribución geográfica de las diferentes especies que integran el género <i>Taxus</i> (modificado de Onrubia <i>et al.</i> 2010).....	40
Figura 4. En oscuro, la distribución de <i>T. globosa</i> en el territorio mexicano.....	42
Figura 5. Corteza de un ejemplar de <i>T. globosa</i> , parque nacional El Chico, Hidalgo, México.....	43
Figura 6. Representación esquemática de la comparativa entre los estudios empíricos vs racionales y la información que ambos generan	47
Figura 7. Expresión diferencial inducida por MeJA de los genes implicados en la biosíntesis de taxanos  : Potenciales dianas para la ingeniería metabólica	53

Figura 8. Enfoques para la ingeniería metabólica vegetal. A: Estrategias para la ingeniería metabólica de un solo paso. B: Estrategias holísticas (modificado de Onrubia <i>et al.</i> 2013a).....	60
Figura 9. Obtención de líneas celulares transgénicas de <i>T. media</i> a partir de un cultivo de raíces transformadas.	62
Figura 10. <i>T. globosa</i> silvestre, parque natural "El Chico", Hidalgo, México.....	67
Figura 11. Explantes y cultivo de callos de <i>T. globosa</i> . A: Explantes, de hojas en medio de inducción de callos; B: Explantes de hojas con brote de callo; C: Aspecto de los callos de <i>T. globosa</i>	70
Figura 12. Estudio de la viabilidad de las células en cultivo líquido de <i>T. globosa</i> a los 8 días de cultivo. A: Células vivas, B: Células muertas; C: Células vivas en verde y muertas en rojo.	73
Figura 13. A: pDEST-TB768. Indicando el promotor y terminador T7, y el gen <i>TB768</i> entre las secuencias de recombinación (<i>attB</i>). B: pEarlyGate203-TB768. Indicando el promotor 35S, el Myc-tag y el gen <i>TB768</i> . C: pEarlyGate102-TB768. Indicando las posiciones del promotor 35S, el gen <i>TB768</i> y la YFP	79
Figura 14. Apariencia de los callos de <i>T. globosa</i> , A: Coloración clara durante los primeros días del subcultivo, B: Oscurecimiento de la masa de callo después de varios subcultivos.....	90
Figura 15. Curso del crecimiento expresado en peso seco (g/L) de los cultivos celulares de <i>T. globosa</i> en medio de crecimiento durante 28 días. Cada valor es la media de 3 repeticiones \pm DE.	92
Figura 16. Curso de la viabilidad de los cultivos celulares de <i>T. globosa</i> en medio de crecimiento durante 28 días.....	92

Figura 17. Contenido de taxanos totales (intracelulares y extracelulares) en suspensiones celulares de <i>T. globosa</i> cultivadas durante 28 días en medio de crecimiento. Resultados expresados como mg/L de medio de cultivo; los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE	95
Figura 18. Variaciones en los contenidos de taxanos expresados en mg/L de cultivo celular de <i>T. globosa</i> en medio de crecimiento. DAB: 10-deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE.....	95
Figura 19. Comportamiento del crecimiento expresado en g de peso seco por litro de cultivo celular (g/L) de A: <i>T. globosa</i> y B: <i>T. media</i> durante el experimento de elicitación por 20 días, en medio de producción, cada valor es la media de 3 repeticiones \pm DE. CTL (sin elicitar), CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), CD+CORO (elicitación combinada).....	97
Figura 20. Contenido de taxanos totales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de <i>T. globosa</i> cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitors juntos. A: Contenido de taxanos totales expresados como mg/L de cultivo celular. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE. B: Proporción de taxanos intracelulares, expresada como porcentaje del contenido total.....	99
Figura 21. Contenido de taxanos totales (intra y extracelulares) en las suspensiones celulares de <i>T. media</i> cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitors juntos. A: Contenido de taxanos totales expresados como mg/L de cultivo celular. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE. B: Proporción de taxanos intracelulares, expresada como porcentaje del contenido total.....	102

Figura 22. Contenido de taxanos individuales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de *T. globosa*, cultivadas durante 20 días en condiciones de control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitores juntos. **A:** Taxanos intracelulares expresados como mg/L de cultivo celular. **B:** Taxanos extracelulares expresados en mg/L de cultivo celular. DAB: 10-deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: 10-deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE..... 104

Figura 23. Contenido de taxanos individuales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de *T. media*, cultivadas durante 20 días en condiciones de control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitores juntos. **A:** Taxanos intracelulares expresados como mg/L de cultivo celular. **B:** Taxanos extracelulares expresados en mg/L de cultivo celular. DAB: 10-deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: 10-deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE..... 106

Figura 24. Perfil de expresión en los cultivos celulares de *T. globosa* durante las primeras 48 h en medio de producción, elicitados o no con CD, CORO o ambos elicitores. Los resultados se expresan como nivel de expresión del gen con respecto al nivel de expresión alcanzado en cultivos mantenidos durante 14 días en el medio de MC, TS, taxadieno sintasa; T7 β OH, taxadieno7- β -hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasa; CoA ligasa, β -fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoiltransferasa. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE..... 110

Figura 25. Perfil de expresión en los cultivos celulares de *T. media* durante las primeras 48 h en medio de producción, elicitados o no con CD, CORO o ambos elicitors. Los resultados se expresan como nivel de expresión del gen con respecto al nivel de expresión alcanzado en cultivos mantenidos durante 14 días en MC, TS, taxadieno sintasa; T7 β OH, taxadieno7- β -hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasa; CoA ligasa, β -fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE. 112

Figura 26. Biosíntesis de taxol, a partir del geranilgeranil difosfato. Las flechas múltiples indican varios pasos. Los genes desconocidos y las correspondientes proteínas se representan en rojo. TS, taxadieno sintasa; T1 β OH, taxano 1 β -hidroxilasa; T2 α OH, taxano 2 α -hidroxilasa; T7 β OH, taxano 7 β -hidroxilasa; T9 α OH, taxano 9 α -hidroxilasa; TBT, taxano-2 α -O-benzoil transferasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetiltransferasa; PAM, fenilalanina aminomutasa; BAPT, C-13-fenilpropanoil-CoA transferasa; T2' α OH, taxano 2' α -hidroxilasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa. 116

Figura 27. Perfiles de transcripción basados en los resultados del estudio de cDNA-AFLP de los cultivos celulares de *T. baccata*. Agrupación jerárquica de los tags identificados que presentan una expresión genética diferencial. En la parte superior se indica el tratamiento y momento de análisis (en horas). Los cuadrados azules y amarillos indican respectivamente, la activación o represión transcripcional, en relación con el nivel medio de expresión. Los cuadrados grises representan la falta de datos para ese punto. Se indican los subgrupos de los genes que codifican para las enzimas *T. baccata* conocidas y los posibles candidatos que catalizan la

biosíntesis de taxol. El tag <i>TB768</i> está indicado con una punta de flecha roja a la derecha.	121
Figura 28. Tags secuenciados y agrupados en categorías funcionales de acuerdo a la clasificación FunCat.	122
Figura 29. Estructura terciaria de la proteína <i>TB768</i> , predicción y modelado por Phyre2.	125
Figura 30. Comparación de las estructuras 3D entre la proteínas <i>TB768</i> y <i>3a9V</i> . En rojo se muestra la predicción de la proteína <i>TB768</i> y en verde el modelo descrito experimentalmente para la 4CL de <i>Populus tomentosa</i> (<i>3a9v</i>).	125
Figura 31. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la <i>TB768</i> con otras 4CL conocidas de plantas. Las letras blancas en fondo negro son los residuos completamente conservados, los conservados en menor proporción se indican con tonos de grises. Los residuos con función catalítica están indicados con estrellas (<i>Lys438</i> , <i>Gln443</i> , <i>Lys523</i>), el aminoácido específico para la unión al CoA está indicado con un triángulo (<i>Gly441</i>). Dentro de los residuos involucrados en la unión al AMP, están indicados, <i>Gly306</i> , <i>Ala307</i> y <i>Tyr330</i> con círculos, aminoácidos específicos para la unión.....	127
Figura 32. Predicción de dominios catalíticos de CoA ligasa en la proteína <i>TB768</i> . El sitio activo está indicado en verde, en naranja el posible sitio de unión a CoA, en rojo el sitio de unión al AMP y en azul el sitio de activación de acilo.....	128
Figura 33. Imagen de SDS-PAGE de los extractos proteicos de <i>E. Coli</i> BL21 pLyss pDEST- <i>TB768</i> inducidos con IPTG a 28°C. 1) Marcador de peso molecular preteñido; PageRuler Plus (Thermo Fisher Scientific), se indican las bandas de 70 kDa y 55 kDa. Concentraciones de IPTG utilizadas para inducir: 2) 1mM, 3) 0,8mM, 4) 0,6mM, 5) 0,4mM, 6) 0,2 mM, 7) 0,1mM; 8) sin IPTG, 9) WT sin IPTG, 10) WT con 1mM IPTG. El recuadro en rojo muestra la proteína expresada.....	129

Figura 34. Imagen de SDS-PAGE de lisados bacterianos inducidos con 0,1mM de IPTG a 28°C, separando el sedimento del sobrenadante. 1) Marcador de peso molecular preteñido (Fermentas). Se indican las bandas de 90 kDa y 50 kDa. 2) Control negativo sin inducir, ni lisar. 3) Control negativo sedimento. 4) Control negativo sobrenadante 5) pDEST14-TB768 sin lisar, 6) pDEST14-TB768 sedimento, 7) pDEST14-TB768 sobrenadante. El recuadro en rojo muestra el sitio donde se espera la banda de 59 kDa correspondiente a TB768..... 130

Figura 35. Inmunoblot de la proteína TB768 purificada y concentrada, imagen obtenida por quimioluminiscencia. 1) Marcador de peso molecular preteñido; PageRuler Plus (Thermo Fisher Scientific) indicándose las bandas de 70 kDa y 55 kDa. 2) Proteína TB768 purificada y concentrada (200 ng), mostrando una única banda con un peso molecular de 59 kDa. 131

Figura 36. Esquema de la reacción catalizada por la enzima codificada por el gen *TB768*..... 133

Figura 37. Análisis por HPLC-MS/MS del ensayo de actividad *in vitro* de la proteína TB768. Cromatograma de extracción de iones para los sustratos **A:** ácido 4-cumarico y **B:** β-fenilalanina. La línea roja corresponde al ensayo con la proteína TB768 añadida y la azul al control sin enzima, las flechas indican el pico que corresponde al ion molecular de cada producto con su respectivo tiempo de retención (TR: 3,87 min para el 4-cumaroil-CoA, 3,89 min para la β-fenilalanoil-CoA). Análisis MRM de los productos de reacción en los ensayos con **C:** ácido 4-cumarico y **D:** β-fenilalanina. Las flechas indican el pico al correspondiente TR de los dos fragmentos específicos para cada compuesto utilizados para confirmar su identidad (914,3/407,3 y 914,3/428,2 para el 4-cumaroil-CoA con un TR: 3,87 min; 916,2/409,3 y 916,2/307,3 con un TR: 3,89 min para la β-fenilalanina-CoA). 135

Figura 38. Pantalla desplegada por el programa ChloroP 1.1 mostrando en el recuadro azul, que la proteína TS contiene el péptido de transito de cloroplastos, cTP (Yes).....	139
Figura 39. Pantalla desplegada por el programa TMHMM 1.1 mostrando, en rojo dos posibles dominios transmembrana de la proteína T7βOH. En azul los aminoácidos dentro de la membrana y en magenta los aminoácidos fuera.	139
Figura 40. Pantalla desplegada por el programa Signal peptide 4.0 mostrando la ausencia de péptido señal en la proteína BAPT. La gráfica plana indica que no hay aminoácidos que puedan corresponder a un péptido de señalización, lo cual sugiere una localización citosólica.	140
Figura 41. Pantalla desplegada por el programa Signal peptide 4.0 mostrando la ausencia de péptido señal en la proteína TB768. La gráfica plana indica que no hay aminoácidos que puedan corresponder a un péptido de señalización, lo cual sugiere una localización citosólica.	141
Figura 42. Análisis de microscopía confocal de la proteína TB768-YFP y la YFP libre en hojas de <i>N. benthamiana</i>	142
Figura 43. Expresión de la proteína fusionada TB768-YFP en hojas de <i>N. benthamiana</i> preteñidas con IP.	143
Figura 44. Análisis FRAP por 40 segundos; en donde se muestra la rápida recuperación de la fluorescencia de la fusión TB768-YFP y la GFP libre después del tratamiento con rayos laser de alta intensidad.	144
Figura 45. Localización subcelular de los pasos de la biosíntesis de taxanos.....	145

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos secundarios vegetales bioactivos producidos biotecnológicamente a nivel comercial (modificado de Sharma <i>et al.</i> 2014).....	29
Tabla 2. Estructuras químicas del taxol y algunos de sus análogos semisintéticos (modificado de Onrubia <i>et al.</i> 2013a).....	31
Tabla 3. Listado de las enzimas que se ha postulado están implicadas en la biosíntesis de paclitaxel. Se indica su nombre abreviado, el número de accesión GenBank y la primera vez que fueron descritas/publicadas.....	35
Tabla 4. Contenidos de taxanos en las acículas de diferentes especies de <i>Taxus</i> . Tx, taxol; DAB, 10 deacetilbaccatina; CF, cefalomanina; BIII, baccatina III, DT, deacetiltaxol; Brev, brevifolina. Contenidos expresados en µg/g PS (modificado de Van Rozzendal <i>et al.</i> 2000).	41
Tabla 5. Una revisión sobre los análisis transcriptómicos desarrollados con <i>Taxus spp.</i>	58
Tabla 6. Medios de cultivo utilizados para la inducción y cultivo de callos y células en suspensión de <i>T. globosa</i> .Todos llevan además mioinositol 100 mg/L y las vitaminas correspondientes	69
Tabla 7. Primers utilizados en el estudio de expresión de los genes involucrados en la síntesis de Tx. TS, taxadieno sintasa; T7βOH, taxadieno7-β-hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasaM; CoA ligasa, β-fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa.	76
Tabla 8. Crecimiento de callos de <i>T. globosa</i> en distintos medios en cultivo sólido. S: Supervivencia. M: Muertes:	

material oscuro con síntomas de necrosis. Resultados en % de supervivencia. La composición de los medios de cultivo se describe en el apartado 2.2..... 91

Tabla 9. Lista completa de los genes candidatos agrupados según su función provisional en la ruta biosintética de taxanos: (Función hipotética), número del tag a partir del análisis de cDNA-AFLP (TAG), el mejor hit para el gen secuenciado completo (homología), número de acceso SwissProt para el mejor hit (código Prot. acc.) y valor-e de ese hit. 123

Tabla 10. Estudio bioinformático de la localización subcelular de los pasos de la biosíntesis del taxol. Se indica la enzima, en que parte de la ruta se encuentra y si posee los péptidos o dominios que la dirijan a algún compartimento celular. 137

1. Presentación y Objetivos

Cuando la fuente natural de un fitofármaco no puede satisfacer su demanda en el mercado o es cada vez más limitada debido a la sobreexplotación o el deterioro de su hábitat natural, la biotecnología vegetal puede proporcionar un sistema alternativo para su producción, las llamadas “Biofactorías Vegetales”, éstas se consideran procesos basados en la utilización de los cultivos *in vitro* vegetales con fines de producción. Las biofactorías vegetales presentan numerosas ventajas sobre los cultivos convencionales de plantas: a) El compuesto de interés puede cosecharse en cualquier lugar del mundo, manteniendo al mismo tiempo un estricto control de la producción y calidad; b) no se requiere el uso herbicidas ni pesticidas; c) se evitan los problemas relacionados con el clima y la ecología; d) los ciclos de crecimiento se reducen significativamente, siendo de semanas en vez de años como son en los cultivos de la planta intacta y d) cuando se trabaja con ingeniería metabólica no existe riesgo de dispersión de transgenes (Ramachandra Rao y Ravishankar 2002). En resumen, se trata de sistemas biosostenibles y respetuosos con el medio ambiente que no compiten con los cultivos agronómicos por grandes extensiones de terreno y en consecuencia, también economizan grandes cantidades de agua. Sin embargo y a pesar de todas estas ventajas, todavía son pocos los procesos de producción basados en las biofactorías vegetales que se han desarrollado a nivel industrial, probablemente debido al escaso conocimiento que se tiene sobre el metabolismo secundario vegetal (Sharma *et al.* 2014). En este contexto, los cultivos de células, tejidos y órganos vegetales constituyen también una excelente plataforma tecnológica para estudiar las rutas metabólicas secundarias y su control (Cusido *et al.* 2014).

Para conseguir con éxito la producción biotecnológica de metabolitos secundarios vegetales se requiere la optimización del sistema, ya sea por métodos empíricos o racionales. De manera empírica, se puede mejorar la producción de biomasa, la productividad del sistema y la liberación del compuesto de interés al medio de cultivo, mediante la selección de líneas celulares altamente productivas, variando la composición del medio y las condiciones del cultivo, la adición de inductores y precursores, el diseño del biorreactor, la mejora de los procesos de extracción y aislamiento del producto, etc. (Cusido *et al.* 2014).

Complementariamente, en las aproximaciones de tipo racional se consideran principalmente, la identificación de los genes, enzimas y rutas biosintéticas implicadas en la producción de un metabolito secundario específico y su control (Walker y Croteau 2002a). Actualmente, el descubrimiento de nuevos genes y proteínas potencialmente implicadas en el metabolismo secundario puede ser más fácil con la implementación de herramientas "ómicas", así como la evaluación de las posibles funciones de las secuencias candidatas, mediante estudios *in silico* y herramientas de genómica funcional (Sabater-Jara *et al.* 2010).

El interés en los taxanos, un grupo de compuestos diterpénicos con actividad antitumoral, es cada vez mayor a medida que se descubren nuevos derivados semisintéticos con acciones mejoradas y/o menos efectos secundarios, así como nuevas formas de administración más efectivas de los taxanos ya conocidos. Muchos laboratorios han logrado resultados exitosos en la producción biotecnológica de taxanos e incluso se han desarrollado procesos industriales para su bioproducción (Sharma *et al.* 2014), pero la creciente demanda de estos compuestos requiere la búsqueda de nuevas fuentes de taxanos y la mejora de la productividad de los procesos ya establecidos, una mejora que pasa por un mayor conocimiento sobre el metabolismo de estos compuestos en los cultivos celulares y en el desarrollo de nuevas líneas celulares sobreproductoras, con la ayuda de las técnicas de ingeniería metabólica.

El grupo de "Biotecnología Vegetal: Producción de Fitofármacos" (2014SGR214) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona tiene una larga experiencia en la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp. Por ello, considerando el estado actual de tema y la potencialidad de los cultivos celulares para el desarrollo de estudios básicos sobre el metabolismo secundario vegetal y estudios aplicados a la producción biotecnológica de fitofármacos, esta Tesis Doctoral tiene un objetivo general dual: **La caracterización y desarrollo de nuevas fuentes de taxanos basadas en los cultivos celulares de *Taxus* spp. y su optimización, así como, profundizar en el conocimiento de la biosíntesis de taxanos y su**

control, con el propósito de aplicar los conocimientos generados en el ámbito de la ingeniería metabólica.

Por ello, los objetivos específicos que nos hemos planteado son:

- a) Considerando la capacidad productiva de las biofactorías vegetales, nuestro primer objetivo ha sido desarrollar cultivos celulares de tejo mexicano (*Taxus globosa*), una especie vegetal muy poco estudiada a nivel de cultivos *in vitro* y optimizar su producción mediante el tratamiento con nuevos sistemas de elicitación, y comparar estos resultados con los obtenidos con otra especie vegetal mejor caracterizada a nivel molecular como es *Taxus x media*. Una aproximación racional a este estudio comparativo generará nueva información sobre la capacidad de síntesis y el control de la producción de ambos sistemas biológicos.

- b) Por otro lado, conociendo las posibilidades que ofrecen los cultivos celulares para el estudio del metabolismo vegetal, nuestro segundo objetivo ha sido la caracterización a nivel bioinformático y el posterior análisis funcional del gen *TB768*. Este gen de *Taxus baccata* fue previamente clonado por nuestro grupo de investigación y los análisis *in silico* lo han postulado como un gen potencialmente implicado en un paso hasta ahora no caracterizado en la biosíntesis de taxanos, la activación de la β -fenilalanina, el precursor de la cadena lateral del taxol.

- c) Finalmente nuestro propósito es corroborar la potencialidad de los cultivos de *Taxus* spp. para la producción de taxanos y para el desarrollo de estudios básicos conducentes a un mejor conocimiento de la biosíntesis de taxanos y su regulación.

2. Introducción

Taxol (paclitaxel) y sus derivados son fármacos estabilizadores de microtúbulos ampliamente utilizados en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el de mama, próstata, ovario y carcinoma de pulmón de células no pequeñas, así como el sarcoma de Kaposi asociado con el SIDA y otros tipos de tumores. Los taxanos estabilizan los microtúbulos mediante la mejora de su polimerización y la inhibición de la despolimerización. La dinámica de los microtúbulos es crucial para la formación del huso mitótico y su función. Por ello, las células en contacto con taxanos son incapaces de desarrollar la separación cromosómica durante la mitosis, y el ciclo celular es detenido en las fases G2/M, conduciendo a las células a un proceso de apoptosis (Expósito *et al.* 2009).

Los cultivos de células vegetales se utilizan para la producción biotecnológica a escala industrial de importantes metabolitos secundarios vegetales, incluyendo el agente anticancerígeno taxol. En las dos décadas anteriores, se desarrollaron numerosas aproximaciones de tipo empírico para la mejora de la producción biotecnológica de taxanos, que han llevado a la conclusión de que el tratamiento de los cultivos celulares de *Taxus* spp. con jasmonato de metilo (MeJA) u otros elicitores constituye una eficaz estrategia. Sin embargo, se tiene poca información acerca de cómo los elicitores incrementan la biosíntesis de taxanos o cómo está regulado el proceso (Cusido *et al.* 2014). En los últimos años, con la ayuda de herramientas "ómicas", las aproximaciones de tipo racional han proporcionado nueva información sobre el metabolismo de los taxanos y su control (Onrubia *et al.* 2013a). Una vez logrado un mejor conocimiento de la biosíntesis de estos compuestos, y determinados los pasos limitantes del flujo de carbono de la ruta biosintética, la implementación de las técnicas de ingeniería metabólica a la producción de taxanos puede permitir el diseño de líneas celulares de *Taxus* spp. mediante la sobreexpresión de genes que controlan los pasos flujo-limitantes de su biosíntesis, aumentando así la productividad del sistema. En este capítulo introductorio, se revisa la caracterización química y biológica de taxol, las fuentes biotecnológicas de estos compuestos y sus derivados, los avances en la elucidación de su ruta metabólica y se analizan las perspectivas futuras de

la producción biotecnológica de este importante grupo de compuestos anticancerígenos.

2.1. Los taxanos, un potente grupo de compuestos con acción antitumoral

El cáncer es un término genérico aplicado a un gran grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Una de las características que define el cáncer es la rápida generación de células que crecen más allá de sus límites normales y pueden invadir zonas adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos. Este proceso, denominado metástasis, es la principal causa de las muertes por cáncer. La tasa de mortalidad provocada por el cáncer puede reducirse significativamente mediante el uso de agentes quimioterapéuticos que pueden mejorar la calidad de vida del paciente y prolongar su supervivencia (Onrubia *et al.* 2013a).

En la década de 1950, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos comenzó un programa de cribado de organismos vegetales para descubrir nuevos compuestos anticancerígenos derivados de fuentes naturales, recogiendo muestras de más de 35.500 especies. El tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.) fue la primera especie vegetal con propiedades anticancerígenas demostradas. El taxol (Tx) se aisló y caracterizó químicamente en 1969 como el componente anticancerígeno activo en los extractos de corteza de tejo (Wani *et al.* 1971). El Tx se encuentra en concentraciones muy bajas, y por término medio, tres a cuatro árboles de 150-200 años de edad tienen que ser sacrificados para suministrar la materia prima necesaria (corteza interna) para el tratamiento de un paciente de cáncer (Expósito *et al.* 2009), lo que hace de su producción un sistema no renovable y constituye una gran amenaza ecológica. En consecuencia, se han realizado grandes esfuerzos de investigación tratando de encontrar formas alternativas para el suministro de Tx, entre ellos, su semisíntesis a partir de otros

compuestos vegetales, la utilización de biofactorias vegetales para su producción y los procesos de síntesis química. La demanda a gran escala para Tx fue satisfecha inicialmente utilizando una fuente renovable de 10-deacetilbaccatina (DAB) y baccatina III (BIII) (los precursores semisintéticos de Tx) que se acumulan en ramas jóvenes y hojas de diferentes especies de *Taxus* o en la producción biotecnológica industrial de estos compuestos, en cultivos celulares de *Taxus* spp., por las compañías Phyton Biotech. Inc. y Genexol® -Samyang Genex (Korea) (ver Tabla 1). Más recientemente, la extracción directa de Tx se ha conseguido a partir de plantaciones de árboles de tejo chinos (*T. chinensis* o *T. yunnanensis*) (Fig. 1) (Malik *et al.* 2011).

Tabla 1. Compuestos secundarios vegetales bioactivos producidos biotecnológicamente a nivel comercial. (Modificado de Sharma *et al.* 2014).

Sistema vegetal	Compuesto	Fabricante
<i>Catharanthus roseus</i>	Arbutina	Mitsui Chemicals Inc (Japón)
<i>Coptis japonica</i>	Berberinas	Mitsui Chemicals Inc. (Japón)
<i>Echinacea purpurea</i> . <i>Echinacea angustifolia</i> .	Polisacaridos de equinacea	Diversa (Alemania)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosidos	Nitto Denko Corporation (Japón)
<i>Taxus spp</i>	Paclitaxel	Phyton Biotech. Inc. (USA/Alemania) y Genexol® -Samyang (Corea)
<i>Podophyllum</i>	Podofilotoxina	Nippon oil (Japon)
<i>Coleus blumei</i>	Ácido rosmarínico	A. Natterman & Cie. GmbH (Alemania)
<i>Duboisia spp.</i>	Escopolamina	Sumitomo Chemical Co. Ltd. (Japón)
<i>Lythospermom erythorhizon</i>	Siconina	Mitsui Chemicals, Inc. (Japón)

La frecuente baja producción de agentes anticancerígenos vegetales (menos de 0,02% en peso seco, en el caso de Tx) puede depender del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Kelsey and Vance 1992). Algunas especies vegetales que contienen compuestos de alto valor son difíciles de cultivar o están en peligro de extinción debido a la sobreexplotación. Además,

su síntesis química es a menudo económicamente inviable debido a sus complejas estructuras estereoquímicas y los requisitos específicos para su síntesis. El Tx, es un claro ejemplo de ello, siendo un complejo diterpeno con un sistema anillado tricíclico (6-8-6) altamente oxigenado, una cadena lateral específica y la presencia de 11 centros quirales en su esqueleto, (Tabla 2). Aunque hasta la fecha se han desarrollado 6 procesos independientes para la síntesis total de Tx, estos procesos están aún lejos de constituir un sistema comercial para la producción de este anticancerígeno (Walji y MacMillan 2007).



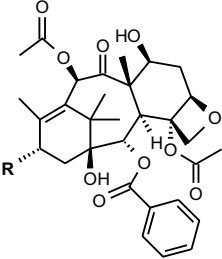
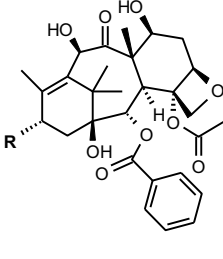
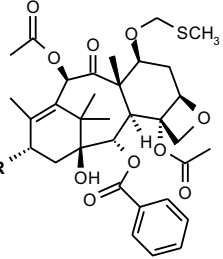
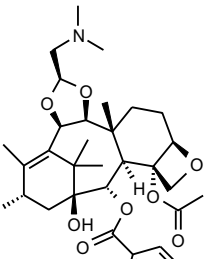
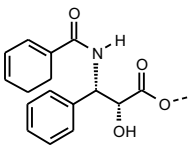
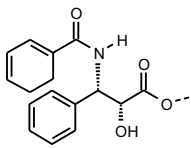
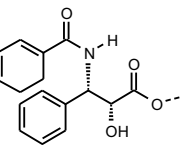
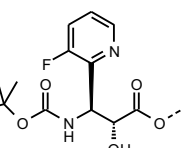
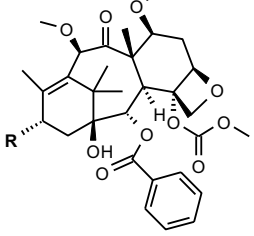
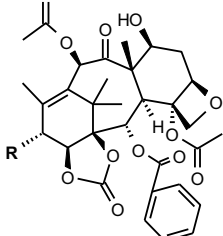
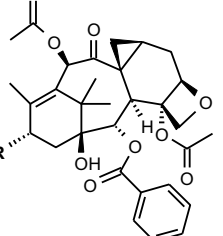
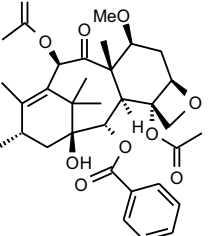
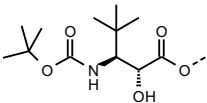
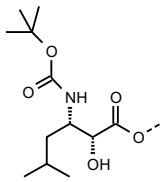
Figura 1. Aspecto de las plantaciones de *Taxus chinensis*, en el parque natural de Da Huan, región de Yunnan (China).

2.1.1. Taxol y sus análogos

Los taxanos son una clase de agentes quimioterápicos entre los que se incluyen Tx y docetaxel (Dx). Como ya se ha indicado, los taxanos inhiben el proceso normal de reorganización de la red de microtúbulos, esencial para el desarrollo del ciclo celular, que conduce a una interrupción de la mitosis (división celular). Estos compuestos constituyeron la primera clase de agentes antineoplásicos con acción estabilizadora sobre los microtúbulos (Tabla 2)

aprobados para su uso clínico por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del cáncer de mama, ovario, y próstata, así como el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Tabla 2. Estructuras químicas del taxol y algunos de sus análogos semisintéticos (modificado de Onrubia *et al.* 2013a).

Nombre:	Taxol	Docetaxel	BMS-184476	DJ-927
Núcleo				
Cadena lateral (R):				
Nombre:	BMS-275183	Ortaxel	Larotaxel	Carbazitaxel
Núcleo:				
Cadena lateral (R):				

Como se ha indicado anteriormente, el Tx fue identificado a principios de 1970 a partir de un extracto crudo de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico) y se demostró su acción citotóxica contra muchos tumores en los estudios preclínicos (Wani *et al.* 1971). Químicamente, Tx es un alcaloide diterpénico con el complejo núcleo químico de taxadieno y una cadena lateral de N-benzoil-3'fenilisoserina (Fig. 2). Es muy escaso en la naturaleza y muy poco

soluble. Dx es un compuesto semisintético producido a partir de 10-deacetilbaccatina-III (DAB), un precursor natural del Tx, que se acumula en las agujas de *T. baccata* (tejo europeo) y es ligeramente más soluble en agua que Tx (Hennenfent y Govindan 2006).

La baja solubilidad de los taxanos requiere su inclusión en vehículos surfactantes complejos para sus formulaciones comerciales. Cremophor EL® (CrEL), que utiliza como vehículo aceite de ricino polioxiethylado, y etanol deshidratado USP (1: 1, v / v) es considerado como el sistema disolvente más adecuado para Tx, mientras que el Dx se solubiliza en otro tensoactivo polihidroxilado, el polisorbato 80 (Tween 80). Sin embargo, numerosos datos experimentales recientes indican que ambos solubilizantes son compuestos biológicamente activos, y su uso como vehículos para la formulación de fármacos está cuestionado, debido a los efectos adversos que producen, incluyendo reacciones de hipersensibilidad aguda y neuropatía periférica (Hennenfent y Govindan 2006). Además, varios informes han vinculado estos disolventes a alteraciones en los perfiles farmacocinéticos de Tx y Dx (Ten Tije *et al.* 2003). La utilización de estos taxanos en entornos clínicos y preclínicos también está cuestionada por el desarrollo de resistencias, principalmente relacionadas con la expresión de isotipos de tubulina mutantes y/o la sobreexpresión de una bomba de flujo transmembrana, la glicoproteína-P (P-gp), que causa resistencia a múltiples fármacos. P-gp también afecta la absorción de fármacos en el tracto gastrointestinal al ser administrados por vía oral (Shionoya *et al.* 2003).

Para mejorar los efectos anticancerígenos de los taxanos, se han desarrollado otros derivados de Tx. Las partículas de albúmina y Tx (nab Px, Abraxane TM) es una formulación que no emplea el sistema disolvente CrEL y ha sido aprobado para usos clínicos por la FDA (Hennenfent y Govindan 2006). Un nuevo compuesto desarrollado es DHA-paclitaxel o Taxoprexin®, formado por la unión covalente del ácido docosahexaenoico (DHA) con Tx. Este conjugado fue diseñado para actuar como un profármaco y se acumula preferentemente en el tejido tumoral (Wolff *et al.* 2003). El Xyotax® (CT-2103) es otro conjugado utilizado para mejorar la solubilidad de Tx. Esta macromolécula consiste en un polímero biodegradable de ácido glutámico

llamado “paclitaxel poligumex”, soluble en agua, que contiene un 37% de Tx (Sabbatini *et al.* 2004). Taxoprexin® se encuentra actualmente en fase clínica III y Xyotax™ está en fase I. Ambos compuestos muestran más solubilidad y menos efectos secundarios que CrEL. También se ha estudiado el uso de micelas como portadores de taxanos, por ejemplo, Genexol-PM, una formulación de Tx-micelar que consta de polietilenglicol (PEG) y poli(ácido D,L-láctico) ha sido aprobado por la FDA para uso en pacientes con cáncer de mama (Oerlemans *et al.* 2010). Otros desarrollos relacionados son la encapsulación de Tx en liposomas (LEP), como el TOCOSOL, que es una emulsión a base de Tx y vitamina-E, o el Paclimer®, donde Tx se incorpora en una matriz de un polímero biodegradable que consiste en un polifosfoéster, el polilactofato, que forma microesferas y contiene un 10% Tx (Pradilla *et al.* 2006).

Por otro lado, también se han desarrollado análogos de taxanos para evitar la toxicidad de Tx y mejorar su actividad antitumoral. El objetivo final de estos estudios es desarrollar un compuesto con una buena biodisponibilidad oral y una eficacia comparable a los taxanos de vía parenteral antes mencionados, y a la vez disminuir los efectos secundarios y la resistencia. El análogo de Tx BMS-184476 (Tabla 2) se caracteriza por la sustitución del grupo 7-hidroxilo de Tx por un grupo 7-metiltiometilo. Este cambio en la molécula de Tx aumenta la solubilidad del fármaco, dando como resultado varias ventajas sobre los taxanos estándar en modelos preclínicos y clínicos (Kim *et al.* 2001; Pradilla *et al.* 2006). DJ-927 (Tabla 2) es otro taxano modificado de alta solubilidad, no neurotóxico, con potente actividad antitumoral y biodisponibilidad oral (Shionoya *et al.* 2003). BMS-275183, un análogo de C-3'-t-butil-Nt-butiloxicarbonilo, es otro taxano biodisponible por vía oral (Heath *et al.* 2011). Otros miembros de la nueva generación de taxanos con una acción mejorada son ortataxel, larotaxel y cabazitaxel (Tabla 2). La mayoría de estos compuestos están en la fase I o II de los ensayos clínicos y es probable que sean aprobados por la FDA en un futuro próximo para el tratamiento de tumores de mama resistente a Tx (Ferlini *et al.* 2008), mientras que carbazitaxel ya tiene la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico (Pean *et al.* 2012).

En resumen, podríamos considerar que los problemas presentados por los taxanos relacionados con su baja solubilidad han sido parcialmente solventados, pero el desarrollo de nuevos análogos que no generen resistencias no se ha validado en estudios clínicos posteriores (Ferlini *et al.* 2008). El reto sigue vigente y es probable que esta clase de agentes anticancerígenos constituya una prometedora fuente de nuevos agentes antitumorales que lleve en el futuro a una demanda superior en el mercado de los precursores biosintéticos de estos compuestos.

2.2. Estado actual del conocimiento sobre la biosíntesis de taxanos

Aunque la biosíntesis de Tx no se conoce completamente, se ha postulado que 19 enzimas podrían estar implicadas en los pasos posteriores a la formación de difosfato de geranilgeranilo (GGPP) (Croteau *et al.* 2006; Vongpaseuth y Roberts 2007). Después de la ciclación de GGPP para originar el taxadieno, los pasos necesarios para formar Tx constan de ocho oxidaciones, cinco acil/aroíl transferasas, una epoxidación, una aminomutasa, dos esterificaciones con CoA y una N-benzoilación. Todas las enzimas que participan en la biosíntesis de Tx se enumeran en la tabla 3 y muchas de ellas han sido clonadas y caracterizadas a partir de estudios realizados con cultivos celulares de *Taxus* spp.

Como diterpenoide natural, Tx se forma exclusivamente del GGPP, que se sintetiza a partir de tres moléculas de difosfato de isopentenilo (IPP) y un difosfato de dimetilalilo (DMAPP) por acción de la enzima GGPP sintasa (Hefner *et al.* 1998) (Fig. 2). La fuente de IPP utilizado en la ruta biosintética no es del todo conocida, y podrían participar tanto la vía plastidial (Eisenreich *et al.* 1996) como la citosólica (Lansing *et al.* 1991; Zamir *et al.* 1999), aunque existen estudios que indican que la vía predominante de IPP dependería de la etapa del cultivo. Por ejemplo, Srinivasan *et al.* (1996) sugirió que la vía

citoplasmática de IPP podría desempeñar un papel en la producción Tx durante la fase inicial del crecimiento de las células de *Taxus*, mientras que Wang *et al.* (2003) propuso que la translocación de IPP a través de la membrana del plastido sólo se produce en una fase tardía del crecimiento del cultivo. Sin embargo, investigaciones en cultivos celulares de *T. baccata* han demostrado que la biosíntesis de Tx es bloqueada por la adición de fosmidomicina (un inhibidor de la vía de plastídica) y también aunque en menor medida, por mevinolina (un inhibidor de la vía citoplasmática), lo que sugiere que ambas vías podrían estar involucradas (Cusidó *et al.* 2007).

Tabla 3. Listado de las enzimas que se ha postulado están implicadas en la biosíntesis de paclitaxel. Se indica su nombre abreviado, el número de accesoión GenBank y la primera vez que fueron descritas/publicadas.

Enzima	Abrev.	GenBank acc No	Referencia
geranilgeranil difosfato sintasa	GGPPS	AF081514	(Hefner <i>et al.</i> 1998)
taxadieno sintasa	TS	AY364469	(Koepp <i>et al.</i> 1995)
taxadieno-5 α -hidroxilasa	T5 α OH	AY289209	(Hefner <i>et al.</i> 1996)
taxadieno-13 α -hidroxilasa	T13 α OH	AY056019	(Jennewein <i>et al.</i> 2001)
taxadieno-5 α -ol-O-acetil transferasa	TAT	AF190130	(Walker <i>et al.</i> 2000)
taxano-10 β -hidroxilasa	T10 β OH	AF318211	(Schoendorf <i>et al.</i> 2001)
taxano -14 β -hidroxilasa	T14 β OH	AY188177	(Jennewein <i>et al.</i> 2001)
taxano-2 α -hidroxilasa	T2 α OH	AY518383	(Chau and Croteau 2004)
taxano-7 β -hidroxilasa	T7 β OH	AY307951	(Chau <i>et al.</i> 2004)
taxano-1 β -hidroxilasa	T1 β OH	----	----
C4 β ,C20-epoxidasa	----	----	----
oxomutasa	----	----	----
taxano-2 α -O-benzoil transferasa	TBT	AF297618	(Walker y Croteau 2000b)
taxano-10 β -O-acetil transferasa o 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetiltransferasa	DBAT	AF193765	(Walker y Croteau 2000a)
taxano-9 α - hidroxilasa	T9 α OH	----	----
fenilalanina aminomutasa	PAM	AY582743	(Walker <i>et al.</i> 2004)
β -fenilalanina-CoA ligasa	----	----	----
baccatina III: 3-amino, 13-fenilpropanoiltransferasa	BAPT	AY082804	(Walker <i>et al.</i> 2002a)
taxano 2' α -hidroxilasa	----	----	----
N-benzoyl transferasa	DBTNBT	AF466397	(Walker, <i>et al.</i> 2002b)

La ciclación de GGPP, que es catalizada por taxadieno sintasa (TS) (Wildung y Croteau 1996), conduce a la formación de taxa-4(5),11(12)-dieno, el primer compuesto de la ruta biosintética de Tx que contiene el núcleo del taxano (Koepp *et al.* 1995). Hezari *et al.* (1997) compararon la actividad *in vitro* de TS con la producción y acumulación de Tx en cultivos celulares de *Taxus* spp. indicando que este paso es lento, y no se produce la acumulación de taxadieno en las células vegetales, pero no es un paso limitante de la ruta biosintética.

El taxadieno es hidroxilado posteriormente en el C5 por la taxadieno-5 α -hidroxilasa (T5 α OH), dando taxa-4(20),11(12)dien-5 α -ol, que no sólo experimenta una hidroxilación, sino también la migración del doble enlace desde la posición C4-C5 a C4-C20 (Fig. 2) (Hefner *et al.* 1996). Esta hidroxilasa tiene una secuencia de inserción a membrana N-terminal (retículo endoplasmático) y, a pesar de ser un paso lento, su actividad no parece ser limitante para la formación de Tx.

En este punto de la biosíntesis, hay una bifurcación y el sustrato puede ser modificado por una transferasa o una hidroxilasa. Taxadien-5 α -ol-O-acetil transferasa (TAT) acila al taxadien-5 α -ol en la posición C5 para formar taxadien-5 α -il-acetato (Walker *et al.* 2000) Por otro lado, la taxadieno-13 α -hidroxilasa (T13 α OH), hidroxila el taxadien-5 α -ol en el C13 y, menos eficientemente, el taxadien-5 α -il-acetato (Wheeler *et al.* 2001). El Taxadien-5 α -il-acetato puede ser fácilmente hidroxilado en el C10 por una monooxigenasa CytP450, la taxano-10 β -hidroxilasa (T10 β OH), pero debido a su naturaleza menos específica T10 β OH también puede modificar otros taxanos (Schoendorf *et al.* 2001). La taxano-14 β -hidroxilasa (T14 β OH) es responsable de la formación de taxadien-5 α -acetoxi-10 β -14 β -diol a partir de taxadien-5 α -acetoxi-10 β -diol (Jennewein *et al.* 2003). T14 β OH no está involucrada en la producción de Tx, ya que este compuesto no presenta hidroxilada la posición C14, pero es responsable de una ramificación de la vía metabólica de taxanos.

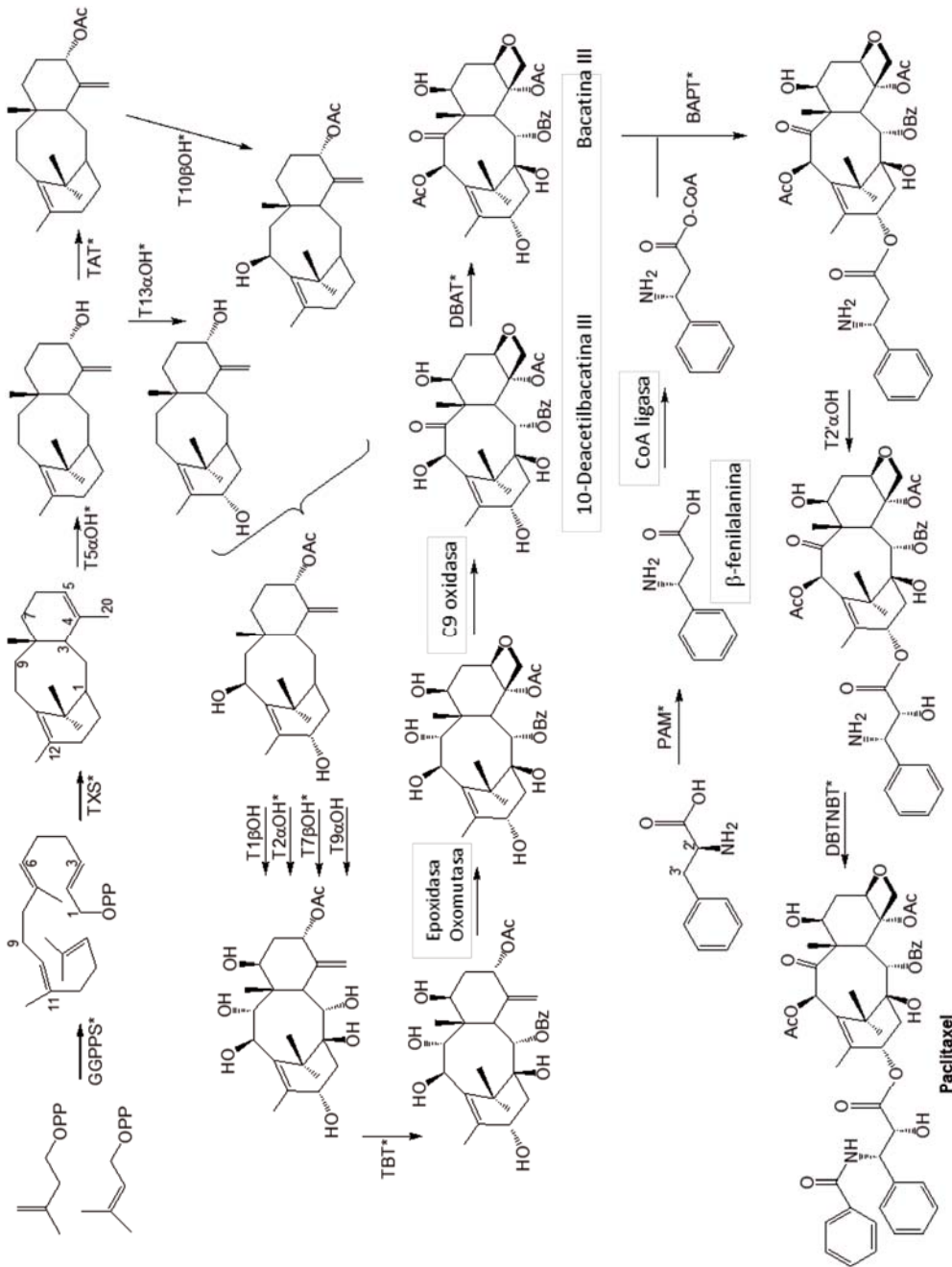


Figura 2. Representación esquemática de la biosíntesis de paclitaxel. GGPPs, Geranilgeranil difosfato sintasa; TS, taxadieno sintasa; T5 α OH, taxadieno 5 α -hidroxilasa; TAT, taxadieno-5 α -ol-O-acetil transferasa; T13 α OH, taxadieno 13 α -hidroxilasa; T10bOH, taxano 10b-hidroxilasa; T11bOH, taxano 1b-hidroxilasa; T9 α OH, taxano 9 α -hidroxilasa; OTC, taxano-2 α -O-benzoil transferasa; DBAT, deacetilbaccatina III-10 -O-acetiltransferasa; PAM, fenilalanina amino mutasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoil transferasa; T2 α OH, taxano 2 α -hidroxilasa; DBTNBT, N-benzoil transferasa. *, Genes conocidos.

Después de la formación de taxadien-5 α -acetoxi-10 β ,13 β -triol, los pasos siguientes de la ruta biosintética que llevan a la formación de Tx incluyen varias hidroxilaciones en las posiciones C1, C2, C4 y C7 (Fig. 2). Se sabe que las hidroxilaciones están mediadas por enzimas de la familia CytP450 pero no exactamente en qué orden actúan. Teniendo en cuenta la frecuencia de la oxidación de los taxanos encontrados en cultivos celulares, una secuencia probable, validada por análisis filogenéticos de las taxano CytP450 oxigenasas previamente clonadas es: C5, C10, C13, C2, C9, C7 y finalmente C1 (Vongpaseuth y Roberts 2007). Sin embargo, en los cultivos *in vitro*, estos intermediarios podrían ser diferentes a lo que realmente sucede en la planta.

Después de la formación del precursor hipotético polihidroxiado, la actividad de la 2 α -O-benzoil transferasa (TBT) (Walker y Croteau 2000b) conduce al siguiente intermediario de la ruta biosintética. Tras una oxidación en el C9, cuya enzima aun no ha sido caracterizada, y una epoxidación en el doble enlace C4-C20 se forma la 10-deacetilbaccatina III (DAB).

Aunque se han propuesto diversos mecanismos para la formación del anillo de oxetano presente en la molécula de Tx (Croteau *et al.* 2006; Floss y Mocek 1995), actualmente se acepta que el proceso implica la epoxidación del doble enlace C4-C20 seguida de la migración del grupo α -acetoxi del C5 al C4 junto con el expansión del oxirano al grupo oxetano. La enzima que epoxida el doble enlace C4-C20 aún no se ha caracterizado funcionalmente y la expansión de anillo de oxirano a oxetano es también un paso no conocido completamente.

La acetilación en la posición C10 de DAB es catalizada por la enzima 10-deacetilbaccatina transferasa III-10-O-acetilo (DBAT) (Walker y Croteau 2000a). El resultado es la formación de baccatina III (BIII), utilizando DAB y acetil CoA como sustratos (Fig. 2).

Un paso clave en la biosíntesis de Tx es la esterificación del grupo hidroxilo de C13 de la baccatina III (BIII) con la cadena lateral β -fenilalanina CoA. Esta cadena lateral se obtiene a partir del aminoácido α -fenilalanina por la acción de fenilalanina aminomutasa (PAM) (Floss y Mocek 1995). Una CoA ligasa desconocida hasta el momento, probablemente activaría al intermediario

β -fenilalanina para que se pueda unir a la BIII. La enzima que cataliza la conjugación de la cadena lateral de β -fenilalanina-CoA a la BIII es la C-13-fenilpropanoil-CoA transferasa (BAPT), produciendo el compuesto 3'-N-debenzoil-2'-deoxypaclitaxel (Walker *et al.* 2002a).

Aunque BAPT puede unir β -fenilalanina y β -fenilisoserina, se cree que una 2' α -hidroxilasa no caracterizada hasta el momento podría actuar en este paso. La hidroxilasa propuesta debería pertenecer al grupo de los CytP450 y compartir otras características comunes con el resto de hidroxilasas de taxanos. Estudios previos de Long y Croteau (2005) y Long *et al.* (2008) indican que una N-benzoil transferasa (DBTNBT) sería la responsable de la última etapa en la formación de Tx, ya que no hay evidencia de la hidroxilación directa de β -fenilalanina en la posición 2', o en 2'-deoxypaclitaxel, mientras que 3-N-debenzoil-2'-deoxypaclitaxel puede ser hidroxilado en la posición 2' de la cadena lateral. Por otra parte, DBTNBT tiene más afinidad por 3-N-debenzoilpaclitaxel que por 3-N-debenzoil-2'-deoxypaclitaxel, con un factor de eficiencia catalítica de dos. La N-benzoil transferasa es una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta varias características similares a otras aciltransferasas de *Taxus* (Walker *et al.* 2002b). La modificación de N-debenzoil paclitaxel, o incluso del propio Tx, por otras transferasas conduce a la formación de otros compuestos, tales como cefalomanina (CF) o 10-deacetiltaxol (DT).

2.3. Fuentes naturales de taxanos

El género *Taxus* pertenece a la clase *Pinopsida*, orden *Taxales* y familia *Taxaceae*. Las especies de *Taxus* se distribuyen en las zonas templadas del norte de Asia, Asia Menor, India, Europa, África del Norte y América del Norte (Fig. 3). Estas especies son muy similares y a menudo son más fáciles de caracterizar geográficamente que morfológicamente. Por esta razón, desde que Linneo escribió *Species Plantarum* en 1753, la clasificación del género *Taxus* se ha discutido exhaustivamente. La subdivisión del género en

diferentes especies se ha basado en las características de las acículas, el tamaño eventual de la planta, hábitos de crecimiento y su distribución geográfica (Hartzell 1991; Zanoni y Farjon 1999). Típicamente ocho especies se reconocen y son distinguibles por su distribución (Fig. 3): *Taxus baccata* (tejo europeo), *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), *Taxus canadensis* (tejo canadiense), *Taxus chinensis* (tejo chino), *Taxus cuspidata* (tejo japonés), *Taxus floridana* (tejo de Florida), *Taxus globosa* (tejo mexicano) y *Taxus wallichiana* (tejo del Himalaya). También hay dos híbridos reconocidos: *Taxus x media* = *Taxus baccata* x *Taxus cuspidata* y *Taxus x hunnewelliana* = *Taxus cuspidata* x *Taxus canadensis*. Además hay casi 400 cultivares de tejo de las diferentes especies reconocidas en todo el mundo (Cope 1998).

Los análisis fitoquímicos realizados, revelan que los contenidos de taxanos varían según la especie, tejido, edad de la planta y momento de la cosecha, los contenidos más altos de Tx suelen encontrarse en la corteza en la mayoría de las especies, alcanzándose valores de hasta un 0,015% PS de Tx en *Taxus brevifolia* (Vidensek *et al.* 1990). Por el contrario en las acículas se acumulan en general, altos contenidos del precursor de Tx, 10 deacetilbaccatina III (DAB), sobre todo en *T. canadienses*, *T. globosa* y *T. wallichiana* llegando a alcanzar cantidades de hasta 0,27% PS (Tabla 4) (van Rozendaal *et al.* 2000).

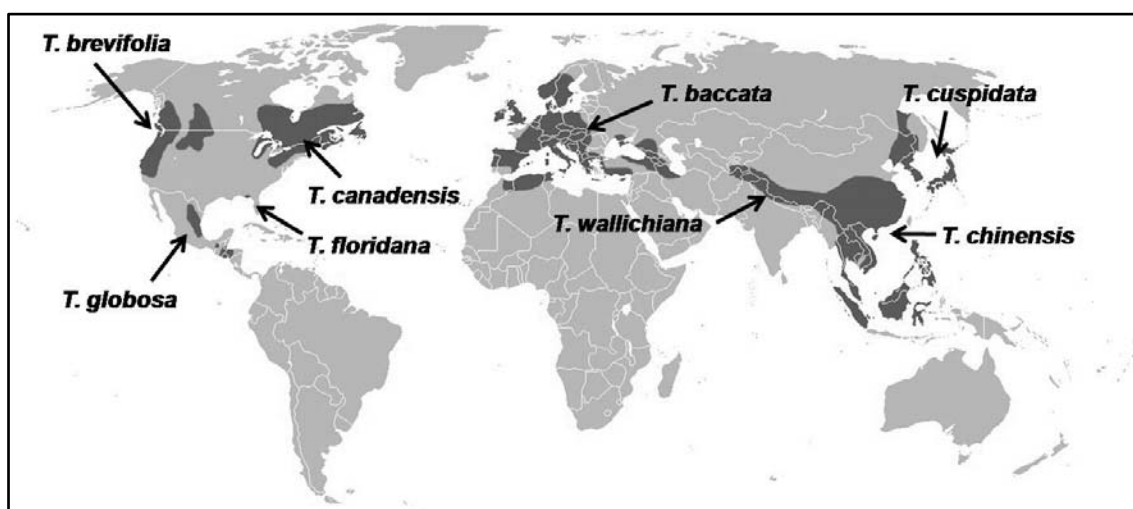


Figura 3. Distribución geográfica de las diferentes especies que integran el género *Taxus* (modificado de Onrubia *et al.* 2010).

Tabla 4. Contenidos de taxanos en las acículas de diferentes especies de *Taxus*. Tx, taxol; DAB, 10 deacetilbaccatina; CF, cefalomanina; BIII, baccatina III, DT, deacetiltaxol; Brev, brevifolina. Contenidos expresados en $\mu\text{g/g}$ PS (modificado de Van Rozzendal *et al.* 2000).

Especie	Tx	DAB	CF	BIII	DT	Brev	Total
<i>T. baccata</i>	41	198	22	14	762	3	1039
<i>T. baccata cv.</i>	63	179	42	10	468	6	768
<i>T. brevifolia</i>	130	0	0	296	41	9132	9599
<i>T. canadensis</i>	285	253	289	224	2665	77	3793
<i>T. celebica</i>	26	81	0	0	70	46	223
<i>T. cuspidata</i>	105	113	40	15	120	6	399
<i>T. cuspidata cv.</i>	136	198	93	18	116	1	562
<i>T. globosa (a)</i>	516	515	0	0	1689	0	2720
<i>T. × hunnewelliana</i>	433	229	480	168	1395	0	2705
<i>T. × media cv.</i>	41	100	0	0	63	0	204
<i>T. wallichiana</i>	211	205	131	36	230	6	819
<i>T. globosa (b)</i>	272	420	0	0	1092	0	1784

Una de las últimas especies que se han introducido *in vitro* (Tapia *et al.* 2013) ha sido *Taxus globosa* Schtdl que es la única especie del género *Taxus* nativa de México, de ahí el nombre "tejo mexicano". Su distribución geográfica es muy limitada, se restringe principalmente a los bosques protegidos a 1000-3400 m de altitud en las zonas montañosas de los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Chiapas (Fig. 4) (Soto *et al.* 2000; Zavala-Chávez 2001). Debido a su lento crecimiento y baja densidad de población, *T. globosa* tiene el estatus de una especie rara y en la

actualidad está protegida por el gobierno mexicano, lo que limita la recolección de material vegetal para la extracción de taxanos y su comercialización.



Figura 4. En oscuro, la distribución de *T. globosa* en el territorio mexicano

Taxus globosa es un árbol bajo o arbusto perennifolio, que puede alcanzar entre 6 y 12 m de alto; con tallo de 30 a 40 cm de diámetro a diferencia de la especie europea, *T. baccata*, que alcanza los 20 m de alto, con un tallo de cerca de 2,2 m de diámetro. El tejo mexicano posee una corteza escamosa de color pardo claro (Fig. 5), sus hojas jóvenes están distribuidas en espiral, son aplanadas, lineares a linear-lanceoladas, también son ligeramente falcadas de 2 a 3,5 cm de largo, por 2 a 2,5 mm de ancho, con ápice agudo, acuminado, base angostada en un pecíolo corto, verde oscuro en el haz y más claras en el envés; presentan estróbilos masculinos axilares, estróbilos femeninos solitarios en las axilas de las hojas y semillas ovoides de 6 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo. Los nombres comunes registrados son granadillo, palmira, romerillo y tlatscal (Zamudio 1992).



Figura 5. Corteza de un ejemplar de *T. globosa*, parque nacional El Chico, Hidalgo, México.

Estos árboles dioicos, se reproducen por semilla; florecen de diciembre a marzo o de febrero a mayo, según sea su hábitat; se ha observado polinización abundante en febrero y marzo. La fructificación ocurre de mayo a agosto en algunas localidades del norte del país o de julio a noviembre en otras del centro, pero aún se desconoce la variabilidad y el grado de sincronía o asincronía en la floración de las poblaciones silvestres. De acuerdo con observaciones de campo, la multiplicación parece basarse de manera fundamental en la producción de semillas, pero en algunos lugares se ha encontrado una notable producción de rebrotes a partir de la base del tallo. Esto podría ser indicio de un mecanismo regenerativo combinado, una característica de la especie que podría ser aprovechada para su propagación y regeneración artificial en México. El ciclo reproductivo de *T. globosa* parece cubrirse en un año, iniciándose de octubre a noviembre y concluyendo de septiembre a noviembre del siguiente año; pero se desconocen los detalles de la diferenciación de estructuras reproductoras y de la fertilización de óvulos, además de la fenología completa de la especie (Zavala *et al.*2001)

Los estudios fitoquímicos sobre los contenidos de taxanos realizados en árboles silvestres de *T. globosa* (Guerrero *et al.* 2000; Strobel *et al.* 1973) han demostrado que a diferencia de otras especies de *Taxus*, el tejo mexicano tiene un alto contenido de taxanos, particularmente Tx (433 µg/g PS), que se acumula principalmente en las acículas y tallos jóvenes de los árboles (van Rozendaal *et al.* 2000)

Aunque el origen filogenético de *Corylus avellana* está muy alejado de los principales taxones productores de Tx, las especies de *Taxus*, estudios recientes han revelado que esta especie vegetal también puede constituir una fuente de taxanos. A finales de los años 90 (Hoffman *et al.* 1998), se determinó la presencia de Tx y otros taxanos en extractos de plantas avellano. Más recientemente, la producción de Tx en hojas y cáscaras de avellana de *C. avellana* ha sido estudiada por Ottaggio *et al.* (2008), encontrando que los niveles de este compuesto en hojas eran tres veces más altos que en las cáscaras. Bestoso *et al.* (2006) demostraron que el Tx presente en cultivos celulares de avellano no derivaba de hongos endófitos, lo que sugiere que es sintetizado por la propia planta. Aunque los contenidos de Tx en *C. avellana* son unas 10 veces menores que en los árboles de tejo (Hoffman *et al.* 1998), la producción de taxanos en cultivos de células en suspensión de *C. avellana* y su excreción al medio de cultivo se ha mejorado por el tratamiento con elicitores tales como MeJA (Bestoso *et al.* 2006). Además, recientemente se han optimizado los medios de crecimiento para los cultivos celulares de avellano y se han desarrollado plataformas biotecnológicas a nivel de biorreactores, basadas en estos cultivos (Gallego *et al.* 2015; Gallego *et al.* 2015)

En las últimas décadas también se ha demostrado la producción de taxanos en hongos endófitos de *Taxus* spp. (Huang *et al.* 2001; Lee *et al.* 1995; Li *et al.* 1996; Stierle *et al.* 1993), y se han caracterizado más de 30 especies productoras, la mayoría pertenecientes a los grupos de ascomicetos y hongos imperfectos, entre ellos, *Cephalosporium* spp., *Ectostroma* spp. y *Botryodiplodia theobromae* (Ji *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2010), que podrían constituir una fuente alternativa de Tx y sus derivados. En general los hongos endófitos crecen más rápidamente y son más fáciles de cultivar (Zhou *et al.* 2010), en relación con los cultivos celulares vegetales, por lo que además de

reducir los costes y aumentar los rendimientos del sistema, la producción de Tx por fermentación fúngica ayudaría a proteger un recurso natural tan importante como son los árboles de *Taxus* spp. Sin embargo últimamente estos aspectos han sido cuestionados, se duda si los hongos son capaces de sintetizar taxanos o más bien los almacenan en estructuras de la pared celular (Heinig *et al.* 2013).

2.4. Producción biotecnológica de taxanos

La producción de Tx en cultivos celulares de *Taxus* se ha convertido en un importante reto para la biotecnología vegetal debido a la gran eficacia de este compuesto en el tratamiento de una gran variedad de tumores, su escasez en la naturaleza y la creciente demanda de taxanos a nivel mundial. Como se mencionó anteriormente, varios estudios han demostrado que los análogos estructurales de Tx obtenidos por procesos semisintéticos a partir de intermediarios biosintéticos como BIII, DAB, CF, etc., son igualmente eficaces o incluso superan la acción de Tx, así como también presentan propiedades que facilitan su administración y absorción. En consecuencia, Tx y sus análogos estructurales tienen un alto valor añadido en el mercado químico-farmacéutico y como es de esperar hay un considerable interés en el desarrollo de procesos biotecnológicos rentables que puedan garantizar una alta producción de estos compuestos.

2.4.1. Estudios empíricos

Las aproximaciones de tipo empírico para la producción biotecnológica de metabolitos secundarios vegetales (MSV) suelen incluir, la optimización del sistema de cultivo a través de factores de entrada (selección de líneas

celulares, medio y condiciones de cultivo, adición de elicitores y precursores, diseño del biorreactor, procesos de aislamiento y purificación de los compuestos de interés, etc.) y la evaluación de los factores de salida (capacidad de crecimiento del cultivo, consumo de nutrientes y productividad del sistema). Sin embargo, normalmente no aportan información sobre lo que ocurre a nivel celular y molecular en el cultivo (Zhang *et al.* 2004) (Fig. 6).

Los primeros estudios empíricos desarrollados para optimizar bioprocesos basados en cultivos *in vitro* de *Taxus* spp., se iniciaron a principios de la década de 1990 y demostraron que los callos y suspensiones celulares de *Taxus* spp., podían producir Tx y sus precursores al menos de forma tan eficaz como la propia planta (Fett-Neto *et al.* 1992; Wickremesinhe y Arteea 1993; para recientes revisiones ver, Expósito *et al.* 2009; Malik *et al.* 2011). Generalmente, el éxito de la mejora de la producción biotecnológica de Tx y otros taxanos relacionados, en cultivos *in vitro*, incluye como principales estrategias, la optimización de las condiciones de cultivo, la selección de líneas celulares de alta producción y la adición de elicitores y precursores a los medios de cultivo.

Al igual que en otros sistemas biotecnológicos, la producción de Tx en cultivos celulares no suele depender de crecimiento. En un sistema de cultivo celular en dos etapas (Cusidó *et al.* 2002), las células vegetales se cultivan primero en un medio optimizado para su crecimiento, antes de ser transferidas a un medio de producción diseñado para estimular la biosíntesis de metabolitos secundarios. La principal ventaja de este sistema es que los precursores biosintéticos y elicitores se pueden añadir en el momento de máxima producción de los compuestos bioactivos.

La producción de Tx en cultivos celulares de *Taxus* spp. también se puede incrementar por la adición de diferentes combinaciones de hormonas a los medios de cultivo (Cusidó *et al.* 2002), variando el tipo y combinación de las fuentes de hidratos de carbono (Choi *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001), y el uso de precursores biosintéticos (Bentebibel *et al.* 2005; Srinivasan *et al.* 1996). Numerosos estudios se han centrado en el tratamiento de los cultivos con elicitores, ya sean abióticos como el lantano (Wu *et al.* 2001) o el sulfato de vanadilo (Cusidó *et al.* 1999), o bióticos tales como extractos de hongos

patógenos, no patógenos y endófitos (Lan *et al.* 2003; Li y Tao 2009; Yuan *et al.* 2002), celulasas (Rautengarten *et al.* 2010), ácido araquidónico (Bonfill *et al.* 2003), ácido salicílico (Wang *et al.* 2004), etileno (Mirjalili y Linden 1996) o incluso la combinación de diferentes tipos de elicitors (Khosroushahi *et al.* 2006). Otras estrategias incluyen el uso de disolventes orgánicos (Wang *et al.* 2001), ultrasonidos de baja energía (Wu y Ge 2004), campos magnéticos (Shang *et al.* 2004) o luz UV-B (Zu *et al.* 2010).

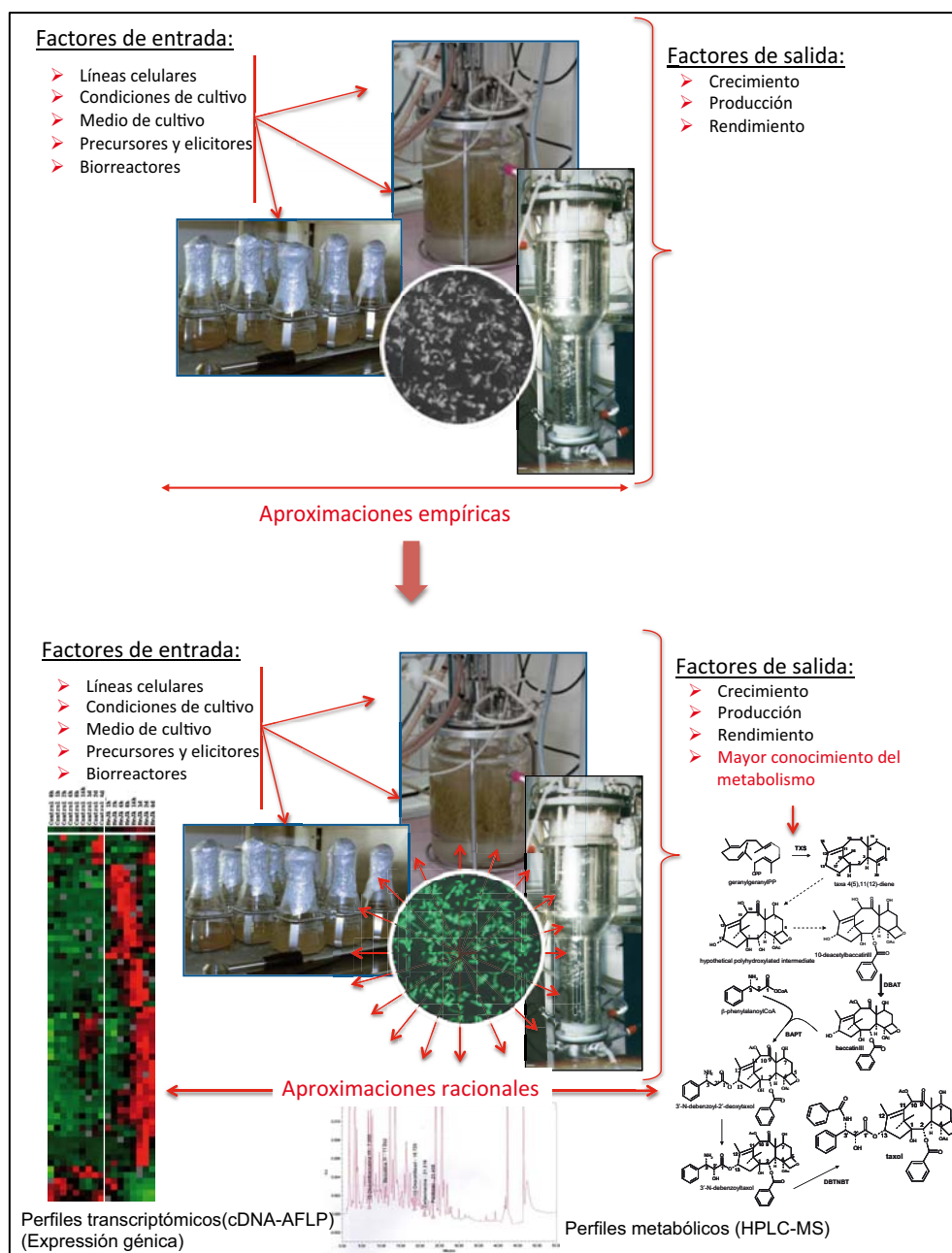


Figura 6. Representación esquemática de la comparativa entre los estudios empíricos vs racionales y la información que ambos generan.

A pesar del amplio rango de estudios de elicitación desarrollados hasta el momento, el tratamiento con el elicitor biótico MeJA sigue siendo una de las estrategias más eficaces para aumentar la producción de taxanos. Los jasmonatos desempeñan un papel importante en el proceso de transducción de señales que regulan los genes de defensa en las plantas (Farmer y Ryan 1990). Cuando se aplica exógenamente MeJA, se produce una mejora de la producción de metabolitos secundarios en una gran variedad de especies vegetales (Gundlach *et al.* 1992; Rischer *et al.* 2006; Uppalapati *et al.* 2005). Yukimune *et al.* (1996), fueron los primeros en utilizar este elicitor en cultivos celulares de *T. baccata*, a una concentración de 100 μ M MeJA, logrando un incremento en la producción taxanos, de entre 120 a 130 veces obteniendo respectivamente, 48,3 mg/L de Tx y 53,5 mg/L de BIII.

Hasta la fecha, Bentebibel *et al.* (2005) han obtenido las mayores tasas de productividad en Tx trabajando con cultivos de células inmovilizadas de *T. baccata*, alcanzando valores de 2,71 mg/L/día en un biorreactor de agitación mecánica y con un medio de crecimiento optimizado, suplementado con los precursores biosintéticos, mevalonato (0,38 mM) y N-benzoilglicina (0,2 mM), y elicitando con 100 μ M MeJA. Ketchum *et al.* (1999) obtuvieron un incremento de 40 veces en la producción de Tx en cultivos de suspensión de células *T. canadiensis* mediante la adición de 200 μ M MeJA llegando a alcanzar una producción de casi 120 mg/L. Sin embargo, a pesar de los grandes avances en este campo, desde el año 2005, la optimización de los medios y las condiciones de cultivo, así como las nuevas estrategias de elicitación diseñadas, no se han traducido en un aumento muy significativo en la producción de taxanos (Frense 2007; Malik *et al.* 2011; Sabater-Jara *et al.* 2010). Por ello, la búsqueda de nuevos y más activos elicitors para la producción biotecnológica de taxanos es uno de los nuevos objetivos para la investigación en este tema a desarrollar durante el siglo XXI. En este contexto, recientemente se ha demostrado que la elicitación con la fitotoxina coronatina (CORO), o el tratamiento combinado de MeJA con ciclodextrinas (CD), son más eficaces que el tratamiento con MeJA solo, para incrementar la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus x media* (Onrubia *et al.* 2013b; Sabater-Jara *et al.* 2014).

Actualmente se considera que un avance significativo en la producción biotecnológica de Tx sólo puede lograrse con un mayor conocimiento de su biosíntesis y de los factores que regulan su producción *in vitro*. A todo ello, el desarrollo de aproximaciones de tipo racional mediante la aplicación de herramientas “ómicas” puede contribuir muy positivamente para llegar a explicar realmente, qué está pasando a nivel celular y molecular en los cultivos de *Taxus spp.* cuando son sometidos a condiciones de elicitación.

2.4.2. Estudios racionales

La tarea principal de las aproximaciones de tipo racional a los bioprocesos desarrollados con células vegetales es identificar genes biosintéticos, enzimas y sistemas de regulación de las rutas metabólicas secundarias (Zhang *et al.* 2004), y aplicar esta información, mediante las técnicas de ingeniería metabólica, al desarrollo de nuevos y/o mejorados organismos vegetales. En las últimas décadas, los estudios bioquímicos realizados utilizando metodologías clásicas, se han dirigido al mapeo bioquímico y estudio de las vías de señalización implicadas en la producción de MSV, incluyendo el estudio de la transducción de señales, biosíntesis, transporte y almacenamiento. En la era post-genómica, los nuevos métodos de alto rendimiento libres de hipótesis como los estudios transcriptómicos (microarrays, cDNA-AFLP, bibliotecas de cDNA SSH) y la proteómica están actuando como catalizadores para acelerar el descubrimiento de nuevos genes y proteínas potencialmente implicados en las rutas metabólicas secundarias, y se están utilizando nuevas herramientas de bioinformática y genómica funcional para evaluar la función de las secuencias de los genes candidatos (Fig. 6) (Verpoorte 2007).

El Tx es un claro objetivo para mejorar su producción biotecnológica en sistemas vegetales. Un mejor conocimiento de los mecanismos de inhibición por retroalimentación, rutas alternativas, sistemas de acumulación y/o liberación y el catabolismo podría llevar a una optimización racional de los bioprocesos que llevan a la producción de compuestos de alto valor añadido, y

la aplicación de técnicas de bioingeniería puede incluso permitir el diseño de líneas celulares u organismos más productivos.

Desde el año 2000, se han realizado numerosos estudios de tipo racional para el esclarecimiento de los mecanismos de regulación de genes relacionados con la biosíntesis de Tx en diferentes especies de *Taxus*, utilizando dos modelos diferentes: a) Cultivos de células en suspensión y b) cultivos de plantas. Como ya se ha mencionado, el precursor para Tx es GGPP. Ensayos en cultivos de células en suspensión de diferentes especies de *Taxus*, incluyendo *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2013a), *T. media* (Liao *et al.* 2005; Onrubia *et al.* 2013b), *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006) y *T. chinensis* (Hu *et al.* 2006) han demostrado que la elicitación con MeJA o 2-hidroxi-etil-jasmonato (Qian *et al.* 2004) incrementa la expresión del gen *GGPPS* en comparación con los cultivos de células no tratadas. Este incremento en la expresión génica podría ser responsable en parte, del aumento de la producción de taxanos de los cultivos celulares tratados con MeJA.

Hace menos de 10 años que se vienen estudiando los perfiles de expresión de *TS*, el gen que codifica para la primera enzima específica en la biosíntesis de Tx, en cultivos celulares de *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006) *T. chinensis* (Hu *et al.* 2006), *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2010) y *T. media* (Onrubia *et al.* 2013b). En condiciones control (células no elicitadas), la expresión del gen *TS* fue indetectable (Nims *et al.* 2006) o se encontraba a niveles muy bajos (Hu *et al.* 2006; Onrubia *et al.* 2013b), mientras que bajo la elicitación con diferentes jasmonatos, la expresión de *TS* aumentó de 4 a 10 veces. De acuerdo con Hezari *et al.* (1995), la actividad ciclasa de la enzima se localiza principalmente en la corteza del tallo y cambium, pero la expresión del gen *TS* se ha localizado principalmente en las células de hojas jóvenes y tallos. En plántulas de *T. baccata*, *TS* aumenta su expresión en el primer año de crecimiento, alcanzando niveles similares en la parte aérea y las raíces, aunque la acumulación de taxanos en la parte aérea era de entre 4 y 10 veces mayor que en las raíces (Onrubia *et al.* 2011). En plantas de *T. mairei* (Ho *et al.* 2005), *TS* se expresa en las hojas y tallos jóvenes, pero no es detectable en las raíces y órganos maduros. Después de la elicitación con MeJA se activa la

transcripción de *TS*, resultando en un aumento en la acumulación de mRNA en hojas jóvenes y un nivel detectable en las hojas maduras.

Como los jasmonatos inducen la expresión de *TS* en cultivos celulares de *Taxus* spp. sin que se produzca la acumulación de su producto el taxadieno, (Hezari *et al.* 1997), y además mejora la acumulación total de taxanos, es fácil deducir que el sustrato producido por este primer paso específico de la biosíntesis de Tx es rápidamente metabolizado provocando el significativo aumento de la producción de taxanos observado en los sistemas vegetales estudiados.

El paso siguiente en la biosíntesis de Tx corresponde a la enzima codificada por el gen *T5 α OH*, cuya expresión ha sido poco estudiada. Su mRNA se ha detectado en cultivos de suspensiones celulares sólo en las primeras horas siguientes a la elicitación (Nims *et al.* 2006) siendo 8-9 veces más alta después de 15 h de tratamiento que en las condiciones de control (Patil *et al.* 2012). Posteriormente, el producto taxadieno-5 α -ol es modificado por T13 α OH, y, al igual que otras hidroxilasas estudiadas que participan en la región central de la ruta, es altamente inducible por jasmonatos. En cultivos de células en suspensión de *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2013a), *T. media* (Onrubia *et al.* 2013b) y *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006) T13 α OH se indujo unas pocas horas después de la elicitación y apenas se detectó expresión de este gen en las células control no tratadas. Taxadien-5 α -ol es también el sustrato de la enzima TAT, que, como se mencionó anteriormente, acila el taxadien-5 α -ol en la posición C5 para formar taxadieno-5 α -il-acetato. La expresión del gen *TAT* apenas se vio afectada por la adición de elicitores, ni en los cultivos de *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2013a) ni en *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006).

A partir de esta primera bifurcación en la ruta biosintética de Tx, bajo condiciones de elicitación se expresa mucho más la rama hidroxilasa que la rama transferasa. Los diferentes patrones de expresión de ambos genes apuntan a uno de los primeros pasos limitantes de la biosíntesis de Tx, ya que *TAT* apenas se transcribe incluso bajo el estímulo del MeJA. Después de la modificación por TAT, el taxadien-5 α -il-acetato es hidroxilado en la posición 10 por la enzima T10 β OH. La expresión del gen *T10 β OH* también ha sido poco estudiada, y sólo se dispone de datos publicados con cultivos celulares en

suspensión de *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006). El mRNA de T10 β OH no se ha detectado en condiciones de control y en muy bajo nivel tras la elicitación con MeJA, solo durante las primeras horas de tratamiento. Por lo tanto, aunque el gen que codifica para esta hidroxilasa no está tan fuertemente inducido como el gen *T13 α OH*, puesto que *TAT* actúa previamente limitando el flujo de productos intermediarios, la expresión *T10 β OH* podría ser suficiente para hidroxilar todo el sustrato disponible a taxadien-5 α -il-acetato.

En cuanto a los pasos intermedios de la vía de Tx, se ha estudiado el curso de expresión de los genes correspondientes a las hidroxilasas *T7 β OH* y *T2 α OH* en cultivos celulares de *T. baccata* y *T. media* (Onrubia *et al.* 2013b). Su patrón de expresión es similar a la de *T13 α OH*, siendo muy bajo o indetectable en condiciones de control y fuertemente expresado bajo elicitación con MeJA o el nuevo elicitor coronatina. La enzima TBT, que produce deacetilbaccatina III a partir de un derivado polihidroxilado, no aislado hasta el momento, también se ha estudiado en las suspensiones celulares de *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2013a) y *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006; Patil *et al.* 2012). Se ha demostrado que el gen *TBT* se expresa diferencialmente en líneas celulares de *Taxus* spp. de alta y de baja producción bajo condiciones control, pero su expresión es claramente inducida por MeJA (Fig. 7).

La formación de DAB se logra después de una serie de reacciones enzimáticas que todavía no están bien caracterizadas, y es modificada por el producto del gen *DBAT*, cuya expresión ha sido estudiada en cultivos de células suspensión de *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006; Patil *et al.* 2012), *T. media* (Onrubia *et al.* 2013b) y *T. baccata* (Katkovčínová *et al.* 2008). La expresión del gen *DBAT* es casi indetectable en condiciones control, pero presenta un patrón de inducción claro bajo elicitación, aunque su nivel de expresión es mucho menor a los incrementos de expresión que experimentan las hidroxilasas que participan en los pasos centrales de la ruta metabólica. En plantas *T. mairei* (Ho *et al.* 2005), *DBAT* se expresa en las partes verdes jóvenes, mientras que es escasa en las hojas maduras, donde sí se sobreexpresa después de la elicitación. En plántulas de *T. baccata*, (Bruňáková *et al.* 2010; Onrubia *et al.* 2011) se demostró que el gen *DBAT* no está altamente expresado durante las diferentes etapas de crecimiento en las partes

jóvenes y como los niveles de BIII también son muy bajos en relación con los de DAB, parece que el gen *DBAT* podría controlar un posible paso de flujo-limitante de la formación de Tx en las plantas.

De forma simultánea a la formación del núcleo de taxano, las células de *Taxus* spp. han de sintetizar la cadena lateral. El gen *PAM*, que conduce a la formación de β -fenilalanina, se expresa diferencialmente en líneas celulares de *Taxus* spp. que presentan producciones diferentes de taxanos (Patil *et al.* 2012), y su expresión es altamente inducida por MeJA y CORO (Nims *et al.* 2006; Onrubia *et al.* 2013b; Patil *et al.* 2012).

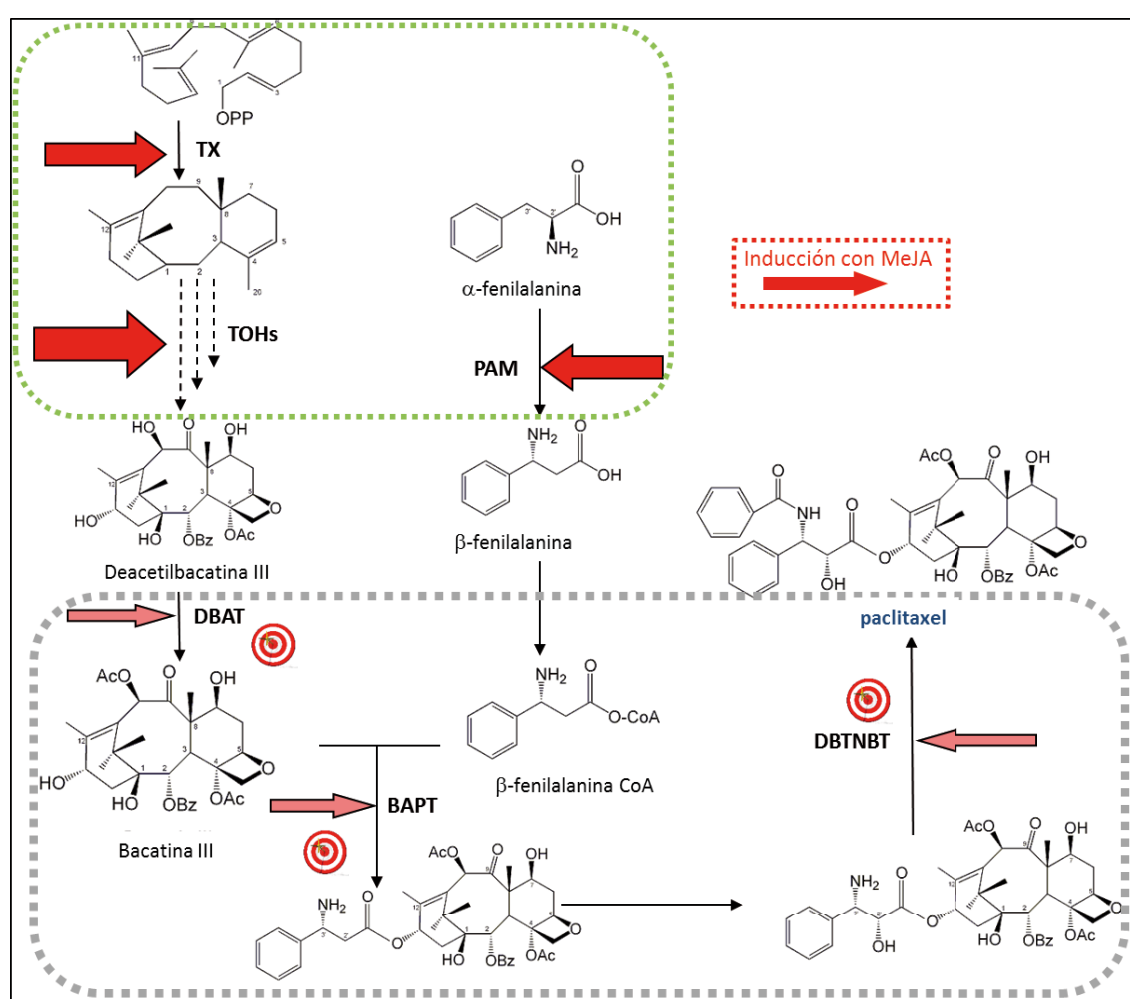


Figura 7. Expresión diferencial inducida por MeJA de los genes implicados en la biosíntesis de taxanos 🎯 : Potenciales dianas para la ingeniería metabólica.

La enzima BAPT cataliza la unión de la cadena lateral β -fenilalanina-CoA a baccatina III. En cultivos de pequeños agregados de *T. cuspidata*, Patil *et al.* (2012) no detectaron la expresión génica de *BAPT* hasta después de la adición de MeJA, cuando aumentó al doble. De igual modo en cultivos celulares elicitados de *T. cuspidata*, el mRNA de *BAPT* fue claramente detectable por PCR (Nims *et al.* 2006). En cultivos celulares de *T. media* el incremento en la expresión del gen BAPT fue superior bajo inducción por CORO que por MeJA, aunque en todos los casos fue menor que la de otros genes implicados en la biosíntesis de Tx (Onrubia *et al.* 2013b; Sabater-Jara *et al.* 2014). Todos estos datos indican que *BAPT* juega un papel clave en la biosíntesis de taxanos y su expresión necesita ser incrementada para mejorar la producción de Tx y por ello sería una diana de elección para estudios de ingeniería metabólica. En plántulas de *T. baccata* (Onrubia *et al.* 2011), los niveles de expresión de *BAPT* aumentaron significativamente durante todo el periodo de tiempo estudiado, tanto en la parte aérea como en las raíces.

Finalmente, la última enzima conocida que actúa en la ruta biosintética de Tx, la DBTNBT, también tiene una regulación diferencial dependiendo del organismo. En condiciones de elicitación con MeJA, en la línea P991 de *T. cuspidata*, la expresión génica de *DBTNBT* era indetectable hasta después de 18 h (Nims *et al.* 2006), mientras que en la línea P93AF su expresión se indujo considerablemente a tiempos menores (Patil *et al.* 2012). La expresión de *DBTNBT* también varía entre las líneas celulares de baja y alta productividad de taxanos en condiciones de control (sin elicitar). En *T. baccata* y *T. media* (Onrubia *et al.* 2013b), la expresión del gen *DBTNBT* se activa tempranamente y se ve incrementada por la elicitación con jasmonatos, siguiendo un patrón similar al de *BAPT*, lo que sugiere algún tipo de vínculo en la regulación de los genes de la parte final de biosíntesis de taxanos, o una regulación por sustrato. En plántulas de *T. baccata*, la expresión de *DBTNBT* es altamente inducida durante los primeros días de desarrollo (Bruňáková *et al.* 2010), y su expresión es superior en la parte aérea que en las raíces. Como los niveles de taxanos son superiores en la parte aérea, esta expresión diferencial podría estar relacionada con la disponibilidad de sustrato.

Aunque se necesitan más estudios sobre la actividad de las enzimas involucradas en los pasos metabólicos estudiados, los resultados obtenidos en los estudios racionales sobre la producción biotecnológica de Tx sugieren que los principales pasos flujo-limitantes se encuentran principalmente en la última etapa de la ruta biosintética (Fig. 7). Los genes implicados en la primera etapa y pasos intermedios están claramente activados por elicitores como MeJA o son activos por naturaleza, mientras que los pasos finales de la biosíntesis de Tx están solo ligeramente activados. Por lo tanto, podría inferirse que estos pasos finales son probablemente responsables de la limitada producción de Tx en los sistemas biológicos ensayados y en consecuencia, constituyen potenciales dianas para los estudios de ingeniería metabólica, en el diseño de nuevas líneas celulares de *Taxus* spp. y plantas transgénicas.

2.4.3. Aplicación de las tecnologías “ómicas” y la Ingeniería Metabólica a la mejora de la producción de taxanos

La elicitación de células vegetales con jasmonatos desencadena una extensa reprogramación génica que en general se correlaciona con cambios observables en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Esto ha sido demostrado en varias ocasiones mediante estudios transcriptómicos diseñados para visualizar el efecto de los jasmonatos en la expresión de genes relacionados con el metabolismo (Pauwels *et al.* 2009). Los estudios realizados hasta el momento, han corroborado que en la mayoría de los casos, (i) los genes que participan en una ruta biosintética, están estrechamente coregulados, lo que ha llevado a adoptar el término de “regulones transcripcionales”, y (ii) que la inducción de genes ocurre en una etapa muy temprana, por lo general al cabo de 1 a 4 h después de la elicitación, lo que indica que la activación del metabolismo secundario es uno de los objetivos de la vía de señalización de jasmonatos (Pauwels *et al.* 2009). Estas características altamente conservadas del metabolismo secundario han potenciado el desarrollo de programas para la identificación de genes que

codifican para pasos enzimáticos de las rutas metabólicas secundarias que todavía no han sido caracterizados.

Un estudio transcriptómico pionero en este ámbito, consistió en la secuenciación aleatoria de una biblioteca de cDNA a partir de cultivos celulares de *T. cuspidata* elicitados con MeJA (Jennewein *et al.* 2004). El estudio permitió identificar todos los genes de la biosíntesis de Tx conocidos hasta ese momento, el descubrimiento de 2 nuevas hidroxilasas dependientes de CytP450 implicadas en la biosíntesis de taxanos, y además, probablemente contenía genes candidatos para la mayor parte de los pasos de la biosíntesis de taxanos para los que el gen correspondiente no había sido identificado (Croteau *et al.* 2006). Estos resultados también permitieron identificar enzimas que desvían el flujo de precursores de la formación de Tx generando ramificaciones de la ruta biosintética (Hampel *et al.* 2009).

En la inducción del metabolismo secundario mediada por jasmonatos, durante la respuesta a estrés, se necesita una rápida inducción para garantizar que el programa de defensa persista o incluso se intensifique durante el tiempo en el que la planta está sometida a un estrés. Por ello, las plantas han desarrollado un sistema de retroalimentación positiva con numerosos sistemas de control. Uno de los puntos de control es que los factores de transcripción inductores de la expresión de genes vinculados al metabolismo secundario están codificados por los propios genes de respuesta a jasmonato, así como por otras proteínas reguladoras (De Geyter *et al.* 2012). Al igual que los genes que codifican para enzimas implicadas en una ruta biosintética, el conocimiento de nuevos genes reguladores es uno de los principales objetivos de los programas que se han desarrollado para el descubrimiento de genes. Estos programas se basan en la detección de los llamados “reguladores maestros”, capaces de activar la expresión de todos los genes que codifican para las enzimas implicadas en una ruta metabólica específica. Este tipo de aproximaciones se ha desarrollado con éxito para el estudio de la biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios y ha permitido la identificación de factores de transcripción que regulan directamente la expresión de los genes implicados en la vía correspondiente (De Geyter *et al.* 2012), así como de ubiquitina ligasas E3 que controlan la actividad de enzimas flujo-limitantes

(Pollier *et al.* 2013) y puntos de entrecruzamiento entre la vía de señalización de jasmonatos con otras vías hormonales (Häkkinen *et al.* 2007; Lackman *et al.* 2011).

Hasta el momento, sólo dos factores de transcripción de *Taxus* se han caracterizado funcionalmente. El primero, TcWRKY1 de *T. chinensis*, interactúa con un elemento W-box en el promotor del gen que codifica para DBAT y se ha demostrado que es un regulador de tipo positivo para este gen (Li *et al.* 2012). El segundo, TcAP2 de *T. cuspidata*, interactúa con un elemento responsable de la respuesta a elicitación con jasmonatos (JERE) caracterizado en los promotores de los genes de *C. roseus* que participan en la formación de alcaloides indol-monoterpénicos (Dai *et al.* 2009). El papel de TcAP2 en la regulación de la biosíntesis de Tx todavía está sin investigar.

Con posterioridad al estudio de Jennewein *et al.* (2004), se han desarrollado análisis transcriptómicos de *Taxus* spp. con el propósito de conseguir las secuencias completas de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de taxanos (Tabla 5). Estos estudios hacen referencia a diferentes especies de *Taxus*, tipos de explantes, así como, distintos tipos de RNA, los RNAm específicos (referidos como unigenes en la Tabla 5) y pequeños RNAs tales como microRNAs (referidos como pequeños RNAs en la Tabla 5). Desafortunadamente, la mayoría de estos estudios no ha llevado al descubrimiento de nuevas enzimas o genes reguladores que pudieran estar implicados en la biosíntesis de Tx. Información complementaria también podría ser generada a partir de los datos de secuenciar el genoma de *Taxus*, pero hasta el momento, sólo se ha conseguido secuenciar parcialmente los genomas de *T. baccata* y *T. mairei* (Hao *et al.* 2011; Nystedt *et al.* 2013)

Tabla 5. Una revisión sobre los análisis transcriptómicos desarrollados con *Taxus* spp.

Especie	Expianto	Método analítico	Número de transcritos	Referencia
<i>T. chinensis</i>	células MeJA-elicitadas	"Illumina deep sequencing"	46,581 unigenes	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>T. chinensis</i>	células MeJA-elicitadas	"Illumina deep sequencing"	1,256,425 RNAs	Qin <i>et al.</i> , 2009
<i>T. cuspidata</i>	células MeJA-elicitadas	"Random Sanger sequencing of cDNA library"	3,563 unigenes	Jennewein <i>et al.</i> , 2004
<i>T. cuspidata</i>	células MeJA-elicitadas	"Sanger sequencing of subtractive hybridization library"	331 unigenes	Lenka <i>et al.</i> , 2012
<i>T. cuspidata</i>	células ce cambium	"454 Deep sequencing"	26,906 unigenes	Lee <i>et al.</i> , 2010
<i>T. cuspidata</i>	acículas	"454 Deep sequencing"	20,557 unigenes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>T. mairei</i>	raíces, hojas, tallos	"Illumina deep sequencing"	36,493 unigenes	Hao <i>et al.</i> , 2011
<i>T. mairei</i>	acículas	"Illumina deep sequencing"	1,190,874 RNAs	Hao <i>et al.</i> , 2012
<i>T. media</i>	células MeJA-elicitadas	"Illumina deep sequencing"	40,348 unigenes	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>T. baccata</i>	células MeJA-elicitadas	"cDNA-AFLP"	667 unigenes	Onrubia, 2012

La utilidad de los estudios transcriptómicos de *Taxus* spp. en cultivos celulares elicitados con MeJA, con el propósito de incrementar el conocimiento sobre la biosíntesis de taxanos y su control ha sido demostrada recientemente por Onrubia *et al.* (2014). En este estudio se identificó el Taximin, un gen que codifica para un pequeño péptido de señalización, rico en cisteína. La expresión del péptido Taximin está modulada de manera coordinada con la de los genes de la biosíntesis de Tx. El tratamiento de cultivos celulares de *T. baccata* con un péptido sintético similar a Taximin activa transitoriamente la biosíntesis de taxanos. Este péptido está ampliamente conservado en el reino vegetal. También se ha demostrado que la sobreexpresión de Taximin puede estimular de forma sinérgica con jasmonatos, la producción de alcaloides en cultivos de raíces transformadas de *Nicotiana tabacum*. En última instancia, Taximin podría aumentar el potencial práctico de la ingeniería metabólica de plantas medicinales y es necesario continuar los estudios sobre las acciones de este péptido en otros organismos vegetales.

Las técnicas de Ingeniería Metabólica Vegetal implican la modificación de las vías del metabolismo secundario con tres objetivos básicos: i) El aumento de la producción de un compuesto deseado, ii) la reducción de la producción de compuestos no deseados, y iii) la producción de nuevos compuestos (Bruňáková *et al.* 2010). Las estrategias para lograr estos objetivos incluyen la ingeniería de pasos individuales de una vía para aumentar o disminuir el flujo metabólico a un compuesto de destino, el bloqueo de vías competitivas o del catabolismo de los compuestos de interés (Fig. 8). Sin embargo, este tipo de enfoques tienen sólo un valor limitado ya que el flujo metabólico puede ser más predeciblemente controlado actuando simultáneamente en múltiples pasos de una misma vía (enfoques holísticos). En este contexto, el uso de genes reguladores que pueden controlar más de un paso de una ruta metabólica sin duda, puede constituir una estrategia eficaz (Fig. 8).

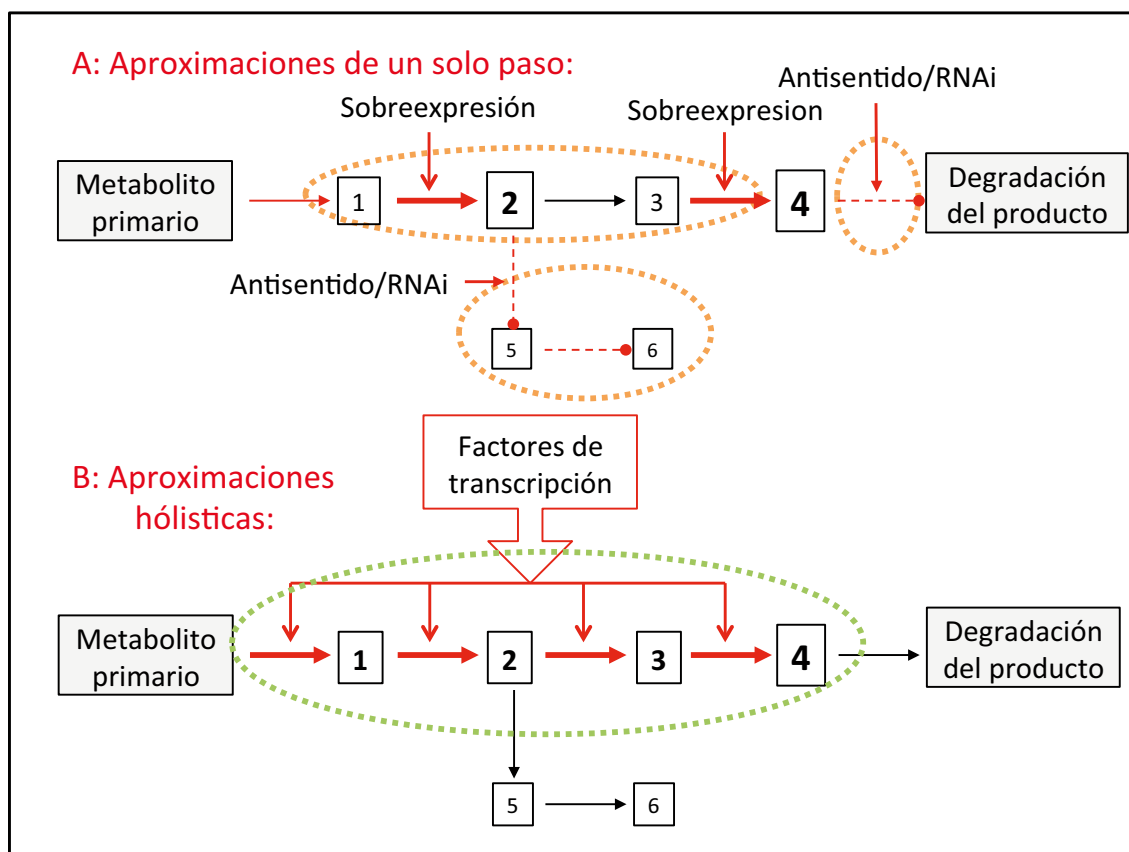


Figura 8. Enfoques para la ingeniería metabólica vegetal. **A:** Estrategias para la ingeniería metabólica de un solo paso. **B:** Estrategias holísticas (Modificado de Onrubia *et al.* 2013a).

El potencial de la ingeniería metabólica para mejorar la producción de MSV mediante la modulación de los pasos individuales de una ruta biosintética se ha demostrado con éxito, y la revisión de numerosos trabajos confirma que la modificación de la expresión de un solo gen puede mejorar la producción del compuesto de interés, aunque esta técnica tiene limitaciones (Bruňáková *et al.* 2010; Capell y Christou 2004; Dudareva y Pichersky 2008).

En relación con la producción de Tx y otros taxanos, existen pocos ejemplos sobre la aplicación de las técnicas de ingeniería metabólica debido probablemente a las dificultades de transformar genéticamente las plantas gimnospermas como es *Taxus* spp. Sin embargo, existen estudios que han demostrado la idoneidad de esta estrategia para aumentar sustancialmente la producción de taxanos. Ho *et al.* (2005) establecieron dos líneas celulares portadoras del transgen *DBAT*, una que producía sólo baccatina III, mientras

que la otra presentaba una elevada producción de diferentes taxanos. En ambos casos, la producción de taxanos de los cultivos transgénicos fue dependiente de la elicitación con MeJA, y en las líneas celulares de baja producción aumentaron significativamente los niveles de BIII y Tx con el tratamiento con este elicitor, mientras que en las líneas de alta producción sólo se incrementaron los niveles Tx. Zhang *et al.* (2011) trabajando con suspensiones celulares de *T. chinensis*, que también sobreexpresaban el gen *DBAT* obtuvieron incrementos de Tx de 1,7 veces en relación con los cultivos de células no transformadas de la misma especie.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación (Exposito *et al.* 2010) demostraron que una línea celular de *T. media* derivada de un cultivo de raíces transformadas, portadoras del transgen *TS*, al ser elicitada con MeJA, incrementó la producción total de taxanos en 2,6 veces, en comparación con el control sin transformar (Fig. 9). Estos resultados indican que, aunque el gen *TS* no controla un paso flujo-limitante de la biosíntesis Tx, su sobreexpresión puede aumentar los niveles de los intermediarios biosintéticos, dando lugar a una mayor producción de este compuesto.

Recientemente, Li *et al.* (2011) establecieron una línea celular de *T. media* portadora en su genoma del cDNA antisentido de *T14OH*. La enzima codificada por el gen *T14OH* no está involucrada en la ruta de biosíntesis de Tx pero cataliza la formación temprana de los C-14 taxanos hidroxilados, una ramificación de la biosíntesis de Tx. La sobreexpresión de este gen en antisentido se tradujo en un descenso considerable en el RNAm de *T14OH* y en una reducción significativa de tres taxanos oxigenados en C14 (yunnanxano, taxuyunnanina C y sinenxano C), lo que sugiere que la estrategia de la utilización de RNA antisentido para bloquear rutas alternativas a la biosíntesis de Tx podría aumentar la producción de este potente anticancerígeno.

En otros estudios, la manipulación de la ruta biosintética del ácido abscísico (ABA) por sobreexpresión del gen 9-cis-epoxicaroteno dioxigenasa se tradujo en un aumento de los niveles de ácido abscísico ABA y Tx (Li *et al.* 2012), lo que sugiere que la ingeniería metabólica aplicada al metabolismo

ABA es una estrategia útil para mejorar la biosíntesis de Tx y/o su acumulación en cultivos celulares de *T. chinensis*.

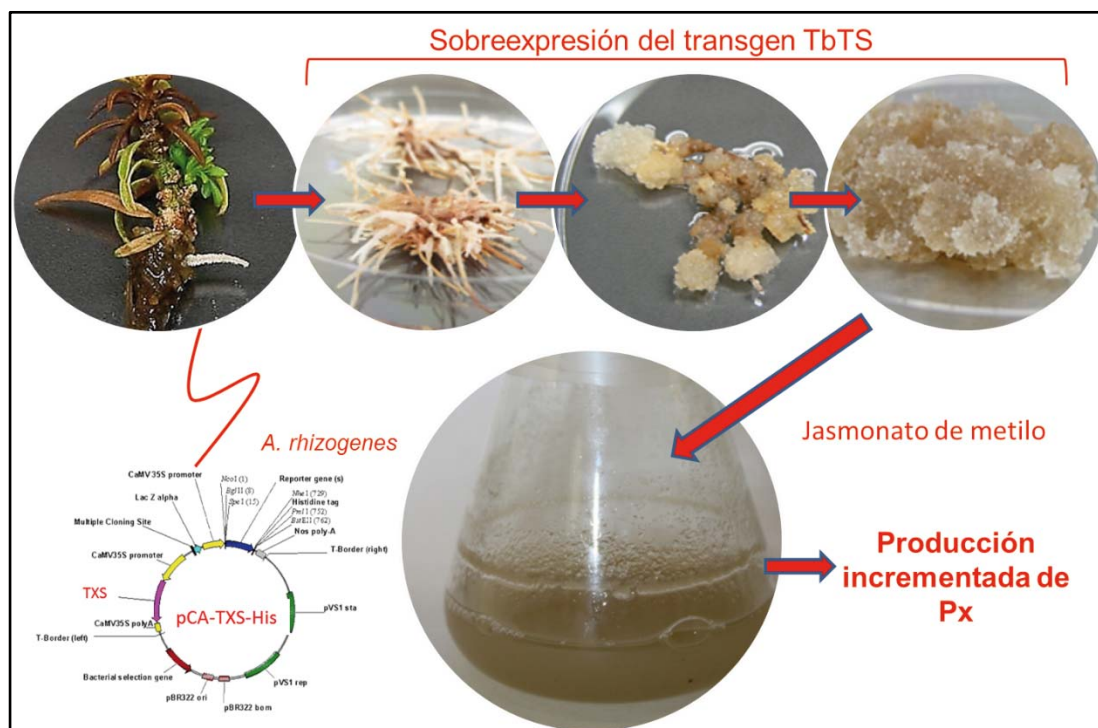


Figura 9. Obtención de líneas celulares transgénicas de *T. media* a partir de un cultivo de raíces transformadas.

En los últimos años, se han hecho avances significativos en ingeniería metabólica mediante la aplicación de las tecnologías "ómicas" para dilucidar y caracterizar las vías metabólicas de manera integral y para detectar los pasos flujo-limitantes. En este contexto, y con el objetivo de establecer relaciones directas entre genes y metabolitos, y determinar los genes que de manera global están relacionados con la biosíntesis de taxanos, incluyendo potenciales factores de transcripción, Lenka *et al.* (2012) estudiaron el perfil de transcripción de cultivos celulares de *T. cuspidata* usando una técnica de hibridación sustractiva por supresión basada en PCR (SSH). Se compararon las bibliotecas de cDNA de muestras tomadas a diferentes tiempos después del tratamiento con MeJA y en condiciones de control. De los genes secuenciados 155 respondían positivamente a MeJA y 176 unigenes respondieron negativamente; de todos ellos, se identificaron 3 nuevas

hidroxilasas de taxanos, 2 nuevas acetiltransferasas, 2 isoformas de TS, y 2 nuevos CytP450, aunque su función todavía requiere confirmación experimental. Basándose en publicaciones anteriores, estos autores concluyeron que los jasmonatos inhiben la expresión de algunos genes en cultivos celulares de *Taxus* spp. Este enfoque ha permitido la identificación de otros genes potencialmente relacionados con respuestas a MeJA, como la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACCs), que actúa en los últimos pasos de la biosíntesis de etileno. Como el etileno inhibe la señalización de MeJA, la inhibición del gen ACCs podría ayudar a amplificar la señal de MeJA. Por otro lado, a partir de los fragmentos génicos identificados en este experimento se dedujo que un 47% de ellos corresponden a nuevos genes, probablemente específicos de tejo y relacionados directa o indirectamente con el metabolismo de los taxanos y su control, y un 12% correspondían a genes desconocidos pero cuyas secuencias ya habían sido descritas previamente. También se observó que la activación génica se producía especialmente, unas pocas horas después del tratamiento con MeJA, lo que podría indicar que la detección de la presencia de MeJA por las células está asociada con la inducción de genes. Por ello, se ha propuesto una relación entre los genes expresados tempranamente y el metabolismo de taxanos, y los genes expresados tardíamente y el transporte de taxanos y su degradación.

Todavía queda mucho trabajo por hacer antes de que el transcriptoma de *Taxus* spp. se secuencie completamente, pero como las nuevas investigaciones que se están desarrollando actualmente aumentan considerablemente nuestro conocimiento sobre el metabolismo de los taxanos, cada vez es posible prever con mayor certeza, futuros avances en la producción biotecnológica de estos valiosos metabolitos secundarios basados en la modificación del genoma de las líneas celulares productoras de taxanos. Existen motivos para el optimismo, y con la ayuda de las técnicas de bioingeniería y el diseño de nuevas líneas celulares, la producción biotecnológica de Tx y sus derivados será capaz de satisfacer la creciente demanda mundial de estos compuestos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Para el desarrollo de los cultivos de callo de *T. globosa* se utilizaron explantes recolectados de árboles adultos silvestres situados en el predio Anacahuite, del parque Nacional El Chico (Fig. 10), localizado en la parte occidental de la sierra de Pachuca, en el estado de Hidalgo, México.



Figura 10. *T. globosa* silvestre, parque natural "El Chico", Hidalgo, México.

Los estudios con *T. x media* se desarrollaron con una línea de callo transgénica portadora del gen *TS* bajo el control del promotor CaMV 35S. Esta línea fue obtenida previamente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (Fig. 9), tal como se describe con detalle en Exposito *et al.*(2010). Los callos fueron subcultivados periódicamente en medio sólido de Gamborg (B5) (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con 5 g/L de sacarosa, 5 g/L de fructosa, 100 mg/L de mioinositol y las siguientes hormonas: picloram (Pic) 2 mg/L, quinetina (Kin) 0,1 mg/L y ácido giberélico (GA3) 0,5 mg/L, como se ha descrito previamente (Exposito *et al.* 2010), hasta obtener suficiente biomasa para los estudios.

3.2. Medios de cultivo utilizados

En este estudio, se utilizaron dos medios de cultivo basales con sus correspondientes vitaminas, el medio B5 (Gamborg *et al.* 1968) y WPM (Woody Plant Medium) (McCown y Lloyd 1981) con suplementos hormonales y fuente de carbono específicos para cada objetivo y cada especie. El medio B5 inducción (B5 Ind) fue utilizado para inducir la desdiferenciación celular en los explantes de *T. globosa*, el medio B5_{C1} fue el primero en probarse para el crecimiento de callos de *T. globosa*. Las composiciones de cada medio utilizado para la inducción y crecimiento de callos de *T. globosa* se describen en la Tabla 6. Además del medio de cultivo antes mencionado, para el crecimiento del callo de *T. globosa* se probaron los medios WPM_{C1} y WPM_{C2} con el objetivo de mejorar el crecimiento, ambos con la misma composición basal (WPM) pero distintos reguladores de crecimiento y fuente de carbono (Tabla 6). También se utilizaron los medios B5_{C2} y B5_{C3} los cuales tienen la misma composición basal (B5) y fuente de carbono, pero con diferente suplemento hormonal (Tabla 6). Un último medio ensayado fue el SH (Schenk y Hildebrandt 1972) (Tabla 6) suplementado con 1 mg/L de ácido naftalenacético (NAA), 0,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) y 0,025 mg /L de bencilaminopurina (BAP), como fuente de carbono se utilizó 30 g/L de sacarosa, y el pH se ajustó a 7,0 (Barrios *et al.* 2009).

Todos los medios después de autoclavarlos fueron adicionados de una solución de antioxidantes (L-glutamina 2 mM; ácido ascórbico 0,285 mM y ácido cítrico 0,26 mM), ya que en general los cultivos celulares de *Taxus* spp. producen una cantidad elevada de compuestos fenólicos, metabolitos secundarios que alguno de los cuales actúan como inhibidores del crecimiento (Kim *et al.* 2005; Piñol *et al.* 2008).

Para el estudio de la producción de taxanos en las suspensiones celulares de ambas especies, usando el sistema de dos fases, se utilizó el medio de producción previamente descrito para *T. media* (Cusidó *et al.* 2002), el cual consiste en sales basales B5 suplementadas con 30 g/L de sacarosa,

mionositol 100 mg/L, 2,4-D (4 mg/mL), BAP (0,1 mg/mL), y GA3 (0,5 mg/mL). La cantidad de vitaminas B5 para *T. globosa* fue el doble (Tapia *et al.* 2013).

Tabla 6. Medios de cultivo utilizados para la inducción y cultivo de callos y células en suspensión de *T. globosa*. Todos llevan además mioinositol 100 mg/L y las vitaminas correspondientes.

Medio	Sales basales	Fuente de carbono	Concentración de hormonas
B5 Ind pH5,8	B5	Sacarosa 30 g/L	2,4-D 4 mg/L Kin 1 mg/L GA3 0,5 mg/L
B5_{C1} pH5,8	B5	Sacarosa 30 g/L	Pic 2 mg/L Kin 0,1 mg/L GA3 0,5 mg/L
WPM_{C1} pH5,8	WPM	Sacarosa 15 g/L Fructosa 15 g/L	Pic 2 mg/L Kin 0,1 mg/L GA3 0,5 mg/L
WPM_{C2} pH5,8	WPM	Sacarosa 20 g/L	NAA, 2 mg/L GA3, 0,5 mg/L BAP, 0,1 mg/L
B5_{C2} pH5,8	B5	Fructosa 5 g/L Sacarosa 5 g/L	NAA 2 mg/L GA3 0,5 mg/L BAP 0,1 mg/L
B5_{C3} pH5,8	B5	Fructosa 5 g/L Sacarosa 5 g/L	2-4D 4 mg/L BAP 0,1 mg/L GA3 0,5 mg/L
SH pH7	SH	Sacarosa 30 g /L	NAA, 1mg/L 2,4D 0,5 mg/L BAP 0,025 mg/L

3.3. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de *T. globosa*

Para provocar la desdiferenciación de los explantes de hoja y obtener el callo, es necesario someterlos a un protocolo efectivo de esterilización. En este estudio se utilizó el método de esterilización previamente descrito por Tapia *et al.* 2013. Una vez esterilizados los explantes, se colocaron directamente en placas Petri que contenían medio adecuado para inducir la desdiferenciación

del tejido vegetal (B5 Ind, Tabla 6) (Fig. 11A y B). Los explantes se mantuvieron en oscuridad a una temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, subcultivándolos periódicamente cada 15 días.

Después de algunas semanas, cuando se había desarrollado suficiente cantidad de callo, éste se separó del resto del explante y se transfirió primeramente al medio B5_{C1} (Fig. 11C). Posteriormente se probaron los medios descritos en el apartado 3.2. con el fin de optimizar el crecimiento de los callos (Tabla 6).

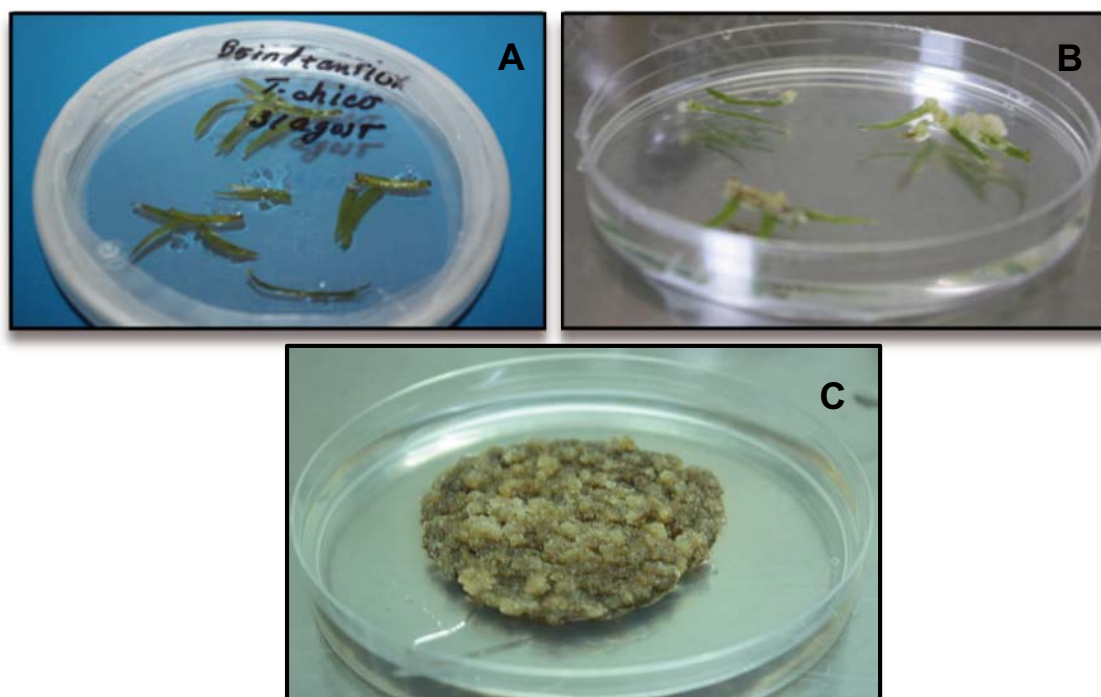


Figura 11. Explantes y cultivo de callos de *T. globosa*. **A:** Explantes de hojas en medio de inducción de callos; **B:** Explantes de hojas con brote de callo; **C:** Aspecto de los callos de *T. globosa*.

Los cultivos de callos se mantuvieron en el medio de crecimiento óptimo a 25°C en oscuridad y se subcultivaron cada dos semanas para obtener suficiente biomasa de callo friable para establecer las suspensiones celulares.

Las líneas celulares de *T. globosa* se obtuvieron a partir de piezas de callo friable procedentes de los respectivos cultivos de callo en placa. Se inocularon 3 g de callo por 20 mL de medio (150 g/L) WPM_{C1}. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y

en oscuridad. Transcurridos 12 días, se separaron de la suspensión los fragmentos de callo no disgregados mediante la filtración de la suspensión celular con filtros de nylon de 0,76 mm de diámetro de poro. Las suspensiones finas obtenidas se subcultivaron periódicamente (cada 12-15 días) en medio fresco, manteniendo la proporción peso inóculo/volumen de medio de cultivo hasta conseguir la cantidad de biomasa para llevar a cabo los experimentos posteriores.

3.4 Estudio del curso de crecimiento de las líneas celulares de *T. globosa*

Para determinar la capacidad de producción de biomasa del sistema, se determinó el crecimiento y la viabilidad de una línea celular inoculando 2 g de peso fresco (PF) en 10 mL (200 g/L) de medio de crecimiento (WPM_{C1}). Se tomaron muestras cada 4 días por triplicado durante un periodo de cultivo de 28 días y la viabilidad del cultivo celular se determinó a las 0 h, y a los 8, 16, 24 y 28 días.

La capacidad de crecimiento de los cultivos de células en suspensión se determinó mediante la cuantificación del correspondiente PS a los diferentes tiempos del cultivo. Para ello, las suspensiones celulares se filtraron a través de un filtro de nylon de 50 μ m de diámetro de poro con el fin de separar las células del medio de cultivo. La biomasa celular se liofilizó y se determinó el correspondiente peso seco (PS). Este material se utilizó posteriormente en la extracción de taxanos.

Para estimar la viabilidad celular de los cultivos, se empleó el método propuesto por Duncan y Widholm (1990) con algunas modificaciones. Para ello, una pequeña alícuota de la suspensión celular se mezcló con una solución marcadora de diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (IP) ambos a la concentración de 0,01 % (p/v). El DAF es hidrolizado por esterazas que poseen las células vivas produciendo de este modo la fluoresceína. Al

excitarse a una longitud de onda (λ) de 490 nm (luz azul) emite a λ 520 nm, observándose una fluorescencia verde (Fig. 12A). La exposición simultánea al IP, que se intercala entre las bases del DNA, permite visualizar los núcleos de las células muertas de color rojo ya que al excitarse con una λ 530 nm (luz verde) emite a 620 nm, observándose así fluorescencia roja (Fig. 12B). La preparación se observó en un microscopio de fluorescencia (Leica, Suiza), equipado con una lámpara de mercurio (Nikon, Japón). La viabilidad fue expresada en porcentaje de células con fluorescencia verde en relación con el total de las células observadas (Fig. 12C).

3.5 Elicitación de las suspensiones celulares de *T. globosa* y *T. media*

Las suspensiones celulares de *T. globosa* se establecieron inoculando callo friable en el medio de crecimiento líquido correspondiente, tal como se describe en la sección 3.3 y se subcultivaron cada 14 días para obtener suficiente biomasa para los experimentos de elicitación. La línea celular de *T. media* fue desarrollada tal como se describe en Expósito *et al.* (2010) y se ha mantenido durante varios años mediante subcultivos sucesivos cada 2 semanas, en medio B5 adicionado de Pic (2 mg/L), Kin (0,1 mg/L) y GA3 (0,5 mg/L). Ambas líneas celulares han sido mantenidas en la oscuridad, a 25°C de temperatura y agitación de 100 rpm.

Para la realización de los experimentos de elicitación, se ha utilizado un sistema de cultivo en 2 etapas optimizado para cada una de las especies vegetales en estudio (Cusidó *et al.* 2002; Tapia *et al.* 2013). Para ello, ambas líneas celulares se cultivaron primero en el medio óptimo de crecimiento (MC) (ver Sección 3.1 y 3.3) y luego se transfirieron a los respectivos medios de producción (MP), que consistían en medio B5 suplementado con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 2,4-D (2 mg/L), BAP (0,1 mg/L), y GA3 (0,5 mg/L). La cantidad de vitaminas B5 se duplicó para los cultivos con *T. globosa*.

Después de 15 días en MC, las células se transfirieron, 2 g para *T. x media* y 1 g para *T. globosa*, a matraces de 200 mL que contenían respectivamente 10 o 20 mL del correspondiente MP. Las suspensiones celulares se trataron con 1 μ M de coronatina (CORO), 50 mM de β -ciclodextrina metilada al azar (CD) o con la combinación CD+CORO. Ambos elicitores se añadieron al comienzo de la segunda fase del cultivo. Las muestras para la determinación de taxanos se tomaron cada 4 días durante los 20 días que duró el experimento en MP; para el análisis de la expresión génica temprana se tomaron muestras a tiempo 0h (MC), 4h, 24h, 12h y 48h en MP.

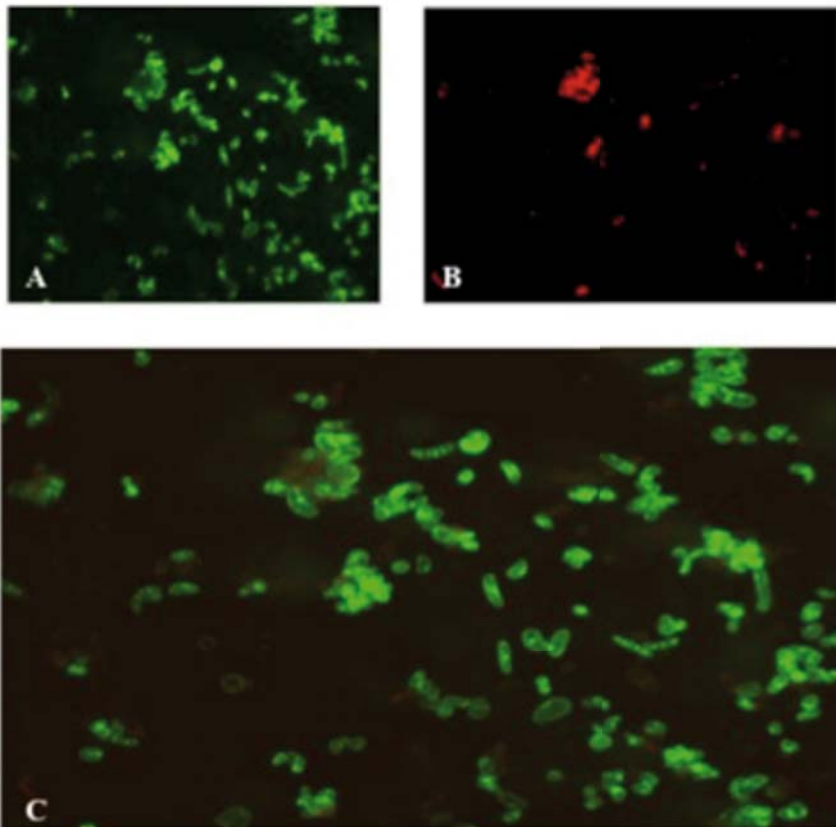


Figura 12. Estudio de la viabilidad de las células en cultivo líquido de *T. globosa* a los 8 días de cultivo. **A:** Células vivas; **B:** Células muertas; **C:** Células vivas en verde y muertas en rojo.

3.6 Extracción y cuantificación de taxanos por HPLC

La extracción de taxanos a partir del medio líquido y de las células liofilizadas, se realizó según el método previamente descrito por Cusidó *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Para la extracción de taxanos a partir del medio líquido, se añadió al medio un 25% de su volumen de diclorometano y se agitó durante 2 min en vórtex. A continuación se sonicó en un baño de ultrasonido durante 1 h. La fase orgánica se desecó a temperatura ambiente. A la biomasa celular liofilizada y finamente pulverizada se agregó una solución metanol:agua (9:1) por cada 50 mg de polvo de células; la suspensión se calentó durante 8 minutos en microondas a mínima potencia (80 Watts). Posteriormente se filtró la mezcla reservando el extracto metanólico y con el residuo se repitieron los pasos anteriores, obteniendo así 4 mL de extracto metanólico por muestra. A dicho extracto se agregó 4 mL de hexano, la mezcla se centrifugó a 2500 g durante 20 min a 25° C. A la fase acuosa recuperada se añadieron 2 mL de diclorometano y 1 mL de agua destilada y se mezcló, la fase orgánica se recuperó y reservó y a la fase acuosa restante se le añadieron 2 mL más de diclorometano, se mezcló y de nuevo la fase orgánica se recuperó añadiéndola a la anteriormente obtenida, secándose posteriormente a temperatura ambiente. Las muestras con CD se resuspendieron en 1 mL de metanol y el resto en 500 μ L. Antes del análisis, las muestras se filtraron a través de filtros PVDF de 0,22 μ m (Millipore, Billerica, MA, EEUU).

Los taxanos se cuantificaron por cromatografía líquida-UPLC basándose en el método de HPLC descrito por Richheimer *et al.* (1992). Los análisis UPLC se realizaron con un sistema Waters Acquity Ultra Performance LC system (Waters, Milford, MA, EEUU.). Los taxanos se separaron en una columna Supelcosil LC-F 25 cm x 4,6 mm (SUPELCO, Bellefonte, PA, EEUU.) utilizando una mezcla de agua (A) y acetonitrilo (B) como fase móvil, con el siguiente programa de gradiente: tiempo (min)/% B, 0/25, 38/60, 40/100, 43/100, 45 / 25, y 55/25 con un flujo de 1 mL/min. Los criterios utilizados para la identificación de los picos fueron el tiempo de retención, los espectros UV y co-cromatografía con estándares, comprobando la homogeneidad de los picos en un detector

“photodiode array” (DAD). Los taxanos se cuantificaron mediante la integración de los picos correspondientes a cada taxano calculado a partir de las muestras y la comparación de ellos con una curva de calibración estándar externa. Los estándares de Tx y los otros taxanos relacionados fueron proporcionados por ChromaDex (Irvine, CA, EEUU). Se determinaron las concentraciones de 5 taxanos: DAB con un tiempo de retención de 6,753 min; BIII: 10,716 min; DT: 18,433 min; CF: 21,036 min y Tx: 22,914 min (Anexo Fig. 1).

3.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para el análisis de la expresión génica, el RNA total fue aislado a partir de 100 mg de células congeladas utilizando el Kit SPIN REAL RNazol (REAL, Valencia, España), según las instrucciones del fabricante. La concentración de cada muestra se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Tecnologías de Wilmington, DE, EEUU). Sólo las muestras con un ratio 260/280 entre 1,9 a 2,0 se utilizaron para el análisis. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. 1 µg de RNA total de cada muestra se utilizó en la síntesis de cDNA usando la MMLV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

El análisis de qRT-PCR se llevó a cabo utilizando el iTaq™ universal SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EEUU) en un sistema de placa de 384 pocillos (ABI Prism 7900HT Sistema de Detección de Secuencia, Applied Biosystems, Foster, CA, EEUU) y se usaron primers específicos para los genes a evaluar, los cuales fueron diseñados con el software Primer3 versión 0.4.0 (Tabla 7). Las condiciones de reacción y la eficiencia de amplificación de los primers fueron realizadas según previamente se ha descrito, el gen de referencia utilizado fue el TBC41 (Sabater-Jara *et al.* 2014). Para cada gen, los niveles de expresión relativa fueron comparados con respecto a la misma línea celular transgénica cultivada durante 14 días en MC y sin elicitores (valor de referencia = 1).

Tabla 7. Primers utilizados en el estudio de expresión de los genes involucrados en la síntesis de Tx. TS, taxadieno sintasa; T7 β OH, taxadieno7- β -hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasa; CoA ligasa, β -fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa.

Gen	Secuencia del primer	Tamaño del amplicón
TBC41	Forward: 5'-CAA GAA GAA AGA GTC AGC AAA TGG-3' Reverse: 5'-GGA ACG ACA TGA CAT TAT GAA TAG C-3'	91 bp
TS	Forward: 5'-TTCG CAC GCA CGG ATA CG-3' Reverse: 5'-TTC ACC ACG CTT CTC AAT TCG-3'	115 bp
T7βOH	Forward: 5'-GGT CCG CCC AAA TTG CCA GAA-3' Reverse:5'-CCC TGC AGA GCC CAA AAA ACC T-3'	110 bp
DBAT	Forward: 5'-AGT TGG ATT TGG TGA TCG AA-3' Reverse: 5'-ATC CAT GTT GCA CGA GAC TT-3'	92 bp
CoA ligasa	Forward: 5'-AGC AGA CAC TAT GGA ACA-3' Reverse: 5'-GCC ACA ACT CTC CTC TAT-3'	109 bp
BAPT	Forward: 5'-TAA GCA CTC TAC AAC AAC AAT GG-3' Reverse: 5'-GCA TGA ACA TTA GTA TCT TGA TTC C-3'	111 bp
DBTNBT	Forward: 5'-CGG GGG GTT TGT TGT GGG ATT A-3' Reverse: 5'-TTA GCC TCT CCC CTC GCC ATC T-3'	105 bp

3.8. Análisis *in silico* del gen candidato *TB768*

La secuencia de aminoácidos codificada por el gen *TB768* fue analizada utilizando el programa Phyre2 (Kelley y Sternberg 2009) para obtener la posible estructura terciaria de dicha proteína. La predicción resultante con una certidumbre de casi el 100% fue visualizada utilizando el programa PyMOL

(PyMOL Molecular Graphics System, versión 1.5.0.4 Schrödinger, LLC), el cual también se utilizó para localizar e indicar los residuos que se encuentran en contacto con los sustratos. Los dominios catalíticos fueron identificados utilizando la base de datos de dominios conservados (CDD) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Marchler-Bauer *et al.* 2011; Marchler-Bauer *et al.* 2009).

Para hacer el alineamiento de secuencias proteicas se utilizó el programa t-coffee (Notredame *et al.* 2000) y Jalview (Waterhouse *et al.* 2009) usando las secuencias de aminoácidos del gen *TB768*, la de 4-cumarato CoA ligasa (4CL) de *Populus tomentosa* (Hu *et al.* 2010), la proteína caracterizada más cercana experimentalmente a *TB768*, así como otras 4CL de plantas con alto porcentaje de homología; *Arabidopsis thaliana* 4CL (55%), *P. tomentosa* 4CL4 (43%), *Humulus lupulus* CCL5 (64%), *Teobroma cacao* OPC8 (63%), y *Morus notabilis* 4CL5 (65%) (Onrubia 2012).

3.9. Clonación del gen *TB768*

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Onrubia 2012), se obtuvo la secuencia completa del gen candidato para la CoA-ligasa (Anexo Fig. 2) y fue clonada en un vector compatible con la tecnología Gateway® (Invitrogen™), el plásmido pDEST14® (Fig. 13A). Dicho vector, está diseñado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* usando el sistema de inducción por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Posteriormente el gen *TB768* fue sometido a diferentes reacciones de recombinación con la tecnología Gateway hasta finalmente introducirlo en el vector pEarlyGate203 (Earley *et al.* 2006). El vector de expresión resultante pEarlyGate203-TB768 (Fig. 13B) contiene el gen *TB768* controlado por el promotor 35S y fusionado en el N-terminal a Myc-tag, que es una etiqueta que nos permitirá detectar y purificar la proteína para los estudios posteriores de funcionalidad enzimática.

Para los estudios de localización subcelular fue necesario amplificar de nuevo por PCR, a partir del plásmido pDEST14-TB768, la secuencia del gen *TB768*, suprimiendo el codón de finalización. El amplicón obtenido fue introducido en el vector pENTR/D-TOPO utilizando el kit TOPO-cloning (Invitrogen™), la secuencia fue verificada por secuenciación y posteriormente transferida por recombinación Gateway al vector pEarlyGate102 (Earley *et al.* 2006). La construcción resultante, pEarlyGate102-TB768 (Fig. 13C), posee el gen *TB768* fusionado en el C-terminal a la proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein, YFP).

3.10. Expresión del gen *TB768* en *E. coli*

Las cepas de *E. coli* BL21 DE3 y BL21 DE3 pLyss (Invitrogen™) fueron transfectadas con el vector pDEST14-TB768 (Fig. 13A). A los clones positivos se probó la capacidad de expresar la proteína *TB768* utilizando distintas concentraciones del inductor IPTG, en un rango de 0,1 mM a 1 mM y 3 temperaturas diferentes: 37°C, 28°C y 16°C, todo ello con el propósito de determinar las mejores condiciones de inducción y seleccionar la mejor cepa. Los sedimentos bacterianos se cosecharon a las 4 h de la inducción y se resuspendieron en tampón de carga desnaturizante para visualizar las proteínas presentes en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Posteriormente para determinar la solubilidad de la proteína *TB768*, los cultivos bacterianos se indujeron con 0,1 mM de IPTG y se cosecharon 4 h después. Los cultivos se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C hasta formar un sedimento, los cuales fueron resuspendidos en tampón PBS para posteriormente ser lisados por sonicación, haciendo 3 pulsos de 20 s (amplitud 12) con 10 s de descanso entre cada uno. Los lisados resultantes, se centrifugaron nuevamente a 14000 rpm durante 30 min a 4°C; el residuo y el sobrenadante obtenidos fueron resuspendidos en tampón de carga desnaturizante para posteriormente ser analizados por SDS-PAGE.

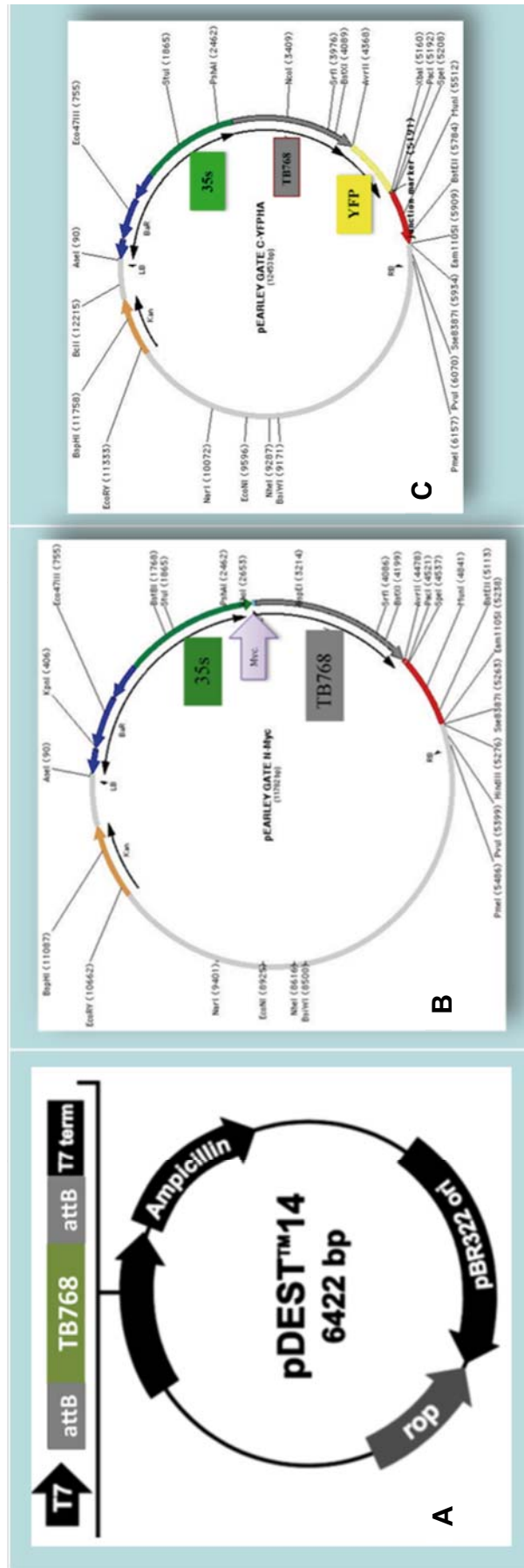


Figura 13. A: pDEST14-TB768, indicando el promotor y terminador T7, y el gen TB768 entre las secuencias de recombinación (attB). B: pEarlyGate203-TB768, indicando el promotor 35S, el Myc-tag y el gen TB768. C: pEarlyGate102-TB768, indicando las posiciones del promotor 35S, el gen TB768 y la YFP.

3.11. Expresión del gen *TB768* en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Para llevar a cabo la expresión transitoria del gen *TB768* en plantas de *Nicotiana benthamiana*, y la posterior extracción y purificación de la proteína correspondiente; el vector de expresión pEarlyGate203-TB768 fue electroporado en la cepa *Agrobacterium tumefaciens* C58C1-pGv2260 (Deblaere *et al.* 1985). Dicha cepa fue co-infiltrada en hojas de plantas de 3-5 semanas de *N. benthamiana* en una proporción 1:1 con la cepa de *Agrobacterium HCPPro* (Goytia *et al.*, 2006), la cual contiene un gen que codifica para una proteína supresora del silenciamiento, siguiendo el protocolo descrito previamente por Voinnet *et al.* (2003). Las plantas fueron mantenidas en el invernadero en condiciones de día largo a 25°C.

Seis días después del proceso de agroinfiltración, las hojas tratadas fueron colectadas y pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente se realizó la extracción de proteína total utilizando el tampón previamente descrito por Dickerson *et al.* (1984) con algunas modificaciones. A 300 mg de tejido pulverizado le fue agregado 300 µL del siguiente tampón: 0,1M Tris-HCl pH 7,8; 0,5% Triton X-100; 15mM de β-mercaptoetanol y 15 % de glicerol. La homogenización del tejido se realizó con el equipo de Qiagen Tissuelyser II a máxima velocidad por un minuto; el homogenizado fue centrifugado a 4°C durante 45 min a 14000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo donde se diluyó con tampón Tris 0,1 mM (pH 7,5) para posteriormente realizar la purificación de la proteína soluble TB768. La purificación de la proteína fue llevada a cabo siguiendo el protocolo del kit c-Myc-tagged protein mild purification (MBL, Woburn MA, USA), el cual permite mantener las condiciones nativas de la enzima para los posteriores análisis.

La proteína purificada fue concentrada por centrifugación en tubos Amicon-ultra de 15 mL, 50 kDa (Millipore, Madrid España) y la concentración final fue determinada por método Bradford (Ernst y Zor 2010). Para determinar la integridad de la proteína, 1 µL de la proteína TB768 purificada fue analizada por western-blot, usando el anticuerpo anti-Myc pAb (Genescript, USA).

3.12. Ensayo *in vitro* de la actividad CoA ligasa

La reacción *in vitro* de la CoA ligasa fue llevada a cabo siguiendo el protocolo de Koetsier *et al.* (2009). Todos los reactivos fueron disueltos en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 para la reacción con β -fenilalanina y pH 8,5 para el ácido 4-cumárico. La mezcla de reacción contenía 1,5 mM de Coenzima A; 3 mM de ATP; 200 mM de NaCl; 5 mM de $MgCl_2$; 20 $\mu g/mL$ de la enzima purificada y 10 mM β -fenilalanina o 1 mM de ácido 4-cumarico respectivamente, en un volumen final de 400 μL . También se desarrolló en paralelo un control sin enzima para cada sustrato. Los tubos de reacción fueron incubados a 30°C durante 45 min; para detener la reacción fueron llevados a ebullición en un baño de agua a 100°C durante 10 min y posteriormente liofilizados. Las muestras resultantes fueron resuspendidas en 50 μL de HCl 0,01 M (Muchiri y Walker 2012).

Los productos de reacción β -phenilalanoil-CoA y 4-coumaroil-CoA, se detectaron por HPLC-MS/MS. Las muestras obtenidas fueron separadas y analizadas en un espectrómetro de Masas de Triple Cuadrupolo API 300 (Perkin-Elmer Sciex instruments) acoplado a un sistema HPLC Agilent 1100, utilizando una columna Luna ® C18 de 5 μm tamaño de partícula (50 mm x 2 mm, tamaño de poro 100 Å) (Phenomenex) a 45°C. El volumen de inyección fue de 10 μL y los compuestos se eluyeron por medio de un gradiente previamente descrito por Mera *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Como fase móvil se utilizaron: 10 mM de acetato de amonio pH 5,3 (A); acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (B) y 100% de acetona (C); el gradiente utilizado fue el siguiente: 100% de solvente A durante 2 min, posteriormente se redujo a 0% aumentando el solvente B a 10% y el C a 90% en 3 min, manteniendo estas condiciones durante 1 min, para finalmente regresar a las condiciones iniciales en 10 s y manteniéndolas durante 4 min. El flujo utilizado fue de 1,1 mL/min. Los compuestos separados se analizaron en el espectrómetro de masas, donde el primer cuadrupolo (en modo negativo) fue ajustado para seleccionar el ion molecular de cada compuesto (β -fenialanoil-CoA; 916,2 y 4-coumaroil-CoA; 914,3). Cada ion seleccionado fue dirigido a la cámara de colisión donde

la energía de colisión fue ajustada para obtener los dos fragmentos específicos para cada molécula: 409,1 y 307,1 para β -fenilalanoil-CoA; 407,3 y 428,2 para 4-coumaroil-CoA. Estos fragmentos fueron detectados y analizados en el tercer cuadropolo por MRM (Molecular Reaction Monitoring). Los tiempos de retención (Anexo Fig. 3) y las transiciones específicas 916,2/409,1; 916,2/307,1 y 914,3/407,3; 914,3/428,2 fueron previamente establecidas utilizando los estándares de β -fenilalanoil-CoA y 4-coumaroil-CoA respectivamente (Anexo Fig. 4). La selección de los fragmentos se realizó en base a su intensidad, considerando los dos más intensos para cada molécula, con los cuales por medio de MRM confirmarían la identidad de los compuestos.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron por espectrofotometría con las condiciones previamente descritas por Ehltng *et al.* (1999). Para llevar a cabo este método es necesario conocer los coeficientes de extinción molar (ϵ) para cada uno de los compuestos a analizar, por lo que se calculó dicho parámetro con cada uno de los estándares disueltos en el respectivo tampón de reacción. Para ello se determinó la longitud de onda de mayor absorción (λ_{max}) de las soluciones stock de β -fenilalanina y ácido 4-cumarico utilizando el espectrofotómetro UV-VIS modelo UV2310 (Dinko). A la λ_{max} de cada compuesto, se midió la absorbancia de diferentes diluciones del stock de estándares (de 25 $\mu\text{g/mL}$ -100 $\mu\text{g/mL}$). Con estos datos se calculó ϵ para cada compuesto partiendo de la ley de Lambert-Beer $A_{\lambda_{max}} = \epsilon \cdot c \cdot L$.

Para calcular la actividad específica se visualizó la formación de β -fenilalanoil-CoA y 4-coumaroil-CoA a 315 y 336 nm respectivamente durante 60 min usando un espectrofotómetro UV/Vis SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate (Molecular Devices). La concentración del producto formado fue calculada en relación al coeficiente de extinción de cada compuesto; β -fenilalanoil-CoA ϵ 315nm 3421 mM/cm, y 4-coumaroil-CoA ϵ 336nm 3585 mM/cm.

3.13. Aproximación bioinformática de la localización subcelular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de taxanos

Para el análisis *in silico*, se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas on line: ChloroP V1.1 (Emanuelsson *et al.* 1999), programa que analiza la secuencia proteica prediciendo la presencia de péptidos de tránsito que dirigen la proteína a cloroplastos (cTP) y localizan los sitios potenciales de corte de los mismos; SignalP V4.1 (Petersen *et al.* 2011), que predice la presencia y la localización de sitios de corte de péptidos señal en la secuencia proteica estudiada; TargetP V1.1 (Emanuelsson *et al.* 2000), programa capaz de predecir la posible localización subcelular de la proteína analizada y TMHMM V2.0 (Sonnhammer *et al.* 1998), programa que busca dominios transmembrana e indica las partes de la proteína que se encontrarían dentro y fuera de la membrana.

3.14. Localización subcelular de la proteína codificada por el gen *TB768*

La construcción pEarlyGate101-TB768 fue introducida por electroporación en la cepa de *A. tumefaciens* C58C1-pGv2260 (Deblaere *et al.* 1985). La cepa resultante fue agroinfiltrada en plantas de *N. benthamiana* como se describe en la sección 3.10. Después de 3 días en condiciones normales de crecimiento, las hojas agroinfiltradas fueron recolectadas para ser analizadas en el microscopio confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Se cortaron segmentos de las hojas transformadas y el envés de las mismas fue observado al microscopio. Las paredes celulares fueron teñidas con una solución saturada (5 mg/mL) de yoduro de propido (IP), previo al análisis de microscopía. Las imágenes fueron capturadas por un microscopio confocal

Olympus FV 1000 (Tokio, Japón) NA: 1,20 en objetivo de inmersión en agua de 60X. Un láser de argón de 514 nm fue utilizado para excitar la YFP y el IP. Para la visualización, la ventana de emisión se estableció entre 500-545 nm y 590-670 nm, respectivamente.

Para el estudio de “recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueado” (FRAP), se definió una región de interés (ROI) de 10-12 μm y se aplicó durante 6 seg el láser al 100% de potencia. La recuperación de la fluorescencia fue visualizada escaneando el área enfocada con una potencia baja del láser (20%). La fotografía previa al fotoblanqueado fue tomada con la misma potencia de láser.

3.15. Análisis estadístico

Todos los datos son la media de tres réplicas \pm DE. Para las comparaciones estadísticas se utilizó; el análisis multifactorial ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como diferencia significativa.

4. Resultados y su Discusión

4.1. “Biofactorías Vegetales” para la producción de taxanos. Una aproximación racional al estudio de nuevas fuentes

La producción biotecnológica de Tx y taxanos relacionados en cultivos celulares de *Taxus* spp. ha sido optimizada mediante estudios de tipo empírico, desde pequeña escala hasta nivel de biorreactor (Bentebibel *et al.* 2005; Cusidó *et al.* 2002). También se han utilizado técnicas de ingeniería metabólica para obtener cultivos de células que sobreexpresan genes de la ruta biosintética de Tx (Exposito *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011). Además hasta el momento se han desarrollado varios estudios de tipo racional, con el objetivo de investigar cómo los factores que activan la producción de taxanos también afectan los perfiles de expresión génica y metabólicos en los cultivos celulares de *Taxus* spp. (CCT) (Croteau *et al.* 2006; Nims *et al.* 2006; Onrubia *et al.* 2011; Onrubia *et al.* 2010; Sabater-Jara *et al.* 2014).

En su conjunto, estos estudios han demostrado que la adición de elicitors es crucial para conseguir una alta acumulación de taxanos en los CCTs. Recientemente, se ha demostrado que coronatina (CORO), una toxina producida por *Pseudomonas syringae* (Bender *et al.*, 1999), la cual es análogo estructural de la forma activa del jasmonato de metilo (JA-Ile), es un nuevo y potente elicitor para la producción de taxanos en CCTs (Haider *et al.* 2000; Katsir *et al.* 2008; Onrubia *et al.* 2013b; Tamogami y Kodama 2000). También es de interés para los sistemas de producción de MSV el tratamiento con ciclodextrinas (CD), que debido a su estructura química, pueden formar complejos de inclusión con compuestos apolares poco hidrosolubles, facilitando así su excreción de las células y su aislamiento posterior del medio de cultivo (Cai *et al.* 2012). Las CD también han despertado una gran atención por su capacidad de inducir respuestas de defensa en los cultivos de células vegetales, actuando como verdaderos elicitors (Bru *et al.* 2006; Lijavetzky *et al.* 2008). La acción de CD, solas o junto con MeJA, ya ha sido estudiada en cultivos de células *T. media* (Sabater-Jara *et al.* 2014), así como los efectos de

CORO (Onrubia *et al.* 2013b), pero no el efecto de un tratamiento elicitor combinando CD y CORO. Tampoco ha sido estudiado el efecto de estos elicitores en cultivos celulares de *T. globosa*.

Varias especies del género *Taxus* se han utilizado para la producción biotecnológica de taxanos, incluyendo *T. baccata* (Bentebibel *et al.* 2005), *T. media* (Cusidó *et al.* 2002; Liao *et al.* 2005), *T. cuspidata* (Nims *et al.* 2006) y *T. chinensis* (Hu *et al.* 2006). Recientemente, también se han propuesto como una nueva fuente de Tx, los cultivos celulares de *T. globosa* (tejo mexicano). Para ello, se han desarrollado cultivos de callos y suspensiones celulares de *T. globosa* a partir de acículas y tallos jóvenes de tejos (Barradas-Dermitz *et al.* 2010; Barrales *et al.* 2011; Barrios *et al.* 2009), aunque la producción de Tx y sus precursores fueron muy bajas.

En estudios posteriores, se establecieron líneas de callo y suspensiones celulares de *T. globosa*, que fueron cultivadas en dos medios diferentes aumentando los rendimientos de taxanos y su liberación al medio de cultivo (Tapia *et al.* 2013). Recientemente, los mismos autores (Osuna *et al.* 2015), en cultivos en dos fases de *T. globosa*, evaluaron el efecto de la inmovilización celular y la elicitación con MeJA, en dos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Los niveles de productividad de los taxanos y su excreción al medio de cultivo se vieron incrementados en los cultivos de células libres, mientras que, la inmovilización celular en perlas de alginato no mejoró de manera significativa la producción biotecnológica de los taxanos estudiados. La mayor productividad de Tx se obtuvo en las células libres en los cultivos crecidos en el medio que contenía 2,4-D (2 mg/L), BAP (0,1 mg/L), GA3 (0,5 mg/L) y elicitados con MeJA. Tomados en su conjunto, estos resultados son esperanzadores y abren una nueva vía para la producción biotecnológica de taxanos, los cultivos celulares de *T. globosa* en dos fases.

A raíz de los estudios anteriormente mencionados, se han desarrollado cultivos celulares de *T. globosa* para estudiar y optimizar la producción de taxanos combinando, por primera vez, el nuevo inductor CORO con el agente permeabilizante CD, en un estudio comparativo con *T. media* una especie mejor caracterizada a nivel molecular. Igualmente se pretende estudiar cómo éstos tratamientos afectan a la expresión de genes clave en la biosíntesis de

taxanos, con el propósito de conocer mejor los mecanismos de regulación de su biosíntesis.

4.1.1. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de *T. globosa*

Los explantes esterilizados de *T. globosa* fueron sembrados y cultivados en el medio y condiciones adecuadas para la formación de callo, según se describe en la sección 2.3. Después de 3-4 semanas se comenzó a observar la dediferenciación del tejido vegetal y la formación de masas de callo. Posterior a la obtención de suficiente biomasa, el callo se separó del explante y se transfirió a medio de crecimiento (B5_{C1}, Tabla 6). Las masas de callo inicialmente presentaban un color claro durante los primeros días, pero al paso del tiempo, las piezas de callo se fueron oscureciendo progresivamente (debido al acúmulo de fenoles) a pesar de que el medio contenía una solución antioxidante (Fig. 14). Parte de los callos se tornaron totalmente oscuros y algunos acabaron muriendo, por lo que se decidió ensayar el cultivo en otros medios descritos previamente en la bibliografía para tratar de mejorar su crecimiento.

En el medio B5_{C1}, los callos llegaron después del 4º subcultivo a un porcentaje de supervivencia del 66%, es decir, se observó que desde el inicio del estudio, la supervivencia de los callos incrementaba con los sucesivos subcultivos; del mismo modo sucedió en el medio de cultivo WPM_{C1}, que aunque los callos en el primer subcultivo mostraron una supervivencia muy baja (20%), a lo largo de los siguientes subcultivos fueron recuperándose hasta llegar al 85%. Estos estudios preliminares, nos permitieron llegar a la conclusión de que para hacer posteriores estudios y/o para guardar una cierta cantidad de callos de las líneas celulares establecidas, el medio de cultivo WPM_{C1} era el más idóneo (Tabla 8).

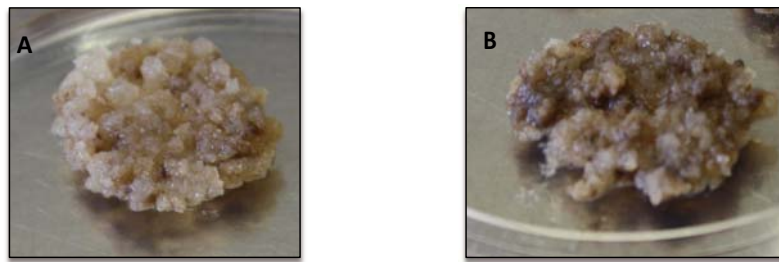


Figura 14. Apariencia de los callos de *T. globosa*, **A:** Coloración clara durante los primeros días del subcultivo, **B:** Oscurecimiento de la masa de callo después de varios subcultivos.

Las dificultades para la obtención y el crecimiento del callo, así como la producción de fenoles en este material ya había sido indicada previamente por otros autores, trabajando con diferentes especies de *Taxus* (Kim *et al.* 2005; Piñol *et al.* 2008), por lo que nuestros resultados confirman que este género es extraordinariamente difícil de manipular *in vitro*, y que para su cultivo se requiere la adición de agentes antioxidantes, así como extremar los cuidados durante su manipulación y realizar subcultivos muy frecuentes. Además como es sabido, el curso de crecimiento de los cultivos celulares, está influenciado por las condiciones físicas-químicas del cultivo y es claramente dependiente de la especie vegetal en estudio (Navia-Osorio *et al.* 2002a,b).

Una vez obtenida la cantidad de biomasa suficiente, se escogieron las líneas de callo más claras y friables con el objetivo de establecer las suspensiones celulares. Los cultivos se iniciaron con un inóculo del 150 g/L utilizando el medio de cultivo de crecimiento previamente seleccionado (WPM_{C1}). A los 12 días de cultivo se observó de manera clara el crecimiento celular, así como la presencia de agregados, por ello las suspensiones fueron filtradas y los agregados celulares desechados. Las suspensiones celulares finas establecidas fueron subcultivadas cada 12 días, manteniendo en cada subcultivo la misma proporción de inóculo P/V, para obtener mayor cantidad de biomasa. Los cultivos celulares siempre presentaron una coloración marrón claro. Una vez obtenida la biomasa suficiente, se prosiguió con los experimentos subsecuentes.

Tabla 8. Crecimiento de callos de *T. globosa* en distintos medios en cultivo sólido. S: Supervivencia. M: Muerte: material oscuro con síntomas de necrosis. Resultados en % de supervivencia. La composición de los medios de cultivo se describe en el apartado 2.2.

Medios	1er Subcultivo		2º Subcultivo		3er Subcultivo		4º Subcultivo	
	S	M	S	M	S	M	S	M
B5 _{C1}	51,75	48,25	59	41	58,55	41,45	65,8	34,2
WPM _{C1}	20	80	58,8	41,6	75	25	84,7	15,3
SH	68	32	0	100				
B5 _{C2}	33,3	66,6	0	100				
WPM _{C2}	48	52	2	98				
B5 _{C3}	54,3	45,7	39	61				

4.1.2. Producción de biomasa de las líneas celulares de *T. globosa*

La capacidad de producción de biomasa del sistema, se determinó por medida de su crecimiento (PS). Para ello, se inocularon 2 g de peso fresco en 10 mL de medio de crecimiento (WPM_{C1}). Se tomaron muestras cada 4 días por triplicado durante un periodo de cultivo de 28 días y la viabilidad del cultivo celular se determinó en los tiempos: 0 h, 8 días, 16 días, 24 y 28 días.

Como se puede observar en la figura 15, el crecimiento expresado como aumento de peso seco fue incrementando hasta los 16 días en que la proporción de crecimiento llegó a su máximo (fase exponencial), para disminuir paulatinamente hasta el final del estudio. El índice de crecimiento a los 16 días fue de 2,5 con un tiempo de duplicación de 9 días. Estos resultados demuestran una alta capacidad para formar biomasa de los cultivos de *T. globosa* estudiados en este trabajo. Este es un dato destacado (considerando que se trata de una planta gimnosperma) ya que en *T. cuspidata* el tiempo medio de duplicación del inóculo fue de 17 días (Fett-Neto *et al.* 1994) y en *T. media* de 14 días (Wickremesinhe y Arteea 1993).

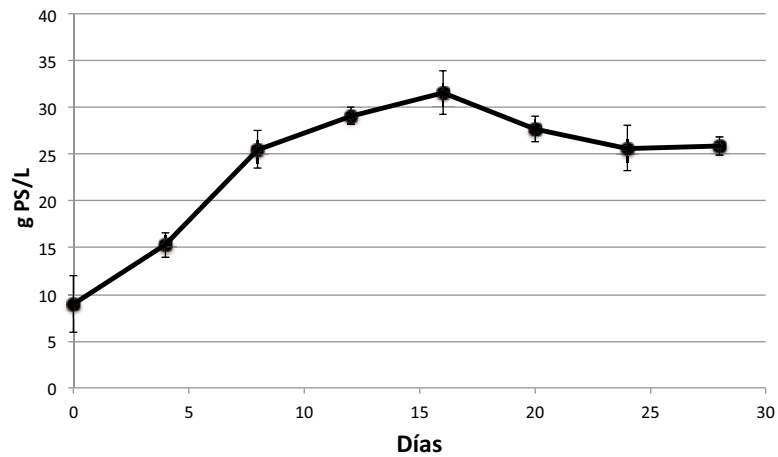


Figura 15. Curso del crecimiento expresado en peso seco (g/L) de los cultivos celulares de *T. globosa* en medio de crecimiento durante 28 días. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm DE.

Las células en suspensión de *T. globosa* mantuvieron su crecimiento con un porcentaje de viabilidad elevado de entre el 83-94% (Fig. 16), hasta los 16 días de cultivo; después la biomasa del sistema medida como PS, disminuyó gradualmente, del mismo modo que también se produjo un descenso significativo de la viabilidad celular.

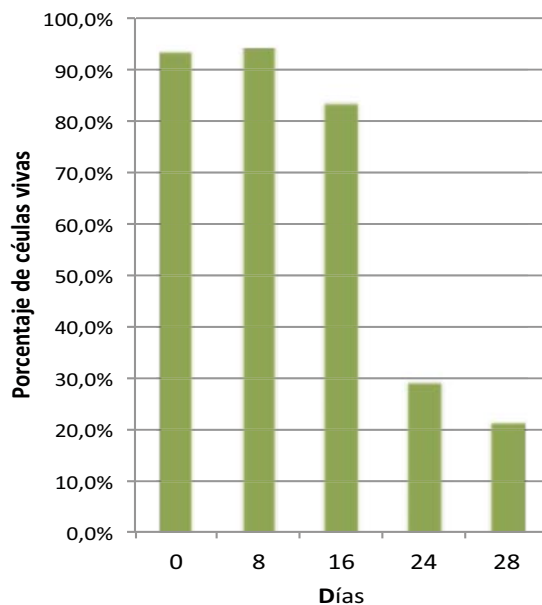


Figura 16. Curso de la viabilidad de los cultivos celulares de *T. globosa* en medio de crecimiento durante 28 días.

4.1.3 Contenido de taxanos en las suspensiones celulares de *Taxus globosa* no elicidadas

Para determinar la capacidad de producción de taxanos en las células de *T. globosa*, se tomaron muestras cada 4 días por triplicado durante un periodo de cultivo de 28 días; los taxanos extraídos de dichas muestras fueron analizados por UPLC-DAD. Los taxanos cuantificados en este estudio fueron: 10-deacetilbaccatina III (DAB), baccatina III (BIII), 10-deacetiltaxol (DT), cefalomanina (CF) y taxol (Tx),

En cuanto al contenido total de taxanos (suma de los taxanos estudiados, intra y extracelulares), encontramos que a los 20 días de crecimiento, se produjo el máximo de producción (3,6 mg/L) (Fig. 17). También se observó otro máximo, aunque menor a los 8 días de cultivo. Este comportamiento ya había sido descrito por otros investigadores (Ketchum *et al.* 1999). Los contenidos de taxanos, como la mayoría de compuestos secundarios, no están controlados tan sólo a nivel de biosíntesis sino que presentan un metabolismo activo que les lleva a la degradación o transformación en otros compuestos de estructura similar. A partir de los 20 días de cultivo se observó un descenso marcado de la producción de los taxanos estudiados.

El hecho de que el máximo de producción de taxanos tenga lugar en la fase del cultivo en que el crecimiento es estacionario o disminuye es habitual en muchos cultivos celulares y, concretamente en los de *Taxus* spp., en los que se ha observado repetidamente que la biosíntesis de estos compuestos incrementa claramente cuando el crecimiento celular disminuye (Cusidó *et al.* 1999; Fett-Neto *et al.* 1994a,b; Ketchum *et al.* 1999). De acuerdo con Fett-Neto y DiCosmo (1997), este hecho podría ser debido a la desviación de sustratos requeridos para el metabolismo secundario hacia procesos de crecimiento, a un catabolismo alterado y/o a la falta de sistemas de transporte y acumulación del producto final.

En las suspensiones celulares de *T. globosa*, la mayoría de los taxanos se encontraron asociados a las células, siendo muy poca la proporción liberada al medio de cultivo (Fig. 17). Este comportamiento ha sido observado anteriormente en cultivos celulares de *T. media* en los cuales, los taxanos extraídos del medio de cultivo optimizado para la formación de biomasa fue <30% del total de taxanos producidos por las células (Expósito *et al.* 2010)

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Palazón *et al.* 2003) han demostrado la efectividad del cultivo en dos fases, en el que las células de *Taxus* spp. en primer lugar, crecen en un medio seleccionado como óptimo para la formación de biomasa, para ser transferidas a continuación a un medio de cultivo óptimo para la producción, donde se activa el metabolismo secundario y en consecuencia la producción de taxanos. A la vez, el sistema en dos fases permite la adición de elicitores al medio de cultivo en el momento de máxima producción, es decir en la segunda fase del cultivo. Se ha demostrado repetidamente que la adición de elicitores y especialmente MeJA al medio de cultivo incrementa la producción de Tx y taxanos relacionados en cultivos celulares de diferentes especies de *Taxus* (Beum *et al.* 2004; Bonfill *et al.* 2006; Cusidó *et al.* 2002; Ketchum *et al.* 1999; Yukimune *et al.* 1996).

En cuanto al perfil de taxanos encontrados en las muestras, se observó que en las condiciones de cultivo utilizadas y en la mayoría de los tiempos considerados, el taxano que se acumulaba en mayores concentraciones era la CF, seguida de la DAB y el DT (Fig. 18). Por el contrario, la BIII y el Tx se acumularon en menores proporciones a lo largo del cultivo. En el momento de máxima producción (20 días de cultivo), la proporción en que se acumularon los taxanos estudiados fue: CF: 30%; DAB: 27%; DT: 24% y BIII 19%. Tanto la CF como el DT son taxanos que presentan la cadena lateral de feniloserina, pero que en el primer caso el benzoilo de la cadena lateral está sustituido por un grupo tigloilo y en el segundo el grupo acetilo del C10 del Tx está ausente. Realmente poco se conoce de la biosíntesis de estos dos compuestos y no se ha podido demostrar si son precursores, productos de degradación o se forman por caminos metabólicos independientes del Tx (Onrubia *et al.* 2011). Un hecho que se observa repetidamente en los cultivos celulares de diferentes

especies de *Taxus* es que la CF es uno de los taxanos predominantes, cuando el Tx se acumula en muy baja proporción (Bonfill *et al.* 2003).

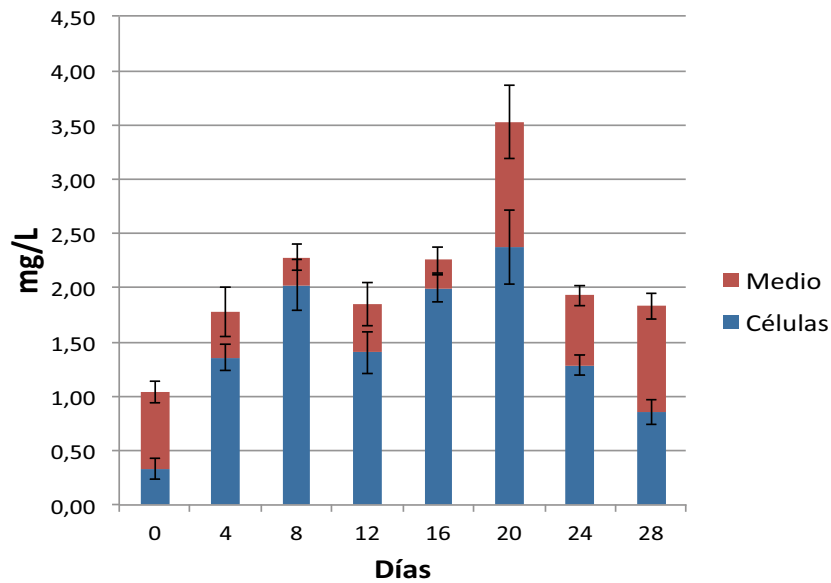


Figura 17. Contenido de taxanos totales (intracelulares y extracelulares) en suspensiones celulares de *T. globosa* cultivadas durante 28 días en medio de crecimiento. Resultados expresados como mg/L de cultivo celular. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE.

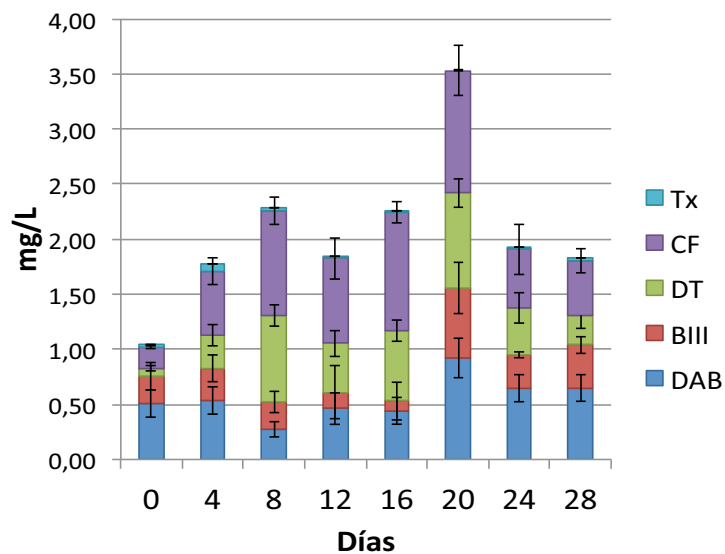


Figura 18. Variaciones en los contenidos de los diferentes taxanos expresados en mg/L de cultivo celular de *T. globosa* en medio de crecimiento. DAB: 10-deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: 10-deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE.

La alta proporción de DAB y las bajas de BIII y Tx encontradas en nuestros cultivos no resultan tampoco sorprendentes. Es un hecho conocido que en cultivos con baja producción, es decir en cultivos que no han sido elicitados, ni cultivados en un medio óptimo para la producción, tan solo producen en gran cantidad DAB y en algunos casos BIII (Nims *et al.* 2006).

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que los cultivos celulares de *T. globosa* pueden producir los taxanos considerados en este estudio, pero que el sistema requiere ser optimizado para llegar a alcanzar contenidos mas elevados de Tx. Como se ha comentado anteriormente, numerosos investigadores han demostrado que la elicitación es una herramienta indispensable para alcanzar producciones elevadas de Tx en los cultivos celulares de *Taxus* spp. (Kim *et al.* 2004; Bonfill *et al.* 2006; Ketchum *et al.* 1999; Yukimune *et al.* 1996), por ello cabría esperar que el tratamiento con elicitors también incrementará los niveles de taxanos en el tejo mexicano.

4.1.4. Efecto de la elicitación con CORO y CD en los cultivos celulares de *T. media* y *T. globosa*

Para los ensayos de elicitación de las líneas celulares de *T. media* y de *T. globosa* se estableció un sistema de dos fases (Cusidó *et al.* 2002; Tapia *et al.* 2013). Las suspensiones celulares de ambas especies se cultivaron durante 12 días en los medios de crecimiento (MC) óptimos para cada una de ellas, hasta el final de la fase de crecimiento exponencial, y a continuación se transfirieron a un medio de producción optimizado (MP) durante 20 días. Los elicitors CORO (1 μ M), CD (50 mM), o ambos (1 μ M CORO + 50 mM CD) se añadieron al medio de cultivo al comienzo de esta segunda etapa. Los cultivos celulares de *T. media* y *T. globosa* se establecieron utilizando un inóculo optimizado de 200 g/L y 50 g/L de PF, respectivamente, basados en resultados anteriores (Sabater-Jara *et al.* 2014; Tapia *et al.* 2013). Los resultados obtenidos se

compararon con cultivos sin elicitar de las dos líneas celulares.

La biomasa de los cultivos celulares de *T. globosa* en MP en condiciones de control, medida como PS, se duplicó hasta el día 16, para disminuir ligeramente a partir de entonces hasta el final del cultivo en el día 20 (Fig. 19A). Un patrón de crecimiento similar se observó en *T. media*, pero con un menor incremento en la biomasa (1,4 veces el día 16; Figura 19B).

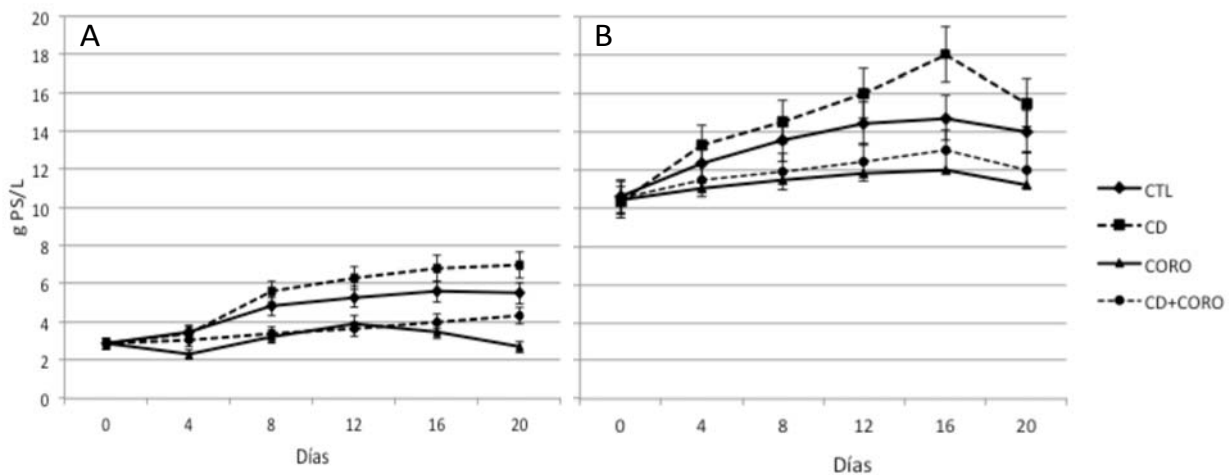


Figura 19. Comportamiento del crecimiento expresado en peso seco por litro de cultivo celular (g/L) de **A:** *T. globosa* y **B:** *T. media*, durante el ensayo de elicitación durante 20 días, en medio de producción. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm DE. CTL (sin elicitar), CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), CD+CORO (elicitación combinada).

La adición de CORO ($1\mu\text{M}$) disminuyó la capacidad de crecimiento celular, especialmente al final del periodo de cultivo ($p < 0,05$). Este efecto se observó particularmente en las células de *T. globosa*, cuyo crecimiento se redujo en un 53% comparado con 20%, en las células de *T. media*. Anteriormente ya se había observado que los elicitors CORO y MeJA disminuyen la capacidad de crecimiento de los cultivos celulares de *Taxus* spp. (Onrubia *et al.* 2013b; Sabater-Jara *et al.* 2014). Por el contrario, la CD (50 mM) incrementó la biomasa medida como PS 1,2 veces en relación al control, en los cultivos celulares de ambas especies en comparación con el control. Trabajos anteriores ya habían demostrado que el tratamiento con CD no repercute

negativamente en la capacidad de crecimiento de cultivos celulares, tales como la *Vitis vinifera* y *T. media* (Belchí-Navarro *et al.* 2012; Sabater-Jara *et al.* 2014). Finalmente, en el tratamiento combinado, la adición de CD aparentemente contrarrestó los efectos negativos de CORO sobre el crecimiento celular en ambas líneas celulares (Fig. 19), ya que el crecimiento de *T. globosa* y *T. media* se redujo tan solo en un 22% y 14%, respectivamente, después de 20 días, en relación con el control.

4.1.5 Producción de taxanos en los cultivos de *T. media* y *T. globosa* elicitados con CORO y CD

Como se muestra en la figura 20, la producción máxima de taxanos totales en los cultivos celulares de *T. globosa* se observó al final del experimento, entre los días 16 y 20 de la elicitación. La mayoría de los taxanos fueron excretados al medio de cultivo, por lo que los taxanos asociados a las células no representaron más del 10% del total de la producción, en todas las condiciones ensayadas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en experimentos anteriores desarrollados con esta línea vegetal cultivada en MC (ver sección 4.1.3) y podría estar atribuida a las diferentes condiciones de cultivo de ambos experimentos.

En estudios llevados a cabo con diferentes líneas celulares de diversas especies de *Taxus*, se ha observado una considerable variación en la capacidad de las células productoras para excretar los taxanos al medio, la cual va de un 10% al 90% dependiendo de la línea celular y las condiciones de cultivo ensayadas (Naill *et al.* 2012). En cuanto al mecanismo de excreción del Tx se sabe que requiere de energía metabólica para poderse llevar a cabo, sin embargo hasta la fecha no se conoce exactamente como se produce (Fornalè *et al.* 2002).

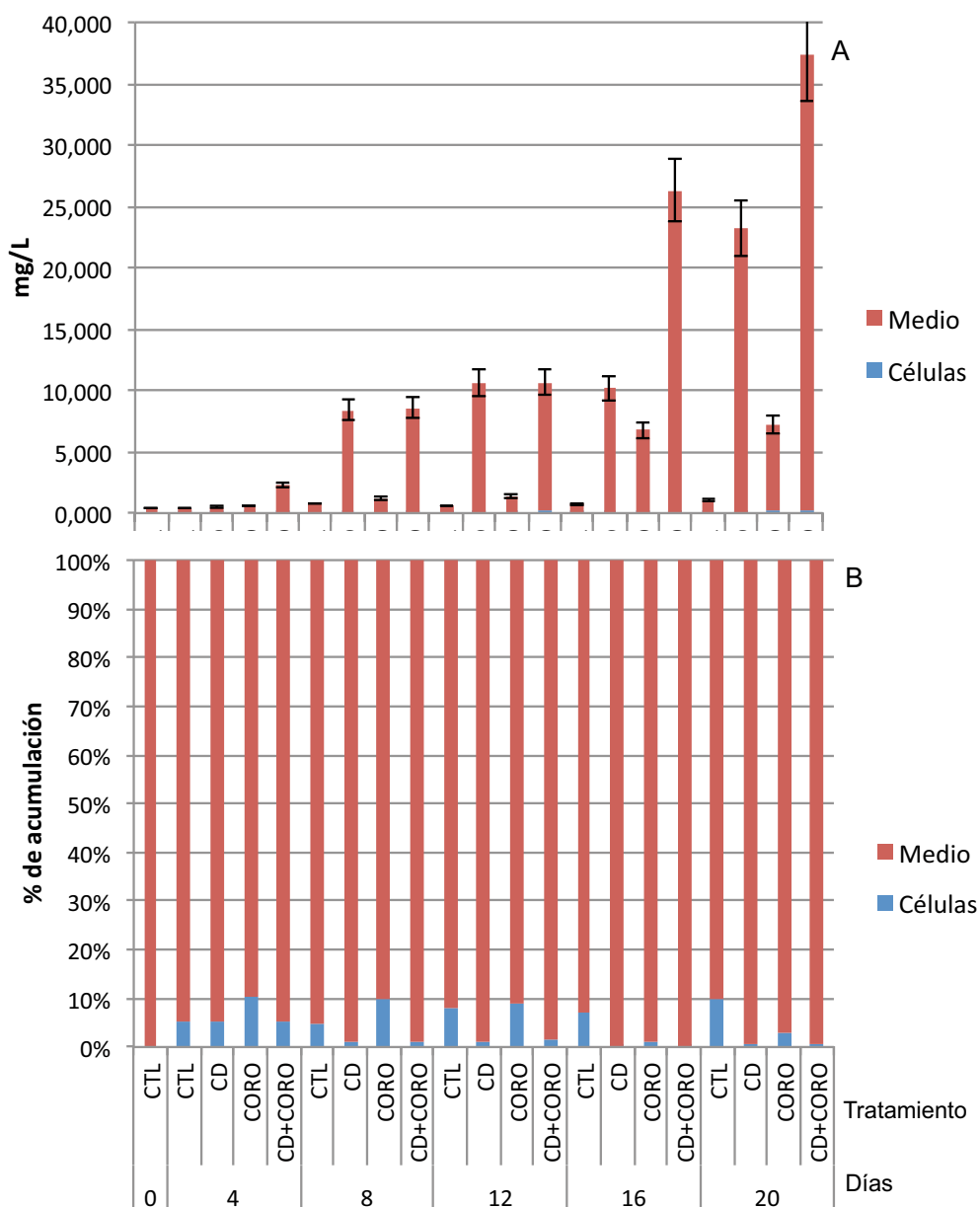


Figura 20. Contenido de taxanos totales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de *T. globosa* cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL), con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitores juntos. **A:** Contenido de taxanos totales expresados como mg/L de cultivo celular. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE. **B:** Proporción de taxanos intracelulares, expresada como porcentaje del contenido total.

El tratamiento de elicitación que resultó ser más eficaz en la mejora de la producción de taxanos en *T. globosa* fue la adición combinada de CORO y CD (Fig. 20A). En dicho tratamiento, al final del experimento, se observó un máximo de producción unas 40 veces superior al control (células sin elicitar). La adición de CORO y CD por separado indujeron también al final del cultivo, una producción total de taxanos 8 y 25 veces mayor, respectivamente, en relación al control. Este patrón se observó a lo largo de todo el experimento, aunque los valores de producción fueron menores en las otras muestras recolectadas. Mayoritariamente, los taxanos fueron excretados por las células y acumulados en el medio de cultivo (Fig. 20B), especialmente en los tratamientos con CD, lo que confirma la capacidad de estos compuestos para liberar los taxanos al medio (Sabater-Jara *et al.* 2014).

Recientemente, Osuna *et al.* (2015), han demostrado que los cultivos celulares de *T. globosa* elicitados con MeJA alcanzaban un máximo de producción de 0,5 mg/L, mientras que en este estudio la producción de taxanos en los cultivos elicitados con CORO+CD fue superior a 35 mg/L, un valor 70 veces superior al alcanzado con MeJA. Además, contrariamente a los resultados obtenidos con MeJA, en los que los taxanos eran acumulados mayoritariamente en las células, en el tratamiento de elicitación combinado se acumularon en el medio de cultivo. En su conjunto estos resultados demuestran la efectividad del tratamiento CORO+CD para incrementar la producción de taxanos y liberarlos al medio de cultivo, un factor muy importante en los procesos posteriores de recuperación de estos compuestos. Las CDs han recibido creciente atención en los últimos tiempos, no sólo por su capacidad de elicitación en cultivos de células vegetales, resultado de la inducción de las respuestas de defensa (Bru *et al.* 2006; Lijavetzky *et al.* 2008), sino también, por su capacidad para facilitar la excreción de metabolitos con baja hidrosolubilidad (Cai *et al.* 2012).

En los cultivos celulares de *T. media*, el tratamiento más efectivo también fue la combinación de CD+CORO, aunque en este caso las mayores producciones de taxanos totales se obtuvieron a los 12 y 16 días de la elicitación (Fig. 21A). Al día 16, la producción total de taxanos obtenida en los cultivos celulares tratados con CD+CORO, CORO, o CD, fue 19, 1,3 y 1,5

veces mayor que el control, respectivamente. En los tratamientos con los elicitores por separado, contrariamente al patrón observado en *T. globosa*, la producción en los cultivos de *T. media*, en general, fue más inducida por CORO que por CD. Las variaciones en la respuesta de los cultivos celulares a la elicitación no sólo depende de factores relacionados con el elicitador en sí (tipo, concentración, duración de elicitación, etc.), sino también de la especie, la línea celular y el estado de desarrollo del cultivo (Onrubia *et al.* 2010).

Cabe destacar que, durante todo el experimento, la producción total de taxanos en los cultivos celulares tratados con CORO+CD fue mayor que la combinación de los tratamientos aplicados por separado. Después de 12 y 16 días de elicitación, los niveles de taxanos en los cultivos celulares tratados con CORO+CD fueron más de 4 veces superiores que la suma de los taxanos acumuladas en los dos tratamientos por separado (Fig. 21A). Estos resultados sugieren un posible efecto sinérgico de los dos inductores en la producción de taxanos, como previamente se había observado en cultivos celulares de *T. media* tratados con CD y MeJA (Sabater-Jara *et al.* 2014).

Al estudiar la capacidad celular para excretar los taxanos al medio (Fig. 21B) en el tratamiento con CD, ya sea sola o, en menor medida, en combinación con CORO, indujo una alta liberación de estos compuestos al medio de cultivo, especialmente cuando la producción fue más alta (entre los 12 a 20 días de cultivo). Contrariamente, los cultivos control y las células tratadas con CORO conservaron hasta el 50% de los taxanos producidos dentro de las células. Estos resultados indican que en ambos sistemas, *T. globosa* y *T. media*, las CD tuvieron un efecto similar sobre la capacidad de liberar los taxanos formados intracelularmente al medio de cultivo.

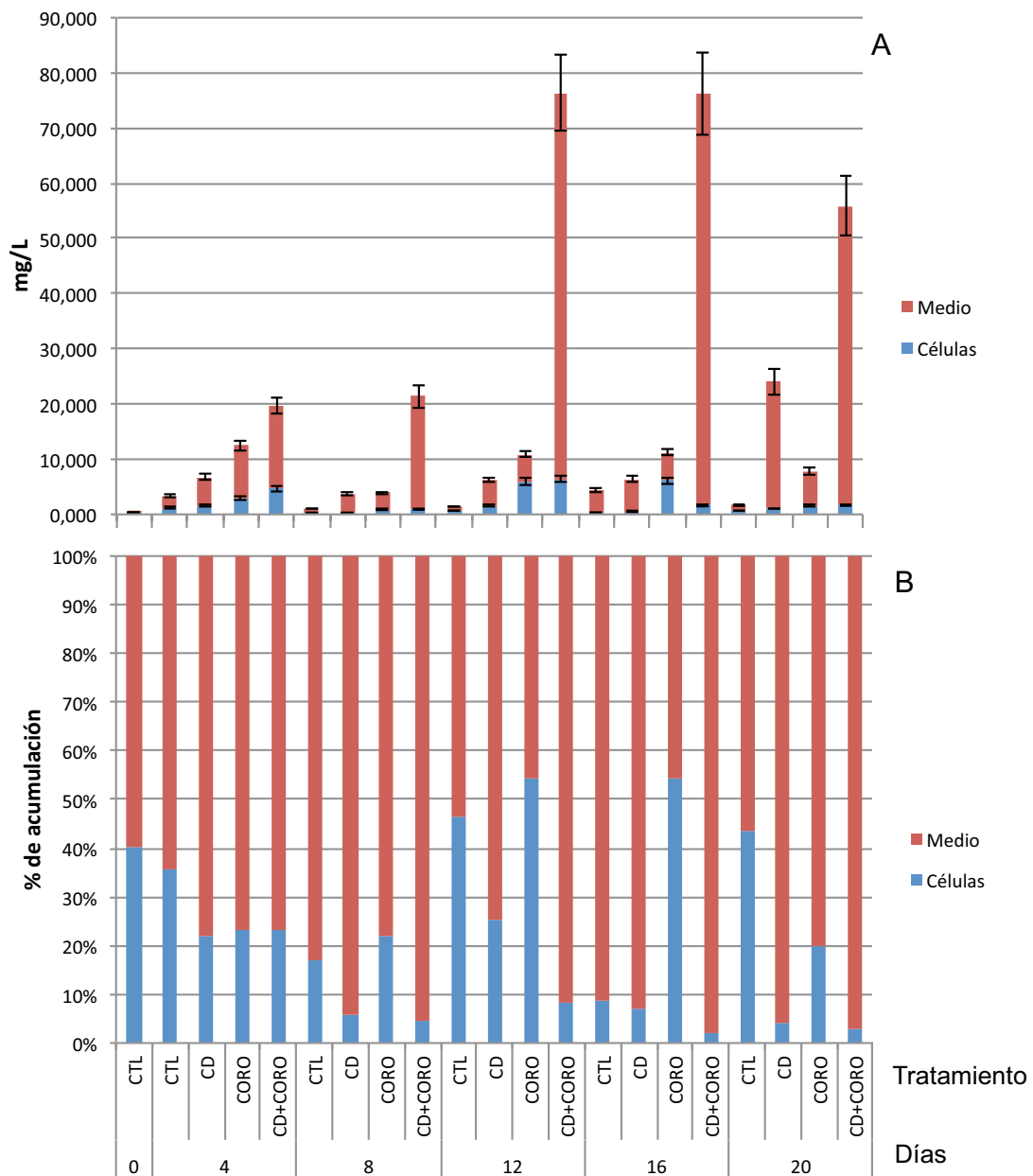


Figura 21. Contenido de taxanos totales (intra y extracelulares) en las suspensiones celulares de *T. media* cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL), con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitors juntos. **A:** Contenido de taxanos totales expresados como mg/L de cultivo celular. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE. **B:** Proporción de taxanos intracelulares, expresada como porcentaje del contenido total.

Los taxanos estudiados, tanto los asociados a las células, como los extracelulares, fueron: taxol (Tx), cefalomanina (CF), 10-deacetiltaxol (DT), baccatina III (BIII) y 10-deacetilbaccatina III (DAB). Sus contenidos en las suspensiones celulares de *T. globosa* se muestran en las figuras 22A y 22B, y para *T. media* en las figuras 23A y 23B.

El taxano que se acumuló en mayor proporción en las células de *T. globosa* en condiciones control fue DT, aunque su nivel máximo no superó 2 $\mu\text{g/L}$, independientemente del tratamiento. También se encontraron aunque en cantidades muy bajas Tx y CF. El efecto de los elicitores en la producción de los taxanos individuales dentro de las células productoras, no se pudo determinar debido a la escasa cantidad en que se encontraron. (Fig. 22A).

Los principales taxanos acumulados en el medio del cultivo fueron aquellos que llevan la cadena lateral (CF, DT y Tx), especialmente en los tratamientos con CD y CD+CORO (Fig. 22B). En el día 16 de elicitación con CD, CORO o CD+CORO, la suma de Tx, CF y DT era de 11; 5,5 y 15,2 veces mayor, respectivamente, que los de los taxanos sin cadena lateral (BIII y DAB). Resultados similares se obtuvieron en el día 20, cuando la suma de Tx, CF y DT bajo los tres tratamientos de elicitación fue de 10,4; 2,7 y 4,2 veces mayor, respectivamente, que la suma de los taxanos sin la cadena lateral. Al contrario, en los cultivos no elicitados, la producción de BIII y DAB fue siempre mayor que la suma de los taxanos que llevan la cadena de fenilisoserina (aunque las cantidades eran muy bajas). También cabe destacar que al inicio del experimento (días 0 y 4), el taxano mayoritario en los cultivos control fue BIII. Previamente, ya se había observado (Nims *et al.* 2006; M Onrubia *et al.* 2013a; Onrubia *et al.* 2010) que cuando la producción total de taxanos es baja en los cultivos celulares de *Taxus* spp., ya sea porque no se han añadido elicitores, o porque estos carecen de efecto, los taxanos predominantes son DAB y BIII. Estos dos taxanos intermediarios de la biosíntesis de Tx y otros taxanos que llevan la cadena lateral, se forman en las etapas tempranas del cultivo (Fig. 2), mientras que la unión de la cadena lateral a la BIII, se lleva a cabo después de varios días y es inducida por la presencia de elicitores.

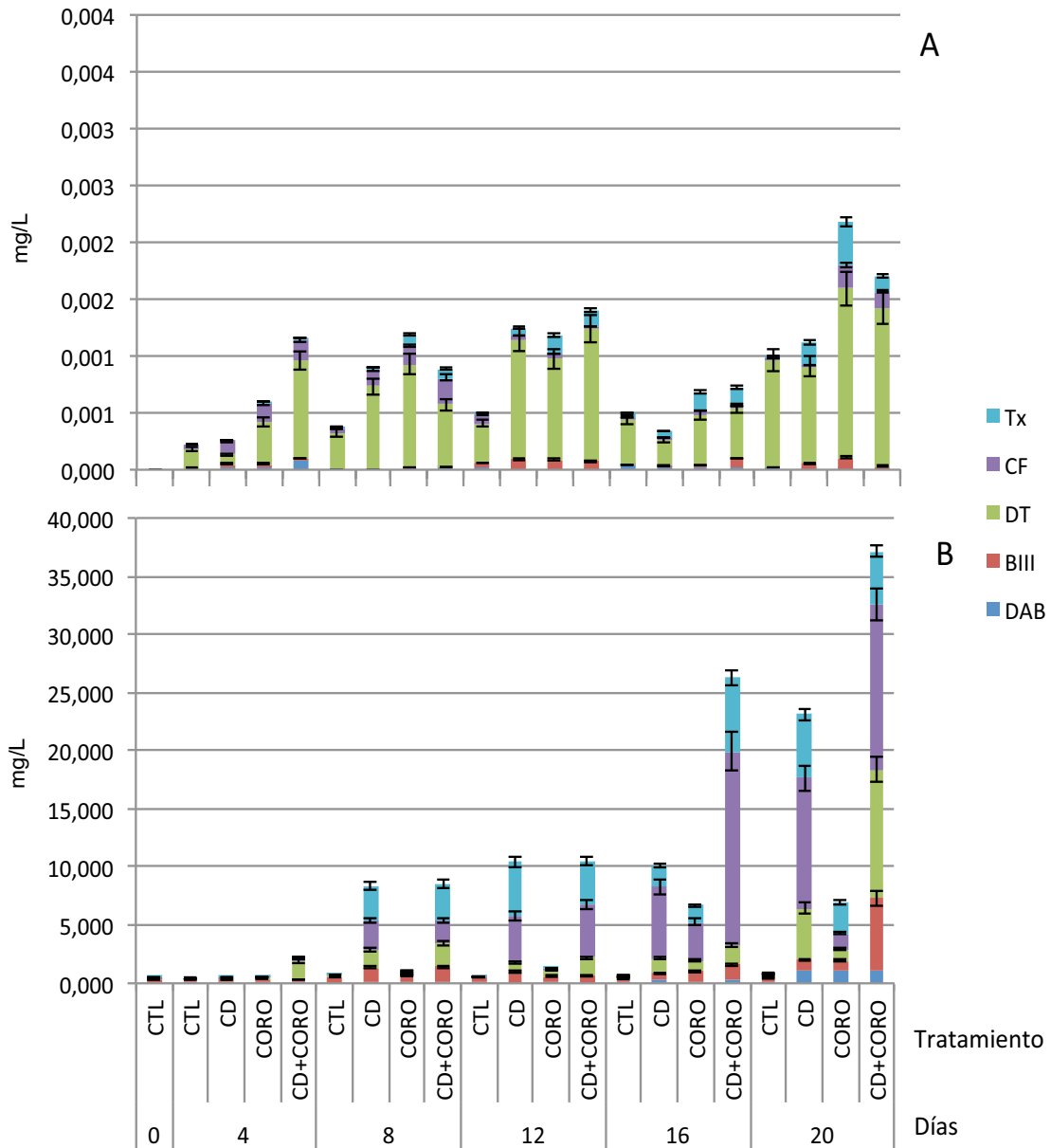


Figura 22. Contenido de taxanos individuales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de *T. globosa*, cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitors juntos. **A:** Taxanos intracelulares expresados como mg/L de cultivo celular. **B:** Taxanos extracelulares expresados en mg/L de cultivo celular. DAB: 10-deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: 10-deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE.

En los cultivos celulares de *T. media* (Fig. 23A y B), en todas las condiciones estudiadas, BIII y Tx fueron los principales taxanos encontrados asociados a células, particularmente la BIII; la única excepción fue en el inicio de la elicitación (día 4), cuando el taxano principal fue CF. Como se mencionó anteriormente, la capacidad de excreción de estas células fue alta, ya que la acumulación máxima de taxanos en las células de los cultivos tratados con CD+ CORO, 12 días después de elicitación (Fig. 23A) representaba menos del 10% de la producción total de taxanos.

Los niveles más altos de taxanos en los medios de cultivo se obtuvieron con el tratamiento combinado de CD+CORO. En el máximo de producción (d16) los cultivos celulares tratados con CORO o CD por separado, o sin elicitar, presentaron una producción de Tx que representó sólo el 2%, 1,3% y 1,2%, respectivamente, del rendimiento obtenido con la elicitación dual. Del mismo modo, la acumulación de BIII en estas condiciones representa sólo el 6%, 9,8% y 7,8%, respectivamente, del nivel alcanzado con CD + CORO.

Al contrario que en *T. globosa*, los cultivos celulares de *T. media* no mostraron diferencias significativas entre los niveles de taxanos con o sin cadena lateral, especialmente en las condiciones más inductivas. De hecho, el taxano predominante en los cultivos de células *T. media* fue BIII, excepto bajo la elicitación dual, en la cual, como se mencionó anteriormente, fueron BIII y Tx, los taxanos con mayores concentraciones. Se encontraron cantidades muy bajas de DAB, CF y DT en el medio, a lo largo del experimento. En estudios previos con cultivos celulares de *T. media*, después de la elicitación con CORO o MeJA se demostró que el taxano principal obtenido era en general BIII (Onrubia *et al.* 2013b; Sabater-Jara *et al.* 2014).

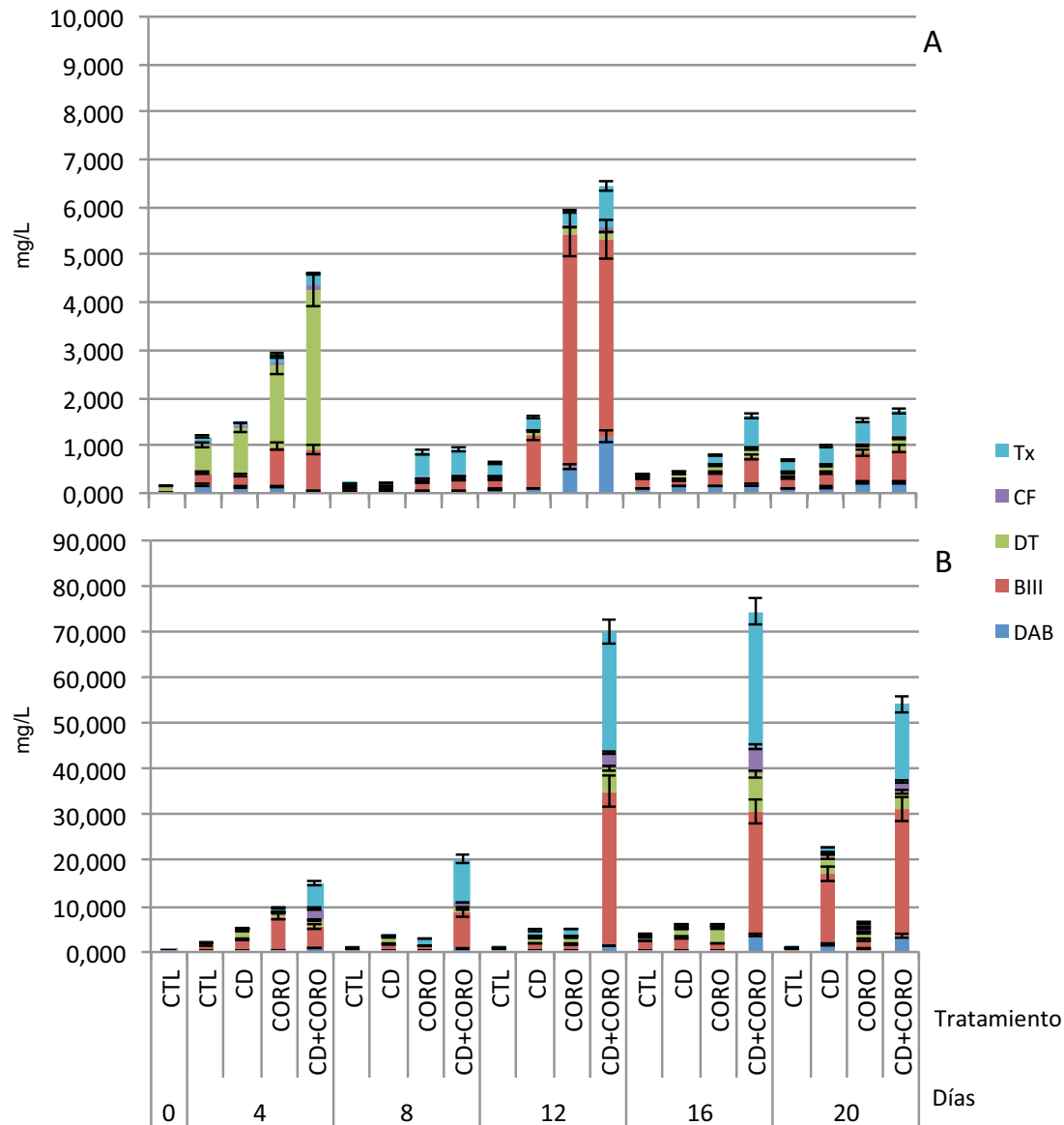


Figura 23. Contenido de taxanos individuales (intra y extracelulares) de las suspensiones celulares de *T. media*, cultivadas durante 20 días en condiciones control (CTL) y con la adición de CD (ciclodextrina), CORO (coronatina), o ambos elicitors juntos. **A:** Taxanos intracelulares expresados como mg/L de cultivo celular. **B:** Taxanos extracelulares expresados en mg/L de cultivo celular. DAB: 10-deacetilbacatina, BIII: baccatina III, DT: 10-deacetiltaxol, CF: cefalomanina, Tx: taxol. Los datos son la media de tres repeticiones independientes \pm DE.

4.1.6. Cambios en el perfil de expresión de los genes involucrados en la síntesis de taxanos en cultivos celulares de *T. media* y *T. globosa* elicitados con CORO y CD

Para analizar la relación entre los perfiles de transcripción y la producción total e individual de los taxanos estudiados en las líneas celulares de *Taxus* spp. durante el experimento de elicitación, se determinaron los cambios en los niveles de expresión por qRT-PCR de los genes *TS*, *T7 β OH*, *DBAT*, *BAPT*, *CoA ligasa (TBPCCL)* y *DBTNBT*, que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de Tx (Fig. 2). La acumulación del transcrito se cuantificó en diferentes puntos durante las primeras 48 horas del experimento de elicitación (Fig. 24 y 25). La mayoría de estos genes se han estudiado previamente en diferentes sistemas de *Taxus* bajo la acción de diversos elicitores, pero el nivel de expresión del gen *TBPCCL* (β -fenilalanina CoA ligasa de *Taxus*) no se había determinado hasta ahora, ya que su actividad como CoA ligasa y su posible participación en la biosíntesis del Tx se ha confirmado en este estudio (ver sección 4.2).

En cultivos celulares de *T. globosa*, la acumulación de transcritos de los genes mencionados en respuesta a los elicitores fue, en general, muy baja (Fig. 24). Dos días después de la elicitación con CD+CORO, la expresión del gen *TS* aumentó más de 20 veces sobre el valor de referencia. Los transcritos correspondientes a los genes de *T7 β OH*, *DBAT* y *CoA ligasa* aumentaron, aunque en niveles muy bajos, después de 4 horas en el tratamiento de doble elicitación. También se observaron cantidades muy bajas de RNAm correspondientes a los genes *BAPT* y *DBTNBT*. Estos resultados sugieren que la baja expresión de estos genes podría ser la responsable de la escasa producción de taxanos en los cultivos celulares de *T. globosa*. Sin embargo, la producción total de taxanos en la línea celular elicitada con CD+CORO fue superior a 35 mg/L, lo cual no se refleja en su perfil de expresión génica. Patil *et al.* (2012), trabajando con cultivos de *T. cuspidata*, con diferentes tamaños de agregados celulares elicitados con MeJA, indicaron que las diferencias en la expresión de varios genes de biosíntesis de Tx fueron menores en

comparación con las diferencias en la acumulación de taxanos. Por lo tanto, deben existir otros factores que controlan la biosíntesis de taxanos, además de los ligados a la expresión de los genes estudiados.

La expresión del gen *TS* que controla el primer paso de la vía metabólica del Tx (Hezari *et al.* 1995), incrementó marcadamente en los cultivos celulares de *T. media* elicitados con CORO, o con CD+CORO. En el tratamiento con CORO, los niveles de transcripción del gen *TS* alcanzaron un máximo a las 12 h después de la elicitación, presentando un valor 18,6 veces superior al control, y disminuyendo a partir de entonces, pero manteniéndose altos durante las 48 h estudiadas (Fig. 25). Aunque la adición de CD al cultivo también aumentó la expresión de gen *TS*, el efecto no fue tan notorio (solo 4 veces superior al control, en el momento de máxima expresión). La elicitación conjunta (CD+CORO) también mejoró la acumulación de los niveles del transcrito de *TS* (hasta casi 80 veces la del control en el máximo de expresión), sin embargo en los demás puntos evaluados, la acumulación de transcritos *TS* no fue superior a los alcanzados con el tratamiento CORO.

La fuerte expresión del gen *TS* en los cultivos de *T. media* inducida por los elicitores contrasta con la alcanzada por la línea celular de *T. globosa*. Estas diferencias de expresión no pueden ser atribuidas a la naturaleza transgénica de la línea celular utilizada en este experimento, debido a que en trabajos previos realizados con líneas no transformadas de *T. baccata* y *T. chinensis*, el incremento en la acumulación de transcrito *TS*, 12-16 horas después de la elicitación fue de respectivamente de 60 y 12 veces (Onrubia *et al.* 2010; Li *et al.* 2012), mientras que el incremento observado en *T. globosa* fue solo de unas 5 veces. Además después de 48h del tratamiento elicitor en las líneas celulares de *T. baccata* fue 80 veces superior en relación al control no elicitado, mientras que en *T. globosa* fue solo de 20 veces (Onrubia *et al.* 2010). Los resultados comentados demuestran que también las líneas no transformadas de *Taxus* spp. pueden presentar una alta respuesta a la elicitación incrementando el nivel de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de taxanos.

La $T7\beta OH$ cataliza la hidroxilación en la posición C7 del esqueleto de taxano, en uno de los pasos intermedios de la biosíntesis de Tx (Chau *et al.* 2004). La expresión del gen $T7\beta OH$ en los cultivos celulares de *T. media* fue inducida por la adición de CORO y CD+CORO, siendo poca la diferencia entre los dos tratamientos; el máximo de expresión de este gen (a las 12 h) fue aproximadamente 2 y 3 veces mayor al alcanzado en los cultivos tratados con CD y los control (no tratados), respectivamente. El mismo patrón de transcripción se observó para el gen $DBAT$, que codifica para la enzima que convierte DAB en BIII (Walker y Croteau 2000a). La máxima expresión del gene $DBAT$ se obtuvo 12 h después de la elicitación con CORO o CD+CORO, cuando aumentó un 268% y 295%, respectivamente, en comparación con el control, y el 100% y el 117,4% en comparación con las cultivos tratados con CD.

Los genes, TS , $T7\beta OH$ y $DBAT$, participan en los pasos biosintéticos que conducen a la formación de BIII, por lo que su alto nivel de expresión en los cultivos celulares de *T. media* elicitados con CD+CORO podría explicar los también altos niveles de producción de BIII alcanzados en estos cultivos.

Como se ha indicado anteriormente, el gen de la CoA ligasa ($TBPCCL$) codifica para la enzima que activa a β -fenilalanina para formar β -fenilalanin CoA, antes de su unión a la BIII. Su expresión fue máxima a las 4 horas del tratamiento con CD+CORO, cuando los niveles de transcripción fueron respectivamente, 3,2; 8,7 y 6 veces mayores a los alcanzados en los cultivos celulares tratados con CORO o CD por separado, o en ausencia de elicitor (Control). Aunque la expresión de este gen disminuyó a partir de entonces, los niveles más altos de expresión siempre se encontraron con el tratamiento de doble elicitación. El nivel de expresión del gen $TBPCCL$ aumentó debido a la elicitación, pero el incremento fue menor al alcanzado con otros de los genes evaluados en los cultivos celulares de *T. media*. Podemos deducir de estos resultados que el gen $TBPCCL$ podría estar involucrado en el control de un paso limitante en la ruta de biosíntesis del Tx, aunque aún son necesarios más estudios sobre esta enzima recientemente caracterizada.

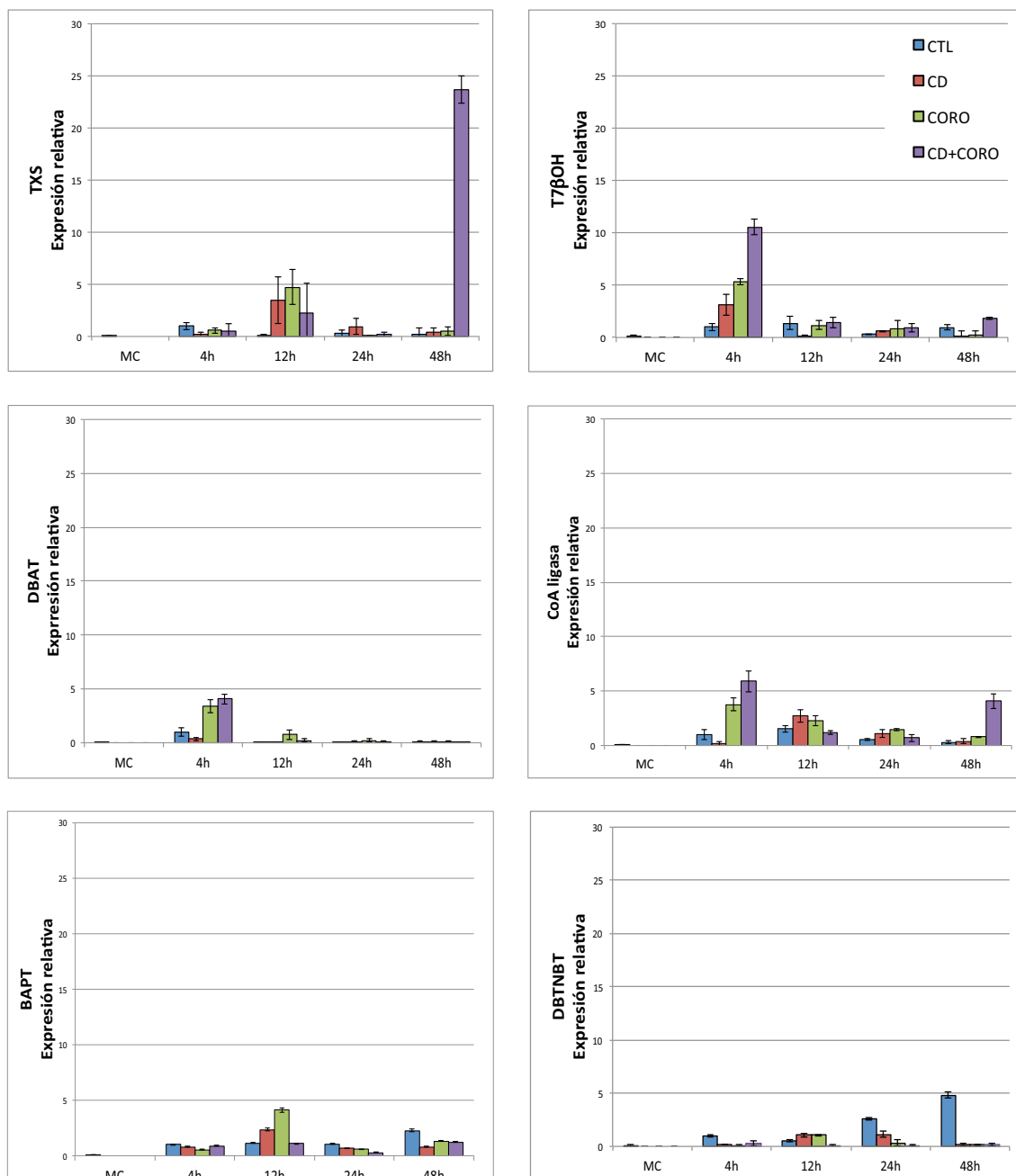


Figura 24. Perfil de expresión en los cultivos celulares de *T. globosa* durante las primeras 48 h en medio de producción, elicitados o no con CD, CORO o ambos elicitors. Los resultados se expresan como nivel de expresión del gen en relación al nivel de expresión alcanzado en cultivos mantenidos durante 14 días en MC. TS, taxadieno sintasa; T7βOH, taxadieno7-β-hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasa; CoA ligasa, β-fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa. Los datos son la media de tres repeticiones independientes ± DE.

En los pasos finales de la vía metabólica (Fig. 2) participa la enzima baccatina III 13-O-(3-amino-13-fenilpropanoil) transferasa (BAPT) siendo responsable de la unión de la β -fenilalanina a la BIII, lo que posteriormente deriva en los taxanos con cadena lateral (Walker *et al.* 2002a). En los cultivos celulares de *T. media*, el gen de *BAPT* fue más inducido por el tratamiento de CORO, presentando su máxima expresión 12 h después del tratamiento elicitor. En este punto la acumulación del transcrito correspondiente fue de 2 y 11,2 veces superior a la alcanzada en condiciones de elicitación con CD+CORO o CD, respectivamente, y 23 veces superior al control. Este incremento también fue significativamente superior al alcanzado por la línea celular de *T. globosa* (menor a 5 veces). Como ya se ha indicado la conducta diferente de ambas líneas celulares no puede ser atribuida a la naturaleza transgénica de las líneas celulares de *T. media*, ya que las líneas celulares de otras especies de *Taxus* mostraron incrementos de expresión del gen *BAPT* incluso superiores al alcanzado por la línea transgénica de *T. media*.

El último gen considerado en este estudio ha sido *DBTNBT*, el cual está implicado en la benzoilación de la cadena lateral de los taxanos (Long *et al.* 2008) y representa el paso final en la biosíntesis de Tx (Fig. 2). Al comparar los diferentes tratamientos, el nivel de expresión más alto en casi todo el estudio se observó en los cultivos celulares elicitados con CORO. En este caso, la mayor acumulación del transcrito se produjo 4 h después de la elicitación, siendo sus niveles 3; 18,7 y 17,4 veces mayor que en los cultivos elicitados con CD+CORO, CD y el control, respectivamente.

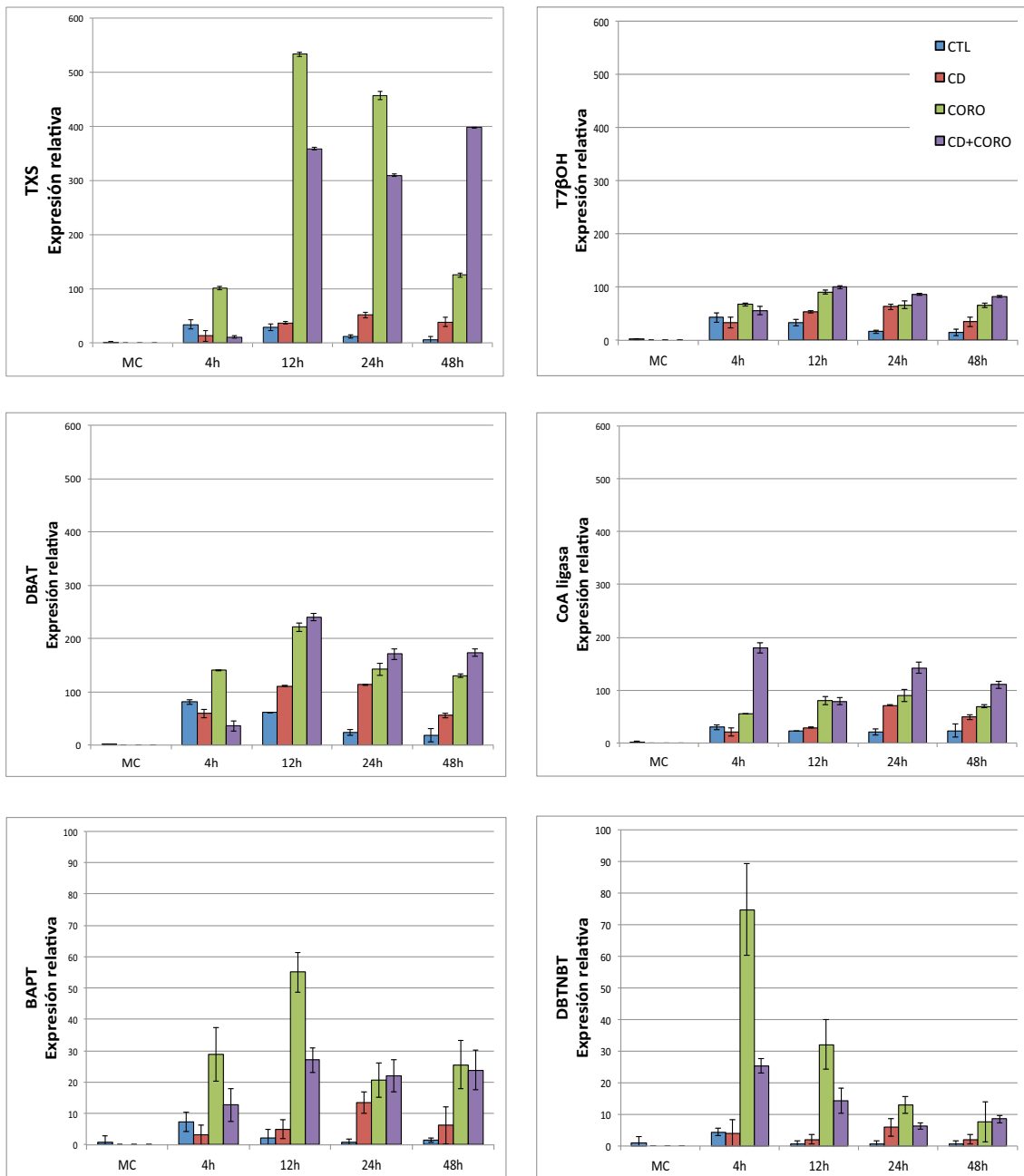


Figura 25. Perfil de expresión en los cultivos celulares de *T. media* durante las primeras 48 h en medio de producción, elicitados o no con CD, CORO o ambos elicitores. Los resultados se expresan como nivel de expresión del gen con respecto al nivel de expresión alcanzado en cultivos mantenidos durante 14 días en MC. TS, taxadieno sintasa; T7βOH, taxadieno7-β-hidroxilasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina-III-10-O-acetiltransferasa; CoA ligasa, β-fenilalanina CoA ligasa; BAPT, baccatina III-3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa. Los datos son la media de tres repeticiones independientes ± DE.

Aunque la expresión de los dos genes que codifican las enzimas directamente responsables de la formación de Tx y de los taxanos que llevan la cadena lateral de β -fenilalanina (*BAPT* y *DBTNBT*) fue mayor en los cultivos celulares tratados con CORO, la mayor producción de estos taxanos se obtuvo en el tratamiento de elicitación conjunta CD+CORO. En consecuencia, no se observó una relación clara entre la expresión de los genes *DBTNBT* y *BAPT* y la producción de taxanos con cadena lateral. Patil *et al.* (2012) observaron que, aunque la producción de taxanos se relaciona con la expresión de genes implicados en el proceso de biosíntesis, otros factores pueden estar implicados, tales como la regulación postranscripcional y postraduccional. Sin embargo, dado que los otros genes estudiados mostraron el máximo de expresión en la elicitación con CD+CORO, o al menos igualan a los niveles alcanzados en los cultivos tratados con CORO, es probable que más intermediarios en la biosíntesis de Tx hayan sido producidos por el tratamiento combinado. En este caso, al parecer, la cantidad y/o la actividad de *BAPT* y *DBTNBT* habrían sido suficientes para conseguir la formación de los altos niveles de Tx y los otros taxanos con cadena lateral en los cultivos celulares de *T. media*. También se debe tener en cuenta que la adición de CD juntamente con CORO dio lugar a una alta excreción de taxanos al medio de cultivo. El hecho de que el Tx y otros taxanos puedan formar complejos de inclusión con CD, además de condicionar una disminución de la toxicidad celular, también puede evitar posibles degradaciones intra y extracelulares, todo ello dando lugar a los altos niveles de taxanos obtenidos en los cultivos celulares tratados con ambos elicitores.

En su conjunto, los resultados comentados demuestran que los CCETs constituyen una excelente plataforma biotecnológica para la producción de Tx y taxanos derivados, y que los cultivos celulares de *T. globosa* podría constituir una nueva fuente alternativa de taxanos, si bien, se requieren estudios adicionales para mejorar la producción de Tx en este sistema. Por otro lado, la confirmación de que en presencia de elicitores el flujo de precursores hacia la formación de Tx está limitado en los últimos pasos de la ruta biosintética sugiere que los genes que participan en estos pasos son dianas metabólicas de elección para el diseño de nuevas líneas celulares de *T. globosa* y *T. media*

que sobreexpresen estos genes mediante la utilización de técnicas de bioingeniería.

4.2 “Biofactorías Vegetales” una potente herramienta para caracterizar nuevos genes/enzimas implicados en la biosíntesis de taxanos

Como se ha indicado en el capítulo introductorio, Tx es el nombre comercial que Bristol-Myers Squibb registró para el compuesto paclitaxel (Px), el cual se considera actualmente como uno de los fármacos más eficaces contra el cáncer que se hayan desarrollado. La fuente natural de Tx es la corteza interna de varios *Taxus spp.*, donde se acumula a una concentración muy baja. La producción alternativa de taxol en cultivos celulares de *Taxus spp.* se ha convertido en un gran desafío para la biotecnología vegetal debido a la creciente demanda en todo el mundo y su escasez en la naturaleza (Onrubia *et al.* 2013a). Por estas razones, numerosos laboratorios de investigación y empresas biotecnológicas están interesados en el diseño de nuevas estrategias, basadas en los cultivos celulares elicitados de *Taxus* (CCETs), con el objetivo de optimizar la producción biotecnológica de este compuesto anticancerígeno. Por otro lado, los CCETs también representan una excelente plataforma para llevar a cabo estudios básicos sobre la biosíntesis de taxanos encaminados a profundizar en el conocimiento de esta vía metabólica y su regulación (Cusidó *et al.* 2014).

Como se ha comentado ampliamente en el capítulo introductorio, la ruta biosintética del Tx es altamente compleja, el primer intermediario que lleva el anillo de taxano es el taxa-4 (5),11(12)dieno, cuya formación a partir de GGPP está catalizada por la enzima plastídica la taxadieno sintasa (TS) (Hezari *et al.* 1997; Koepp *et al.* 1995). Una sucesión de pasos, que implican la acción de hidroxilasas, aciltransferasas y otras enzimas, llevan a la producción de la 10-deacetilbaccatina III (10-DAB) y baccatina III (BIII), ambos taxanos son ampliamente utilizados como intermediarios para la semisíntesis de taxol y sus análogos (Croteau *et al.* 2006; Malik *et al.* 2011; Onrubia *et al.* 2013a). Posteriormente, la cadena lateral derivada de β -fenilalanina es unida a la BIII, y después de dos pasos biosintéticos más, la molécula final se ensambla (Fig. 26).

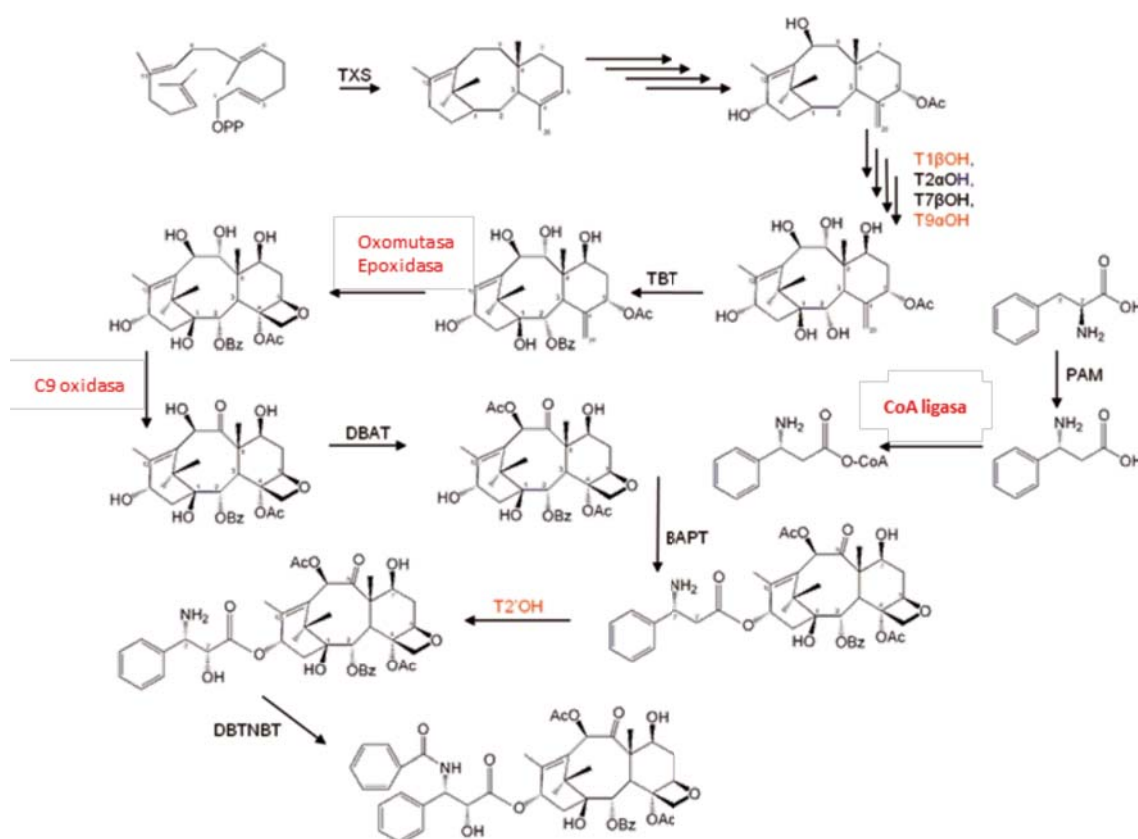


Figura 26. Biosíntesis de taxol, a partir del geranylgeranyl difosfato. Las flechas múltiples indican varios pasos. Los genes desconocidos y las correspondientes proteínas se representan en **rojo**. TS, taxadieno sintasa; T1 β OH, taxano 1 β -hidroxilasa; T2 α OH, taxano 2 α -hidroxilasa; T7 β OH, taxano 7 β -hidroxilasa; T9 α OH, taxano 9 α -hidroxilasa; TBT, taxano-2 α -O-benzoil transferasa; DBAT, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetiltransferasa; PAM, fenilalanina aminomutasa; BAPT, C-13-fenilpropanoil-CoA transferasa; T2 α OH, taxano 2' α -hidroxilasa; DBTNBT, debenzoiltaxol N-benzoil transferasa.

Croteau *et al.* han identificado, clonado y expresado en organismos heterólogos los genes que codifican para doce de las enzimas implicadas en la biosíntesis de taxol: GGPP sintasa (GGPPS), TS, cinco hidroxilasas, cinco acil transferasas y la fenilalanina aminomutasa (PAM) (Croteau *et al.* 2006; Guo *et al.* 2006; Lange y Ahkami 2013; Nims *et al.* 2006; Walker y Croteau 2001). Sin embargo, los genes que codifican las tres hidroxilasas restantes, una oxidasa, epoxidasa, oxomutasa, y la β -fenilalanina-CoA ligasa aún no han sido

descritos, quedando por definir completamente siete etapas de la ruta (Croteau *et al.* 2006; Nims *et al.* 2006) (Fig. 26).

Hasta ahora, se sabe que la cadena lateral que se encuentra unida en la posición C13 del núcleo de taxano deriva de β -fenilalanina, pero existen dudas respecto a su síntesis. Aunque la fenilioserina también se ha postulado como precursora de la cadena lateral (Floss y Mocek 1995), Croteau y colaboradores (2006) indicaron que β -fenilalanina es incorporada en BIII tres veces más eficientemente que fenilioserina. Para que la β -fenilalanina pueda ser incorporada al anillo de taxano, es necesaria su previa activación a través de la unión a la Coenzima A (CoA). La síntesis de la β -fenilalanil-CoA a partir de la β -fenilalanina y la CoA, estaría catalizada por una hipotética β -fenilalanina-CoA ligasa, sin embargo la estructura de esta enzima y la identidad del gen que la codifica no se han determinado hasta la fecha.

Las células vegetales generalmente responden a la adición de elicitores mediante el aumento de la producción de metabolitos secundarios involucrados en el sistema de defensa de la planta. Este hecho ha sido descrito en varias ocasiones en cultivos de células de *Taxus spp.* tratados con elicitores bióticos y abióticos (Bentebibel *et al.* 2005; Cusidó *et al.* 2002; Li *et al.* 2012; Onrubia *et al.* 2013b)

El aumento en la producción de metabolitos secundarios, suele ser resultado de una mayor expresión de los genes que controlan las rutas metabólicas (Expósito *et al.* 2009; Frense 2007; De Geyter *et al.* 2012; Malik *et al.* 2011; Vongpaseuth and Roberts 2007). Por lo tanto, la comparación del transcriptoma de una línea celular elicitada con una línea control (sin elicitar) es una excelente estrategia para adquirir nuevos conocimientos sobre la respuesta de los genes a los elicitores y, para realizar con éxito experimentos encaminados al descubrimiento de nuevos genes del metabolismo de plantas, en particular de especies de las cuales no se tienen disponibles secuencias de su genoma, como lo es *Taxus spp.* (Cusidó *et al.* 2014; Goossens 2015; Nims *et al.* 2006).

La técnica de cDNA-AFLP permite el estudio de los perfiles transcriptómicos para el análisis de expresión de todo un genoma. Esta técnica

conduce a la identificación de etiquetas de genes (tags) que se sobreexpresan, no se expresan o cuyos niveles de transcripción permanecen sin cambios en unas condiciones experimentales inductivas (Goossens *et al.*, 2003; Colling *et al.*, 2013). Los tags seleccionados, se pueden vincular a funciones enzimáticas específicas mediante análisis *in silico*, que permite la selección de genes candidatos para pasos metabólicos específicos. Según Kemena y Notredame (2009), el alineamiento de secuencias múltiples (MSA) es una forma útil de organización los datos, ya que las secuencias génicas en estudio se alinean junto a otras secuencias conocidas de genes ya caracterizados dando como resultado nueva información biológica relevante sobre la estructura o función de las proteínas codificadas por dichos genes. En un alineamiento funcionalmente correcto, los residuos con una misma función necesitan estar alineados, incluso si el origen de esa similitud se debe a un proceso de evolución convergente. Los estudios bioinformáticos pueden revelar importante información sobre la estructura de la proteína objeto de estudio, los aminoácidos implicados en el centro de reacción enzimática y sus alrededores, el sitio de unión a cofactor, el sustrato adecuado, etc.

Para estudiar la funcionalidad de una proteína diana se pueden utilizar diferentes sistemas heterólogos de expresión. Los genes implicados en la ruta biosintética de taxol se han expresado tanto en organismos procariontas (Walker y Croteau 2000a) como eucariotas, desde levaduras (Hefner *et al.* 1998; Jennewein *et al.* 2001, 2003) hasta células de insectos, incluyendo el sistema de baculovirus-*Spodoptera fugiperda* (Sf9) (Jennewein *et al.* 2001). Un sistema de expresión transitoria desarrollado con éxito, cuando se trata de un único gen heterólogo, es la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con una cepa de *A. tumefaciens* que lleva el gen diana en un plásmido binario (Matić *et al.* 2012; Planas-Portell *et al.* 2013). Esta técnica, versátil, rápida y sencilla, genera una gran cantidad de proteína recombinante cuya funcionalidad puede ser investigada posteriormente.

El establecimiento de vínculos entre los niveles de expresión génica y la biosíntesis de metabolitos secundarios puede generar una considerable cantidad de información sobre el metabolismo secundario vegetal (Goossens *et al.* 2003; Rischer *et al.* 2006). Nuevos conocimientos que se podrían aplicar

para mejorar el potencial práctico de la Ingeniería Metabólica en la producción biotecnológica de importantes compuestos vegetales entre los que se incluyen los taxanos.

Los estudios sobre el metabolismo secundario vegetal (MSV) se ven dificultados en gran medida, por la limitada información genómica que se tiene sobre el MSV en las bases de datos como la EST (NCBI) o en las colecciones de cDNA, información que es necesaria para la aplicación de técnicas convencionales de expresión génica como los microarrays. Una alternativa a estas técnicas podría ser como ya se ha mencionado anteriormente, la aplicación de la tecnología del cDNA-AFLP, que no depende de información genómica previa y que puede proporcionar perfiles de expresión génica cuantificables que pueden ser utilizados en programas de identificación de nuevos genes implicados en el MSV (Goossens *et al.* 2003; Rischer *et al.* 2006; Vuylsteke, *et al.* 2007). Hasta la fecha, se han llevado a cabo muy pocos estudios transcriptómicos en *Taxus* spp. Entre ellos, Hao *et al.* (2011) investigaron el transcriptoma de diferentes tejidos de plantas de *T. mairei* utilizando la segunda generación de la técnica Illumina, y Sun *et al.* (2013) y Li *et al.* (2012) respectivamente, estudiaron los cambios transcriptómicos inducidos en cultivos celulares de *T. x media* y *T. chinensis* al ser elicitados con MeJA. Sin embargo, la información obtenida en estos estudios previos no se ha podido aplicar para identificar, clonar, o determinar la funcionalidad de nuevos genes implicados en la biosíntesis de taxanos.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha utilizado la mencionada técnica cDNA-AFLP para determinar los perfiles transcriptómicos de una línea celular de *T. baccata* cultivada en un sistema de dos etapas (Cusidó *et al.* 2002). Para ello, las suspensiones celulares fueron cultivadas durante 7 días en un medio óptimo para el crecimiento celular (MC), y después se mantuvieron durante 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 1d, 2d y 4d en un medio óptimo para la producción de taxanos (MP). En esta última etapa, los cultivos fueron adicionados del elicitador MeJA. Como el metabolismo celular es reprogramado en favor del metabolismo secundario cuando los cultivos de *Taxus* se transfieren al medio MP (Cusidó *et al.* 2002), la muestra 7d MC (día 7 en medio de crecimiento) fue seleccionada como control negativo para el estudio de los

patrones de expresión de los genes implicados en el metabolismo de taxanos. El uso de 128 combinaciones de cebadores BstYI-MseI permitió la determinación y el análisis cuantitativo de los patrones temporales de acumulación de 8.192 etiquetas de transcritos (tags). Como tags de interés se consideraron inicialmente aquellos que se expresaban diferencialmente en las células elicidadas en relación con las control (Fig. 27). Sin embargo, ya que algunos genes de la biosíntesis de taxol y posibles candidatos se activaron tanto en condiciones control como inductivas y presentaban una expresión diferencial durante el experimento, también se analizó su patrón de expresión. De los 858 tags expresados diferencialmente, 667 fragmentos (77,7%) se secuenciaron de manera correcta directamente de los productos de PCR, lo que indica que dichos tags podrían corresponder a genes únicos. La búsqueda de homología de las secuencias de los tags correspondientes a genes únicos reveló que un 55,3% (369) eran homólogas a genes ya conocidos. En la figura 27 se muestran los tags seleccionados agrupados de acuerdo con el sistema de clasificación jerárquica funcional FunCat (Ruepp *et al.* 2004).

El umbral de similitud mantenido para las búsquedas BLAST se estableció en un valor de $10e^{-2}$. De los tags secuenciados, 309 (46,3%) mostraban similitud con genes de funciones conocidas y 60 (9,0%) con genes sin función asignada (proteínas no clasificadas). Por el contrario, para 298 tags (44,7%) no se encontró homología con secuencias conocidas (Fig. 28).

La categoría funcional más importante fue "Metabolismo y Energía" (Fig. 28), con tags homólogos a genes del metabolismo primario y secundario, seguida de "Organización celular y defensa". Dado que los jasmonatos están relacionados con los sistemas de defensa de plantas frente a un gran rango de estímulos (Wasternack 2007), y que en los cultivos celulares de *Taxus* spp. la producción de taxanos se activa en respuesta a jamonatos, no es de extrañar que en la categoría de "Metabolismo y Energía" aparecieran numerosos tags relacionados con la biosíntesis de taxanos, así como posibles genes implicados en este proceso que todavía no han sido clonados y que podrían corresponder a hidroxilasas, una oxomutasa, epoxidasa, oxidasa y una CoA ligasa (Tabla 9).

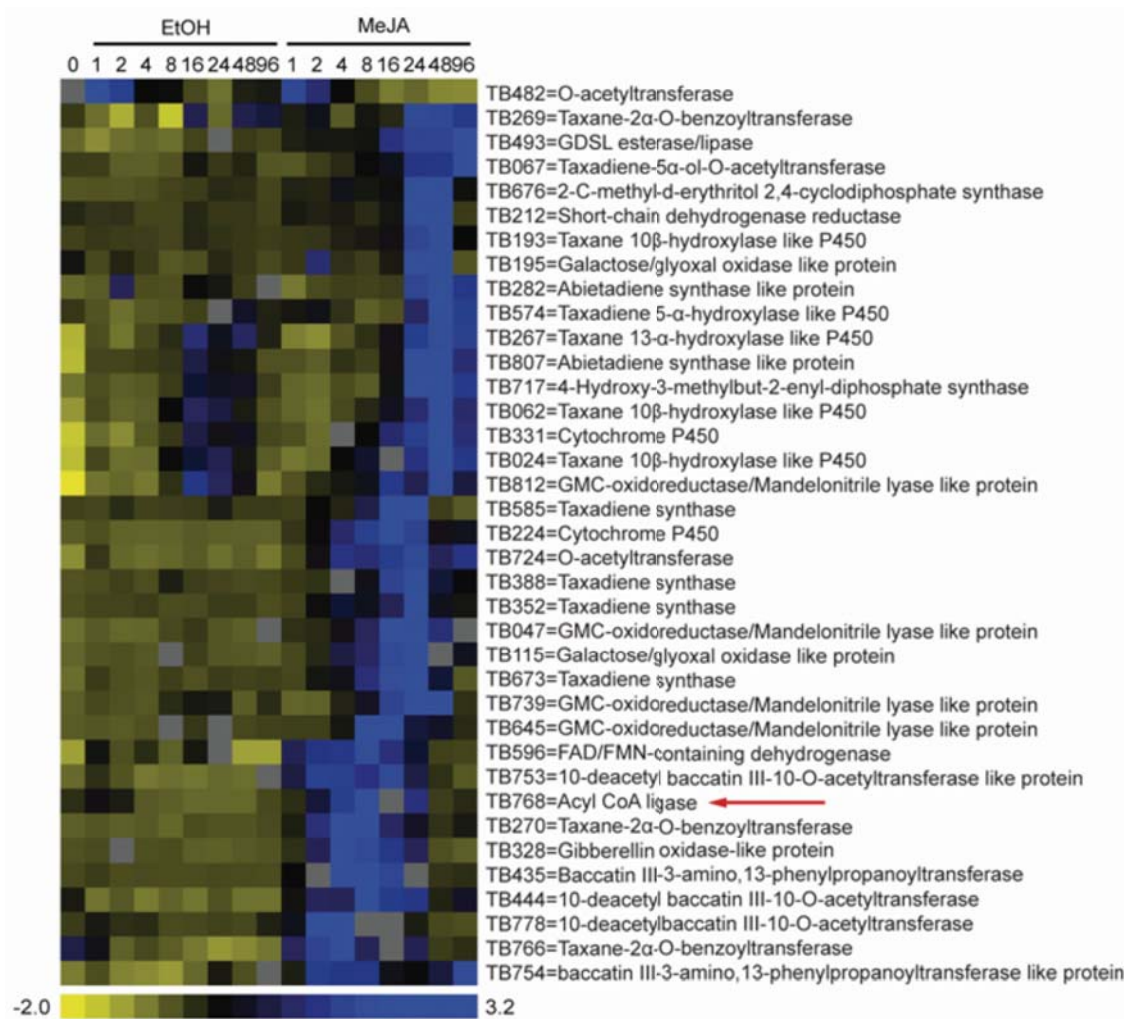


Figura 27. Perfiles de transcripción basados en los resultados del estudio de cDNA-AFLP de los cultivos celulares de *T. baccata*. Agrupación jerárquica de los tags identificados que presentan una expresión genética diferencial. En la parte superior se indica el tratamiento y momento de análisis (en horas). Los cuadrados azules y amarillos indican respectivamente, la activación o represión transcripcional, en relación con el nivel medio de expresión. Los cuadrados grises representan la falta de datos para ese punto. Se indican los subgrupos de los genes que codifican para las enzimas *T. baccata* conocidas y los posibles candidatos que catalizan la biosíntesis de taxol. El tag *TB768* está indicado con una punta de flecha roja a la derecha.

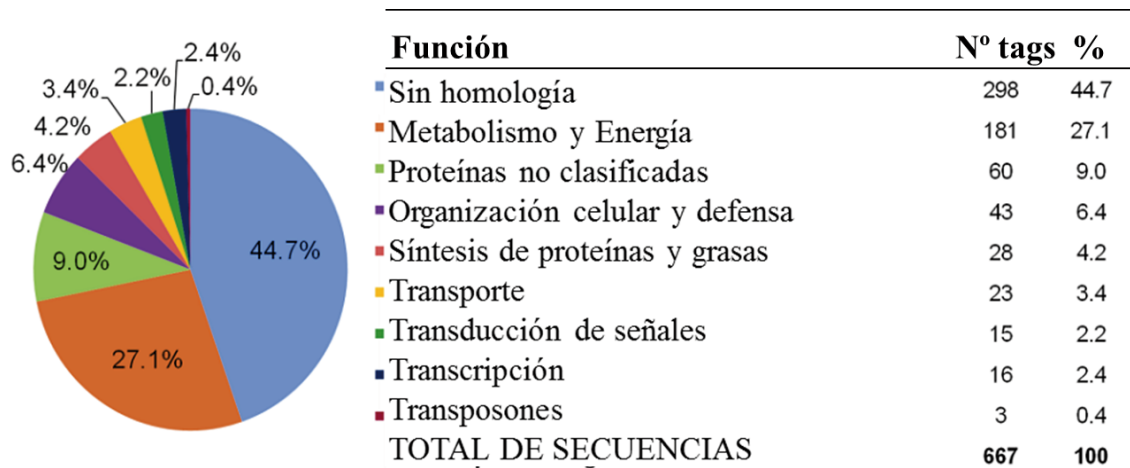


Figura 28. Tags secuenciados y agrupados en categorías funcionales de acuerdo a la clasificación FunCat.

El análisis de los perfiles de transcripción no genera una información directa acerca de la probabilidad de los tags detectados para estar involucrados en la biosíntesis de taxanos. Con el fin de priorizar los supuestos genes implicados en la ruta biosintética de taxanos y seleccionar los candidatos más probables (Tabla 9), se obtuvieron sus secuencias completas y fueron clasificados de acuerdo a su similitud con proteínas ya caracterizadas (Macie, Swissprot) que interactúan con sustratos similares a intermediarios de la biosíntesis de taxanos, considerando únicamente las posiciones que interactúan con dichos sustrato. El objetivo de este procedimiento fue centrar la comparación entre el modelo y el candidato en aquellos residuos que son determinantes de su especificidad y cuyo patrón evolutivo es poco probable que haya variado. Usando esta aproximación, se mapeó y determinó la conservación del sitio activo de 15 candidatos procedentes del estudio de cDNA-AFLP, agrupados en 5 categorías funcionales (CoA ligasa, C1 y 9 hidroxilasas, epoxidasa C4-C20, C9 oxidasa y oxomutasa) (Tabla 9).

Tabla 9. Lista completa de los genes candidatos agrupados según su función provisional en la ruta biosintética de taxanos: (Función hipotética), número del tag a partir del análisis de cDNA-AFLP (TAG), el mejor hit para el gen secuenciado completo (homología), número de acceso SwissProt para el mejor hit (código Prot. acc.) y valor-e de ese hit.

Función hipotética	TAG	Homología	Prot. código Acc.	Valor-e
CoA ligasa	TB768	Acyl-CoA ligasa	B9GQ39	0.0
	TB506	Cinnamato 4-hidroxilasa	B2Z6P5	0.0
C1 y C9 hidroxilasas	TB331	Putativa citocromo P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB574	Putativa citocromo P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB224	Putativa citocromo P450	D5A7Y6	1.0E-152
C4-C20 epoxidasa	TB328	Putativa giberelina 20-oxidasa	A9NW35	1.0E-45
	TB596	Desconocida (conteniendo una FAD/FMN- deshidrogenasa)	B8LR72	8.0E-87
C9 oxidasa	TB812	Desconocida (GMC oxidoreductasa)	A9NXU5	1.0E-151
	TB047	Desconocida (GMC oxidoreductasa)	A9NXU5	1.0E-109
	TB739	Desconocida (GMC oxidoreductasa)	A9NXU5	1.0E-148
	TB212	Desconocida (alcohol deshidrogenasa)	A9NU86	6.0E-91
	TB645	Desconocida (GMC oxidoreductasa)	A9NXU5	1.0E-158
Oxomutasa	TB493	Hipotética éster carboxílico hidrolasa	A9SVY3	1.0E-44
	TB195	Hipotética proteína (Glioxal oxidasa)	F6GTQ6	1.0E-164
	TB115	Hipotética proteína (Galactosa oxidasa)	D8RR64	1.0E-163

4.2.1 Expresión y análisis funcional del gen *TB768*

Como hemos indicado anteriormente, la producción de taxol y taxanos afines se mejoró substancialmente mediante la adición de elicitores a cultivos celulares de *Taxus* spp. (Bentebibel *et al.* 2005; Cusidó *et al.* 2002; Onrubia *et al.* 2013; Palazón *et al.* 2003; Sabater-Jara *et al.* 2014).

Sin embargo, una mejora adicional en la producción de este agente anticancerígeno depende de una mejor comprensión de su biosíntesis. Esto nos motivó a llevar a cabo un estudio profundo de los mecanismos moleculares que regulan el metabolismo secundario en los cultivos celulares de *Taxus* spp. Como ya se ha indicado, el análisis de las variaciones en el perfil transcriptómico de una línea celular de *Taxus baccata* elicitada mostró que todos los genes hasta ahora conocidos de la ruta del taxol aumentan su expresión tras la elicitación con MeJA, y el posterior tratamiento bioestadístico de los resultados nos ha permitido identificar con un elevado grado de certeza, posibles genes candidatos que codifican enzimas involucradas en los pasos desconocidos de esta ruta metabólica, incluyendo una CoA ligasa. Estos estudios han sugerido que uno de los genes candidatos más probables, el *TB768*, podría codificar una CoA ligasa, específicamente aquella que cataliza la activación de la β -fenilalanina para posteriormente ser añadida como cadena lateral en la posición C13 de BIII. Por tanto, este gen ha sido seleccionado para realizar estudios sobre su estructura, función y localización subcelular.

4.2.1.1 Análisis *in-silico* del gen candidato *TB768*

Con el fin de caracterizar mejor la proteína producto del gen *TB768*, en este trabajo se ha realizado un análisis *in silico* más profundo del gen utilizando distintas herramientas bioinformáticas

La secuencia proteica codificada por el gen *TB768* fue analizada con el programa Phyre2, el cual generó un modelo con casi un 100% de certidumbre (Fig. 29). Este modelo se comparó con la estructura terciaria de la proteína 3a9v, una CoA ligasa (4CL) de *Populus tomentosa* (Hu *et al.* 2010), que resultó ser la proteína experimentalmente descrita más homóloga a *TB768*. La comparación de los modelos 3D de ambas proteínas reveló un alto grado de semejanza (Fig. 30), corroborando de este modo a partir de su estructura 3D la posible función de *TB768* como una CoA ligasa.



Figura 29. Estructura terciaria de la proteína TB768, predicción y modelado por Phyre2.

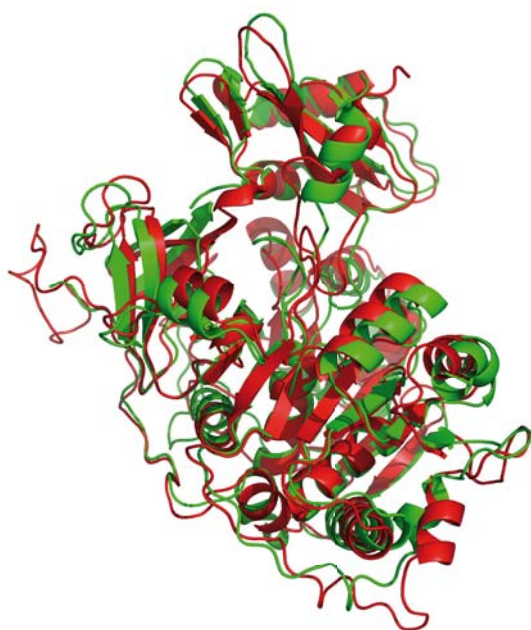


Figura 30. Comparación de las estructuras 3D entre la proteínas TB768 y 3a9V. En rojo se muestra la predicción de la proteína TB768 y en verde el modelo descrito experimentalmente para la 4CL de *Populus tomentosa* (3a9v).

En el alineamiento de la proteína TB768 con otras 4CL de plantas, se pudo observar que la similitud entre los aminoácidos es de entre 40-65% (Fig. 31). Las 4CL son dependientes de ATP para alcanzar su actividad óptima; todos los aminoácidos que son importantes para determinar la actividad catalítica de las 4CL de plantas (Hu *et al.* 2010) se encontraron conservados en la secuencia de la TB768 (Fig. 31 y 32); entre ellos se incluyen los que están implicados en la unión al AMP (QGYGLTE), los residuos específicos de la unión al AMP (Gly306, Ala307 y Tyr330); los aminoácidos con función catalítica

(Lys438, Gln443 y Lys523) y el residuo específico para la unión del CoA (Gly441). La distribución espacial de los dominios catalíticos de TB768 se obtuvo mediante la utilización del programa PyMOL (ver Fig. 32), en la que se puede observar la localización del sitio activo de la enzima, su posible sitio de unión a la CoA, así como el sitio de unión a AMP y el sitio de activación de acilo, todos ellos factores requeridos para el funcionamiento de las CoA ligasas vegetales.

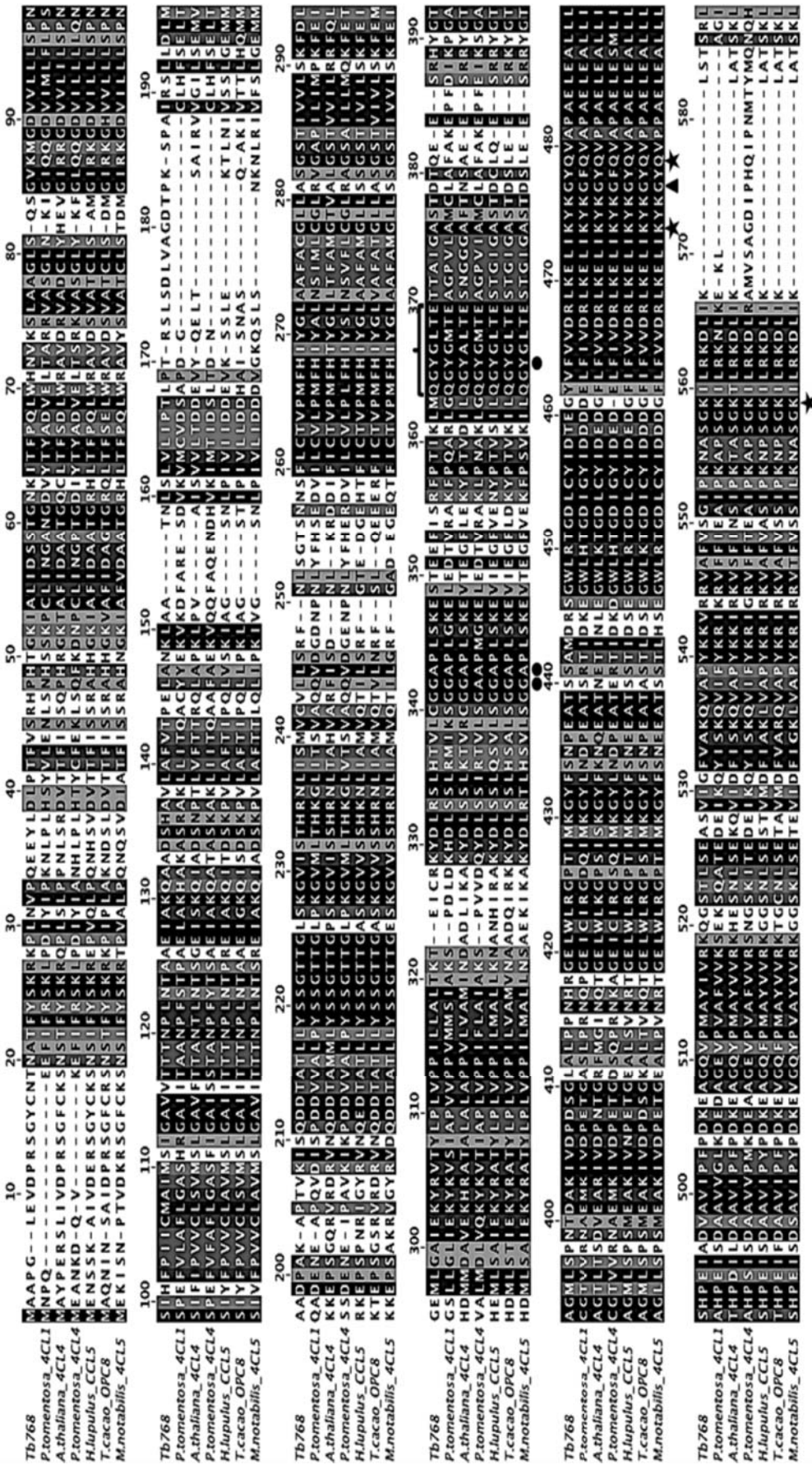


Figura 31. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la TB768 con otras 4CL conocidas de plantas. Las letras blancas en fondo negro son los residuos completamente conservados, los conservados en menor proporción se indican con tonos de grises. Los residuos con función catalítica están indicados con estrellas (Lys438, Gln443, Lys523), el aminoácido específico para la unión al CoA está indicado con un triángulo (Gly441). Dentro de los residuos involucrados en la unión al AMP, están indicados, Gly306, Ala307 y Tyr330 con círculos, aminoácidos específicos para la unión.

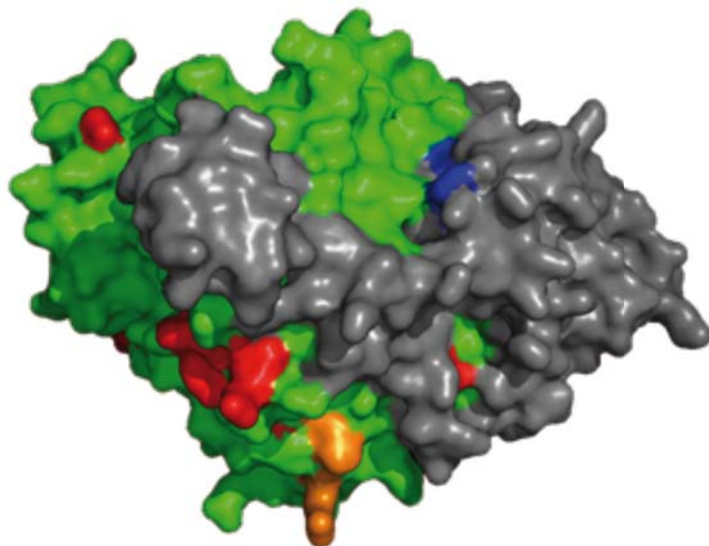


Figura 32. Predicción de dominios catalíticos de CoA ligasa en la proteína TB768. El sitio activo está indicado en verde, en naranja el posible sitio de unión a CoA, en rojo el sitio de unión al AMP y en azul el sitio de activación de acilo.

4.2.1.2 Expresión de la proteína recombinante del gen *TB768*

Como ya se ha indicado, la activación de la β -fenilalanina con CoA, se produce como un paso previo, antes de la unión de la cadena de fenilalanina al esqueleto de taxano (Croteau *et al.* 2006) (Fig. 26), un paso que está catalizado por una enzima hasta ahora desconocida. El gen seleccionado para ser el mejor candidato a este paso *TB768*, se clonó en un vector de expresión bacteriano (pDEST14®) compatible con la tecnología Gateway (Invitrogen™). Este plásmido, se probó en 2 cepas de *E. coli* con diferentes temperaturas y concentraciones de la molécula inductora IPTG, para así evaluar las mejores condiciones para la expresión de la proteína TB768. La cepa que ofreció mejores resultados fue la *E. coli* BL21 DE3 pLyss, a todas las concentraciones de IPTG y todas las temperaturas probadas (37, 28 y 16°C) fue capaz de producir una proteína de 59 kDa que corresponde al peso molecular asignado a TB768 deducido de su secuencia de aminoácidos (Fig. 33).

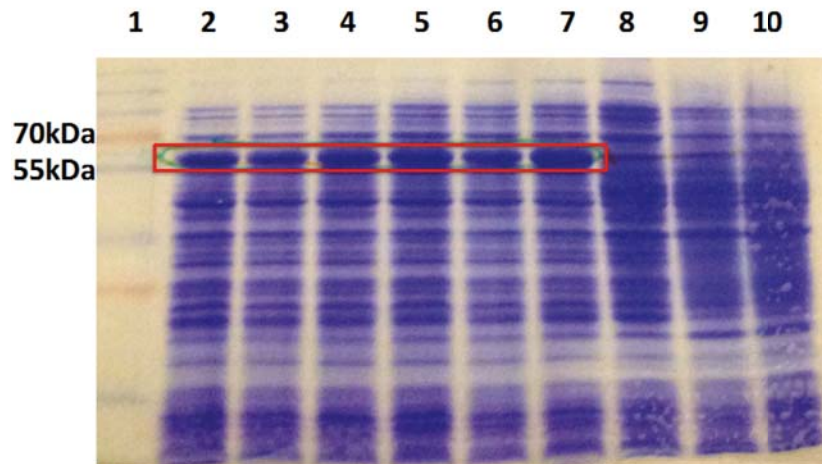


Figura 33. Imagen de SDS-PAGE de los extractos proteicos de *E. Coli* BL21 pLyss pDEST-TB768 inducidos con IPTG a 28°C. 1) Marcador de peso molecular preteñido; PageRuler Plus (Thermo Fisher Scientific), se indican las bandas de 70 kDa y 55 kDa. Concentraciones de IPTG utilizadas para inducir: 2) 1mM, 3) 0,8mM, 4) 0,6mM, 5) 0,4mM, 6) 0,2 mM, 7) 0,1mM; 8) sin IPTG, 9) WT sin IPTG, 10) WT con 1mM IPTG. El recuadro en rojo muestra la proteína expresada.

Las pruebas de solubilidad indicaron que TB768 se inducía correctamente con 0,1 mM de IPTG a todas las temperaturas ensayadas, sin embargo, la proteína siempre se mantuvo en el sedimento, dificultando su aislamiento posterior sin dañar las características nativas de la enzima (Fig. 34).

Debido a los problemas que representó la expresión de TB768 en *E. Coli*, la baja solubilidad de la proteína formada y la dificultad de su posterior aislamiento y purificación, se decidió cambiar a un organismo vegetal para lograr la producción de dicha proteína. El gen TB768 se clonó mediante recombinación en el vector para plantas pEarlyGate203N-Myc, y el plásmido resultante pEarlyGate203-TB768, se introdujo en una cepa patógena de *A. tumefaciens*, con la que se transformaron las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana*. Dentro del plásmido pEarlyGate203-TB768 el gen TB768 posee fusionado al extremo que corresponde al N-terminal la etiqueta Myc (Myc-tag), con el propósito de favorecer su purificación. La proteína soluble expresada

ectópicamente se purificó con perlas que unen el Myc-tag y se eluyó a pH neutro para mantener la actividad de la enzima. La proteína de 59 kDa aislada, se concentró cuatro veces y se visualizó mediante análisis inmunoblot (Fig. 35). Esta proteína purificada que mantiene su estructura nativa es la que se ha utilizado para el estudio de la funcionalidad de gen *TB768*.

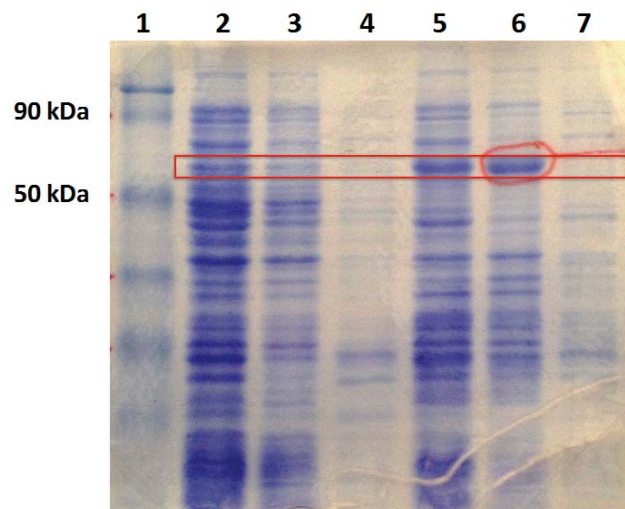


Figura 34. Imagen de SDS-PAGE de lisados bacterianos inducidos con 0,1mM de IPTG a 28°C, separando el sedimento del sobrenadante. 1) Marcador de peso molecular preteñido (Fermentas). Se indican las bandas de 90 kDa y 50 kDa. 2) Control negativo sin inducir, ni lisar. 3) Control negativo sedimento. 4) Control negativo sobrenadante. 5) pDEST14-TB768 sin lisar. 6) pDEST14-TB768 sedimento. 7) pDEST14-TB768 sobrenadante. El recuadro en rojo muestra el sitio donde se espera la banda de 59 kDa correspondiente a TB768.

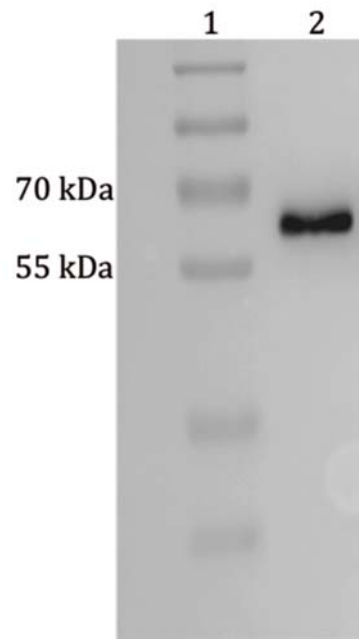


Figura 35. Inmunoblot de la proteína TB768 purificada y concentrada, imagen obtenida por quimioluminiscencia. 1) Marcador de peso molecular preteñido; PageRuler Plus (Thermo Fisher Scientific) indicándose las bandas de 70 kDa y 55 kDa. 2) Proteína TB768 purificada y concentrada (200 ng), mostrando una única banda con un peso molecular de 59 KDa.

4.2.1.3 Análisis funcional de la proteína codificada por el gen *TB768*

Las enzimas que forman ésteres de CoA con los ácidos cinámicos se conocen como 4-cumarato-CoA ligasas (4CLs; EC 6.2.1.12) (Allina *et al.* 1998). En angiospermas y gimnospermas, los genes que codifican estas enzimas forman parte de una familia multigénica con miembros regulados diferencialmente, los cuales pueden formar parte de diferentes procesos metabólicos, aunque todos ellos activan una gama de sustratos muy similares (Hamberger y Hahlbrock 2004). Docimo *et al.* (2013) han indicado que en varias especies vegetales, los miembros de la familia 4CL muestran un patrón de expresión variable y diferente especificidad por el sustrato. En arroz, el perfil de expresión de los

cinco genes *4CL* conocidos difieren en función del tejido, etapa de desarrollo y en respuesta al estrés, y todas las enzimas codificadas muestran propiedades cinéticas distintas en función del sustrato. En *Populus tremuloides*, se han determinado dos isoformas de 4CL, una participa principalmente en la formación de lignina y la otra en la biosíntesis de los derivados fenilpropanoides (Hu *et al.* 1998). En la mayoría de las plantas estudiadas, la actividad de las isoformas conocidas de 4CL se asocia tanto con la biosíntesis de lignina como de flavonoides, aunque pueden utilizar diferentes sustratos con eficiencias variables. Lindermayr y colaboradores (2002) determinaron la presencia de cuatro isoenzimas 4CL en *Glycine max*, cada una codificada por un solo gen, con diferente especificidad por el sustrato. Pero hasta la fecha no se ha caracterizado ningún gen que codifique para una 4CL en *Taxus spp.*

Para realizar el ensayo de actividad enzimática *in vitro* de TB768 proteína candidata para ser una 4CL de *Taxus spp.*, se utilizaron 2 posibles sustratos: la β -fenilalanina y el ácido 4-cumárico, ambos compuestos presentan estructuras similares, si bien la β -fenilalanina es un precursor de la biosíntesis de taxanos, mientras que el ácido 4-cumárico participa en la ruta de los ácidos cinámicos. Los dos compuestos se adicionaron por separado a la mezcla de reacción que contenía: la proteína purificada TB768, ATP, $MgCl_2$ y el cosustrato CoA (Fig. 36). Los productos de la reacción se detectaron por HPLC-espectrometría de masas (MS/MS).

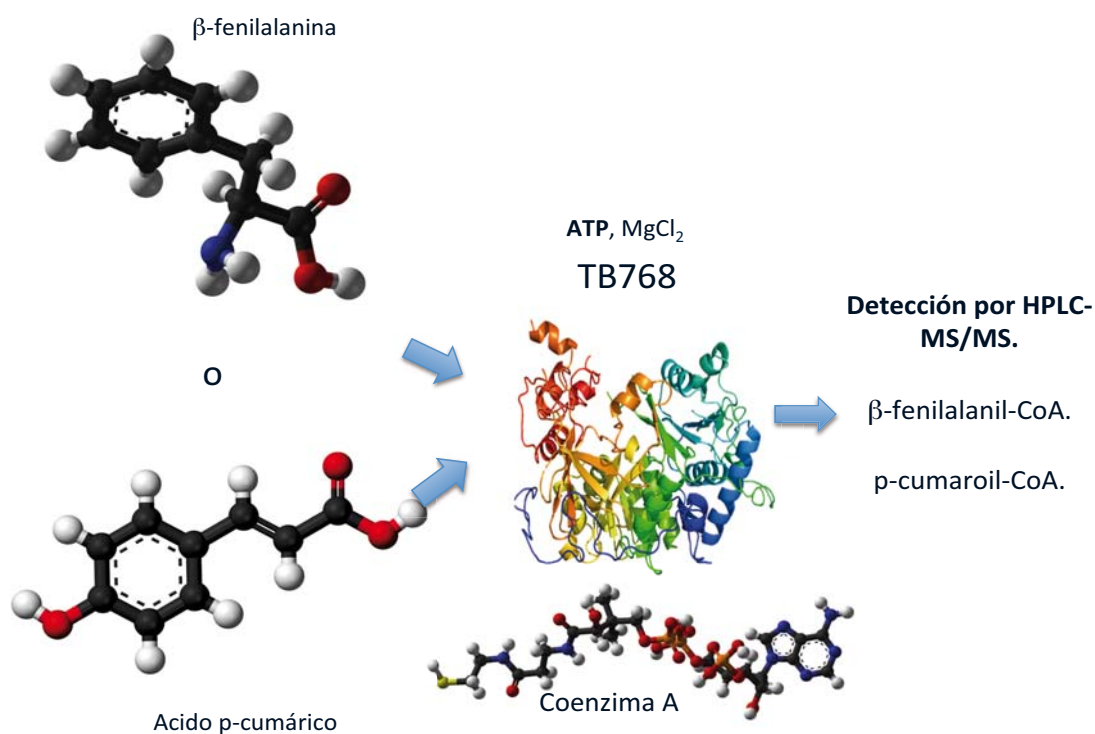


Figura 36. Esquema de la reacción catalizada por la enzima codificada por el gen *TB768*.

Los resultados obtenidos, demostraron que la proteína TB768 era capaz de catalizar la esterificación con CoA de ambos sustratos; tanto de la β -fenilalanina como del ácido 4-cumárico. Los respectivos productos catalíticos se identificaron por su tiempo de retención y el patrón de fragmentación de la molécula en comparación con los estándares. La identidad de las moléculas de β -fenilalanil-CoA (m/z 916,2, tiempo de retención: 3,93 min) y 4-coumaril-CoA (m/z 914,3, tiempo de retención: 3,95 min) (Anexo Fig. 3) fue confirmada por MRM (Multiple Reaction Monitoring) (Fig. 37), técnica que se basa en la previa fragmentación de los estándares y la selección de iones moleculares y los fragmentos derivados de estos que poseen la más alta intensidad (Anexo Fig. 4). Paralelamente se llevó a cabo un ensayo control sin la enzima, donde no se detectaron los iones correspondientes a los productos acil-CoA (Fig. 37). Estos resultados confirman el gen *TB768* codifica para una acil-CoA ligasa que transforma la β -fenilalanina en su respectivo éster CoA y que podría estar

implicada en la biosíntesis del taxol. Esta enzima no es específica, ya que también puede aceptar otros sustratos, tales como ácido 4-cumarico. El hecho de que el producto del gen *TB768* active tanto a la β -fenilalanina como al 4-cumarato, quienes comparten una estructura química muy similar, indica que esta enzima pertenece a la familia 4CL, ya que estas enzimas pueden utilizar más de un sustrato de diferentes procesos metabólicos, pero con estructuras muy similares (Hamberger y Hahlbrock 2004).

Para hacer los análisis de cinética enzimática, fue necesario calcular el coeficiente de extinción molar en el tampón de reacción, resultando para la β -fenilalanil-CoA un valor de ϵ 315nm de 3421 mM/cm, y para el 4-coumaril-CoA ϵ 336nm de 3585 mM/cm. Para cada sustrato se calculó la actividad específica de la enzima purificada, resultando un valor de 102,309 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para β -fenilalanina, y de 617,76 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para el ácido 4-cumárico. Estos resultados sugieren una mayor afinidad de la proteína *TB768* por el ácido 4-cumárico, un hecho que podría deberse al mayor volumen de la β -fenilalanina en relación a este compuesto, debido a la presencia del grupo amino adicional que presenta la β -fenilalanina en la cadena alifática unida al anillo bencénico.

En su conjunto los resultados obtenidos indican que el gen estudiado, *TB768*, codifica para una proteína capaz de formar ésteres de CoA con β -fenilalanina y con 4-cumarato; esta proteína se ha nombrado como β -fenilalanina CoA ligasa (TBPCCL) y es la primera acil-CoA ligasa caracterizada para *T. baccata*. Como se ha descrito anteriormente en otras especies de plantas, probablemente *Taxus spp.* también posea más de un gen que codifique para 4CL, con un patrón de expresión variable y diferente especificidad de sustrato. Esto también se apoya con los previos estudios del transcriptoma en el que se identificó un segundo gen que posiblemente codifique para otra 4CL (*TB154*), dicho gen mostró una cinética de expresión distinta en comparación con el gen *TB768* y los genes de la síntesis de taxanos, y por lo tanto, debido a la falta de correulación, no fue considerado para su análisis (Onrubia 2012).

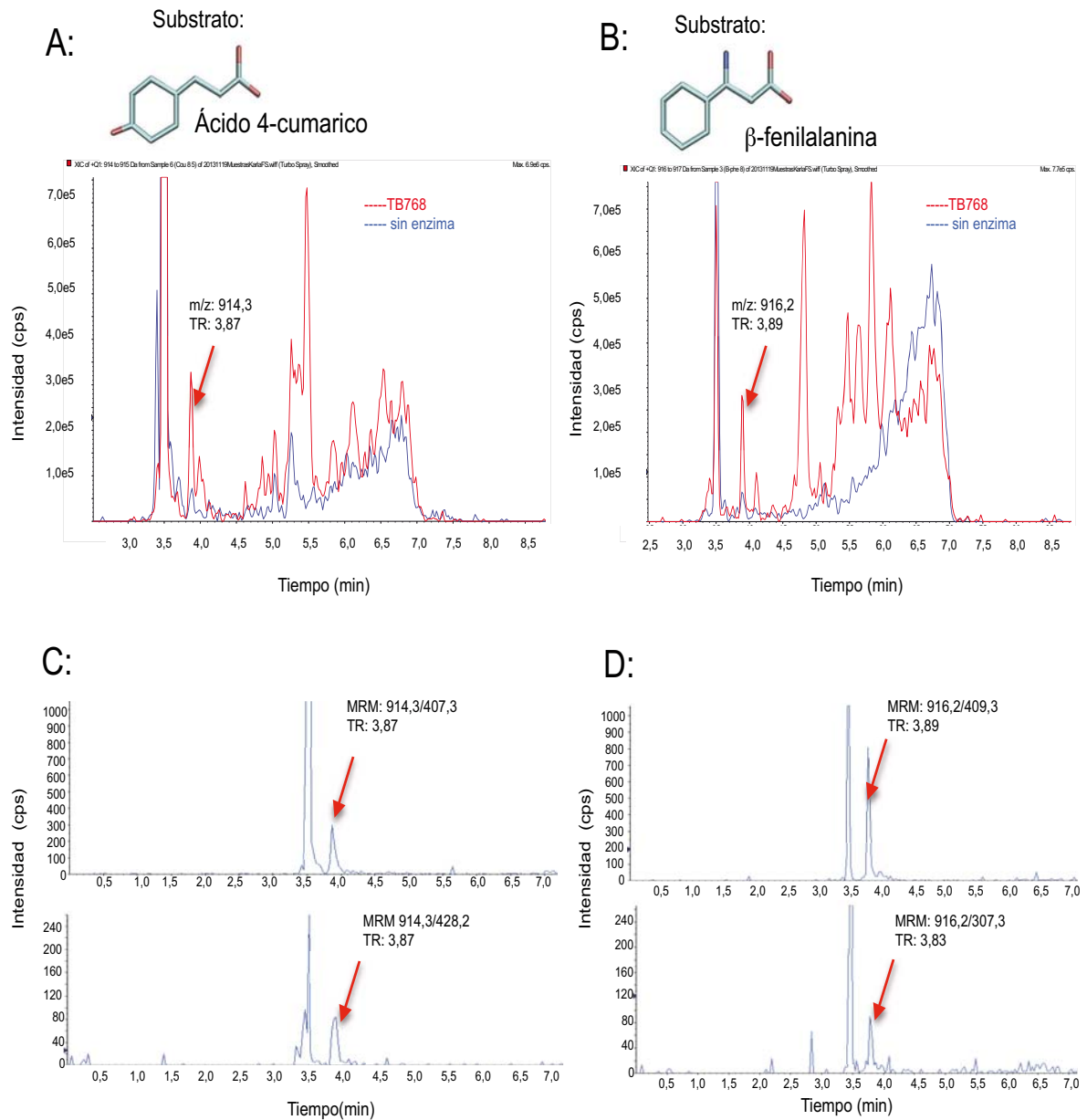


Figura 37. Análisis por HPLC-MS/MS del ensayo de actividad *in vitro* de la proteína TB768. Cromatograma de extracción de iones para los sustratos **A:** ácido 4-cumárico y **B:** β-fenilalanina. La línea roja corresponde al ensayo con la proteína TB768 añadida y la azul al control sin enzima, las flechas indican el pico que corresponde al ion molecular de cada producto con su respectivo tiempo de retención (TR: 3,87 min para el 4-cumaroil-CoA, 3,89 min para la β-fenilalanoil-CoA). Análisis MRM de los productos de reacción en los ensayos con **C:** ácido 4-cumárico y **D:** β-fenilalanina. Las flechas indican el pico al correspondiente TR de los dos fragmentos específicos para cada compuesto utilizados para confirmar su identidad (914,3/407,3 y 914,3/428,2 para el 4-cumaroil-CoA con un TR: 3,87 min; 916,2/409,3 y 916,2/307,3 con un TR: 3,89 min para la β-fenilalanin-CoA).

La baja especificidad de TBPCCL podría llevarla a actuar sobre más sustratos, y así la activación del ácido 4-cumárico conduciría a la formación de flavonoides y ligninas mientras la formación de β -fenilalanin-CoA facilitaría su incorporación en la cadena lateral que está unida al C13 del anillo del taxol, y cuyo papel es esencial para la actividad anticancerígena de este compuesto (Kingston 2000). Después de que la cadena lateral se une a la BIII, un paso mediado por la enzima BAPT, sólo son necesarios dos pasos más, una hidroxilación y una benzoilación, para obtener el taxol. Anteriormente se había demostrado que los pasos más limitantes en la biosíntesis de taxol se encuentran al final de la ruta, después de la formación de la DAB (Cusidó *et al.* 2014). La identificación del gen *TBPCCL*, junto con la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica, podría contribuir a la creación de cultivos celulares de *Taxus* capaces de sobreexpresar dicho gen y que podrían resultar altamente productores de taxol y taxanos relacionados. También el incremento en el conocimiento básico de la ruta biosintética del taxol, puede facilitar su semisíntesis a través de la biología sintética en sistemas heterólogos.

4.2.2. Localización subcelular de la biosíntesis de taxanos

Otro aspecto interesante de la biosíntesis de taxol que necesita ser investigado es la localización subcelular de algunos de los pasos enzimáticos. El anillo taxadieno se forma en los plastos, debido a que el precursor diterpenico de este compuesto se forma mayoritariamente a través de la vía metabólica del metileritritol 4-fosfato (MEP) (Palazón *et al.* 2003). Los pasos de hidroxilación que requieren enzimas del grupo CytP450, usualmente ocurren en la fracción microsomal, pero hasta la fecha no ha sido determinado el compartimiento subcelular en el que ocurre la activación de la β -fenilalanina por la CoA. Parece por ello que en la formación del taxol y otros taxanos estarían implicados diferentes compartimentos celulares existiendo un flujo de precursores/intermediarios a través de estos orgánulos. Con el propósito de obtener mayor información de la localización subcelular de la biosíntesis de

taxanos se realizó un estudio bioinformático basado en las secuencias de los genes conocidos hasta el momento, que participan en la biosíntesis de estos compuestos. Este estudio se ha complementado con la determinación experimental de la localización subcelular de la proteína TBPCCL.

Tabla 10. Estudio bioinformático de la localización subcelular de los pasos de la biosíntesis de taxol. Se indica la enzima, en que parte de la ruta se encuentra y si posee los péptidos o dominios que la dirijan a algún compartimento celular.

Paso en la biosíntesis de taxol	Enzima. Número de acceso Gene Bank	Péptido de tránsito de cloroplastos	Péptido señal	Dominios transmembrana	Localización subcelular
Inicio	TXS AY424738.1	✓	X	X	Cloroplastos
Hidroxilaciones	5 α -hidroxilasa AY289209.2	X	X	✓	Fracción microsomal
	2 α -hidroxilasa AY518383.2	X	X	✓	Fracción microsomal
	7 β -hidroxilasa AY518383.2	X	X	✓	Fracción microsomal
Vía alterna de hidroxilaciones	13 α -hidroxilasa AY959321.1	X	X	✓	Fracción microsomal
	10 β -hidroxilasa JQ029684.1	X	X	✓	Fracción microsomal
Intermedios	T5 α -O- acetiltransferasa Q9M6F0.1	X	X	X	Citoplasma
Final	TBT AF297618 DBAT AF456342.1 BAPT AY563630.1 DBTNBT AY563629.1	X	X	X	Citoplasma
		X	X	X	Citoplasma
		X	X	X	Citoplasma
		X	X	X	Citoplasma
		X	X	X	Citoplasma

Para el análisis *in silico*, se utilizaron las herramientas bioinformáticas ChloroP V1.1 (Emanuelsson, *et al.* 1999), SignalP V4.1 (Petersen *et al.* 2011), TargetP V1.1 (Emanuelsson *et al.* 2000) y TMHMM V2.0 (Sonnhammer *et al.* 1998). Con estos programas y con el objetivo de validar la fiabilidad del método bioinformático utilizado, se corroboró la localización subcelular de las enzimas conocidas de la biosíntesis del taxol y de las cuales se dispone la información experimental de su citolocalización, así mismo se analizaron las secuencias de las enzimas que están caracterizadas pero de las cuales no se ha descrito su localización subcelular (Tabla 10).

La biosíntesis del taxol implica 19 pasos enzimáticos a partir del precursor universal de diterpenos geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). La TS es la enzima que cataliza la ciclación de este compuesto en el intermediario taxadieno, en el primer paso específico de la síntesis del taxanos. La TS, al igual que su sustrato, se encuentra en plastos (Davis y Croteau 2000). El análisis bioinformático realizado corrobora que esta enzima posee en su secuencia un péptido de tránsito que la dirige a dicho compartimiento celular (Fig. 38, Tabla 10).

Los siguientes pasos de la ruta metabólica son hidroxilaciones en los carbonos del esqueleto del taxano, las enzimas involucradas pertenecen al grupo de los CytP450, y se localizan en la fracción microsomal (Croteau *et al.* 2006). El estudio bioinformático realizado corrobora que las hidroxilasas de la síntesis de taxanos, poseen dominios transmembrana (Fig. 39) y dada su naturaleza de CytP450 se localizan en las membranas del retículo endoplasmático (Tabla 10). Los pasos intermedios conocidos (acil y aroil transferasas) y las últimas etapas etapas de la biosíntesis del taxol hasta ahora descritas (unión de la cadena lateral) están catalizados por enzimas que carecen de péptidos o dominios que las dirijan hacia algún orgánulo, por lo que de acuerdo con los resultados de este estudio se sugiere que estos pasos estarían catalizados por enzimas que se encuentran libres en el citosol. (Tabla 10, Fig. 40). En cuanto a la activación de la β -fenilalanina por la CoA, mediante la acción de TBPCCL hasta la fecha no ha sido determinado, el compartimiento subcelular en el que ocurre.

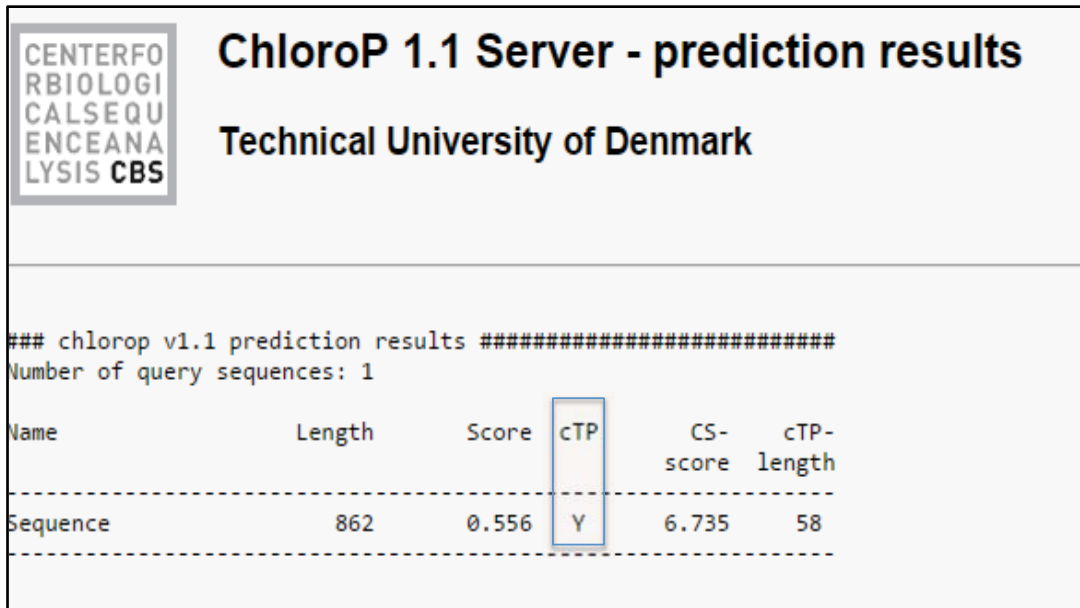


Figura 38. Pantalla desplegada por el programa ChloroP 1.1 mostrando en el recuadro azul, que la proteína TS contiene el péptido de tránsito de cloroplastos, cTP (Yes).

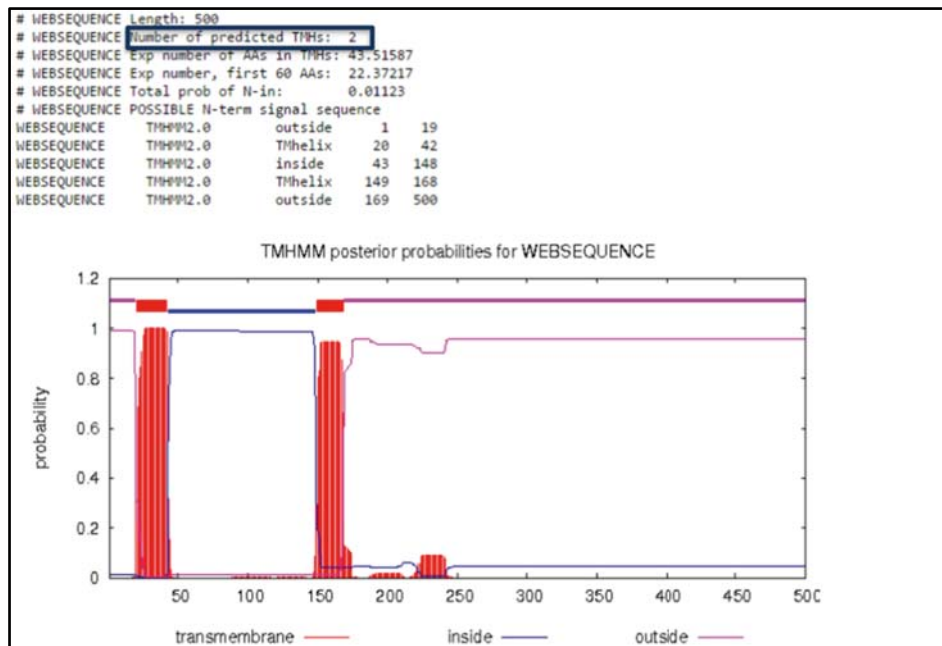


Figura 39. Pantalla desplegada por el programa TMHMM 1.1 mostrando, en rojo dos posibles dominios transmembrana de la proteína T7 β OH. En azul los aminoácidos dentro de la membrana y en magenta los aminoácidos fuera.

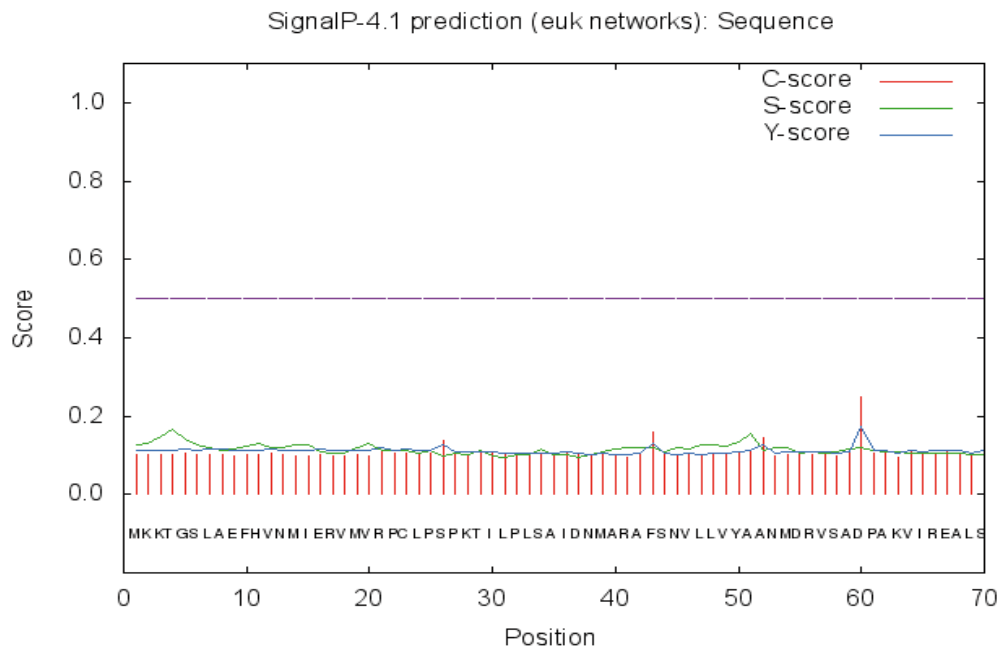


Figura 40. Pantalla desplegada por el programa Signal peptide 4.0 mostrando la ausencia de péptido señal en la proteína BAPT. La gráfica plana indica que no hay aminoácidos que puedan corresponder a un péptido de señalización, lo cual sugiere una localización citosólica.

4.2.2.1. TBPCCL es una enzima citosólica

En relación con la localización subcelular de TBPCCL, el análisis con la herramienta bioinformática SignalP V4.0 (Petersen *et al.* 2011) predijo que esta proteína carecía de péptido señal de localización (Fig. 41), lo cual sugiere que la enzima se encuentra en el citosol.

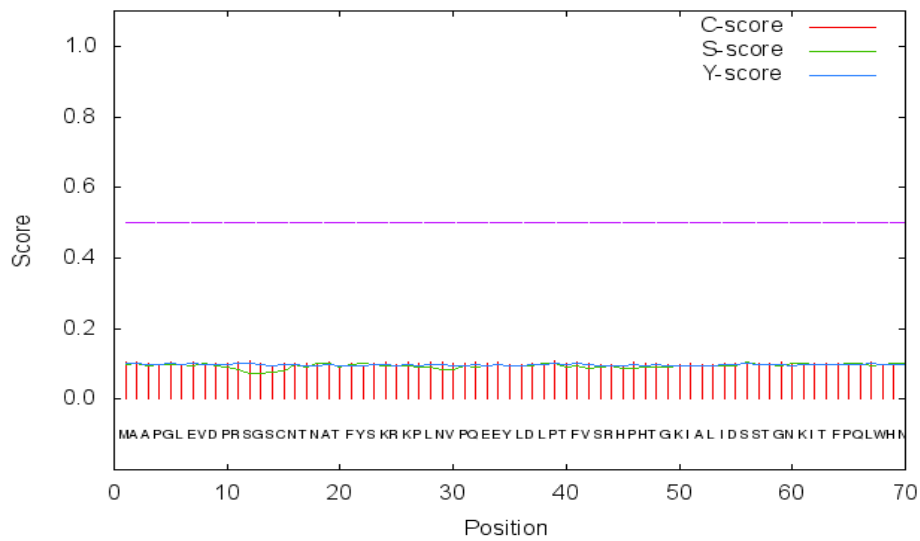


Figura 41. Pantalla desplegada por el programa Signal peptide 4.0 mostrando la ausencia de péptido señal en la proteína TB768. La gráfica plana indica que no hay aminoácidos que puedan corresponder a un péptido de señalización, lo cual sugiere una localización citosólica.

Para confirmar experimentalmente estos resultados, el gen *TB768* fue fusionado en el C-terminal a la yellow fluorescent protein (YFP) en el vector pEarlyGate101. El plásmido resultante se expresó transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, que posteriormente se observaron en el microscopio confocal de fluorescencia. El análisis de microscopía mostró la señal de la TB768-YFP como una banda gruesa en la periferia de la célula. Puesto que las células vegetales presentan en su mayoría una gran vacuola que comprime el citoplasma y sus orgánulos hacia la periferia celular (Onrubia *et al.* 2014a), los resultados obtenidos indicarían que la TBPCCL tanto podría estar situada en la membrana plasmática como en el citosol ya que presenta un patrón de expresión parecido al de la proteína libre citosólica YFP (Fig. 42).

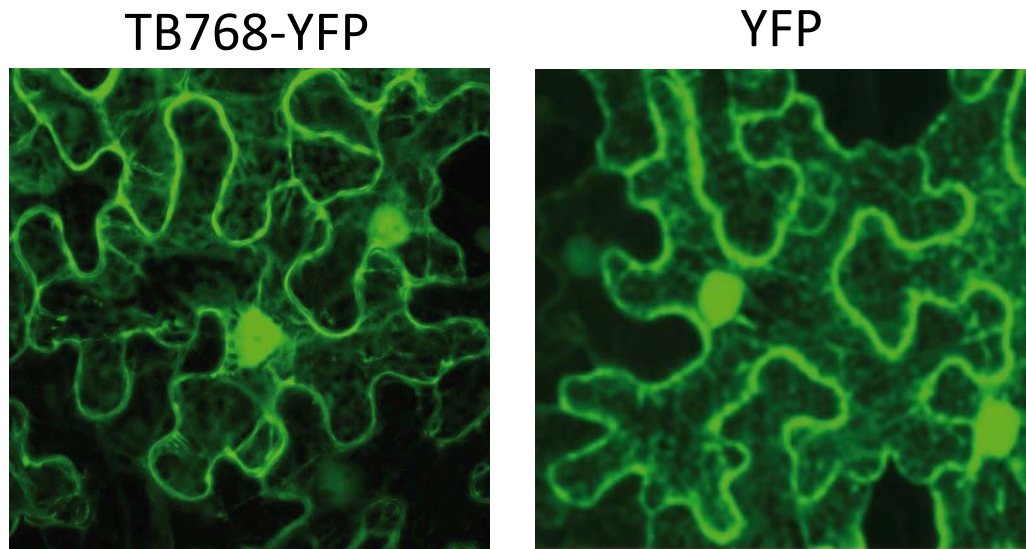


Figura 42. Análisis de microscopía confocal de la proteína TB768-YFP y la YFP libre en hojas de *N. benthamiana*.

Para discernir la exacta localización subcelular de la proteína TBPCCL, las paredes celulares de las hojas de *N. benthamiana* transfectadas con el gen *TB768-YFP* se tiñeron con yoduro de propidio (IP) antes del análisis confocal. Los resultados mostraron que la señal correspondiente al IP se encontraba separada de la señal de TB768-YFP, lo cual indica que esta proteína posee un patrón de expresión citosólico, tal como sugerían los estudios bioinformáticos (Fig. 43).

Una técnica que permite estudiar la movilidad de las proteínas en el interior de las células es la “Recuperación de la Fluorescencia después de un Fotoblanqueado” (FRAP). Cuando una proteína fusionada a la YFP es expuesta durante unos segundos a un rayo láser de alta intensidad, se destruye el fluoróforo de manera irreversible en la región de interés (ROI). Inmediatamente después, las proteínas fluorescentes no dañadas que se encuentran más próximas son capaces de migrar a la zona “quemada” recuperándose la fluorescencia en esa área. Las proteínas que se encuentran libres en el citoplasma tienen tasas altas de recuperación de la fluorescencia, ya que tienen una movilidad superior a aquellas que están inmersas en las membranas (Held *et al.* 2008; Wu *et al.* 2006). La aplicación de esta técnica a

las células de *N. benthamiana* que expresaban la fusión TB768-YFP demostró la casi completa recuperación de la fluorescencia al cabo de pocos segundos (Fig. 44), casi en la misma medida que el control de la GFP libre. Estos resultados confirman la localización citosólica de la proteína TBPCCL y sugieren, junto a los obtenidos en los estudios bioinformáticos que los últimos pasos de la ruta biosintética de taxanos se desarrollan en el citoplasma de las células de *Taxus* spp. (Fig. 45).

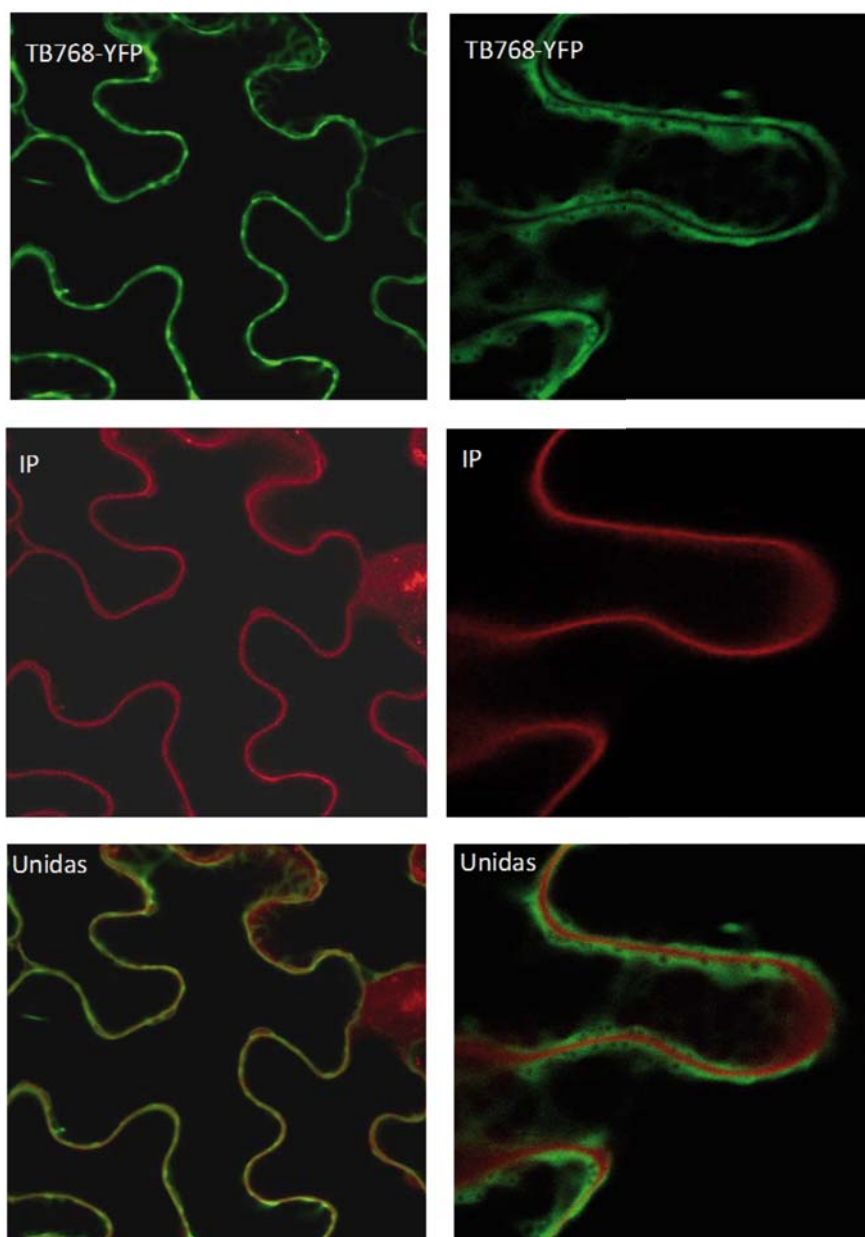


Figura 43. Expresión de la proteína fusionada TB768-YFP en hojas de *N. benthamiana* preteñidas con IP.

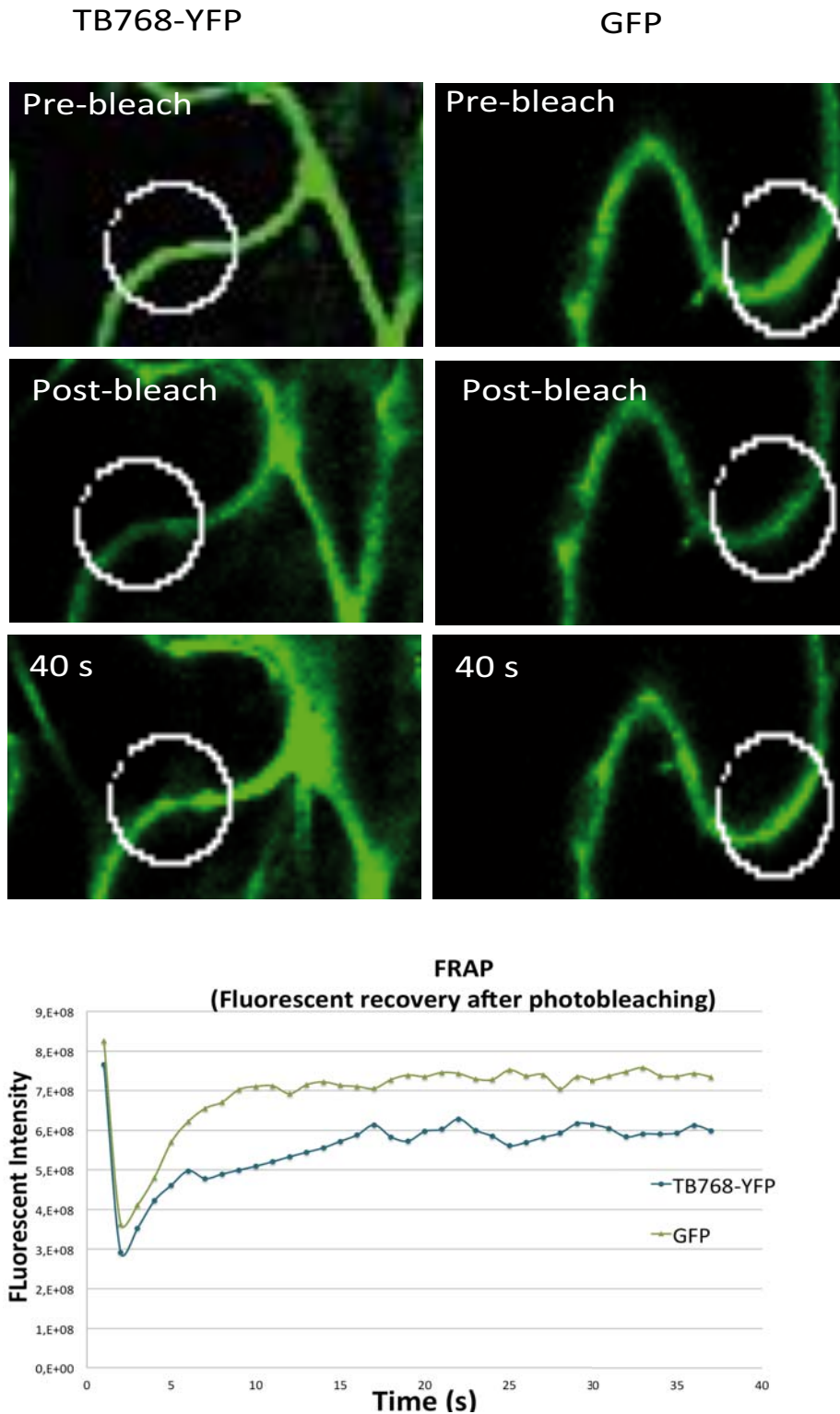


Figura 44. Análisis FRAP por 40 segundos donde se muestra la rápida recuperación de la fluorescencia de la fusión TB768-YFP y la GFP libre después del tratamiento con rayos láser de alta intensidad.

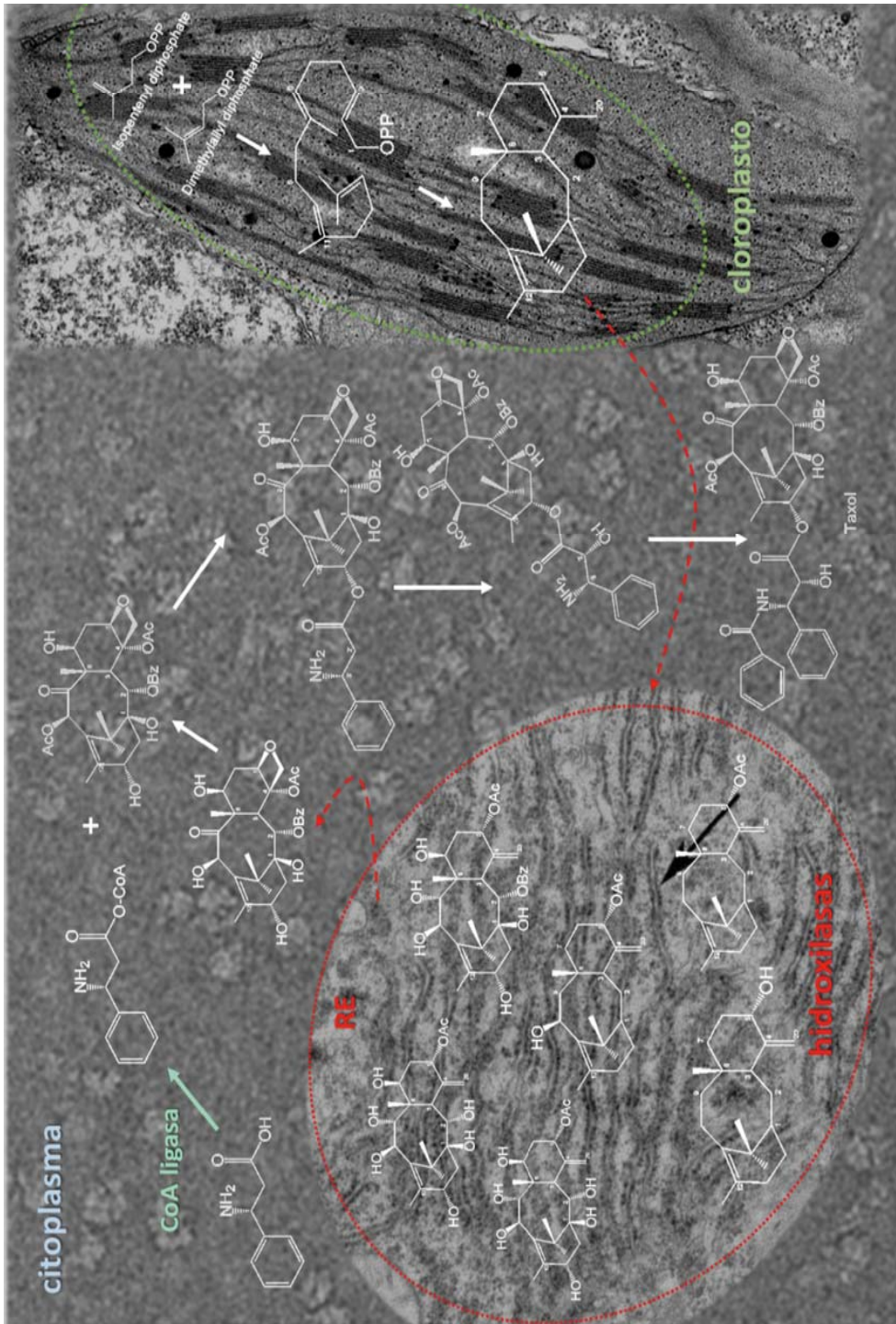


Figura 45. Localización subcelular de los pasos de la biosíntesis de taxanos.

Considerados en su conjunto, los resultados de este estudio confirman que los estudios de transcriptómica combinados con el análisis *in silico* de los candidatos mejor posicionados representan un eficaz juego de herramientas para profundizar en el conocimiento del metabolismo secundario vegetal, si bien se requieren estudios posteriores de expresión y análisis funcional de los genes candidatos para confirmar las predicciones *in silico*. En nuestro caso y aunque previamente se habían realizado otros estudios transcriptómicos con *Taxus* spp. (Tabla 5), por primera vez se ha descubierto un nuevo gen de la ruta de taxanos mediante una aproximación ómica y por ello, constituye un paradigma para este género vegetal. Por otro lado, los resultados de este estudio también confirman la utilidad de los cultivos celulares elicitados de *Taxus* spp. para avanzar en el conocimiento de la ruta biosintética de taxanos y su regulación.

5. Conclusiones

El objetivo fundamental de este estudio ha sido el desarrollo y optimización de nuevos sistemas biotecnológicos para la producción de taxanos, así como, profundizar en el conocimiento sobre la biosíntesis de estos compuestos y su regulación utilizando para ello, los cultivos celulares de *Taxus spp.* elicitados. Una vez finalizado nuestro estudio, el análisis y discusión de los resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- I. Con el propósito de optimizar la capacidad de crecimiento de los callos y suspensiones celulares de *Taxus globosa* se han ensayado diferentes medios de cultivo con distintas concentraciones hormonales. Los resultados obtenidos demuestran que el WPM adicionado de Pic 2 mg/L, Kin 0,1 mg/L y GA3 0,5 mg/L, constituye un medio de elección para estos cultivos.
- II. En condiciones optimizadas de crecimiento, es durante la fase estacionaria del cultivo, cuando las células de *T. globosa* producen los niveles más elevados de taxanos que mayoritariamente se acumulan intracelularmente, aunque en niveles inferiores a los alcanzados por otros cultivos celulares de *Taxus spp.*
- III. En un sistema en dos fases, los cultivos celulares de *T. globosa* se han elicitado con coronatina y β -metilciclodextrina y los resultados se han comparado con los obtenidos con una línea celular de *T. media*. Los resultados confirmaron la baja capacidad productiva de los cultivos en condiciones control (no elicitados) y la efectividad de los elicitores para incrementar la producción en ambas especies. Además, también se ha confirmado, la capacidad de las ciclodextrinas para provocar la liberación de taxanos al medio de cultivo.
- IV. De los tratamientos de elicitación ensayados, la combinación de coronatina y β -metilciclodextrina ha demostrado ser el más efectivo, activando en mayor medida la producción de taxanos que los tratamientos de elicitación individuales.
- V. En condiciones inductivas, nuestro estudio ha demostrado una respuesta superior a la elicitación de los cultivos de *T. media*, en relación a los de *T. globosa*. A la vez, el patrón de taxanos que se han

- obtenido en ambos sistemas también ha resultado ser diferente. Este hecho confirma que el perfil de acumulación de taxanos en respuesta a la elicitación es dependiente de la especie vegetal en estudio.
- VI. Mediante el estudio, por qRT-PCR, de los perfiles de expresión de genes clave de la biosíntesis de taxanos en los cultivos celulares elicitados, se ha podido demostrar que, en relación a los cultivos control, la respuesta a la elicitación viene determinada por una reprogramación selectiva del transcriptoma de las células de *Taxus*, que conlleva la activación de la mayoría de los genes implicados en la ruta biosintética de taxanos.
 - VII. El análisis de los perfiles de transcritos de los cultivos celulares, también nos ha permitido demostrar el menor nivel de expresión, en los cultivos control y elicitados de *T. globosa*, en relación a los cultivos de *T. media*, lo que justificaría su menor capacidad de producir taxanos. Por otro lado, este estudio también ha revelado una menor respuesta a la elicitación de los genes que actúan en los últimos pasos biosintéticos.
 - VIII. En un estudio previo, la variación de los perfiles transcriptómicos de los cultivos elicitados de *Taxus* spp. determinada por cDNA-AFLP nos permitió identificar una serie de genes candidatos a pasos todavía no caracterizados de la vía de taxanos. Su selección *in silico* determinó que el gen *TB768* era uno de los candidatos más probables para actuar como una CoA ligasa en la formación de la cadena lateral del taxol. Nuestro estudio ha demostrado que la proteína TB768 presenta un modelo de estructura 3D muy similar a la de otras CoA ligasas, con un alto grado de homología de los dominios catalíticos
 - IX. Los ensayos de expresión heteróloga del gen *TB768* realizados demuestran, que el mejor sistema para aislar la proteína nativa es mediante su expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, un sistema que ha permitido la purificación de una proteína de 59 kD, correspondiente al producto del gen *TB768*.
 - X. El análisis funcional de *TB768* ha confirmado que esta proteína es capaz de unir CoA a β -fenilalanina para formar su éster de CoA, el precursor de la cadena lateral del taxol y que por lo tanto desempeña un papel fundamental en la biosíntesis de taxanos con cadena lateral.

- XI. Por otro lado, los estudios sobre la funcionalidad de este gen también han demostrado que, al igual que otras CoA ligasas caracterizadas en diferentes especies vegetales, TBPCCL (fenilalanina CoA ligasa de *Taxus*) es inespecífica y puede utilizar también el ácido 4-cumárico como sustrato, lo que la llevaría potencialmente a jugar un importante papel en la formación de flavonoides y ligninas.
- XII. Los análisis *in silico* de las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de taxol confirman que las primeras enzimas de la ruta de taxanos están localizadas en plastos, la secuencia de hidroxilaciones que llevan a la formación del anillo polihidroxilado de los taxanos están ligadas al retículo endoplasmático, y sugieren que los últimos pasos de la ruta biosintética (entre ellas la activación de β -fenilalanina) podrían localizarse a nivel citoplasmático.
- XIII. El estudio de la localización subcelular de TBPCCL ligada a YPF demuestra inequívocamente que esta CoA ligasa de *Taxus* se localiza exclusivamente a nivel citoplasmático.
- XIV. Finalmente, podemos concluir que en su conjunto, los resultados de este estudio demuestran que los cultivos celulares de *Taxus* spp. constituyen una potente plataforma biotecnológica para la producción de taxol y otros taxanos derivados, y a la vez se confirma que pueden ser utilizados en aproximaciones racionales para profundizar en el conocimiento de la biosíntesis de taxanos y su regulación.

6. Bibliografia

- Allina SM, Pri-Hadash A, Theilmann DA, Ellis BE, Douglas CJ. 4-Coumarate:coenzyme A ligase in *Hybrid poplar*. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiol*. 1998;116(2):743-54.
- Barradas-Dermitz DM, Hayward-Jones PM, Mata-Rosas M, Palmeros-Sánchez B, Platas-Barradas OBJ, Velásquez-Toledo RF. *Taxus globosa* S. cell lines: Initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. *Biocell*. 2010;34(1):1-6.
- Barrales-Cureño H, Soto-Hernández R, Ramos-Valdivia A, Trejo-Téllez L, Martínez-Vázquez M, Ramírez-Guzmán M, *et al.* Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. *Spanish J Rural Dev*. 2011;2:103-14.
- Barrios H, Zhang Y-L, Sandoval C, Xiao Z-A. Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. *Open Nat Prod J*. 2009;2(1):33-7.
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Lijavetzky D, Bru R, Pedreño MA. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Rep*. 2012;31(1):81-9.
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(2):266-92.
- Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, *et al.* Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng*. 2005;89(6):647-55.
- Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, *et al.* *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce taxol and taxanes. *BMC Biotechnol*. 2006;6:45.

- Beum JK, Gibson DM, Shuler ML. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* spp. suspension cultures. *Biotechnol Prog.* 2004;20(6):1666-73.
- Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2006;42(5):422-6.
- Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM, Joly S, Morales C, Piñol MT. Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus media* cells. *Plant Physiol Biochem.* 2003;41(1):91-6.
- Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem.* 2006;54(1):66-71.
- Bruňáková K, Košuth J, Katkovčínová Z, Lázárová M, Čellárová E. Expression of two genes of paclitaxel biosynthetic pathway during germination of *Taxus baccata* zygotic embryos. *Biol Plant.* 2010;54(3):515-9.
- Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I. Exudation: An expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 2012;31(3):461-77.
- Capell T, Christou P. Progress in plant metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(2):148-54.
- Chau M, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2-alpha-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2004;427(1):48-57.
- Chau M, Jennewein S, Walker K, Croteau R. Taxol Biosynthesis: Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7-Beta-Hydroxylase. *Chem Biol.* 2004;11:663-72.

- Choi HK, Kim SI, Son JS, Hong SS, Lee HS, Chung IS, *et al.* Intermittent maltose feeding enhances paclitaxel production in suspension culture of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol Lett.* 2000;22(22):1793–6.
- Cope EA. *Taxaceae*: The genera and cultivated species. *The Botanical Review.* 1998;64(4):291–322.
- Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R, Wildung MR. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews.* 2006;5(1):75–97.
- Cusidó RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Goossens A, *et al.* A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnol Adv.* 2014;32(6):1157-1167
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Piñol MT. Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochem Eng J.* 2007;33(2):159–67.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):418–23.
- Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, *et al.* Production of Taxol® and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Sci.* 1999;146:101–7.
- Dai Y, Qin Q, Dai D, Kong L, Li W, Zha X, *et al.* Isolation and characterization of a novel cDNA encoding methyl jasmonate-responsive transcription factor TcAP2 from *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Lett.* 2009;31(11):1801–9.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science.* 2012;17(6):349–59.
- Deblaere R, Bytebier B, de Greve H, Deboeck F, Schell J, van Montagu M, *et al.* Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 1985;13:4777–88.

- Dickerson D, Pascholati SF, Hagerman AE, Butler LG, Nicholson RL. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiol Plant Pathol*. 1984;25:111–23.
- Docimo T, Consonni R, Coraggio I, Mattana M. Early phenylpropanoid biosynthetic steps in *Cannabis sativa*: Link between genes and metabolites. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):13626–44.
- Dudareva N, Pichersky E. Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008;19(2):181–9.
- Duncan DR, Widholm JM. Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. En: Pollard JM, Walker JM, editores. *Methods Mol Biol*. The Humana Press, Totowa, 1990;6:29–37.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, *et al*. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*. 2006;45:616–29.
- Ehlting J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E. Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J*. 1999;19(1):9–20.
- Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ, Zenk MH, Bacher A. Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6431–6.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*. 2000;300(4):1005–16.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*. 1999;8(5):978–84.
- Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010.

- Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, *et al.* Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9(1):109–21.
- Exposito O, Syklovska-Baranek K, Moyano E, Onrubia M, Bonfill M, Palazon J, *et al.* Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. *Biotechnol Prog.* 2010;26:1145–53.
- Farmer EE, Ryan CA. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(19):7713–6.
- Ferlini C, Gallo D, Scambia G. New taxanes in development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(3):335–47.
- Fett-Neto a G, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Bio/Technology.* 1992;10(12):1572–5.
- Fett-Neto AG, DiCosmo F. Taxol and taxane production by cell culture. *Encycl Mol Biol Mol Med.* 1997;6:10-17.
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ, DiCosmo F. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng.* 1994;44(8):967–71.
- Fett-Neto AG, Wen Yi Zhang, DiCosmo F. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng.* 1994;44(2):205–10.
- Floss HG, Mocek U. Biosynthesis of taxol. En: Suffness., editor. *Taxol: Science and Applications.* Boca Ratón: CRC Press; 1995. 191-208 p.
- Fornalè S, Esposti DD, Navia-Osorio A, Cusidò RM, Palazòn J, Piñol MT, *et al.* Taxol transport in *Taxus baccata* cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem.* 2002;40(1):81–8.
- Frense D. Taxanes: Perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol and Biotechnol.* 2007;73(6):1233–40.

- Gallego A, Bonfill M, Cusido RM, Pastor M, Palazon J, Moyano E. Assessing factors that affect the growth of *Corylus avellana* cell suspension cultures: a statistical approach. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2015;
- Gallego A, Imseng N, Bonfill M, Cusido RM, Palazon J, Eibl R, *et al.* Development of a hazel cell culture-based paclitaxel and baccatin III production process on a benchtop scale. *J Biotechnol*. 2015;195:93–102.
- Gallego A, Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon HR, Hidalgo D, Lalaleo L, Khan Kayani W, *et al.* Biotechnological production of centellosides in cell cultures of *Centella asiatica* (L) Urban. *Eng Life Sci*. 2014;14(6)1–10.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968;50(1):151–8.
- Goossens A, Goossens A, Häkkinen ST, Häkkinen ST, Laakso I, Laakso I, *et al.* A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 8595-600
- Goossens A. It Is Easy to Get Huge Candidate Gene Lists for Plant Metabolism Now, but How to Get Beyond? *Mol Plant*. 2015;8(1):2-5
- Goytia E, Fernández-Calvino L, Martínez-García B, López-Abella D, López-Moya JJ. Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *J Gen Virol*. 2006;87(11):3413–23.
- Guerrero B, Castillo J, Aguilar MI, Delgado G. 5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -Pentaacetoxy-4(20),11-Taxadiene (7 β -Acetoxy-Taxusin) and other constituents from the bark of the mexican yew, *Taxus globosa* (Taxaceae). *Rev Soc Quim. Mex.*. 2000;44(2):148–50.
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(6):2389–93.
- Guo BH, Kai GY, Jin HB, Tang KX. Taxol synthesis. *African J Biotechnol*. 2006;5:15–20.

- Haider G, von Schrader T, Füsslein M, Blechert S, Kutchan TM. Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol Chem*. 2000;381(8):741–8.
- Häkkinen ST, Tilleman S, Šwiatek A, De Sutter V, Rischer H, Vanhoutte I, *et al*. Functional characterisation of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry*. 2007;68(22-24):2773–85.
- Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2209–14.
- Hempel D, Mau CJD, Croteau RB. Taxol biosynthesis: Identification and characterization of two acetyl CoA:taxoid-O-acetyl transferases that divert pathway flux away from Taxol production. *Arch Biochem Biophys*. 2009;487(2):91–7.
- Hao DC, Ge G, Xiao P, Zhang Y, Yang L. The first insight into the tissue specific *Taxus* transcriptome via illumina second generation sequencing. *PLoS One*. 2011;6(6).
- Hao DC, Yang L, Xiao PG, Liu M. Identification of *Taxus* microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis. *Physiol Plant*. 2012;146(4):388–403.
- Hartzell H. The yew tree, a thousand whispers. Biography of a species. Oregon, USA: Hulogosi; 1991.
- Heath EI, LoRusso P, Ramalingam SS, Awada A, Egorin MJ, Besse-Hamer T, *et al*. A Phase 1 study of BMS-275183, a novel oral analogue of paclitaxel given on a daily schedule to patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs*. 2011;29(6):1426–31.
- Hefner J, Ketchum RE, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Arch Biochem Biophys*. 1998;360(1):62–74.

- Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum RE, Gibson DM, Williams RM, Croteau R. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol.* 1996;3(6):479–89.
- Heining U, Scholz S, Jennewein S, Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. *Fungal Diversity.* 2013;60(1):161-170.
- Held MA, Boulaflous A, Brandizzi F. Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. *Plant Physiol.* 2008;147(4):1469–81.
- Hennenfent KL, Govindan R. Novel formulations of taxanes: A review. Old wine in a new bottle? *Annals of Oncology.* 2006;17(5):735–49.
- Hezari M, Ketchum RE, Gibson DM, Croteau R. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys.* 1997;337(2):185–90.
- Hezari M, Lewis NG, Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 1995;322(2):437–44.
- Ho C, Chang S, Lung J. The Strategies to Increase Taxol Production by Using *Taxus mairei* Cells Transformed with TS and DBAT Genes. *Int J.* 2005;179–85.
- Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, *et al.* Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts. *Spectroscopy.* 1998;13(6):22–32.
- Hu F, Huang J, Xu Y, Qian X, Zhong JJ. Responses of defense signals, biosynthetic gene transcription and taxoid biosynthesis to elicitation by a novel synthetic jasmonate in cell cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Bioeng.* 2006;94(6):1064–71.
- Hu WJ, Kawaoka A, Tsai CJ, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, *et al.* Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct

- 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(9):5407–12.
- Hu Y, Gai Y, Yin L, Wang X, Feng C, Feng L, *et al.* Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. Plant Cell. 2010;22(9):3093–104.
- Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001;31(2):163–7.
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R. Taxoid metabolism: Taxoid 14b-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. Arch Biochem Biophys. 2003;413(2):262–70.
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB. Taxol biosynthesis: taxane 13 alpha-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(24):13595–600.
- Jennewein S, Wildung MR, Chau M, Walker K, Croteau R. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(24):9149–54.
- Ji Y, Bi JN, Yan B, Zhu XD. Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. Chinese Journal of Biotechnology. 2006;22(1):1–6.
- Katkovčínová Z, Lázárová M, Bruňáková K, Košuth J, Čellárová E. Expression of *dbat* and *dbtnbt* genes involved in paclitaxel biosynthesis during the growth cycle of *Taxus baccata* L. callus cultures. Zeitschrift fur Naturforsch C,A J Biosci. 2008;63(9-10):721–30.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA. CO11 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(19):7100–5.
- Kelley LA, Sternberg MJE. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat Protoc. 2009;4(3):363–71.

- Kelsey RG, Vance NC. Taxol Taxol and Cephalomannine Concentrations in the Foliage and Bark of Shade-Grown and Sun-Exposed *Taxus brevifolia* Trees. *J. Nat. Prod.*, 1992;55(7):912–917
- Kemena C, Notredame C. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics*. 2009;25(19):2455–65.
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng.* 1999;62(1):97–105.
- Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, *et al.* Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biol Int.* 2006;30(3):262–9.
- Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML. Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* spp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnol Prog.* 2005;21(3):700–7.
- Kim JS, Amorino GP, Pyo H, Cao Q, Price JO, Choy H. The novel taxane analogs, BMS-184476 and BMS-188797, potentiate the effects of radiation therapy in vitro and in vivo against human lung cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51(2):525–34.
- Kingston DGI. Recent Advances in the Chemistry of Taxol 1,2. *J Nat Prod.* 2000;63(5):726–34.
- Koepp AE, Hezari M, Zajicek J, Vogel BS, LaFever RE, Lewis NG, *et al.* Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5),11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J Biol Chem.* 1995;270(15):8686–90.
- Koetsier MJ, Jekel PA, van den Berg MA, Bovenberg RAL, Janssen DB. Characterization of a phenylacetate-CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J.* 2009;417:467–76.

- Lackman P, González-Guzmán M, Tilleman S, Carqueijeiro I, Pérez AC, Moses T, *et al.* Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5891–6.
- Lan WZ, Yu LJ, Li MY, Qin WM. Cell death unlikely contributes to Taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett.* 2003;25(1):47–9.
- Lange BM, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnol J.* 2013;11(2):169–96.
- Lansing A, Haertel M, Gordon M, Floss H. Biosynthetic studies on taxol. *Planta Med.* 1991;57:83–4.
- Lee E-K, Jin Y-W, Park JH, Yoo YM, Hong SM, Amir R, *et al.* Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nat Biotechnol.* 2010;28(11):1213–7.
- Lee JC, Yang X, Schwartz M, Strobel G, Clardy J. The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus. *Chem Biol.* 1995;2(11):721–7.
- Lenka SK, Boutaoui N, Paulose B, Vongpaseuth K, Normanly J, Roberts SC, *et al.* Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. *BMC Genomics.* 2012;13(1):148.
- Li F, Ma X, Hu X, Hoffman A, Dai J, Qiu D. Antisense-induced suppression of taxoid 14 β -hydroxylase gene expression in transgenic *Taxus \times media* cells. *African J Biotechnol.* 2011;10(44):8720–8.
- Li JY, Strobel G, Sidhu R, Hess WM, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology.* 1996;142(8):2223–6.

- Li S, Zhang P, Zhang M, Fu C, Zhao C, Dong Y, *et al.* Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics*. 2012;13(1):295.
- Li ST, Fu CH, Zhang M, Zhang Y, Xie S, Yu LJ. Enhancing taxol biosynthesis by overexpressing a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in transgenic cell lines of *Taxus chinensis*. *Plant Mol Biol Report*. 2012;30:1125–30.
- Li YC, Tao WY. Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2009;121(1):97–102.
- Liao Z, Gong Y, Kai G, Zuo K, Chen M, Tan Q, *et al.* An intron-free methyl jasmonate inducible geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Taxus media* and its functional identification in yeast. *Mol Biol*. 2005;39(1):11–7.
- Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martínez-Zapater JM, Bru R, Pedreño MA. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in *Monastrell* grapevine cell cultures. *BMC Res Notes*. 2008;1:132.
- Lindermayr C, Mo B, Fliegmann J, Uhlmann A, Lottspeich F. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate : coenzyme A ligase gene family primary structures, catalytic properties, and differential expression. *Pharmacia*. 2002;1315:1304–15.
- Long RM, Croteau R. Preliminary assessment of the C13-side chain 2'-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):410–7.
- Long RM, Lagisetti C, Coates RM, Croteau RB. Specificity of the N-benzoyl transferase responsible for the last step of Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;477(2):384–9.
- Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazón J, Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochem*. 2011;46(1):23–34.

- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, Deweese-Scott C, Fong JH, *et al.* CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D225-9.
- Matić S, Masenga V, Poli A, Rinaldi R, Milne RG, Vecchiati M, *et al.* Comparative analysis of recombinant Human Papillomavirus 8 L1 production in plants by a variety of expression systems and purification methods. *Plant Biotechnol J.* 2012;10(4):410–21.
- McCown BH, Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Hortic Sci.* 1981;16:543–7.
- Mera P, Bentebibel A, López-Viñas E, Cordente AG, Gurunathan C, Sebastián D, *et al.* C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(6):1084–95.
- Mirjalili N, Linden JC. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnol Prog.* 1996;12:110–8.
- Muchiri R, Walker KD. Taxol biosynthesis: Tyrocidine synthetase catalyzes the production of phenylisoserinyl coa and other amino phenylpropanoyl thioesters. *Chem Biol.* 2012;19(6):679–85.
- Naill MC, Kolewe ME, Roberts SC. Paclitaxel uptake and transport in *Taxus* cell suspension cultures. *Biochem Eng J.* 2012;63:50–6.
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusido R., Palazón J, Alfermann AW, Pinol MT. Taxol® and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *J Plant Physiol.* 2002;159:97–102.
- Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng.* 2006;8(5):385–94.

- Notredame C., Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment *JMB*, 2000; 302:205-217.
- Nystedt B, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin Y-C, Scofield DG, *et al.* The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*. 2013;497(7451):579–84.
- Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JFW, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*. 2010;27(12):2569–89.
- Onrubia M, Cusidó RM, Ramirez K, Hernández-Vázquez L, Moyano E, Bonfill M, *et al.* Bioprocessing of plant *in vitro* systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives. *Curr Med Chem*. 2013a;20(7):880–91.
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Cusidó RM, Goossens A, Palazón J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *J Plant Physiol*. 2013b;170(2):211–9.
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Expósito O, Palazón J, Cusidó RM. An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of *txs* and *bapt* gene expression. *Biochem Eng J*. 2010;53:104–11.
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Goossens A, Cusidó RM. The relationship between *TXS*, *DBAT*, *BAPT* and *DBTNBT* gene expression and taxane production during the development of *Taxus baccata* plantlets. *Plant Sci*. 2011;181(3):282–7.
- Onrubia M, Pollier J, Vanden Bossche R, Goethals M, Gevaert K, Moyano E, *et al.* Taximin, a conserved plant-specific peptide is involved in the modulation of plant-specialized metabolism. *Plant Biotechnol J*. 2014;12(7):971–83.
- Onrubia M. A molecular approach to taxol biosynthesis. Tesis doctoral. Universitat Pompeu Fabra; 2012.

- Osuna L, Tapia N, Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Zamilpa A, *et al.* Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltldl). *Acta Physiol Plant.* 2015;en prensa.
- Ottaggio L, Bestoso F, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Mazzei M, *et al.* Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*. *J Nat Prod.* 2008;71(1):58–60.
- Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *J Biotechnol.* 2003;101(2):157–63.
- Patil RA, Kolewe ME, Normanly J, Walker EL, Roberts SC. Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. *Biotechnol J.* 2012;7(3):418–27.
- Pauwels L, Inzé D, Goossens A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Sci.* 2009;14(2):87–91.
- Pean E, DEMOLIS P, Moreau A, Hemmings, RJ O'Connor D, Brown D, Shepard T, *et al.* The european medicines agency review of Cabazitaxel (Jevtana) for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. *Oncologist.* 2012;17(0):543–9.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP, 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8(10):785–6.
- Pilger R. Taxaceae-Taxoideae-Taxeeae. En: Engler A. Editor. *Das Pflanzenreich* IV. 1903. 110–116 p.
- Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto J, Talón M, editores. *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* 2a Edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2008. p. 323-48.

- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2013;13(1):109.
- Pollier J, Moses T, González-Guzmán M, De Geyter N, Lippens S, Vanden Bossche R, *et al.* The protein quality control system manages plant defence compound synthesis. *Nature.* 2013;504(7478):148–52.
- Pradilla G, Wang PP, Gabikian P, Li K, Magee CA, Walter KA, *et al.* Local intracerebral administration of paclitaxel with the paclimer® delivery system: Toxicity study in a canine model. *J Neurooncol.* 2006;76(2):131–8.
- Qian ZG, Zhao ZJ, Tian WH, Xu Y, Zhong JJ, Qian X. Novel synthetic jasmonates as highly efficient elicitors for taxoid production by suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Bioeng.* 2004;86(5):595–9.
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* 2002;20(2):101–53.
- Rautengarten C, Baidoo E, Keasling JD, Scheller HV. A simple method for enzymatic synthesis of unlabeled and radiolabeled hydroxycinnamate-CoA. *Bioenergy Res.* 2010;3:115-22.
- Richheimer SL, Tinnermeier DM, Timmons DW. High-performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal Chem.* 1992;64:2323-6.
- Rischer H, Oresic M, Seppänen-Laakso T, Katajamaa M, Lammertyn F, Ardiles-Diaz W, *et al.* Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(14):5614–9.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, *et al.* The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(18):5539-45.
- Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Pedreño M a., *et al.* Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant Biotechnol J.* 2014;1-10.

- Sabater-Jara AB, Tudela LR, López-Pérez AJ. *In vitro* culture of *Taxus* spp. Strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochem Rev.* 2010;9:343–56.
- Sabbatini P, Aghajanian C, Dizon D, Anderson S, Dupont J, Brown J V., *et al.* Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4523–31.
- Schenk RU, Hildebrandt A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot.* 1972;50:199–204.
- Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1501–6.
- Shang GM, Wu JC, Yuan YJ. Improved cell growth and Taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields. *Biotechnol Lett.* 2004;26(11):875–8.
- Sharma P, Sharma S, Yadau S, Srivastav A, Puroit I., Shirivastava N. Plant derived biomolecules: culture vessels to bioreactors. En: Paek K, Murthy HN, Zhong JJ, editores. *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology.* Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2014. 47-63 p.
- Shionoya M, Jimbo T, Kitagawa M, Soga T, Tohgo A. DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* 2003;94(5):459–66.
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1998;6:175–82.
- Soto M, Sanjurjo M, González MT, Cruz D, Giral F. El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Cienc Ergo Sum.* 2000;7(3):277–9.

- Srinivasan V, Ciddi V, Bringi V, Shuler ML. Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell cultures. *Biotechnol Prog.* 1996;12(4):457–65.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science.* 1993;260(5105):214–6.
- Strobel GA, Stierle A, Hess W. Taxol Formation in Yew *Taxus*. *Plant Sci.* 1973;92:1–12.
- Sun G, Yang Y, Xie F, Wen JF, Wu J, Wilson IW, et al. Deep sequencing reveals transcriptome re-programming of *Taxus × media* cells to the elicitation with methyl jasmonate. *PLoS One.* 2013;8(4).
- Tamogami S, Kodama O. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry.* 2000;54(7):689–94.
- Tapia N, Zamilpa A, Bonfill M, Ventura E, Cruz-Vega D, Del Villar A, et al. Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schltdl *in vitro* cultures. *Acta Physiol Plant.* 2013;35:3447–55.
- Ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles: Implications for cancer chemotherapy. *Clinical Pharmacokinetics.* 2003;42(7):665–85.
- Uppalapati SR, Ayoubi P, Weng H, Palmer DA, Mitchell RE, Jones W, et al. The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J.* 2005;42(2):201–17.
- Van Rozendaal ELM, Lelyveld GP, Van Beek TA. Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. *Phytochemistry.* 2000;53(3):383–9.
- Verpoorte R. Applications of plant metabolic engineering. Verpoorte R, Alfermann AW, Jonhson T.S., editores. Dordrecht: Springer; 2007.

- Vidensek N, Lim P, Campbell A, Carlson C. Taxol Content in Bark, Wood, Root, Leaf, Twig, and Seedling from Several *Taxus* Species. *J Nat Prod.* 1990;53(6):1609-10.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003;33(5):949–56.
- Vongpaseuth K, Roberts SC. Advancements in the understanding of Paclitaxel metabolism in tissue culture. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(4):219–36.
- Vuytsteke M, Peleman JD, van Eijk MJT. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1399–413.
- Walji AM, MacMillan DWC. Strategies to bypass the taxol problem. Enantioselective cascade catalysis, a new approach for the efficient construction of molecular complexity. *Synlett.* 2007;10:1477–89.
- Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000a;97(2):583–7.
- Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2-alpha-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000b;97(25):13591–6.
- Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry.* 2001;58(1):1–7.
- Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002a;99(20):12715–20.
- Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002b;99(14):9166–71.

- Walker K, Schoendorf a, Croteau R. Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys. 2000;374(2):371–80.
- Walker KD, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. J Biol Chem. 2004;279(52):53947–54.
- Wang C, Wu J, Mei X. Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. Biotechnol Prog. 2001;17(1):89–94.
- Wang Y-D, Yuan Y-J, Lu M, Wu J-C, Jiang J-L. Inhibitor studies of isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of the yew *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biotechnol Appl Biochem. 2003;37(1):39–43.
- Wang YD, Yuan YJ, Wu JC. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biochem Eng J. 2004;19(3):259–65.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol: a novel antileukemic and antitumour agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc. 1971;93(9):2325–7.
- Wasternack C. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Annals of Botany. 2007;100(4):681–97.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics. 2009;25(9):1189–91.
- Wheeler AL, Long RM, Ketchum RE, Rithner CD, Williams RM, Croteau R. Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 alpha-ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. Arch Biochem Biophys. 2001;390(2):265–78.

- Wickremesinhe ERM, Artea RN. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell, Tiss Org Culture*. 1993;35(2):181–93.
- Wildung MR, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*. 1996;271(16):9201–4.
- Wolff AC, Donehower RC, Carducci MK, Carducci MA, Brahmer JR, Zabelina Y, *et al*. Phase I study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: A taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10):3589–97.
- Wu J, Ge X. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2004;85(7):714–21.
- Wu J, Wang C, Mei X. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *J Biotechnol*. 2001;85(1):67–73.
- Wu Q, Sun C, Luo H, Li Y, Niu Y, Sun Y, *et al*. Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 pyrosequencing. 2011;77(4):394-400.
- Wu YX, Masison DC, Eisenberg E, Greene LE. Application of photobleaching for measuring diffusion of prion proteins in cytosol of yeast cells. *Methods*. 2006;39(1):43–9.
- Yuan YJ, Li C, Hu ZD, Wu JC, Zeng AP. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. *Process Biochem*. 2002;38(2):193–8.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol*. 1996;14(9):1129–32.
- Zamir LO, Cherestes AD, Nikolakakis A, Sauriol F, Mamer O. Rearrangement of the major taxane from *Taxus canadensis*. *Tetrahedron Lett*. 1999;40(45):7917–20.

- Zamudio RS. Flora del Bajío y de sus regiones adyacentes, fascículo 9. Flora del Bajío y de sus regiones adyacentes,. Pátzcuaro, Michoacán: Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío.; 1992.
- Zanoni TA, Farjon A. world checklist and bibliography of conifers. *Brittonia*. 1999;51(1):76.
- Zavala CF, Soto HM, Rodríguez GMT. El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): biología, dificultades y perspectivas de su uso. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2001;7(1):77–94.
- Zavala-chávez F. Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Cien*. 2001;8(2):169–74.
- Zhang P, Li ST, Liu TT, Fu CH, Zhou PP, Zhao CF, *et al*. Overexpression of a 10-deacetylbaocatin III-10 β -O-acetyltransferase gene leads to increased taxol yields in cells of *Taxus chinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;106:63-70.
- Zhang W, Franco C, Curtin C, Conn S. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a study. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(5):264–71.
- Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: Recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol and Biotechnol*. 2010;86(6):1707–17.
- Zu Y gang, Pang HH, Yu JH, Li DW, Wei XX, Gao YX, *et al*. Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2010;98(2):152–8.

7. Anexos

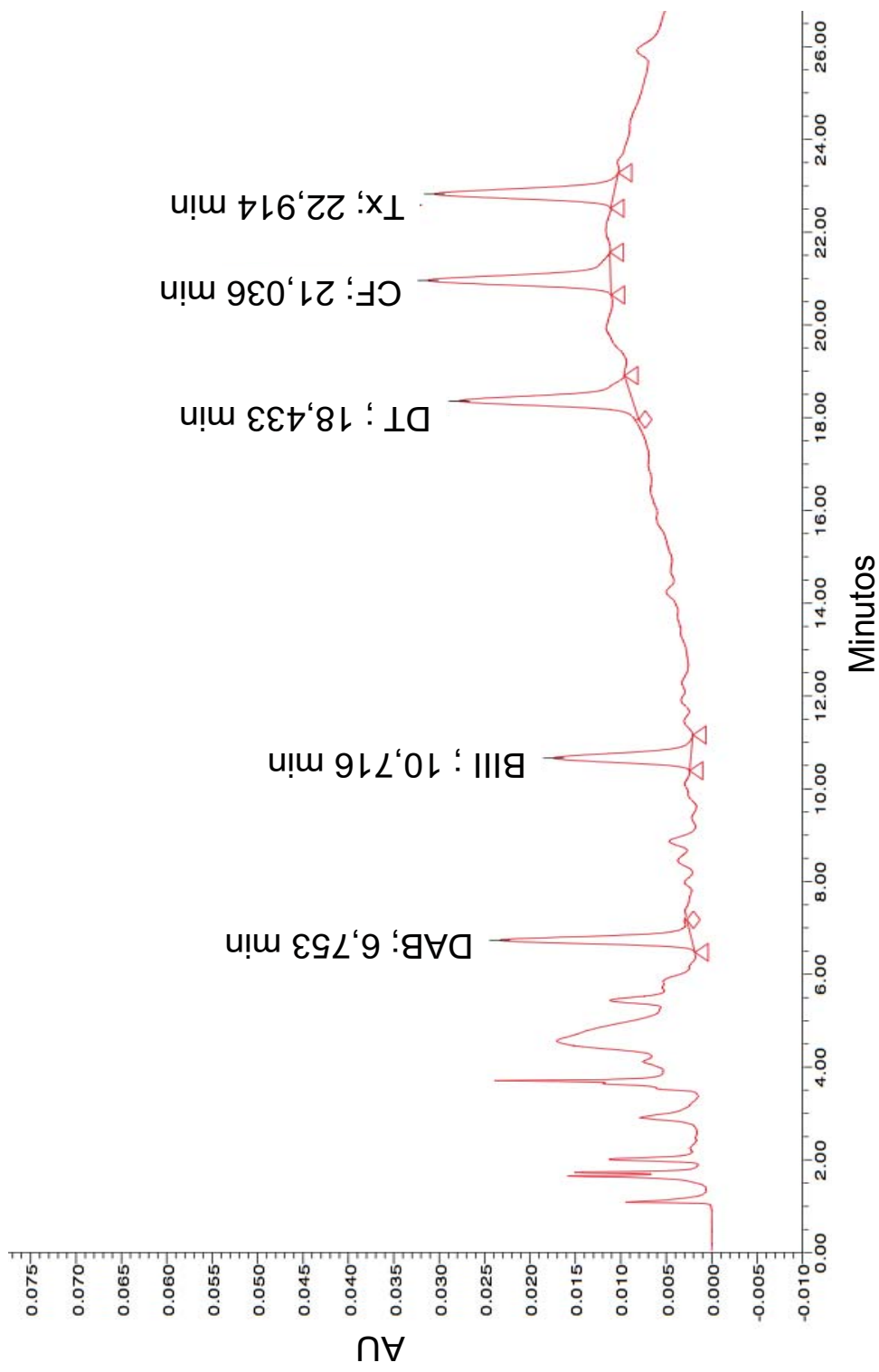


Figura 1: Cromatograma UPLC-DAD del extracto metanólico obtenido del medio extracelular de cultivos celulares de *T. x media* elicitados durante 16 días con 50 mM de CD y 1 μ M de CORO. DAB: deacetilbaccatina, BIII: baccatina III, DT: deacetiltaxol; CF: cefalomanina; Tx: Taxol.

```

atg gca gca cca ggt ctc gag gtc gat ccc cgc agc ggg tac tgc aac aca aat gcc act ttc tac agc aag cga aag ccc tta aac gtc ccc caa gaa g < 100
M A A P G L E V D P R S G Y C N T N A T F Y S K R K P L N V P Q E E
tac cgt cgt cca gag ctc cag cta ggg ggc tgc ccc atg acy ttg ttt tta cgg tga aag atg tgc ttc gct ttc ggg aat ttg cag ggg gtt ctt c
10 20 30 40 50 60 70 80 90

aa tat ctg gac ctc cca acc ttc gtc tca cga cac cct cac aca ggg aaa ata gcc ctc ata gac tcc tcc aca ggc aac aaa atc acc ttt ccc cag ct < 200
Y L D L P T F V S R H P H T G K I A L I D S S T G N K I T F P Q L
tt ata gac ctg gag ggt tgg aag cag agt gct gtg gga gtt ggt ccc ttt cgg gag tat ctg agg agg tgt ccg ttg ttt tag tgg aaa ggg gtc ga
110 120 130 140 150 160 170 180 190

a tgg cac aat gtc aaa tcc ttg gca gca ggt tta tcc caa tcc ggt gtc aaa atg ggc gac gtg gtc ctc ctc tcc ccc aat tca atc cat ttc ccc < 300
W H N V K S L A A G L S Q S G V K M G D V V L L L S P N S I H F P
t acc gtg tta cag ttt agy aac cgt cgt cca aat agy gtt agy cca cag ttt tac ccg ctg cac cag gag tag gag agy ggc tta agt tag gta aag ggg
210 220 230 240 250 260 270 280 290

atc att tgc atg ggc atc atg tcc atc ggc gcc gta gtc aoc acy aoc aat cct ctc aat aoc gct goa gaa att goa aag caa gcc gct gac tgc cat g < 400
T C M A I H S I C A V V T T N P L N T A A E I A K Q A A D S H A
tag taa acy tac cgc tag tac agy tag ccg cgg cat cag tgg tgc tgg tta gga gag tta tgg cga cgt ctt taa cgt ttc gtt cgg cga ctg agc gta c
310 320 330 340 350 360 370 380 390

ca gtt ttg ggc ttt gta acg cca gaa cta gca aac aag tta gca gcc aac tta agc ttg gtt ctc ata cca acc ctg ccc aca agy tct ttg toa ga < 500
V L A F V T P K S P A N K L A A T N L P M A L V L I P T L P T L S D
gt caa aac cgc aaa cat tgc ggt ctt gat cgt ttg ttc aat cgt cgt tgg ttg aat tog aac caa gag tat ggt tgg gac ggg tgt tcc aga aac agt ct
410 420 430 440 450 460 470 480 490

t ctt gtg ggc ggt gat acc ccc aag tcc ccc gcc ata agy tct ttg tta gac ctt atg goa gca gac ccc gcc aag gcc ccc act gtc aaa atc agc caa < 600
L V A G D T P K S P A I R S L L D L M A A D P A K A P T V K I S Q
a gaa cac cgc ccc cta tgg ggg ttc agy ggg cgg tat tcc aga aac aat ctg gaa tac cgt cgt ctg ggg cgg ttc cgg ggg tga cag ttt tag tgc gtt
510 520 530 540 550 560 570 580 590

gat gac act gcc acc tta ctg tac tot tot ggc aoc act ggt ctc agc aaa gya gtc atc tcc aoc cat aga aac ctc ata tcc atg gtc tgt gtt ttg c < 700
D D T A T L L Y S S G T T G L S K G V I S T H R N L I S M V C V L L
cta ctg tga cgg tgg aat gac atg aga cga cgy tgg tga cca gag tcy ttt cct cag tag agy tgg gta tct ttg gag tat agy tac agc aca caa aac g
610 620 630 640 650 660 670 680 690

tg agc agy ttc aat ttg tct ggc acc tct aac aat tct ttt ctg tgc act gtg cca atg ttt cat att tat ggc ctt gca gct ttt gca tgt ggg ctg ct < 800
S R F N L S G T S N N S F L C T V P H F H I Y S L A A F A C G L L
ac tgc tcc aag tta aac aga cgg tgg aga ttg tta aga aaa gac acy tga cac ggt tac aaa gta taa ata ccg gaa cgt cga aaa cgt aca ccc gac ga
710 720 730 740 750 760 770 780 790

t gcc tct ggg tct act att gtt gtg ctg tct aag ttt gac ttg ggg gag atg ctt ggg gct att gag aag tat agy ggc act tat ttg cca ctt gtc cca < 900
A S G S T I V V L S K P D L G E M L G A I E K Y R V T Y L P L V P
a cgg aga ccc aga tga taa caa cac gac aga ttc aac ctg aac ccc ctc tac gaa ccc cga taa ctc ttc ata tcc cac tga ata aac ggt gaa cac ggt
810 820 830 840 850 860 870 880 890

ccg att ttg ctg gca ctc aca aaa aca gag att tgt agy aag tat gat ctg agy tct ctg cat act gtg ctt tgt ggc ggg gct ccc ctc agt aag gac t < 1000
P I L L A L T K K T E I C R K Y D L R R S L H T V L C G G A P L S K E S
ggc taa aac gac cgt gag tgt ttt tgt ctc taa aca tcc ttc ata cta gac tcc aga gac gta tga cac gaa aca ccg ccc cga ggg gag tca ttc ctc a
910 920 930 940 950 960 970 980 990

cc act gaa gag ttt att tct agy ttt ccc aca atc aaa tta atg cag ggt tat ggg ctg aca gaa aca act gca ata gga gca tcc aca gac acc caa ga < 1100
T E E F I S R F P P T I K L M O G Y G L T E T T A I G A S T D T O E
gg tga ctt ctc aaa taa aga tcc aaa ggg tgt tag ttt aat tac gtc cca ata ccc gac tgt ctt tgt tga cgt tat cct cgt agy tgt ctg tgg gtt ct
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

g gag agc aga cac tat gga aca gct ggc aca aat act gat goa aag att gtg gat cct gat tot ggt ctt gct ctc cct cca aat cat aga < 1200
E S R N Y G T A G M L S P N T D A K F I V D S G L A L P P N H R
c ctc tgc tct gtg ata cct tgt cga cgc tac gac agy ggt tta gta cta cgt ttc taa cca gga cta aga cca gaa cga gag gga ggt tta gta tct
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

gga gag ttg tgg cta cgt ggc cca aca att atg aaa ggt tac ttc agc aat cca gaa gct act agt tca gct atg gac cga agt ggc tgg ctc cgt aca g < 1300
G E L W L R G P T I M K G Y F S N P E A T S S A M D R S G W L R T G
cct ctc aac aoc gat goa cgy ggt tgt taa tac ttt cca atg aag tgc tta gct ctt cga tga tca agt cga tac ctg gct tca ccg acc gag goa tgt c
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

gt gat ctc tgc tac att gat act gaa ggc tat gtc ttt gta gta gac aga ctg aaa gag ttg ata aaa tac aaa ggc tat cag gtt gct ccg gca gaa tt < 1400
D L C Y I D T E G Y V P V V D R L F E L I K Y K G Y Q V A P A E L
ca cta gag acy tag taa cta tga ctt ccg ata cag aaa cat cat ctg tct gac ttt ctc aac tat ttt atg ttt ccg ata gtc caa cga ggc cgt ctt aa
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

a gaa gca ctt ctg ctt tct cat cct gag atc gct gat gtc gca gtg ata ccg ttt cca gac aaa gaa gca ggc cag gtt cca atg cgy tac atc gta agy < 1500
E A L L L S H P E I A D V A V I P F P D K E A G Q V P M A Y I V R
t ctt cgt gaa gac gaa aga gta gga ctc tag cga cta cag cgt cac tat ggc aag ggt ctg ttt ctt cgt ccg gtc caa ggt tac cgc atg tag cat tcc
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

aaa cag ggc agc aca ctg tct gaa gct agt gtc att ggt ttt gtt gcc aaa cag gtg gca cca tac aag aaa gtt cgc agy gtg gct ttt gtg agt gga a < 1600
K O G S T L S E A S V I G F V A K O V A P Y K K V R R V A P V S G I
ttt gtc ccg tcy tgt gac aga ctt cga tca cag taa cca aaa cca cgg ttt gtc cac cgt ggt atg ttc ttt caa ccg tcc cac cga aaa cac tca cct t
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

tt cca aaa aat gca tcy gga aag ata tta aga aag gat ttg stc aaa cta tcc aca tca aga ctt tga < 1668
P K N A S G R I L R K D L I K I S T S R L *
aa ggt ttt tta cgt agc oct ttc tat aat tct ttc cta aac tag ttt gat agy tgt agt tct gaa act
1610 1620 1630 1640 1650 1660

```

Figura 2. Gen *TB768*. Pantalla desplegada por el programa Serial Cloner vs. 2.6. La figura muestra la secuencia de DNA completa del gen TB768 en cadena doble, con la traducción a proteína entre las cadenas de DNA.

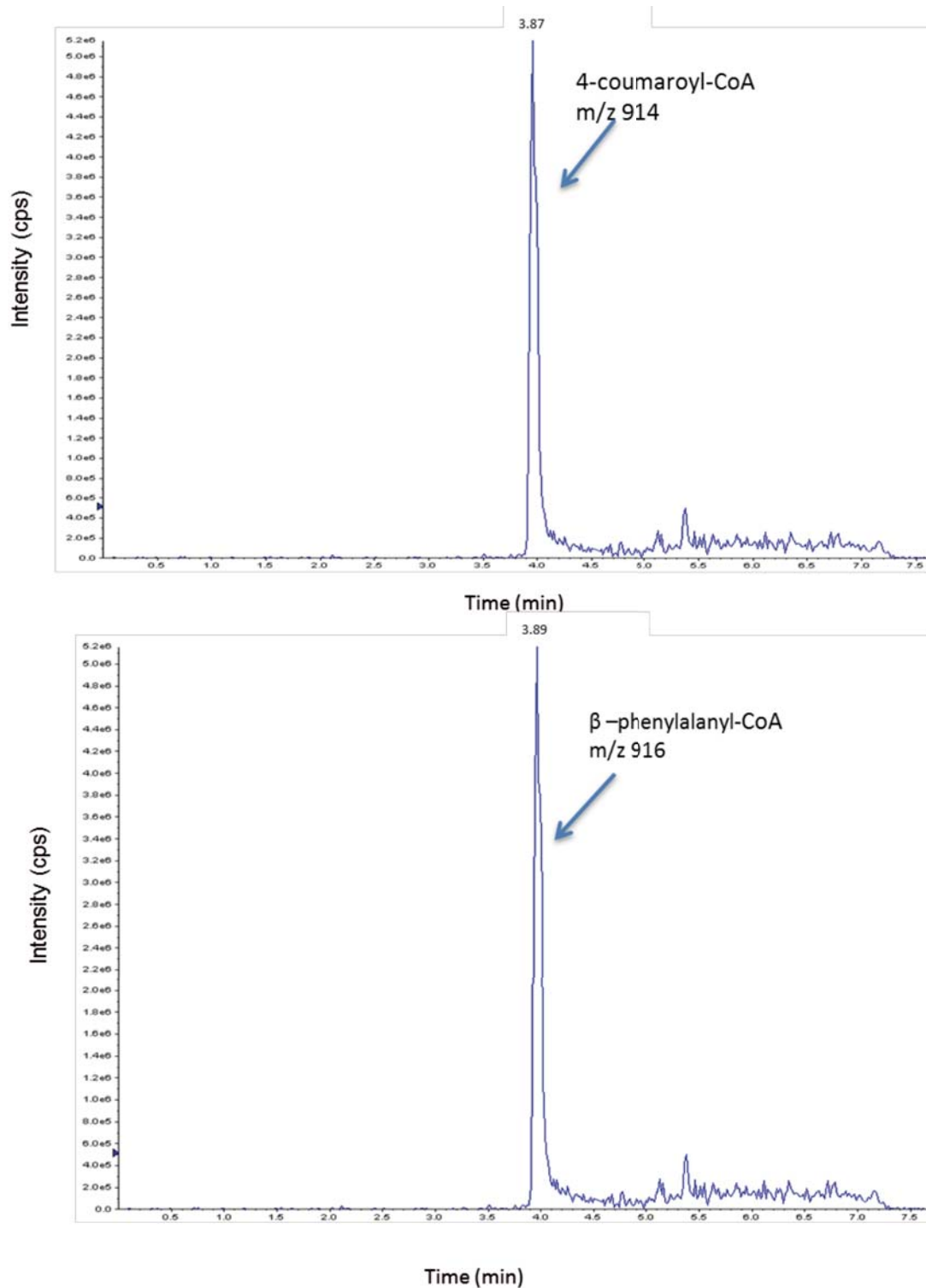


Figura 3. Cromatograma de extracción de iones de los estándares de β-fenilalanil-CoA (m/z 914) y 4-coumaroil-CoA (m/z 916) mostrando el tiempo de retención para cada molécula, 3,89 y 3,87 minutos respectivamente.

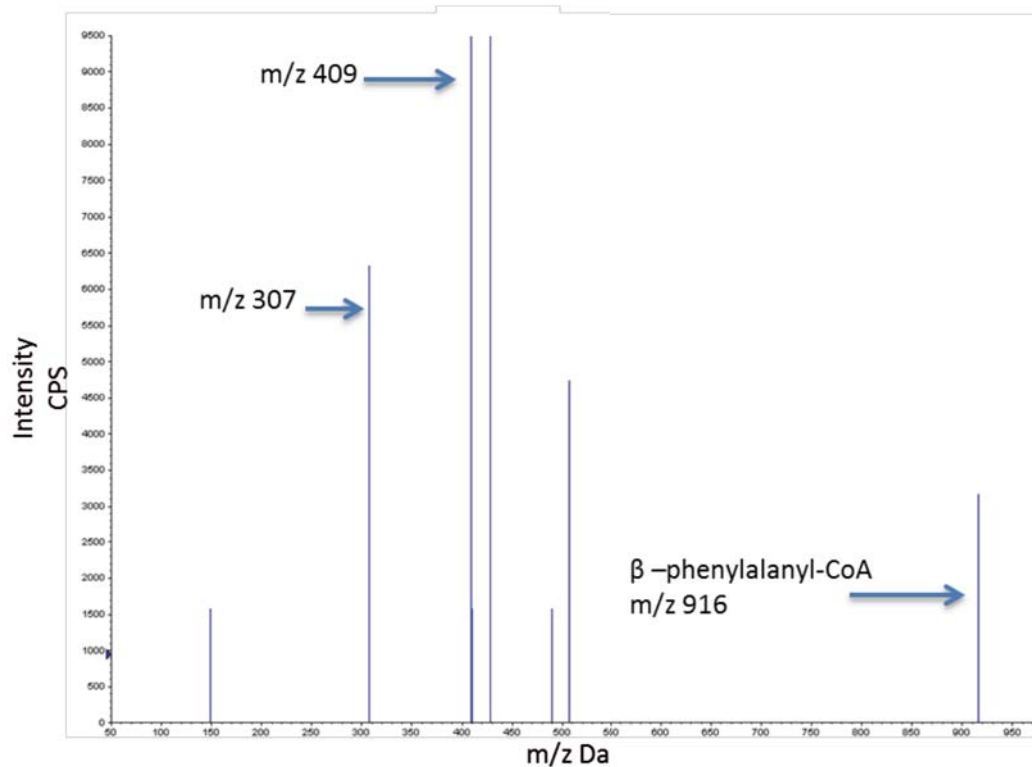
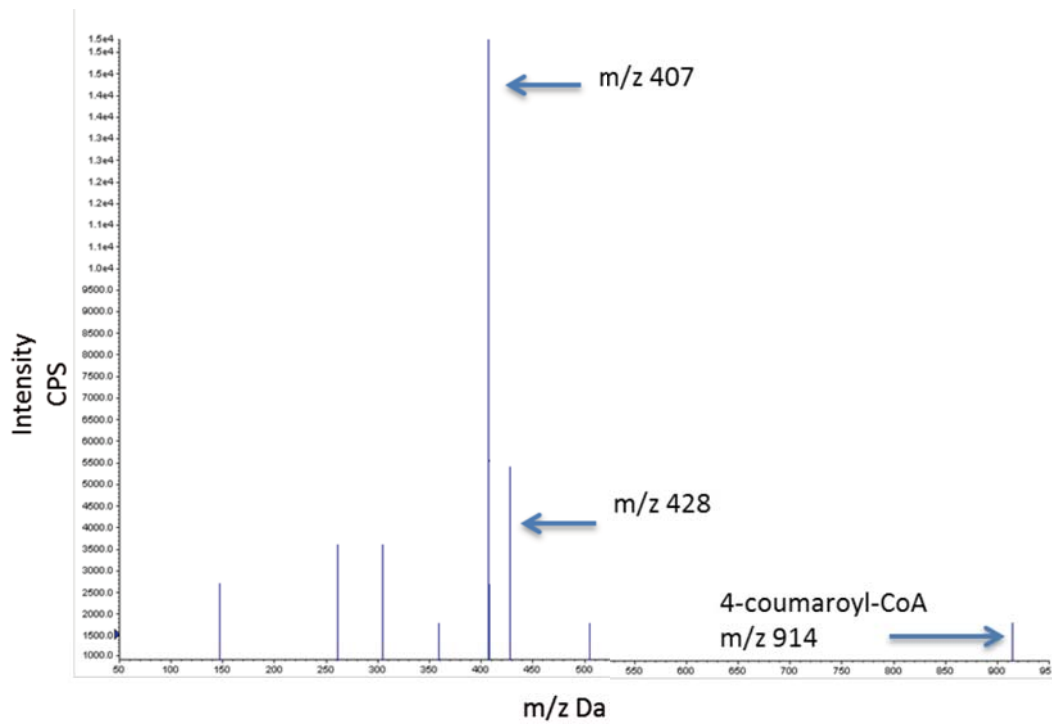


Figura 4. Patrón de fragmentación de los estándares de β -fenilalanil-CoA y 4-coumaril-CoA. Las flechas indican el ion molecular y los dos fragmentos más abundantes utilizados para confirmar la identidad de los productos de reacción en los ensayos enzimáticos.