

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia

**Metabolisme lipídic en plantes:  
Caracterització de la  
dehidrodoliquildifosfat sintasa  
i de les proteïnes Arv  
d'*Arabidopsis thaliana***

Oriol Forés del Ruste

2007



Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia

# Metabolisme lipídic en plantes: Caracterització de la dehidrodoliquildifosfat sintasa i de les proteïnes Arv d' *Arabidopsis thaliana*

Memòria presentada per Oriol Forés del Ruste, Llicenciat en Farmàcia per la Universitat de Barcelona i inscrit en el programa de Doctorat de Biotecnologia del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia de la Universitat de Barcelona durant el Bienni 2000-2002, per aspirar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

El present treball ha estat dirigit al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, sota la direcció dels Drs. Albert Ferrer Prats i Montserrat Arró Plans.

Directors:

Albert Ferrer Prats  
Montserrat Arró Plans

Autor:

Oriol Forés del Ruste



Res no passa en va: tot fenomen té una causa i obeeix a una necessitat”

Leucip (filòsof del segle V aC)



## AGRAÏMENTS:

A tots els que llegiu aquestes línies, moltes gràcies per fer possible la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

Vull donar el meu agraïment en primer lloc a la Núria i a la Montse, que em van ensenyar a treballar en un laboratori i sense les quals no hauria pogut arribar al final del camí. A l'Alber Ferrer per permetrem treballar al seu grup i per totes les coses que he après d'ell.

A tots els meus companys de laboratori, tan als que ja no hi són David, M<sup>a</sup>.Antonia, Angela i Albert, com als que m'han acompanyat als últims anys Marta, Toni i Benjamin, amb els quals hem compartit molt més que la feina. I per suposat a la Vero que continua la feina, el laboratori està en bones mans. A tots vosaltres per treballar en un grup inmillorable, amb bona companyia, i, el més important, amb bon humor i moltes rialles.

A tot el Dept. de Bioquímica on sempre m'han tractat molt bé i m'han ajudat en tot moment. No em puc pas oblidar de tot el personal administratiu del departament i per suposat de la Sílvia que amb la seva dedicació ha fet del Dept. un lloc millor.

Al grup de químiques: Albert, Manuel i Narciso moltes gràcies pels vostres consells, i a la resta de tots vosaltres que hem compartit molts esforços i penes, però també alegria i bons moments.

Als millors farmacèutics de la promoció del 2000! Ana, Albert, David, Javi, Pau, Maria i Joana. Per no perdre el contacte, a veure si ens veiem sovint.

Francis, el millor amic que un es pot imaginar.

Marc, a veure si d'una vegada et converteixes en el cineasta que sé que pots arribar a ser.

A tota la resta dels meus amics, Cristina, Alberto, German, Marcos, Xavi, Maria, Mònica, Edu i a tots els que segur que m'he deixat, per les nostres trobades, calçotades, castanyades, caps d'anys i tots els moments que han fet aquests anys inolvidables.

I per sobre de tots, a la meva família. Pares, Això és per a vosaltres. Sense el vostre suport no estaria aquí. I també a la resta de la família Ton, Pilar, Abel, i a tots els cosins i cosines. Gràcies M.Mar per ser el més proper a una germana que he tingut. Para tí, tío Ángel que no estas aquí para celebrarlo!

# GRÀCIES A TOTS





**35S CaMV:** Promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor.  
**AACT:** Acetoacetil-CoA tiolasa  
**ABA:** Àcid abcísic  
**ADN:** Àcid desoxiribonucleic  
**ADNc:** ADN codificant  
**ADN-T:** ADN transferit  
**AHD:** ARV homology domain  
**AMP:** Adenosina monofosfat  
**AMPK:** AMP quinasa  
**ARE:** ACAT-related enzymes  
**ARN:** Àcid ribonucleic  
**ARNasa:** Ribonucleasa  
**ARV:** ARE required for viability  
**BEL:** Base esfingoide de cadena llarga.  
**Bisacrilamida:** N,N'-metilen-bisacrilamida.  
**BrEt:** Bromur d'etidi.  
**BSA:** Albúmina sèrica bovina  
**C-terminal:** Extrem carboxiterminal  
**C24:** Columbia 24  
**CCF:** Cromatografia per capa fina  
**Ci, µCi:** Curies, microcuries  
**CoA:** Coenzim A  
**Col.0:** Columbia 0  
**Cpm:** Contes per minut.  
**CTAB:** Bromur de cetiltrimetilamoni  
**Da, kDa:** Dalton, kiloDalton.  
**Dedol-PP:** Dehidrodolicol pirofosfat  
**DEPC:** Dietilpirocarbonat.  
**DHS:** Dihidroesfingosina  
**DMAPP:** Dimetilal.lil pirofosfat  
**DMSO:** Dimetilsulfòxid  
**dNTPs:** Desoxirribonucleòtids.  
**DOL:** Dolicol  
**Dpm:** Desintegracions per minut.  
**DTT:** Ditiotritol.  
**DXP:** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat  
**DXR:** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat reductoisomerasa  
**DXS:** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa  
**EDTA:** Àcid Etilendiaminotetracètic  
**ERE:** Elements de resposta a esterols  
**EST:** Expressed Sequence Tag.  
**FPP:** Farnesil pirofosfat  
**FPS:** Farnesil pirofosfat sintasa  
**g:** Gravetats  
**GAP:** Gliceraldehid 3-fosfat  
**GFP:** Green fluorescent protein  
**GFPS:** Geranilfarnesil pirofosfat sintasa  
**GGPP:** Geranilgeranil pirofosfat  
**GIPC:** Glucosil inositol fosforilceramides  
**GPCR:** receptors acoblats a proteïnes G  
**GPI:** Glucofosfatidilinositol  
**GPP:** Geranil pirofosfat  
**GUS:** β-Glucuronidasa  
**HA:** Hemaglutinina  
**HepPS:** Heptaprenil pirofosfat sintasa  
**HexPS:** Hexaprenil pirofosfat sintasa  
**HMG:** gen que codifica per HMGR  
**HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A  
**HMGR:** 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa  
**HMGS:** 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa

**IPC:** Inositol fosforilceramida  
**IPI:** Isopentenil pirofosfat isomerasa  
**IPP:** Isopentenil pirofosfat  
**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosid.  
**km, km<sup>R</sup>:** Kanamicina, resistent a kanamicina.  
**LE:** Landsberg erecta  
**MEP:** 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat  
**MES:** Àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic.  
**Min:** Minuts.  
**MRD:** Membranes resistents a detergents  
**MS:** Espectrometria de masses.  
**MVA:** Mevalonat  
**MVK:** Mevalonat quinasa  
**N-terminal:** Extrem aminoterminal.  
**NADH:** Dinucleòtid de nicotinamida i adenina (forma reduïda).  
**NADPH:** Dinucleòtid de nicotinamida i adenina fosfat (forma reduïda)  
**NAM:** Naftalè acetamida  
**NPTII:** Neomicina fosfotransferas II  
**OPS:** Octaprenil pirofosfat sintasa  
**OSBP:** Oxisterol binding proteins  
**pb, kb:** Parells de bases, kilobases.  
**PCR:** Reacció en cadena de la polimerasa  
**PHS:** Fitoesfingosina  
**PMD:** Mevalonat 5-difosfodecarboxilasa  
**PMK:** Fosfomevalonat quinasa  
**PREN:** Poliisoprenols  
**PSA:** Persulfat amònic.  
**q.s.p.:** Quantitat suficient per  
**RE:** Reticle endoplasmàtic  
**Rpm:** Revolucions per minut  
**S1P:** Esfingosina 1-fosfat  
**SDS:** Dodecilsulfat sòdic.  
**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizant.  
**SMT:** Esterol metiltransferasa  
**SPH:** Esfingosina  
**SPK:** Esfingosina quinasa  
**SPS:** Solanesil pirofosfat sintasa  
**SPT:** Serina-palmitoil transferasa  
**SQS:** Escualè sintasa  
**SREBP:** Sterol regulatory elements binding protein  
**TAE:** Tris-Acètic-EDTA.  
**TE:** Tampó Tris-EDTA.  
**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina  
**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometà.  
**UPPS:** Undecanil pirofosfat sintasa  
**UTR:** Regió transcrita no traduïda  
**UV:** Ultravioleta.  
**X-Gluc:** 5-bromo-4-cloro-3-indonil  $\beta$ -glucurònid.

# Í NDEX



<b>PRESENTACIÓ I OBJECTIUS</b>	19
<b>INTRODUCCIÓ</b>	23
<b>1. Biosíntesis d'isoprenoides</b>	25
1.1. Naturalesa química dels isoprenoides	25
1.2. Síntesis d'isoprenoides	28
1.2.1. Vies de síntesis d'IPP	26
1.2.1.1. Via del mevalonat	29
1.2.1.2. Vial del metileritritol fosfat	30
1.2.1.3. Distribució subcel·lular de la biosíntesis d'isoprenoides en plantes superiors	31
1.2.2. Etapes posteriors a la síntesis d'IPP	32
<b>2. Preniltransferases</b>	34
2.1. Classificació de les preniltransferases	35
2.1.1. <i>Trans</i> -preniltransferases	36
2.1.1.1. Preniltransferases de tipus I: <i>Trans</i> -prenildifosfat sintases de cadena curta	36
2.1.1.2. Preniltransferases de tipus II: <i>Trans</i> -prenildifosfat sintases de cadena mitjana	36
2.1.1.3. Preniltransferases de tipus III: <i>Trans</i> -prenildifosfat sintases de cadena llarga	37
2.1.2. <i>Cis</i> -preniltransferases	37
2.1.2.1. Preniltransferases de tipus IV: <i>Cis</i> -poliprenildifosfat sintases de cadena llarga	37
2.1.2.2. Preniltransferases de tipus V: <i>Cis</i> -poliprenildifosfat sintases de cadena curta	38
2.2. Estructura i funció de les preniltransferases	38
2.2.1. <i>Trans</i> -preniltransferases	38
2.2.2. <i>Cis</i> -preniltransferases	39
<b>3. Dolícols i poliprenols</b>	40
3.1. Estructura i contingut de dolícols i poliprenols en plantes	40
3.2. Biosíntesis dels dolícols i poliprenols	42
3.3. Funcions biològiques dels dolícols i poliprenols	44
3.4. Regulació de la síntesis de dolícols i poliprenols	45
<b>4. Fitoesterols</b>	46
4.1. Biosíntesis dels fitoesterols	48
4.1.1. Tronc comú de la síntesi de fitoesterols	49
4.1.2. Síntesis dels 24-etil- i 24-metilesterols	50
4.2. Funcions dels fitoesterols	52
4.3. Regulació de la biosíntesis d'esterols	53
4.3.1. Famílies multigèniques	54
4.3.2. Paper de la HMGR	55
4.3.3. Altres punts de regulació de la via de síntesis de fitoesterols	58
<b>5. Esfingolípids</b>	59
5.1. Estructura i composició dels esfingolípids en plantes	59
5.2. Biosíntesis dels esfingolípids en plantes	62
5.3. Funcions dels esfingolípids	64
5.4. Regulació de la biosíntesis d'esfingolípids	66
<b>6. Regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids</b>	67
6.1. Lipid rafts	67
6.2. Regulació coordinada dels nivells d'esterols i esfingolípids	70
6.3. Identificació i caracterització dels gens <i>ARV</i>	72
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	75
<b>1. Material vegetal</b>	77
1.1. Cultiu estèril <i>in vitro</i>	77
1.1.1. Esterilització de llavors	77
1.1.2. Sembrada de llavors	78

1.2.Cultiu de plantes en terra .....	78
1.3.Cultiu cel.lular .....	79
<b>2.Soques bacterianes i llevats .....</b>	<b>79</b>
<b>3.Medis de cultiu utilitzats .....</b>	<b>79</b>
<b>4.Eines bioinformàtiques .....</b>	<b>80</b>
<b>5.Vectors plasmídics .....</b>	<b>82</b>
5.1.Vectors per a la preparació de construccions .....	82
5.2.Vectors per a l'expressió de proteïnes en llevat .....	82
5.3.Vector per a l'anàlisi del patró d'expressió mitjançant el gen marcador GUS .....	82
5.4.Vectors per a la localització subcel.lular de proteïnes fusionades a la GFP .....	83
<b>6.Clonatge de l'ADNc de la DPS1 d'<i>A.thaliana</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>7.Clonatge dels ADNc d'ARV1 i ARV2 d'<i>A.thaliana</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>8.Mutagènesis per "overlapping extension" .....</b>	<b>85</b>
8.1.Mutació de la Tyr58 de la AtDps1p .....	85
8.2.Mutació de les cisteïnes 8, 11, 32 i 35 d'Arv2p .....	87
<b>9.Deleccions de l'extrem aminoterminal de l'AtDps1p .....</b>	<b>88</b>
<b>10.Deleccions del domini AHD de l'AtArv2p .....</b>	<b>89</b>
<b>11.Complementació funcional de les soques de llevat .....</b>	<b>90</b>
11.1.Clonatge dels ADNc d'AtDps1p, AtLeu11p, AtLeu23p, AtLeu36p, AtLeu46p, AtLeu59p i AtMet2p en el vector pJR1133 .....	90
11.2.Clonatge dels ADNc d'AtArv1p, AtArv2p, AtΔZn2p, AtΔ35p, AtΔ46p, AtΔ56p, AtΔ68p, AtΔ36-46p i AtΔ47-56p en el vector pJR1133 .....	90
11.3.Transformació de les soques de llevat .....	91
11.4.Complementació funcional de les soques de llevat SNH23-7D i YJN1756 en medi sòlid .....	92
11.5.Complementació funcional de les soques de llevat SNH23-7D i YJN1756 en medi líquid .....	92
<b>12.Anàlisi de l'expressió dels gens <i>AtDPS1</i>, <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> .....</b>	<b>93</b>
12.1.Extracció d'ARN .....	93
12.2.Quantificació de les mostres d'ARN .....	93
12.3.Anàlisi de l'extrem 5'-UTR del gen <i>AtARV2</i> .....	93
12.4.Anàlisi de l'expressió dels gens <i>AtDPS1</i> , <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> a nivell d'ARNm per la tècnica de Northern blot .....	94
12.4.1.Electroforèsis i transferència de l'ARN .....	94
12.4.2.Hibridació de sondes marcades amb <sup>32</sup> P-dCTP .....	96
12.4.3.Marcatge i purificació de les sondes .....	96
12.5.Anàlisi de l'ARNm dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> mitjançant RT-PCR .....	97
12.6.Anàlisi del patró d'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> mitjançant l'assaig d'activitat GUS en plantes transgèniques .....	98
12.6.1.Construcció dels plasmidis pBIA1GUS i pBIA2GUS per a les fusions traduccional <i>ARV1::GUS</i> i <i>ARV2::GUS</i> .....	98
12.6.2.Transformació d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	99
12.6.3.Generació de plantes transgèniques d' <i>A.thaliana</i> .....	100
12.6.3.1.Creixement de les plantes a transfectar .....	101
12.6.3.2.Creixement d' <i>A.tumefaciens</i> .....	101
12.6.3.3.Transformació d' <i>A.thaliana</i> mitjançant <i>A.tumefaciens</i> .....	102
12.6.3.4.Sel.lecció de les plantes transgèniques .....	102
12.6.3.5.Sel.lecció de línies homozigòtiques pel transgen .....	103
12.7.Anàlisi qualitatiu de l'activitat GUS en plantes transgèniques .....	103

<b>13. Localització subcel·lular de les proteïnes AtDps1, AtArv1 i AtArv2</b>	104
13.1. Construcció dels gens recombinants <i>AtDPS1::GFP</i> , <i>AtDPS1trunc::GFP</i> i <i>AtDPS1NH2::GFP</i>	105
13.2. Construcció dels gens recombinants <i>GFP::AtARV1</i> , <i>GFP::AtARV2</i> , <i>AtARV1::GFP</i> , <i>GFP::AtArv2A68</i> i <i>GFP::AtArv2AHD</i>	106
13.3. Expressió transitòria dels gens quimèrics en fulles de ceba mitjançant microbombardeig	107
13.3.1. Preparació de les micropartícules de tungstè	108
13.3.2. Adsorció de l'ADN sobre les micropartícules	108
13.3.3. Microbombardeig o transfecció de teixit de ceba	109
13.4. Observació de les cèl·lules transfectades al microscopi confocal	110
<b>14. Determinació d'activitat enzimàtica</b>	111
14.1. Assaig d'activitat <i>cis</i> -preniltransferasa	111
14.1.1. Preparació dels extractes	111
14.1.2. Assaig d'activitat <i>cis</i> -preniltransferasa	111
14.1.3. Cromatografia en fase reversa dels productes de reacció de l'assaig d'activitat <i>cis</i> -preniltransferasa	112
14.2. Determinació de l'activitat HMGR	113
14.2.1. Reacció de síntesi de mevalonat	113
14.2.2. Purificació del mevalonat format	115
14.2.3. Contatge de la mevalonolactona marcada amb [ <sup>14</sup> C]	116
14.2.4. Càlcul de l'activitat específica	117
<b>15. Western blot</b>	117
15.1. Obtenció d'extractes proteics d' <i>A. thaliana</i>	117
15.2. Obtenció d'extractes proteics de <i>S. cerevisiae</i>	118
15.3. Determinació de la concentració de proteïna en extractes proteics	119
15.4. Separació de proteïnes mitjançant electroforesis en gels de poliacrilamida SDS-PAGE	119
15.5. Transferència de les proteïnes	121
15.6. Immunodetecció quimioluminiscent	122
15.7. Tinció de les proteïnes de les membranes	123
<b>16. Determinació del lloc d'inserció de l'ADN-T en mutants dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i></b>	124
16.1. Extracció de l'ADN genòmic pel mètode del CTAB	124
16.2. Identificació de l'element DS inserit per PCR	125
<b>17. Determinació dels nivells d'esterols en <i>A. thaliana</i></b>	126
17.1. Preparació de les mostres	126
17.2. Extracció dels esterols	126
17.3. Anàlisi de les mostres per GC/MS	126
<b>18. Marcatge metabòlic i anàlisi lipídic en <i>S. cerevisiae</i></b>	127
18.1. Anàlisi dels esterols de llevat per GC/MS	127
18.2. Anàlisi metabòlic d'esfingolípids en llevat	127
18.3. Anàlisi metabòlic de ceramides en llevat	128
18.4. Anàlisi metabòlic de fosfatidilglicerol en llevat	128
<b><u>CAPITOL I</u></b>	129
<b><u>RESULTATS</u></b>	133
1. Identificació i clonatge de l'ADNc de la Dehidrodoliquil-PP sintasa d' <i>A. thaliana</i>	135
2. Estudi de l'expressió del gen <i>AtDPS1</i>	137
3. Anàlisi de la seqüència aminoacídica de la proteïna AtDps1	138

<b>4.Anàlisi funcional de la AtDps1 d'<i>A.thaliana</i></b> .....	140
4.1.Complementació funcional de la soca de llevat SNH23-7D.....	140
4.2.Assaig d'activitat <i>cis</i> -preniltransferasa.....	141
<b>5.Localització subcel.lular de la proteïna AtDps1</b> .....	143
<b>6.Caracterització de l'extrem aminoterminal de la AtDps1p d'<i>A.thaliana</i></b> .....	144
<b>7.Família gènica de Dedol-PP sintases d'<i>A.thaliana</i></b> .....	147
<b><u>DISCUSSIÓ</u></b> .....	151
<b>1.Identificació i clonatge de l'ADNc de la Dehidrodoliquil-PP sintasa d'<i>A.thaliana</i></b> .....	153
<b>2.El gen <i>AtDPS1</i> té un patró d'expressió molt localitzat a les arrels</b> .....	153
<b>3.La proteïna AtDps1 és una Dedol-PP sintasa funcional</b> .....	154
<b>4.Importància de l'extrem N-terminal de la AtDps1p</b> .....	156
4.1.L'extrem N-terminal de la AtDps1p localitza la proteïna al RE.....	156
4.2.L'extrem N-terminal de la AtDps1p és essencial per a la funcionalitat de la proteïna.....	157
<b>6.Existeix una família gènica de <i>cis</i>-preniltransferases en <i>A. thaliana</i></b> .....	158
<b><u>CONCLUSIONS</u></b> .....	161
<b><u>CAPITOL II</u></b> .....	165
<b><u>RESULTATS</u></b> .....	169
<b>1.<i>Arabidopsis thaliana</i> conté una petita família multigènica que codifica Arvp</b> .....	171
1.1.Identificació i clonatge dels ADNc dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> d' <i>A.thaliana</i> .....	171
1.2.Anàlisi de l'extrem 5' del gen <i>AtARV2</i> .....	175
1.3.Organització dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> .....	176
<b>2.Estudi de l'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i></b> .....	177
2.1. Estudi de l'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> per Northern blot.....	177
2.2. Estudi de l'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> per RT-PCR.....	178
2.3. Estudi del patró d'expressió espacial i temporal dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> en plantes transgèniques portadores dels gens quimèrics <i>AtARV:GUS1</i> i <i>AtARV2:GUS</i> .....	180
<b>3.Caracterització de les proteïnes AtArv1 i AtArv2</b> .....	184
3.1.Comparació de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes AtArv1 i AtArv2.....	184
3.2.Comparació de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes AtArv1 i AtArv2 amb les proteïnes Arv de <i>S.cerevisiae</i> i <i>H.sapiens</i> .....	185
<b>4.AtArv1p i AtArv2p són els ortòlegs de la proteïna Arv1 de llevat</b> .....	187
4.1.Les proteïnes AtArv complementen la soca de llevat YJN1756 deficient en la funció Arv.....	187
4.2.AtArv2p suprimeix els defectes del metabolisme lipídic de la soca de llevat YJN1756.....	188
4.2.1.Restauració dels nivells d'esterols.....	189
4.2.2.Restauració del metabolisme d'esfingolípids.....	190
4.2.3.Restauració del metabolisme de fosfolípids.....	192
<b>5.Anàlisi funcional de la regió N-terminal de la proteïna AtArv2</b> .....	193
5.1.Assaig de complementació funcional de la soca YJN1756 transformada amb versions mutades d'AtArv2p-HA.....	194
5.2.Cinètica de creixement en medi líquid de la soca YJN1756 portadora de versions mutades d'AtArv2p-HA.....	197



5.3. Anàlisi per Western blot de la soca YJN1756 transformada amb AtArv1p-HA, AtArv2p-HA i les diferents versions mutades d'AtArv2p-HA.....	198
<b>6. Localització subcel.lular de les proteïnes AtArv1 i AtArv2.....</b>	<b>199</b>
<b>7. Caracterització de mutants d'inserció dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i>.....</b>	<b>204</b>
7.1. Confirmació de la posició de la inserció per PCR.....	204
7.2. Nivells d'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> d' <i>A. thaliana</i> en el mutant <i>arv1</i> .....	206
7.3. Nivells d'expressió dels gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> d' <i>A. thaliana</i> en el mutant <i>arv2</i> .....	209
7.4. Anàlisi fenotípic dels mutants SALK_090151 i ET8675.....	210
<b>8. Efectes de la inhibició de la síntesis d'esfingolípid en la via de síntesis d'esterols d'<i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>210</b>
8.1. Activitat HMGR en plantes tractades amb miriocina.....	211
8.1. Activitat HMGR en plantes tractades amb fumonisina $\beta$ 1.....	212
8.3. Anàlisi per Western blot de plantes tractades amb miriocina i fumonisina $\beta$ 1.....	214
8.4. Determinació dels nivells d'esterols en plantes tractades amb miriocina i fumonisina $\beta$ 1.....	215
8.5. Activitat HMGR en plantes que sobreexpressen la proteïna HMGR1S tractades amb miriocina.....	217
<b><u>DISCUSSIÓ</u>.....</b>	<b>219</b>
<b>1. <i>Arabidopsis thaliana</i> conté dos gens <i>ARV</i>.....</b>	<b>221</b>
<b>2. Caracterització de les proteïnes AtArv1 i AtArv2.....</b>	<b>223</b>
2.1. Les proteïnes AtArv1 i AtArv2 són ortòlogues de la proteïna Arv1 de llevat.....	223
2.2. El Subdomini C-terminal de l'AHD és essencial per a la seva funcionalitat.....	226
<b>3. Estudi de la localització subcel.lular de les proteïnes AtArv1 i 2.....</b>	<b>228</b>
<b>4. Els gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i> presenten patrons d'expressió altament solapants.....</b>	<b>228</b>
<b>5. Caracterització de mutants d'inserció del gens <i>AtARV1</i> i <i>AtARV2</i>.....</b>	<b>234</b>
<b>6. Efectes de la inhibició de la síntesis d'esfingolípid en la via de síntesis d'esterols d'<i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>236</b>
<b><u>CONCLUSIONS</u>.....</b>	<b>241</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u>.....</b>	<b>245</b>
<b><u>APÈNDIXS</u>.....</b>	<b>265</b>



# **PRESENTACIÓ I OBJECTIUS**



Les plantes produeixen una gran varietat de compostos isoprenoides que són essencials tant pel seu creixement i desenvolupament com per la seva relació i adaptació a l'entorn. La biosíntesi d'isoprenoides en plantes té lloc a través d'una via metabòlica molt complexa en la que l'acetil-CoA, via mevalonat, o bé el gliceraldehid-3-fosfat i el piruvat, via metileritritolfosfat, són convertits en isopentenildifosfat (IPP), que posteriorment és utilitzat per produir prenildifosfats de diferents longituds. Aquests intermediaris són els punts de partida de múltiples ramificacions que condueixen a la síntesi de la gran diversitat d'isoprenoides finals. Encara que s'accepta que la biosíntesi d'isoprenoides ha d'estar estrictament regulada, els mecanismes de control són poc coneguts. No obstant, la complexitat de la via metabòlica suggereix l'existència de múltiples punts de control per assegurar la producció d'isoprenoides adequats durant el desenvolupament de les plantes.

Les preniltransferases són una família d'enzims que catalitzen les reaccions de condensació de l'IPP amb diferents prenilfosfats al·lílics, per produir prenildifosfats de diferent longitud. Les *cis*-preniltransferases són un grup de preniltransferases que catalitzen l'addició en *cis* d'IPP sobre el substrat al·lílic. Entre les *cis*-preniltransferases procariotes hi ha les undecaprenildifosfat sintases (Upps) que sintetitzen l'undecaprenildifosfat (C<sub>55</sub>) implicat en la formació de la paret bacteriana. Entre les *cis*-preniltransferases eucariotes hi ha les dehidrodoliquildifosfat sintases (Dps) implicades en la biosíntesi del dolicol, poliprenol de cadena llarga que juga un paper clau en la glicosilació de proteïnes en eucariotes.

En el moment d'iniciar el treball que constitueix aquesta tesi doctoral es disposava de molt poca informació de la via de síntesi del dolicol en plantes. De fet, en eucariotes únicament havia estat clonat el gen que codifica per una Dps de llevat (*RER2*; Sato et al., 1999). D'altra banda s'havia identificat en el nostre grup de recerca una seqüència genòmica en *Arabidopsis thaliana* que podia codificar una dehidrodoliquildifosfat sintasa. Per aprofundir en el coneixement de les *cis*-preniltransferases de plantes i la seva funció en la síntesi dels prenilfosfats precursors del dolicol, ens vam proposar els següents objectius:

1. Clonatge de l'ADNc corresponent a la seqüència genòmica identificada, amb capacitat per codificar una dehidrodoliquildifosfat sintasa (AtDps1p).
2. Anàlisi del patró d'expressió del gen *AtDPS1*.
3. Caracterització estructural i funcional de la AtDps1p.
4. Estudi de la localització subcel·lular de AtDps1p.
5. Identificació en el genoma d'*Arabidopsis* d'altres gens amb capacitat per codificar dehidrodoliquildifosfat sintases (DPSes).

Els esterols són compostos isoprenoides imprescindibles per a la funcionalitat de les membranes, i en els últims anys s'ha vist que també exerceixen un paper en el creixement i desenvolupament de les plantes de forma independent a la seva conversió en brassinosteroids. Tot i que estan presents en tota la membrana, existeixen uns subdominis de la membrana anomenats "lipid rafts" especialment enriquits en esterols. Aquests "lipid rafts" són subdominis de la membrana plasmàtica enriquits amb esterols i glucoesfingolípids, i amb un contingut proteic específic. Els esfingolípids són compostos derivats dels àcids grassos, que a més de formar els "lipid rafts" amb els esterols, modulen les propietats de les membranes i, en el cas dels esfingolípids simples (ceramides i bases esfingoides lliures), poden actuar com a missatgers secundaris i com missatgers intracel·lulars. Durant els últims anys, s'ha descrit que el metabolisme d'esterols i esfingolípids es regula de forma coordinada. Entre les proteïnes implicades en aquesta regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids en eucariotes es troben les proteïnes Arv.

En el moment d'iniciar el treball que constitueix aquesta tesis doctoral es disposava de molt poca informació de la regulació coordinada de metabolisme d'esterols i esfingolípids, i en concret de les proteïnes Arv, en plantes. De fet, en eucariotes únicament havien estat clonats els gens que *ARV* de llevat i humans (Tinkelenberg et al., 2000; Swain et al., 2002). D'altra banda s'havia identificat una seqüència genòmica en *Arabidopsis thaliana* que podia codificar una proteïna Arv. Per aprofundir en el coneixement de la regulació coordinada d'esterols i esfingolípids i en el paper de les proteïnes Arv en plantes, ens vam proposar els següents objectius:

1. Identificació i clonatge dels gens *AtARV* d'*Arabidopsis thaliana*.
2. Anàlisi dels patrons d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2*.
3. Caracterització estructural i funcional de les proteïnes AtArv1 i AtArv2.
4. Estudis de la localització subcel·lular de les proteïnes AtArv1 i AtArv2.
5. Caracterització dels mutants d'inserció SALK\_090151 (gen *AtARV1*) i ET8675 (gen *AtARV2*).
6. Efectes de la inhibició de la síntesis d'esfingolípids sobre la via de síntesis d'esterols en *A.thaliana*.

