

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

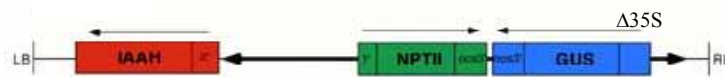
**MATERIALS I MÈTODES**



## 1. MATERIAL VEGETAL

Els experiments que es presenten en aquesta tesis s'han realitzat utilitzant com a material vegetal l'espècie *Arabidopsis thaliana* (Heyn) varietats Columbia gl 1 (Lehle Seeds, USA), Columbia 0, Columbia C24 i Landsberg (Le). En funció de l'experiment a realitzar, s'han utilitzat plantes en diferents estadis de desenvolupament, des de plàntules (d'1 a 15 dies de creixement en placa estèril), fins a plantes adultes (de 5 a 6 setmanes, crescudes inicialment en placa estèril i posteriorment transplantades a terra) tan en fase vegetativa com en fase reproductiva. En els experiments de localització subcel.lular amb GFP s'ha utilitzat també l'espècie *Allium cepa* varietat Figueres.

En el present treball s'ha utilitzat el mutant ET8675 de la col.lecció "Enhancer Trap" del Cold Spring Harbour (NY, USA). L'element DS (**Figura 17**) d'aquest mutant s'ha inserit en la posició -6 pb respecte del codó d'inici de transcripció del gen *AtARV2*. Aquest element DS conté el gen marcador *GUS* amb un promotor mínim que només s'expressa quan s'ha inserit a prop d'activadors cromosomals de la transcripció, de manera que si l'element DS s'insereix en la posició i orientació adequades aquests mutants es poden utilitzar per estudiar el patró d'expressió dels gens en que s'ha inserit. L'element DS conté a més els gens *IAAH* i *NPTII* que confereixen sensibilitat a naftalè acetamida (NAM) i resistència a l'antibiòtic kanamicina respectivament.



**Fig.17. Esquema de l'element DS de la col.lecció "Enhancer Trap".** *IAAH*, gen de la indol acetamida hidrolasa (confereix sensibilitat a naftalè acetamida, NAM); *NPTII*, gen de la neomicina fosfotransferasa (confereix resistència a la kanamicina); *GUS*, gen marcador de la  $\beta$ -glucuronidasa; *LB*, *RB* extrems esquerra i dret de l'ADN-T; *ocs*, *nos* terminadors de la transcripció;  $\Delta 35S$ , promotor mínim (-46 pb del promotor 35S viral).

També s'ha iniciat la caracterització del mutant Salk\_090151 de la col.lecció Salk (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, CA, USA), portador d'una inserció d'ADN-T a la posició +15 respecte l'inici de traducció del gen *AtARV1*. L'ADN-T conté el gen *NPTII* que confereix resistència a l'antibiòtic kanamicina.

### 1.1 Cultiu estèril *in vitro*

#### 1.1.1 Esterilització de llavors

Les llavors són esterilitzades superficialment mitjançant el tractament amb una solució etanòlica de clor actiu durant 8 minuts en agitació constant. Seguidament, i en condicions estèrils, es realitzen dos rentats amb etanol al 96% per eliminar les restes de clor. Posteriorment es deixen assecar les llavors de 12 a 18 hores en la cabina de flux laminar per eliminar completament l'etanol.

La solució etanòlica de clor actiu utilitzada es prepara en dues fases, primer es prepara una solució concentrada, dissolvent una pastilla de *Deterclor* (dicloroisocianurat de sodi al 45%, *DETERCO*<sup>®</sup>) en 40 ml d'aigua destil.lada. Un cop dissolta, es prepara la solució d'esterilització diluint 5 ml de la solució anterior en 45 ml d'etanol al 96%.

### **1.1.2. Sembra de llavors**

Un cop les llavors estan estèrils i seques es distribueixen homogèniament en plaques de Petri, que contenen medi Murashige i Skoog (medi MS) solidificat amb 0,8% d'agar. Després de sembrar, les plaques es sellen amb esparadrap transpirable (Leukopor<sup>®</sup>), i es deixen a 4°C de 2 a 4 dies en foscor. L'objectiu d'aquest procés, denominat estratificació, és sincronitzar la germinació de les llavors sembrades. Posteriorment, es posen a germinar en les condicions de llum adequades.

En aquells experiments en que es sotmeten les plàntules a tractaments amb diferents inhibidors enzimàtics, les llavors estèrils es sembren primer homogèniament a sobre d'una membrana de nylon en plaques de Petri petites (60mm de diàmetre) que continguin medi MS en absència dels inhibidors, de manera que les plantes puguin créixer, però l'arrel no s'introdueixi dins de l'agar, i per tant, les plàntules siguin més fàcils de canviar de medi. S'estratifiquen i posteriorment es posen a créixer durant 20 o 28 dies en condicions de llum de dia curt (8h de llum i 16 de foscor). Al cap de 20 dies, les membranes amb les plàntules es passen amb l'ajuda d'unes pinces, esterilitzades amb etanol, a unes altres plaques de Petri que continguin medi MS en presència de l'inhibidor adequat.

#### Medi Murashige and Skoog (MS)

Murashige & Skoog	4,4 g/L
MES	0,5 g/L
Agar	0,8% (p/v)

Es dissolen les sals de la mescla MS i el tampó MES, s'ajusta el pH a 5,7 amb KOH 5M, s'afegeix l'agar i s'autoclava 30 min. a 120°C. Els antibiòtics o inhibidors, en cas que siguin necessaris, s'afegeixen en el moment de plaquejar. En alguns casos concrets, com per exemple en els escritinis per buscar plantes transgèniques, el medi s'ha suplementat amb sacarosa (10 g/L). Les membranes de nylon es tallen amb el diàmetre adequat perquè capiguin dintre les plaques, s'autoclaven 30 min a 120°C embolicades amb paper d'alumini i s'assequen a l'estufa a 80°C. Un cop seques les membranes es posen en les plaques de MS amb l'ajuda d'unes pinces prèviament esterilitzades amb etanol.

### **1.2. Cultiu de plantes en terra**

En aquells casos en que ha estat necessari realitzar estudis de plantes en estadi adult i/o en fase reproductiva, les plantes s'han transplantat des de les plaques de cultiu *in vitro* a terra. Per això, un cop que les plàntules crescudes en plaques de Petri presenten el primer parell de fulles (uns 10 a 15 dies després de la germinació) es transplanten a terra en testos que contenen com a suport sòlid una mescla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1). Abans de realitzar el transplant, aquest suport sòlid s'hidrata amb aigua o bé amb solució nutritiva (veure més avall; Somerville et al. 1982). Les plantes es separen amb cura del medi de germinació de la placa i es passen al suport sòlid de terra. Un cop coberta l'arrel amb terra es tapen els testos amb plàstic transparent (Saram Wrap<sup>®</sup> o similar) per a mantenir unes condicions d'humitat elevada, donat que les plantes crescudes *in vitro* són molt sensibles a la deshidratació. Als 2 o 3 dies les plantes es poden destapar i es reguen segons les necessitats amb aigua o solució nutritiva.

Composició solució nutritiva: KNO<sub>3</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,5) 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, EDTA fèrric 50 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 µM, MnCl<sub>2</sub> 14 µM, CuSO<sub>4</sub> 0,5 µM, ZnSO<sub>4</sub> 1 µM, NaMoO<sub>4</sub> 0,2 µM, NaCl 10 µM i CoCl<sub>2</sub> 10 nM.

### **1.3. Cultiu cel·lular**

El cultiu en suspensió de cèl·lules de la línia T87 d'*A.thaliana* (var. Columbia) (Axelos et al., 1992) va ser amablement cedit pels Dr. Michèle Axelos i Bernard Lescure (Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, CNRS-INRA, Castanet-Tolosan, France). El cultiu en suspensió s'ha crescut en medi MS líquid suplementat amb àcid naftalenacètic 1 µM a 22°C, 122 rpm i sota condicions de fotoperíode de llum contínua.

## **2. SOQUES BACTERIANES I LLEVATS**

- Les soques bacterianes utilitzades en aquest treball són:

- ***Escherichia coli* JM109:** *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17* (rk-,mk+), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]*.

- ***Escherichia coli* DH5α:** □ *sup E44 Δlac U169 ( 80 lacZΔM15) hsd R17 rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1.*

- ***Agrobacterium tumefaciens* C<sub>58</sub>C<sub>1</sub>** amb el plasmidi pGV2260.

- Les soques de llevat utilitzades en aquest treball han estat cedides amablement pel Dr. J.T.Nickels del Dept. of Biochemistry, MCP Hahnemann University, Philadelphia (PE), USA:

- ***Saccharomyces cerevisiae* YJN1756:** (*arv1::Kan ade2, his3, leu2, trp1, ura3*)

- ***Saccharomyces cerevisiae* W303-1A:** Mata *leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 his3-11, 15 ade2 can1-100*

- ***Saccharomyces cerevisiae* SNH23-7D:** Mata, *rer2-2, mfa1::ADE2, mfa2::TRP1, bar1::HIS3, ade2, his3, leu2, lys2 trp1, ura3*

- ***Saccharomyces cerevisiae* SNY9:** Mata, *mfa1::ADE2, mfa2::TRP1, bar1::HIS3, ade2, his3, leu2, lys2 trp1, ura3*

## **3. MEDIS DE CULTIU UTILITZATS**

1. El medis de cultiu utilitzats per a les soques bacterianes va ser el medi LB líquid o solidificat amb agar i el medi SOC:

- LB: 1% Triptona  
0.5% NaCl  
0.5% extracte de llevat  
pH 7.4 amb NaOH

Plaques LB: medi LB + 15 g/L de bactoagar

- SOC : 20 g/L bactopectona  
5 g/L extracte de llevat  
2.033 g/L CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
2.465 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0.58 g/L NaCl

0.186 g/L KCl  
3.604 g/L glucosa

Per aquest medi SOC, es dissolen tots els components, es comprova que el pH sigui 7.0 i es filtra amb filtres esterilitzants de 0.22µm.

2. La preparació dels medis per a llevat, tan el medi mínim YNB com el complet YPG, s'ha dut a terme seguint les recomanacions del manual de laboratori "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al., 1997):

- YNB: 1.5 g/L base nitrogenada de llevat sense aa ni sulfat amònic (YNB)  
5 g/L Sulfat d'amoni  
9.5 g/L HEPES  
2% Glucosa  
pH 7 amb NaOH

Per preparar el medi mínim, es dissolen el YNB, el sulfat d'amoni i l'HEPES. S'autoclava. La glucosa es prepara a part al 20%, s'autoclava i s'afegeix a l'hora d'utilitzar el medi, en condicions estèrils, a la concentració final del 2%. Els medis sòlids es preparen afegint bactoagar 15 g/L. Els complementos necessaris per complementar les diferents auxotrofies necessàries pel creixement de la soca de llevat s'afegeixen abans d'autoclavar. En aquest treball s'han utilitzat: adenina (40 mg/L), histidina (20 mg/L), leucina (60 mg/L), triptòfan (40 mg/L) i uracil (20 mg/L).

- Plaques YPG: 10 g/L extracte de llevat  
10 g/L bactopectona  
2% Glucosa  
15 g/L bactoagar  
pH 7 amb NaOH

Es dissol l'extracte de llevat i la bactopectona. S'hi afegeix l'agar i s'autoclava. Just abans de plaquejar s'hi afegeix, en condicions estèrils la glucosa, prèviament preparada al 20% i autoclavada.

3. Per a créixer la soca d'*A.tumefaciens* s'ha utilitzat el medi YEP:

- YEP: 1 g/L extracte de llevat  
5 g/L extracte de carn  
5 g/L peptona  
5 g/L sacarosa  
0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Es dissolen tots els components, s'ajusta a pH 7 amb NaOH i s'autoclava. Les plaques es fan amb 15 g/L d'agar.

#### **4. EINES BIOINFORMÀTIQUES**

En el present treball s'han utilitzat les següents eines bioinformàtiques per identificar i analitzar les proteïnes Dps1p i Arvp d'*Arabidopsis thaliana*

- Revistes electròniques:
  - *The Plant Journal*: [www.blackwell-synergy.com/toc/tpg/44/1](http://www.blackwell-synergy.com/toc/tpg/44/1)
  - *Plant Physiology*: [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
  - *Plant Science*: [www.sciencedirect.com/science/journal/01698452](http://www.sciencedirect.com/science/journal/01698452)
  - *The Plant Cell*: [www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)
  - *Plant Molecular Biology*: [www.wkap.nl-jnrltoc.htm-0167-4412](http://www.wkap.nl-jnrltoc.htm-0167-4412)
  - *Planta*: [www.springeronline.com/sgw/cda/frontpage/0,11855,5-10027-70-1071796-0,00.html](http://www.springeronline.com/sgw/cda/frontpage/0,11855,5-10027-70-1071796-0,00.html)
  - *Science*: [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
  - *Nature*: [www.nature.com](http://www.nature.com)
  - *Proceedings of the National Academy of Sciences*: [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
  - *Journal of Biological Chemistry*: [www.jbc.org](http://www.jbc.org)
  - *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*: [www.sciencedirect.com/science/journal/13881981](http://www.sciencedirect.com/science/journal/13881981)
  - *PUBMED*: (base de dades d'articles científics)  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Pubmed)
- Anàlisis del perfil d'hidrofobicitat:
  - [www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/)
  - <http://sosui.proteosome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>
  - <http://bioinfo.ifn.lw.se/tmap>
  - [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)
  - [www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)
- Cerca de motius conservats:
  - <http://ca.expasy.org/tools/scanprosite>
  - [www.ebi.ac.uk/Interproscan](http://www.ebi.ac.uk/Interproscan)
- Traducció de seqüències de nucleòtids:
  - <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>
- Bases de dades:
  - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
  - [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)
- Mapes de restricció:
  - <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
- Cerca d'homòlegs en bases de dades:
  - [www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Blast)
- Aliniaments:
  - <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign>
  - [www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)
- Anàlisi filogenètic:
  - <http://genebee.msu.su/genebee.html>
- Predicció de senyals de trànsit:
  - <http://HypothesisCreator.net/iPSORT/predict>
  - [www.infra.fr/servlet/WebPredotar](http://www.infra.fr/servlet/WebPredotar)
  - [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)
  - <http://psort.nibb.ac.jp>
- Búsqueda de mutants i llavors d'*A.thaliana*:
  - <http://arabidopsis.info>
  - <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>
- Llibres electrònics:
  - [www.aspb.org/publications/arabidopsis](http://www.aspb.org/publications/arabidopsis)



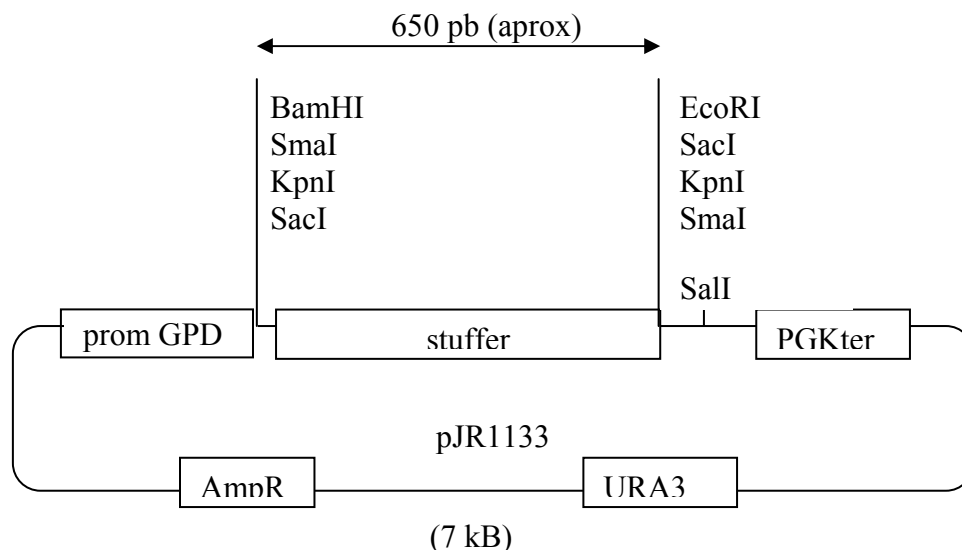
## 5. VECTORS PLASMÍDICS

### 5.1 Vectors per a la preparació de construccions

Per a la preparació de les construccions s'han utilitzat fonamentalment els vectors *pBluescript* (Stratagene) i *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega). La replicació d'aquests plàsmidis s'ha dut a terme per transformació de les soques *d'E.coli* JM109 (Promega) i DH5 $\alpha$  (preparades en el nostre laboratori mitjançant el mètode del clorur càlcic (Seidman et al., 1997)).

### 5.2 Vector per a l'expressió de proteïnes en llevat

Per expressar els ADNc dels gens *ARV* d'*A.thaliana* en la soca mutant YJN1756 s'ha utilitzat el vector pJR1133 (**figura 18**), que ha estat cedit amablement pel Dr. Rodríguez-Concepción del Dept. de Bioquímica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Aquest vector és idèntic al pJR1138 (Rodríguez-Concepción et al. 1999) però en lloc de tenir com a gen de selecció en llevat el *LEU2* té l'*URA3*, cosa que permet créixer als llevats en absència d'uracil. Els ADNc clonats en aquest vector estan sota el control del promotor constitutiu de la gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GPD) de llevat.



**Fig.18.** Vector d'expressió en llevat pJR1133. Conté el promotor de la gliceraldehidfosfat deshidrogenasa (GPD), el gen marcador de resistència a ampicil·lina i el gen que permet sintetitzar uracil i el terminador de la fosfogliceracil quinasa (PGK).

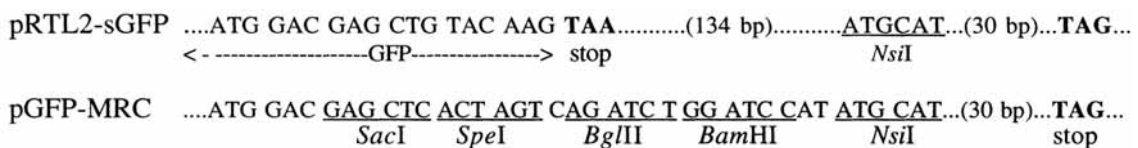
### 5.3. Vector per a l'anàlisi del patró d'expressió mitjançant el gen marcador *GUS*

Per a dur terme l'anàlisi del patró d'expressió dels gens *ARV* d'*A.thaliana* s'han generat plantes transgèniques que contenen la fusió dels promotors respectius al gen marcador *GUS*. Per a això s'ha utilitzat el vector pBI121 (Clontech) que conté les seqüències necessàries per a la transferència de part de l'ADN plasmídic al genoma de la planta, l'ADN-T. En la regió de l'ADN-T es troba el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPT II), que dóna a la planta resistència a antibiòtics, la kanamicina i permet la selecció de les plantes transformades, i el gen *uid A* d'*E.coli*, que codifica per a la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*), una proteïna marcador,

l'activitat de la qual és detectable mitjançant un assaig fàcil i sensible. El vector conté en l'ADN-T dues petites regions amb dianes per enzims de restricció pel clonatge de promotors (substituint al promotor 35S) o regions codificants (substituint la regió codificant del gen *uid A*). Per altra banda, aquest vector conté orígens de replicació per *E.coli* i *Agrobacterium tumefaciens*, permetent la propagació de les construccions inicialment en la soca DH5a d'*E.coli* i posteriorment en la soca d'*Agrobacterium tumefaciens* C<sub>58</sub>C<sub>1</sub> (pGV2260) per obtenir les plantes transgèniques.

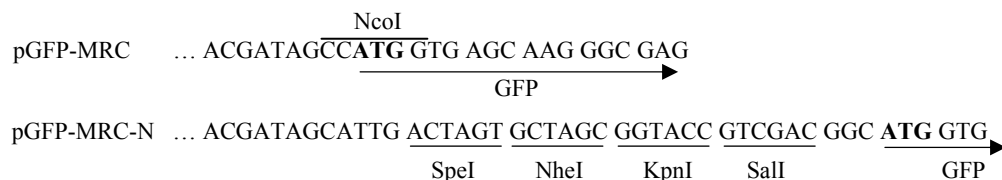
## **5.4 Vectors per a la localització subcel.lular de proteïnes fusionades a la GFP**

Els estudis de localització subcel.lular amb la GFP s'han dut a terme mitjançant la generació de proteïnes de fusió de les proteïnes Arv1p i Arv2p amb la proteïna GFP (*Green fluorescent Protein*). Les construccions s'han generat utilitzant el vector pGFP-MRC (Rodríguez-Concepción et al. 1999), amablement cedit pel Dr. Rodríguez-Concepción (Dept. Bioquímica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona). Aquest vector és una modificació del vector pRTL2-sGFP en que s'ha incorporat, mitjançant PCR, una petita seqüència (**figura 19**) de cinc dianes per enzims de restricció que permeten el clonatge dels gens d'interès en posició C-terminal respecte a la proteïna GFP. Aquest vector conté la versió S65T de la GFP, modificada de manera que presenta una mutació en la serina de la posició 65 que canvia a treonina (Ser→Thr), donant a la proteïna GFP resultant una fluorescència 100 vegades superior que la que presenta la proteïna GFP *wild-type*. Aquest vector conté a més, el gen que dona resistència a l'ampicil.lina i un origen de replicació en bacteris (ori *colE1*), per la selecció i replicació en *E.coli*.



**Fig. 19. Modificació del vector pRTL2-sGFP per incorporar una seqüència de clonatge a C-terminal de la GFP i donar lloc al vector pGFP-MRC.**

Pel clonatge del marcador de golgi (NST: extrem aminoterminal de la N-sialiltransferasa de rata) s'ha utilitzat una modificació del vector pGFP-MRC generada en el nostre laboratori (pGFP-MRC-N) (**figura 20**), en la que s'ha introduït en la diana *NcoI* que conté l'ATG de la GFP una seqüència que conté quatre dianes per enzims de restricció que permeten el clonatge dels gens d'interès en posició N-terminal respecte a la proteïna GFP.



**Fig.20. Modificació del vector pGFP-MRC per incorporar una seqüència de clonatge a N-terminal de la GFP i donar lloc al vector pGFP-MRC-N.**

## **6. CLONATGE DE L'ADNc DE LA DPS1 D'*A. THALIANA***

El clonatge de l'ADNc de la Dps1p d'*A.thaliana* s'ha dut a terme mitjançant l'estratègia de la RT-PCR (reacció de la transcriptasa reversa (RT) seguida d'una reacció en cadena de la polimerasa (PCR)). L'ARN utilitzat per realitzar la RT ha estat 6 µg d'ARN total extret amb el kit RNeasy plant extraction kit<sup>®</sup> (Qiagen) de plàntules de 12 dies crescudes en plaques de Petri amb medi MS sota un règim de llum de dia llarg (16h de llum). L'encebador utilitzat per sintetitzar la mescla d'ADNc monocatenaris amb la RT (Roche) és un oligo(dT): 5'-GCGTCGACTGCAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'. La reacció catalitzada per la RT s'ha dut a terme a 42°C durant 1 h.

Una alíquota de 2 µl de la mescla d'ADNc monocatenaris s'ha utilitzat com a motlle per l'amplificació de l'ADNc AtDPS1 mitjançant una reacció de PCR, utilitzant l'ADN polimerasa *pfu* (Promega). Per amplificar l'ADNc AtARV1 s'ha utilitzat els encebadors 1DPSBam (sentit) i 1DPSEco (antisentit), dissenyats a partir de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC003040 (GenBank).

1DPSBam: 5'-CGGGATCCGGCAAAGCCAAATTAAGTTGTC-3'. Seqüència reversa i complementària del nucleòtid 19113 al 19134 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC007323 (GenBank).

1DPSEco: 5'-CGGAATACGAGAGGATGAAAGGTGGATC-3'. Seqüència directa del nucleòtid 17594 al 17613 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC007323 (GenBank).

El producte resultant es separa en un gel d'agarosa a l'1.5%. Es retalla la banda i es purifica amb el kit JetSorb<sup>®</sup> (Genomed). La DPS1 es digereix amb *Bam*HI i *Eco*RI, i es lliga en el plasmidi pBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Amb la construcció resultant es transforma la soca d'*Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene), per obtenir el plasmidi pBSDPS1. L'ADNc clonat s'ha seqüenciat per les dues cadenes amb el kit BigDye 3.1<sup>®</sup> (Applied Biosystems), basat en el mètode d'acabament de la cadena amb dideoxinucleòtids (Sanger et al., 1977). Aquest mètode s'ha utilitzat per seqüenciar tots els plasmidis obtinguts en aquest treball.

## **7. CLONATGE DELS ADNc D'ARV1 I 2 D'*A. THALIANA***

El clonatge dels ADNc d'ARV1 i 2 d'*A.thaliana* s'ha dut a terme mitjançant l'estratègia de la RT-PCR. L'ARN utilitzat per realitzar la RT ha estat 2,5 µg d'ARN total de plàntules de 10 dies crescudes en plaques de Petri amb medi MS sota un règim de llum de dia llarg (16h de llum). L'encebador utilitzat per sintetitzar la mescla d'ADNc monocatenaris amb la RT (Roche) és l'oligo(dT) i les condicions de transcripció inversa emprades en l'apartat 6 de material i mètodes.

Una alíquota de 2 µl de la mescla d'ADNc monocatenaris s'ha utilitzat com a motlle per l'amplificació dels ADNc AtARV1 i AtARV2 mitjançant dues reaccions de PCR independents, utilitzant l'ADN polimerasa *pfu* (Promega). Per amplificar l'ADNc AtARV1 s'ha utilitzat els encebadors ARV1Bam (sentit) i ARV1Sal (antisentit), dissenyats a partir de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC007323 (GenBank). Per altra banda, per amplificar l'ADNc AtARV2 s'han utilitzat els encebadors ARV2Bam (sentit) i ARV2Sal (antisentit), dissenyats a partir de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AL161492 (GenBank). Per facilitar el posterior clonatge dels dos ADNc en el vector d'expressió a llevat pJR1133 s'ha incorporat als extrems 5' dels encebadors sentit la diana de restricció *Bam*HI i *Sal*I en els encebadors antisentit.

ARV1Bam: 5'-CGGGATTCAGACCCGGACTCTAATTGCT-3'. Seqüència inversa i complementària del nucleòtid 8420 al 8439 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC007323 (GenBank).

ARV1Sal: 5'-CGGTTCGACCTGGAAGCTGATGGGATCATAAC-3'. Seqüència del nucleòtid 6601 al 6622 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AC007323 (GenBank).

ARV2Bam: 5'-CGGGATCCCAACAGTCACAGACACAGAG-3'. Seqüència del nucleòtid 65298 al 65317 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AL161492 (GenBank).

ARV2Sal: 5'-CGGTTCGACCACAAGTTCCTTGCAAGAGAAG-3'. Seqüència inversa i complementària del nucleòtid 66757 al 66778 de la seqüència genòmica d'*A.thaliana* AL161492 (GenBank).

Un cop amplificats els dos ADNc (837 pb per l'ADNc AtARV1 i 745 pb per l'ADNc AtARV2) s'han clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) per obtenir, els plasmidis pGTARV1 i pGTARV2 respectivament.

Un cop clonats els dos ADNc s'ha introduït a 3' dels dos ADNc per PCR una seqüència de 27 nucleòtids que codifica per l'epítip d'hemaglutinina (HA). D'aquesta manera al sobreexpressar els ADNc a llevat o *A.thaliana* les proteïnes resultants tindran fusionada a l'extrem C-terminal la seqüència de 9 aminoàcids de l'epítip HA (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala). Aquest permetrà detectar les proteïnes Arvp mitjançant *Western blot* amb un anticòs comercial contra l'epítip (Roche). Per introduir la seqüència de l'epítip s'han realitzat una PCR utilitzant com a motlle els plasmidis pGTARV1 i pGTARV2, els encebadors sentit A1Bam i A2Bam i els encebadors antisentit A1SalHA i A2SalHA (en els que s'hi ha introduït la seqüència nucleotídica que codifica per l'epítip). S'han purificat els fragments amplificats (749 i 845 pb respectivament) s'han clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) per obtenir els plasmidis pGTARV1HA i pGTARV2HA respectivament.

ARV1SalHA: 5'-GTCGACTCACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACATGACAGATCCTAAGTGTCC-3'. Seqüència des del nucleòtid 687 al 707 de l'ADNc AtARV1.

ARV2SalHA: 5'-GTCGACTCACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTATACGATCTGAAAAAATAAGACATATA-3'. Seqüència des del nucleòtid 774 al 800 de l'ADNc AtARV2.

Aquest encebadors contenen la diana de restricció *Sall* (subratllada) per facilitar el clonatge en el vector pJR1133, el codó d'aturada de la transcripció (negreta) i els nucleòtids que codifiquen per l'epítip HA (cursiva).

## **8. MUTAGÈNESIS PER "OVERLAPPING EXTENSION"**

### **8.1. Mutació de la tyr58 de la AtDps1p**

La mutació de la tirosina 58 i la seva substitució per una fenilalanina s'ha dut a terme mitjançant el mètode de l'"overlapping extension" (Ortiz et al., 1999) que es realitza en dues fases de PCR (**figura 21**), utilitzant la *pfu* ADN polimerasa (Promega).

Per a la primera fase de PCR (reaccions A i B) es dissenyen dos encebadors complementaris (sentit (a) i antisentit (b)), en els que els nucleòtids que codifiquen per l'aminoàcid/s a modificar estan al centre de la seqüència de l'encebador, de manera que hi hagi la mutació, els encebadors anellaran perfectament amb el motlle. També es necessiten dos encebadors per poder realitzar la PCR amb els encebadors anteriors, un (c) situat a 5' dels anteriors i l'altre (d) a 3'. Així, en la primera fase es realitzen dues reaccions de PCR amb el mateix motlle: una amb els encebadors a i d, i l'altre amb els encebadors b i c. Un cop purificats

els fragments obtinguts en la primera fase, es realitza una tercera reacció de PCR utilitzant com a motlle 200 ng de cada un dels fragments amplificats en les PCR A i B, i els encebadors c i d. Així s'amplifica el fragment d'ADN que ha incorporat la mutació desitjada.

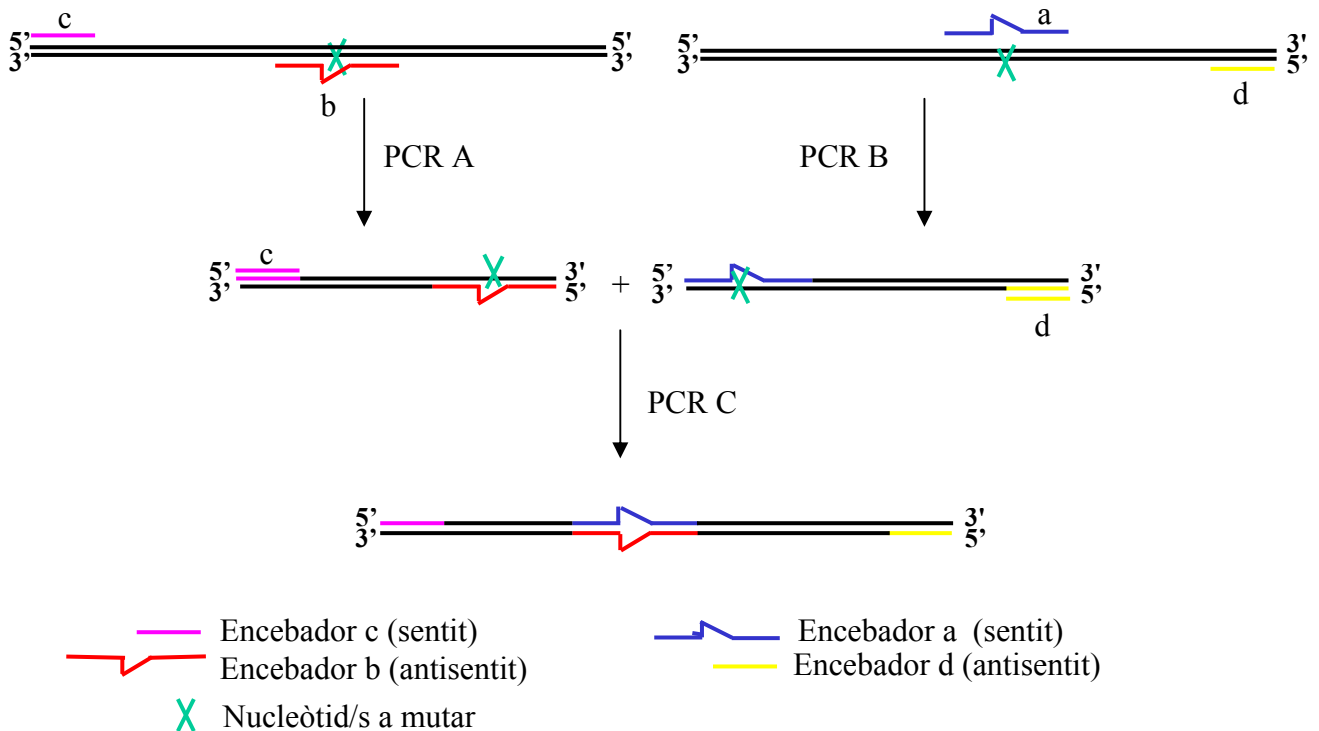


Fig.21. Esquema del procés d'“overlapping extensión” per introduir mutacions puntuals.

En el present treball s'ha mutat la tirosina 58 de la AtDps1p i s'ha substituït per una fenilalanina canviant el triplet TAT que codifica per la tirosina pel triplet TTT que codifica per la fenilalanina. Els encebadors complementaris que s'han dissenyat per introduir aquest canvi són els FTDPS1 (sentit) i RVDPS1 (antisentit). Aquests tenen 11 nucleòtids complementaris al motlle tan a 5' com a 3' dels triplets a modificar. Els encebadors exteriors necessaris per a dur a terme les PCR són els 1DPSBam (sentit; apartat 6 de Materials i Mètodes) i LeuDPS (antisentit).

**FTDPS1:** 5'-ATGAGGGAACTTTTGTTGTCCGCGA-3'. Seqüència del nucleòtid 190 al 214 de l'ADNc AtDPS1.

**RVDPS1:** 5'-TCGCGGACAACAAAAGTTCCCTCAT-3'. Seqüència complementària del nucleòtid 214 al 190 de l'ADNc AtDPS1.

**LEUDPS:** 5'-GCTGAGACTGTATGAACC-3'. Seqüència complementària del nucleòtid 387 al 371 de l'ADNc AtDPS1.

Els nucleòtids a mutageneïtzar estan en negreta i cursiva, i els triplets dels que formen part estan subratllats.

En el primer pas s'ha realitzat dues reaccions de PCR utilitzant com a motlle el plasmidi pBSDPS1 i dos jocs diferents d'encebadors. En la primera PCR s'ha utilitzat com a encebador sentit el 1DPSBam i com a encebador antisentit el RVDPS1, mentre que en la segona s'ha utilitzat com a encebador sentit el FTDPS1 i com a encebador antisentit el LEUDPS. Un cop purificats els dos fragments amplificats (210 pb de la primera PCR i 198 pb de la segona) s'han utilitzat com a motlle per a la tercera reacció de PCR on els primers emprats són 1DPSBam i

LEUDPS. Un cop purificat el fragment amplificat (387 pb) s'ha clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) obtenint el cló pGTOV.

## **8.2. Mutació de les cisteïnes 8, 11, 32 i 35 d'Arv2p**

La mutació de les cisteïnes 8, 11, 32 i 35 i la seva substitució per serines s'ha dut a terme mitjançant la mateixa estratègia de l'apartat anterior, el mètode de l'"overlapping extension" (Ortiz et al., 1999).

En el present treball s'han mutat quatre aminoàcids de la proteïna Arv2p, en concret les cisteïnes 8, 11, 32 i 35, i s'han substituït per quatre serines. Tot i que són quatre els aminoàcids a modificar, la proximitat entre els triplets que codifiquen per les cisteïnes 8 i 11 per una banda i per les cisteïnes 32 i 35 per l'altra permet que la mutació de les quatre cisteïnes s'hagi dut a terme en només dues fases d'"overlapping extension": en la primera s'han mutat les cisteïnes 32 i 35, i en la segona fase s'han mutat les cisteïnes 8 i 11.

En la primera fase s'ha introduït la mutació en els aminoàcids 32 i 35 canviant els triplets TGC que codifiquen per les cisteïnes per triplets AGC que codifiquen per serines. Els encebadors complementaris que s'han dissenyat per introduir aquests canvis són cis32/35S (sentit) i cis32/35R (antisentit). Aquests tenen 9 nucleòtids complementaris al motlle tan a 5' com a 3' dels triplets a modificar.

cis32/35S: 5'-CTCATGAAAAGCGGAGAATAGCGAAGAAGTA-3'. Seqüència des del nucleòtid 85 al 114 de l'ADNc AtARV2.

cis32/35R: 5'-TACTTCTTCGCTATTCTCGCTTTTCATGAG-3'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 85 al 114 de l'ADNc AtARV2.

Els nucleòtids a mutageneïtzar estan en negreta i cursiva, i els triplets dels que formen part estan subratllats.

En el primer pas s'ha realitzat dues reaccions de PCR utilitzant com a motlle el plasmidi pGTARV2 i dos jocs diferents d'encebadors. En la primera PCR s'ha utilitzat com a encebador sentit l'ARV2Bam (apartat 6) i com a encebador antisentit el cis32/35R, mentre que en la segona s'ha utilitzat com a encebador sentit el cis32/35S i com a encebador antisentit l'ARV2SalHA (apartat 6). Un cop purificats els dos fragments amplificats (143 pb de la primera PCR i 593 pb de la segona) s'han utilitzat com a motlle per a la tercera reacció de PCR on els primers emprats són ARV2Bam i ARV2SalHA. Un cop purificat el fragment amplificat (749 pb) s'ha clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) obtenint el cló pGTΔZn.

En la segona fase s'ha introduït la mutació en els aminoàcids 8 i 11 canviant els triplets TGT que codifiquen per cisteïnes per triplets AGT que codifiquen per serines. Els encebadors complementaris que s'han dissenyat per introduir aquestes mutacions són cis8/11S (sentit) i cis8/11R (antisentit). Al igual que en la mutació de les cisteïnes 32 i 35, aquests tenen 9 nucleòtids complementaris al motlle tan a 5' com a 3' dels triplets a modificar.

cis8/11S: 5'-AAGAAGACGAGTGTAGAGAGTGGGCACAAG-3'. Seqüència des del nucleòtid 13 al 42 de l'ADNc AtARV2.

cis8/11R: 5'-CTTGTGCCACTTCTCTACACTCGTCTTCTT-3'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 13 al 42 de l'ADNc AtARV2.

Els nucleòtids a mutageneïtzar estan en negreta i cursiva, i els triplets dels que formen part estan subratllats.

En el primer pas d'aquesta segona fase s'han realitzat dues reaccions de PCR, utilitzant com a motlle el cló pGTΔZn. En una PCR s'ha utilitzat com a encebador sentit l'ARV2Bam (apartat 6) i com a encebador antisentit el cis8/11R, mentre que en l'altra s'ha utilitzat com a encebador sentit el cis8/11S i com a encebador antisentit l'ARV2SalHA. Un cop purificats els dos fragments amplificats (70 pb PCR i 665 pb respectivament) s'han utilitzat com a motlle per a una tercera reacció de PCR on els primers emprats són ARV2Bam i ARV2SalHA. Un cop purificat el fragment amplificat (749 pb) s'ha clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega), obtenint el cló pGTΔZn2.

## **9. DELECCIONS DE L'EXTREM AMINOTERMINAL DE LA DPS1p D'A.THALIANA.**

Es realitzen una sèrie de construccions on es deleccionen progressivament un nombre creixent d'aminoàcids de l'extrem aminoterminal de la Dps1p d'*Arabidopsis thaliana*. Concretament es realitzen 6 construccions en les que es deleccionen 11 (Leu 11), 23 (Leu 23), 36 (Leu 36), 46 (Leu 46), 59 (Leu 59) i 69 (Met2) aminoàcids respectivament. Les tres primeres corresponen a deleccions en una zona hidrofòbica i en les dues següents es deleccionen parts d'una zona altament hidrofílica.

Les diferents construccions s'obtenen amplificant, a partir de la construcció pBDPS1, fragments petits mitjançant PCR, on els encebadors sentit corresponen als primers nucleòtids de cada delecció i l'encebador antisentit és, en totes les construccions, l'encebador LEUDPS (punt 8.1 de Material i Mètodes).

Leu11: 5'-CGGGATCCAACAATGTTGTTATCACTCCTCTTTCTC-3'. Seqüència del nucleòtid 67 al 85 de l'ADNc AtDPS1.

Leu23: 5'-CGGGATCCAACAATGTTGTTTATCACAAGCTATATAGG-3'. Seqüència del nucleòtid 98 al 117 de l'ADNc AtDPS1.

Leu36: 5'-CGGGATCCAACAATGTTGAAACTCATCGGACTCATC-3'. Seqüència del nucleòtid 138 al 154 de l'ADNc AtDPS1.

Leu46: 5'-CGGGATCCAACAATGTTGGCTGCTCGAGACAACGAG-3'. Seqüència del nucleòtid 164 al 181 de l'ADNc AtDPS1.

Leu59: 5'-CGGGATCCAACAATGTTGGTTGTCCGCGAGGATGGG-3'. Seqüència del nucleòtid 164 al 181 de l'ADNc AtDPS1.

Met2: 5'-CGGGATCCAACAATGCCGAGACACGTGGCATTTC-3'. Seqüència del nucleòtid 238 al 256 de l'ADNc AtDPS1.

Els 18 primers nucleòtids dels encebadors sentit per les deleccions Leu 11, 23, 36, 45 i 59 són iguals en tots ells. La seqüència en cursiva correspon a la diana *Bam*HI per facilitar el clonatge posterior. La seqüència subratllada és una seqüència que proporciona l'entorn de l'inici de traducció ideal en llevat. Els sis nucleòtids que estan destacats en negreta han estat introduïts per mantenir els primers aminoàcids de la seqüència completa, perquè totes les proteïnes deleccionades tinguin el mateix inici de traducció. En l'encebador Met2 no s'hi ha introduït la leucina que va darrera la metionina inicial, perquè es vol obtenir la proteïna sense els 69 primers aminoàcids, de manera que la proteïna resultant no inclogui la regió suposadament d'unió a la membrana del RE.

Els fragments amplificats Leu 11(344 pb), Leu 23 (308 pb), Leu 36 (269 pb), Leu 46 (242 pb), Leu 59 (203 pb) i Met2 (117 pb) es purifiquen i es clonen en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy, obtenint les construccions pGTLeu 11, pGTLeu23, pGTLeu 36, pGTLeu 46, pGTLeu 59 i pGTMet2.

## **10. DELECCIONS DEL DOMINI AHD DE L'ATARV2p**

S'han realitzat una sèrie de construccions on es deleccionen progressivament un nombre creixent d'aminoàcids de l'extrem aminoterminal de la proteïna. En concret s'han realitzat 4 construccions on es deleccionen 35 ( $\Delta 35$ ), 46 ( $\Delta 46$ ), 56 ( $\Delta 56$ ) i 68 ( $\Delta 68$ ) aminoàcids respectivament.

Les diferents construccions de les deleccions seriades s'obtenen amplificant, a partir de la construcció pGTARV2HA, mitjançant PCR, on els encebadors sentit corresponen als primers nucleòtids de cada delectió i l'encebador antisentit és, en tots els casos ARV2SalHA (apartat 6 de Material i Mètodes):

( $\Delta 35$ ): 5'-GGATCCATGGAAGAAGTAGCAGAC-3'. Seqüència dels nucleòtids 128 a 142 de l'ADNc AtARV2.

( $\Delta 46$ ): 5'-GGATCCATGCTATTGATTATTTTCATC-3'. Seqüència dels nucleòtids 162 a 176 de l'ADNc AtARV2.

( $\Delta 56$ ): 5'-GGATCCATGCACAAAACAAAGGCT-3'. Seqüència dels nucleòtids 192 a 207 de l'ADNc AtARV2.

( $\Delta 68$ ): 5'-GGATCCATGGTTGTTAATCAAGAA-3'. Seqüència dels nucleòtids 228 a 243 de l'ADNc AtARV2.

En aquests encebadors s'ha afegit una diana BamHI (subratllada) per facilitar el clonatge en el vector pJR1133 i el codó d'inici de transcripció (negreta).

Un cop amplificats els fragments corresponents (620, 586, 556 i 520 pb respectivament) es clonen en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) obtenint els clons pGT $\Delta 35$ , pGT $\Delta 46$ , pGT $\Delta 56$  i pGT $\Delta 68$ . Tots els quals han estat seqüenciats.

Paral·lelament s'han realitzat dues construccions on s'han dut a terme deleccions parcials d'aminoàcids de l'extrem C-terminal del domini AHD d'AtArv2p, en concret una on es deleccionen els aminoàcids del 36 al 46, que correspon a una zona altament hidrofílica, i una segona on es deleccionen els aminoàcids del 47 al 56, que correspon a una zona altament hidrofòbica. Aquestes deleccions s'han dut a terme mitjançant el mètode de l'"overlapping extension" (Ortiz et al., 1999; punt 7.1 de Material i Mètodes) utilitzant com a ADN motlle el plasmidi pGTARV2. A l'igual que en la construcció pGT $\Delta Zn2$  (apartat 7.1 de Material i Mètodes), la modificació en la seqüència nucleotídica que volem incorporar, en aquest cas la delectió dels nucleòtids que codifiquen pels aminoàcids que volem eliminar, s'introdueix en els encebadors complementaris que s'utilitzen en les dues PCR de la primera fase del procediment d'"overlapping extension". Els encebadors utilitzats per introduir les deleccions ( $\Delta 3-4S$  i  $\Delta 3-4R$  per la delectió dels aminoàcids 36 al 46, i  $\Delta 4-5S$  i  $\Delta 4-5R$  per la delectió dels aminoàcids 47 al 56) s'han dissenyat de manera que els 9 nucleòtids de l'extrem 5' de l'encebador (subratllats) corresponen a la seqüència nucleotídica de l'ADNc AtARV2 just a 5' dels nucleòtids a eliminar, mentre que els 16 nucleòtids de l'extrem 3' de l'encebador (en cursiva) corresponen a la seqüència nucleotídica que es troba just a 3' dels nucleòtids a deleccionar, així en aquest cas els encebadors no són 100% complementaris entre si:



Δ3-4S: 5'-GAGAATTCGCTATTGATTATTTCA-3'. Seqüència del nucleòtid 125 al 133 (subratllats) i del 162 al 176 (en cursiva) de l'ADNc AtARV2.

Δ3-4R: 5'-AATCAATAGGCAATTCTCGCATTTC-3'. Seqüència del nucleòtid 170 al 162 (subratllats) i del 133 al 118 (en cursiva) de l'ADNc AtARV2.

Δ4-5S: 5'-GAGTGTGAGCACAAAACAAGGCTT-3'. Seqüència del nucleòtid 153 al 161 (subratllats) i del 192 al 207 (en cursiva) de l'ADNc AtARV2.

Δ4-5R: 5'-TGTTTTGTGCTCACACTCGACATAT-3'. Seqüència del nucleòtid 200 al 192 (subratllats) i del 161 al 146 (en cursiva) de l'ADNc AtARV2.

Per generar la delecció Δ36-46, en les dues reaccions de PCR del primer pas de l'"overlapping extension", s'han utilitzat els encebadors ARV2Bam i Δ3-4R en la primera PCR, i Δ3-4S i ARV2SalHA en la segona PCR. Un cop purificats els dos fragments amplificats (148 pb de la primera PCR i 590 pb de la segona) s'han utilitzat com a motlle per a la tercera reacció de PCR on els primers emprats són ARV2Bam i ARV2SalHA (apartat 7 de Material i Mètodes).

Per altra banda, per generar la delecció Δ47-56, en les dues reaccions de PCR del primer pas de l'"overlapping extension", s'han utilitzat els encebadors ARV2Bam i Δ4-5R en la primera PCR, i Δ4-5S i ARV2SalHA en la segona PCR. Un cop purificats els dos fragments amplificats (176 pb de la primera PCR i 560 pb de la segona) s'han utilitzat com a motlle per a la tercera reacció de PCR on els primers emprats són ARV2Bam i ARV2SalHA.

Un cop purificats els dos fragments amplificats (ambdós de 749 pb) s'han clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) obtenint els clons pGTΔ36-46HA i pGTΔ47-56HA respectivament.

## **11. COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LES SOQUES MUTANTS DE LLEVAT**

### **11.1. Clonatge dels ADNc d'AtDps1, AtLeu11, AtLeu23, AtLeu36, AtLeu46, AtLeu59 i AtMet2 en el vector pJR1133**

L'ADNc de la AtDPS1 s'extreu digerint la construcció pBSDPS1 amb els enzims *BamHI* i *Sall* i es clona l'insert obtingut en les dianes corresponents en el vector d'expressió en llevat pJR1133, obtenint-se la construcció pJRDPS1. Pel que fa a la construcció de les diferents deleccions de la Dps1p i la versió mutada de l'enzim en la tyr58 s'incorporen a la construcció pJRDPS1. Per fer-ho, primer s'extreu el casset *BamHI-SacI* de la construcció pJRDS1 sencera, i posteriorment s'incorporen en el seu lloc les corresponents deleccions, prèviament extretes del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy mitjançant digestió amb *BamHI* i *SacI*, obtenint les construccions pJRLeu11, pJRLeu 23, pJRLeu 36, pJRLeu 46, pJRLeu 59, pJRMet2 i pJROV.

### **11.2. Clonatge dels ADNc d'AtArv1, AtArv2, AtΔZn2, AtΔ35, AtΔ46, AtΔ56, AtΔ68, AtΔ36-46 i AtΔ47-56 en el vector pJR1133**

S'han clonat els ADNc en el vector d'expressió en llevat pJR1133. S'han digerit els clons pGTARV1HA, pGTARV2HA, pGTΔZn2HA, pGTΔ35HA, pGTΔ46HA, pGTΔ56HA, pGTΔ68HA, pGTΔ36-46HA i pGTΔ47-56HA amb els enzims de restricció *BamHI* i *Sall*. Els fragments s'han clonat en els llocs respectius del plàsmidi pJR1133 sota el control del promotor

de la gliceraldehidfosfat deshidrogenasa, per donar lloc als clons pJRARV1, pJRARV2, pJRΔZn2, pJRΔ35, pJRΔ46, pJRΔ56, pJRΔ68, pJRΔ36-46 i pJRΔ47-56.

### **11.3. Transformació de les soques de llevat**

la soca de llevat SNH23-7D, que és un mutant termosensible (creix a 23°C però no ho fa a 37°C), i és deficient en l'activitat dehidrodoliquildifosfat sintasa. El background genètic d'aquesta soca és: MATα, rer2-2, mfa1::ADE2, mfa2::TRP1, bar1::HIS3, ade2, trp1, his3, leu2, ura3, lys2. Per això aquesta soca necessita aport exogen de leucina (leu), lisina (lys) i uracil (ura) per créixer.

D'altra banda, La soca de llevat YJN1756 és un mutant termosensible (creix a 23°C però no ho fa a 37°C) perquè té inactivat el gen *ARV1*. El background genètic d'aquesta soca és: (arv1::Kan) *ade2, his3, leu2, trp1, ura3*. Per això aquesta soca necessita aport exogen d'adenina (ade), histidina (his), leucina (leu), triptòfan (trp) i uracil (ura) per créixer.

Les dues soques es transformen amb les construccions realitzades en el vector pJR1133 (apartat 11.1 i 11.2), mitjançant el procediment de l'acetat de liti (AcLi) [Gietz et al., 1992]:

1. S'inoculen 10 ml de medi mínim YNB suplementat amb leu (60 mg/L), lys (30 mg/L) i ura (20 mg/L) [YNB+ leu+lys+ura] amb la soca SNH23-7D i 10 ml de medi mínim YNB suplementat amb ade (40 mg/L), his (20 mg/L), leu (60 mg/L), trp (40 mg/L) i ura (20 mg/L) [YNB+ade+his+leu+trp+ura] amb la soca YJN1756. Es deixa creixent en agitació a 23°C tota la nit.

2. El dia següent es sembren 100 ml de medi YNB+leu+lys+ura per la soca SNH23-7D i 100 ml de medi YNB+ade+his+leu+trp+ura per la soca YJN1756 a partir dels cultius anteriors. Es deixen creixent en agitació a 23°C tota la nit.

3. Un cop l'absorbància dels cultius és 0.4, es divideixen en dos falcons de 50 ml i es centrifugen a temperatura ambient 10 min. a 2500 rpm.

4. Es resuspenen els sediments amb 10 mL de la solució I (Sorbitol 1M, AcLi 0.1M en TE pH 7.5). S'ajunta el contingut dels dos falcons i es centrifuga 10 min. a 2500 rpm.

5. Es resuspèn el sediment amb la quantitat suficient de la solució I perquè la concentració de cèl.lules sigui de  $2 \times 10^9$  cèl.lules/mL, tenint en compte que segons el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1997) quan l'absorbància del cultiu està entre 0.3 i 0.5, aquest conté unes  $10^7$  cèl.lules/mL. S'incuba 1 hora a 23°C.

6. Es transforma amb les diferents construccions (apartats 11.1 i 11.2 de Material i Mètodes), amb el vector pJR1133 sol, i com a control negatiu es transforma amb TE (pH 7.5):

5 µL ADN (aprox. 200 ng/µL) del plasmidi

5 µL ADN salmó sonicat (50 µg)

50 µL suspensió cel.lular

7. S'incuba 5-10 min. a temperatura ambient.

8. S'afegeix 300 µL de la Solució II (PEG4000 40%, AcLi 0.1M en TE pH 7.5). S'incuba 30 min. a temperatura ambient.

9. S'escalfa 5 min. a 42°C.

10. Es recullen les cèl.lules i es resuspenen en 400 µL de TE pH 8.0.

11. Es sembren les transformacions de la soca SNH23-7D en plaques YNB +leu+ lys+ura i les de la soca YJN1756 en plaques YNB+ade+his+leu+trp, i s'incuben a 23°C. També es sembra una alíquota de la transformació de la soca SNH23-7D amb TE en medi YNB +leu+lys+ura i de la de la transformació de la soca YJN1756 amb TE en medi YNB+ade+his+leu +trp+ura. En els dos casos, les colònies que hagin crescut en el medi sense uracil (colònies ura+) s'originen a partir de llevats que han incorporat el plasmidi.

#### **11.4. Complementació funcional de les soques de llevat SNH23-7D i YJN1756 en medi sòlid**

Un cop aïllades colònies ura<sup>+</sup>, es procedeix a realitzar l'assaig de complementació per veure si els enzims codificats per les diferents construccions de la *AtDPSI* (apartats 11.1 i 11.2 de Material i Mètodes) assajades són capaces de complementar la mutació de la soca SNH23-7D en el gen *RER2* (Sato et al. 1999), que li impedeix créixer a 37°C.

Les colònies ura<sup>+</sup> aïllades corresponents a les diferents construccions d'*AtDPSI* (apartat 11.1 de Material i Mètodes) més la soca salvatge SNY9 (MAT $\alpha$ , mfa1::ADE2, mfa2::TRP1, bar1::HIS3, ade2, trp1, his3, leu2, ura3, lys2), que conté el gen salvatge *RER2*, es sembren en plaques YPG i s'incuben a 23°C i a 37°C. Si creixen tant a 23 com a 37°C, aleshores la construcció assajada complementa la soca SNH23-7D.

Un cop aïllades colònies ura<sup>+</sup> corresponents a les diferents construccions d'*AtARV2* (apartat 11.2 de Material i Mètodes) dins la soca YJN1756 recombinants ura<sup>+</sup> s'ha procedit a realitzar l'assaig de complementació per veure si les proteïnes codificades per les diferents construccions són capaces de complementar la mutació de la soca YJN1756 (Swain et al., 2002) en el gen *ARVI*, que li impedeix créixer a 37°C.

Les colònies aïllades s'han sembrat en plaques de medi complet YPG i s'incuben a 23°C i a 37°C. Si creixen tant a 23 com a 37°C, aleshores la construcció assajada complementa la soca YJN1756.

#### **11.5. Complementació funcional de la soca de llevat YJN1756 en medi líquid**

Per confirmar els resultats obtinguts en l'assaig de complementació en placa per a les diferents construccions d'*AtARV2* s'ha realitzat una corba de creixement en medi YPG líquid de les diferents construccions assajades (apartat 8.2) a 37°C. S'han sembrat en una placa de medi YNB+ade+his+leu+trp una colònia de cada una de les soques YJN1756 recombinants, que han estat transformades amb el vector pJR1133 i els diferents plasmidis d'expressió, i s'han deixat créixer durant dos dies a 27°C. A continuació, s'han inoculat en 10 ml de medi YNB+ade+his+leu+trp líquid i s'han deixat créixer a 27°C en agitació constant (250 rev./min) fins a una O.D.<sub>600</sub>≈1.5. Les cèl.lules s'han diluït fins a una O.D.<sub>600</sub>≈0.05-0.1 en medi YPG líquid preescalfat a 37°C i s'ha incubat a 37°C en agitació constant (250 rev./min). El creixement de les diferents soques es monitoritza a diferents temps mesurant l'absorbància del cultiu a 600 nm.

## **12. ANÀLISI DE L'EXPRESSIONI DELS GENS *AtDPS1*, *AtARV1* i *AtARV2***

### **12.1. Extracció d'ARN**

L'ARN utilitzat en aquest treball s'ha obtingut amb el mètode comercial *RNEasy® Plant Mini Kit* de Qiagen seguint fidelment les instruccions del fabricant. És un kit que permet l'extracció ràpida (en aproximadament 1h) i senzilla d'ARN d'elevada puresa basat en l'absorció de l'ARN a columnes de sílica gel, i per això està indicat per a la manipulació d'un elevat nombre de mostres. A més aquest kit permet realitzar un tractament de les mostres amb DNases, per eliminar l'ADN contaminant, a la mateixa columna. Així s'evita haver de fer el tractament un cop finalitzat el procediment d'extracció d'ARN, fet que obliga a una nova purificació posterior de les mostres, amb la consegüent despesa addicional de temps i la disminució de la quantitat final d'ARN obtingut.

Les mostres de teixit vegetals'han de recollir i congelar immediatament en N<sub>2</sub> líquid. Un cop congelades poden guardar-se a -80°C fins el moment de l'extracció de l'ARN. El treball amb ARN requereix extremar les precaucions per evitar les contaminacions de RNases, enzims particularment abundants, estables i actius que podrien degradar l'ARN. Per evitar-ho, tot el material de vidre, porcel.lana i metall s'ha de deixar al forn a 200°C tota la nit. El material de plàstic fungible s'ha d'autoclavar dues vegades i s'ha de tractar el material restant (cubetes, portagels, etc.) i les solucions amb DEPC (dietilpirocarbonat) reactiu que modifica els residus d'His i Tyr de les proteïnes, inactivant-les inespecíficament. També és essencial l'ús de guants en totes les manipulacions que es realitzin.

### **12.2. Quantificació de les mostres d'ARN**

Les mostres d'ARN es quantifiquen i es determina la seva puresa comprovant la seva absorbància a 260 i 280 nm respectivament, tenint en compte que 1 O.D.<sub>260</sub> equival a 40 µg d'ARN/ml i que la relació O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> ha de ser propera a 2.

El rendiment d'ARN varia en funció del teixit, sent més elevat en plàntules i flors i menor en fulles i arrels. La integritat de l'ARN obtingut s'ha comprovat per electroforesi, corrent 1 µg d'ARN en un gel d'agarosa a l'1% en presència de bromur d'etidi (BrEt) 0,5 µg/ml.

### **12.3. Anàlisi de l'extrem 5'-UTR del gen *AtARV2***

L'anàlisi de l'extrem 5'-UTR del gen *AtARV2* s'ha dut a terme mitjançant la tècnica de la RT-PCR. La RT s'ha dut a terme amb 1 µg d'ARN dels diferents teixits assajats amb l'encebador oligodT en les mateixes condicions de l'apartat 7 de Material i Mètodes. Les reaccions de PCR s'han dut a terme amb el kit PureTaq™Ready-To-GO™PCR Beads (Amersham) utilitzant com a motlle 4 µl de la reacció de RT. Per a cada teixit s'ha dut a terme una reacció de PCR on com a encebador antisentit s'ha utilitzat l'encebador A2AS i com a encebador l'1ARV2 que amplifica un fragment de 502 pb.

1ARV2: 5'-ATGGCCCAAGTTATAACCCG-3'. Seqüència del nucleòtid -72 al -53 respecte el codó d'inici de traducció.

A2AS: 5'-CTCGAGATTAAGATCGTTAAAAG-3'. Seqüència complementària del nucleòtid 496 al 476 de l'ADNc AtARV2.

## **12.4. Anàlisi de l'expressió dels gens *AtDPS1*, *AtARV1* i *AtARV2* a nivell d'ARNm per la tècnica de *Northern blot***

L'anàlisi mitjançant Northern blot permet la detecció dels nivells d'ARN missatger dels gens objecte d'estudi i la comparació d'aquests nivells entre diferents teixits o diferents situacions experimentals. El mètode consisteix en l'extracció de l'ARN del teixit/s d'interès, seguida del seu fraccionament en un gel d'agarosa desnaturalitzant i la transferència de l'ARN a una membrana de nylon on s'hibrida amb una sonda específica d'ARN o ADN complementari marcat. El marcatge de la sonda pot ser radioactiu o bé mitjançant l'ús de molècules marcadores no radioactives, que són detectades a través de sistemes quimioluminiscents. L'extracció de l'ARN, així com l'electroforesi i la transferència a la membrana es realitza de manera idèntica independentment del tipus de sonda a utilitzar. En canvi, tan en el marcatge i purificació de la sonda, com la hibridació i posterior detecció de la mateixa, es segueixen protocols específics en cada cas.

### **12.4.1. Electroforèsi i transferència de l'ARN**

Les mostres d'ARN s'han sotmès a un procés de fraccionament per electroforesi en un gel d'agarosa 1% (p/v) desnaturalitzant en presència de formaldehid 2,2 M preparat amb tampó MOPS 1x en condicions lliures de RNAses. El formaldehid garanteix la desnaturalització de l'ARN. Donat que és un agent fortament al·lèrgic, és necessari afegir-lo un cop l'agarosa ha estat dissolta i posteriorment s'aboca la dissolució del gel en el portagels en una campana d'extracció de gasos. Així mateix és recomanable preparar el gel el més prim possible, ja que això facilitarà el procés posterior de transferència.

Abans de sembrar les mostres d'ARN (10-20 µg), aquestes s'han concentrat mitjançant un liofilitador-evaporador (*Speed-vac*) i s'han resuspès en 20 µl de tampó de mostra. A continuació s'han incubat durant 10 minuts a 65°C per desnaturalitzar l'ARN i es deixen refredar en gel. Finalment, s'han afegit 2 µl de tampó de càrrega i s'han sembrat en el gel, reservant un dels pous per un marcador de mida d'ARN.

Abans de carregar les mostres en el gel, s'ha corregut el gel durant 5 min a 50 volts (V) per eliminar impureses del gel. L'electroforesi s'ha realitzat a baix voltatge (5-7 V/cm de gel), utilitzant MOPS 1x com a tampó de manera que no cobreixi totalment el gel, sinó que arribi just al límit superior del mateix per evitar la dilució del formaldehid, mantenint així la qualitat desnaturalitzant del gel. El gel es cobreix amb un plàstic transparent, tipus Saram wrap®. És recomanable moure el tampó d'electroforesi d'un costat a l'altre dels electodes aproximadament cada 30 min, assegurant així la conductància del mateix. L'electroforesi s'ha aturat quan el front ha recorregut unes 3/4 parts del gel i s'ha procedit a la transferència.

Un cop s'ha acabat l'electroforesi s'ha visualitzat l'ARNr en un transiluminador de llum U.V. i s'ha fotografiat el gel amb un regle al costat del carril corresponent al marcador de mida d'ARN, per a poder calcular posteriorment la mida dels ARNs marcats per la hibridació de la sonda marcada i que hauràn impressionat la pel·lícula autoradiogràfica. Aquesta imatge (fotografia dels ARNr) servirà a més de guia per a normalitzar

la quantitat d'ARN carregat en cada carril. A continuació s'han realitzat dos rentats del gel amb aigua DEPC i SSC 2x per a eliminar l'excés de formaldehid i BrEt.

Seguidament, s'ha dut a terme el procés de transferència. Per a això, en una safata de vidre que contingui tampó SSC 10x s'ha col·locat una placa de vidre a manera de pont i sobre ella s'han situat 2 tires de paper tipus Whatmann 3 MM submergides pels extrems en la solució de SSC 10x. El gel rentat s'ha col·locat a sobre de les tires de paper i a sobre del gel s'ha col·locat la membrana de Nylon carregada positivament (Roche), que prèviament s'ha humitejat amb SSC 10x. A continuació s'han afegit la membrana i 3 papers Whatmann 3 MM de les mateixes dimensions del gel humitejats en la mateixa solució. A continuació s'han posat a sobre una columna de papers de filtre d'uns 10 cm d'alçada de la mateixa mida que els papers Whatmann 3 MM de sota. Alternativament, es pot substituir el paper de filtre per tovallons de paper, però en aquest supòsit s'han de posar al voltant del gel unes de tires de plàstic Parafilm<sup>®</sup> per assegurar que l'SSC 10x puja per capil·laritat a través del gel i no pel costat, ja que els tovallons acostumen a ser més grans que el gel i sense el plàstic l'SSC 10x pujaria també pels costats del gel, i per tant la transferència no seria homogènia. Finalment, s'ha col·locat un vidre a sobre, s'ha cobert tot el muntatge amb plàstic, tipus Saram wrap<sup>®</sup>, per evitar l'evaporació del tampó SSC 10x i s'ha dipositat un pes d'uns 500g a sobre del vidre per assegurar que la transferència sigui homogènia.

La transferència s'ha dut a terme per capil·laritat durant tota la nit. Al dia següent, s'ha desmuntat el sistema, s'ha marcat la membrana de nylon per orientar-la respecte el gel (per exemple realitzant un petit tall amb un bisturí en una cantonada) i s'ha rentat la membrana amb SSC 2x per eliminar possibles restes d'agarosa. Finalment s'ha fixat l'ARN a la membrana de nylon calentant-la 2 hores a 80°C, o bé creant enllaços covalents per irradiació de la membrana amb llum U.V. ( $\lambda=250$  nm) durant 5 min. La membrana s'ha hibridat immediatament amb la sonda específica, però si és necessari es pot guardar a 4°C convenientment sellada fins al moment d'utilitzar-la.

Solucions:

MOPS 5x:

MOPS pH 7 (ajustat amb NaOH)	0,2 M
Acetat sòdic pH 5,3	50 mM
EDTA pH 8	5 mM

Conservar a 4°C protegit de la llum

Tampó de mostra:

MOPS 5x	100 $\mu$ L
Formamida	250 $\mu$ L
Formaldehid	87,5 $\mu$ L
BrEt (2 mg/mL)	12,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O DEPC q.s.p.	500 $\mu$ L

Tampó de càrrega 10x:

Glicerol	50%
EDTA pH 8	1mM
Blau de bromofenol	0,25%

### **12.4.2. Hibridació de sondes marcades amb <sup>32</sup>P-dCTP**

En aquest treball la hibridació de les membranes s'ha dut a terme en un forn d'hibridació amb sondes de ADNc dels gens objecte d'estudi dels gens objecte d'estudi marcades radioactivament amb <sup>32</sup>P-dCTP. En primer lloc s'ha realitzat la prehibridació de la membrana en la solució *ExpressHyb hybridization solution*<sup>®</sup> (Clontech). La prehibridació és essencial per bloquejar la membrana i evitar així la unió inespecífica de la sonda que afegirem després. S'ha realitzat durant 3-4 h a 65°C i amb 1-3 ml de la solució ExpressHyb per cm<sup>2</sup> de membrana.

A continuació s'ha afegit la sonda d'ADNc marcada diluint-la en la mateixa solució d'hibridació nova. S'ha afegit aproximadament 1-2x10<sup>6</sup> cpm de la sonda marcada amb <sup>32</sup>P-dCTP per ml de solució. Abans de diluir la sonda és necessari desnaturalitzar-la escalfant a 95-100°C durant 5 minuts i deixant-la a continuació en gel al menys 2 min més. L'hibridació s'ha realitzat durant tota la nit a 68°C. A continuació, s'ha procedit a la següent seqüència de rentats:

- Tres rentats de 15 min amb SSC 2x, SDS 0,05% a T<sup>a</sup> ambient.
- Dos rentats de 30 min amb SSC 0,1x, SDS 0,1% a 50°C.

Per últim la membrana encara humida s'ha sellat hermèticament en una bossa de plàstic, s'ha exposat a una pel·lícula autorradiogràfica a -80°C en presència d'una pantalla intensificadora de la senyal i, passat el temps adequat (variable en funció de la intensitat de la senyal; en el cas dels gens *DPS1* i *ARV* d'*A.thaliana* són 15 dies) s'ha procedit al revelat de la pel·lícula autorradiogràfica.

### **12.4.3. Marcatge i purificació de les sondes**

Fins fa poc, l'ús de radioisòtops ha estat la forma més habitual pel marcatge i la detecció d'àcids nucleics. No obstant en els últims anys s'han desenvolupat sistemes no radioactius d'alta qualitat que presenten l'avantatge de treballar en condicions de major seguretat, amb sondes més estables en el temps i amb temps d'exposició més curts. Tot i això les tècniques radioactives segueixen sent una mica més sensibles. L'elecció d'un o altre sistema dependrà de les condicions concretes de cada experiment, en particular dels nivells d'expressió del gen estudiat. El tipus de marcatge i purificació de la sonda ve determinat per la naturalesa de la mateixa. En el cas de la tècnica de *Northern blot*, les sondes radioactives solen ser d'ADN i es marquen mitjançant el sistema de *random primer*. En canvi, les sondes no radioactives solen ser d'ARN, ja que s'aconsegueixen millors resultats que amb sondes d'ADN, i existeixen diferents sistemes de marcatge.

En el present treball s'han utilitzat sondes radioactives que s'han marcat amb <sup>32</sup>P mitjançant el sistema *Rediprime II Random Prime Labelling System*<sup>®</sup> (Amersham), ja que el nivell d'expressió dels gens *ARV* d'*A.thaliana* és molt baix. Aquest sistema es basa en la tècnica de *random prime* que utilitza nonàmers [d(N)<sub>9</sub>] de seqüència aleatòria, com encebadors de la síntesis d'ADN que hibridaran en nombrosos llocs al llarg de la seqüència de l'ADN motlle desnaturalitzat. La reacció de polimerització utilitza el fragment klenow de la ADN polimerasa I i permet l'ús eficient dels nucleòtids marcats, de manera que es requereixen quantitats molt petites d'ADN motlle i els propis nucleòtids marcats. La reacció es duu a terme en un tub que conté una esfera liofilitzada amb el fragment Klenow de la ADN polimerasa I, nonàmers aleatoris, dATP, dGTP i dTTP. L'esfera es reconstitueix immediatament amb l'addició d'aigua, s'afegeix l'ADN prèviament desnaturalitzat i el dCTP marcat radioactivament i la reacció es

porta a terme en un volum final de 50 µL. L'ADN motlle es desnatura escalfant prèviament a 100°C durant 5 min i passant-lo posteriorment a gel (4°C) durant al menys 2 min més, abans d'afegir-lo a la reacció.

Reacció de marcatge:

Tub amb l'esfera liofilitzada al qual s'afegeix:

50 ng d'ADN motlle prèviament desnatura a 100°C.  
50 µCi (4µL) de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP  
q.s.p. 50 µL H<sub>2</sub>O mQ estèril

En primer lloc s'ha resuspès l'esfera amb l'aigua mQ i posteriorment s'ha afegit, en aquest ordre, l'ADN motlle i el dCTP marcat radioactivament. La reacció s'ha incubat a 37°C durant 30 min, passats els quals s'ha aturat la reacció afegint 2 µL d'EDTA 0,5 M i col.locat el tub en gel (4°C).

A continuació s'ha procedit a la separació de la sonda d'ADN marcada dels nucleòtids marcats no incorporats amb el *QIAquick Nucleotide Removal Kit*<sup>®</sup>, ja que aquests podrien generar senyal inespecífica en el *Northern*.

Com a sondes s'han utilitzat el fragment de la digestió del plasmidi pBSDPS1 amb els enzims *BamHI* i *Sall*, i els fragments obtinguts de la digestió dels plasmidis pGTARV1 i pGTARV2 amb l'enzim *NcoI*. Els fragments obtinguts, de 960 pb per l'ADNc AtDPS1, de 831 pb per l'ADNc AtARV1 i de 733 pb per l'ADNc AtARV2, s'han separat en un gel d'agarosa a l'1,5% i s'han purificat mitjançant el sistema *Qiaquick gel extraction kit*<sup>®</sup> (Qiagen).

## **12.5. Anàlisi de l'ARNm dels gens *AtARV1* i *AtARV2* mitjançant RT-PCR**

L'anàlisi del perfil d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* també s'ha dut a terme mitjançant la tècnica de RT-PCR que permet un anàlisi semiquantitatiu de l'expressió dels gens d'estudi als teixits estudiats. La RT s'ha dut a terme amb 1 µg d'ARN dels diferents teixits assajats amb l'encebador oligodT en les mateixes condicions de l'apartat 7 de Material i Mètodes. Les reaccions de PCR s'han dut a terme amb el kit PureTaq<sup>™</sup>Ready-To-GO<sup>™</sup>PCR Beads (Amersham) utilitzant com a motlle 4 µl de la reacció de RT, els encebadors sentit A1RTS i A2RTS i els encebadors antisentit A1Sal i A2Sal (apartat 7 de Material i Mètodes el fragment de la digestió del plasmidi pBSDPS1 amb els enzims *BamHI* i *Sall*). Els fragments que s'obtenen són de 395 pb per l'amplificació de l'ADNc AtARV1 i de 404 pb per la de l'ADNc AtARV2.

En el cas del mutant SALK\_090151 s'han utilitzat dos encebadors sentit més [A1+16 i Δ35 (apartat 10 de Material i Mètodes)] per analitzar l'expressió de l'ARNm del gen *AtARV1*. El fragment amplificat amb l'encebador A1+16 i l'A1Sal és de 732 pb i l'amplificat amb els encebadors Δ35 i A1 Sal és de 695 pb.

A1RT: 5'-GGTGTCTTATCTGCAAACGCTG-3'. Seqüència des del nucleòtid 434 al 456 de l'ADNc AtARV1.

A2RT: 5'-CGGATCAAATGTGTCTATGAG-3'. Seqüència des del nucleòtid 335 al 355 de l'ADNc AtARV2.



A1+16: 5'-GATGCGTGGGATGTGGTTTTAGG-3'. Seqüència des del nucleòtid 91 al 113 de l'ADNc AtARV1.

A1+116: 5'-GGATCCATGGAAGAAGTAGCAGAC-3'. Seqüència dels nucleòtids 128 a 142 de l'ADNc AtARV2.

Com a control intern d'expressió s'han utilitzat el gens de la poliubiquitina 10 (*UBQ 10*; At4g05320) i de la actina 2 (*ACT2*; At3g18780) d'*A.thaliana*. En concret s'ha amplificat en la reacció de RT-PCR un fragment de l'ARNm del gen de la *UBQ10* (218 pb) amb els encebadors UBQF (sentit) i UBQR (antisentit), i un fragment de l'ADNc del gen de la *ACT2* (296 pb) amb els encebadors ACTF (sentit) i ACTR (antisentit).

UBQF: 5'-GGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGC-3'. Seqüència del nucleòtid 882 al 905 de l'ADNc del gen *UBQ10* (NM\_202787).

UBQR: 5'-CTTATTCATCAGGGATTATACAAG-3'. Seqüència reversa i complementària del nucleòtid 1077 al 1100 de l'ADNc del gen *UBQ10* (NM\_202787).

ACTF: 5'-GCAAGTCATCACGATTGGTG-3'. Seqüència del nucleòtid 962 al 981 de l'ADNc del gen *ACT2* (NM\_112764).

ACTR: 5'-GAACCACCGATCCAGACACTGT-3'. Seqüència complementària des del nucleòtid 1258 al 1237 de l'ADNc del gen *ACT2* (NM\_112764).

## **12.6. Anàlisi del patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* mitjançant l'assaig de l'activitat GUS en plantes transgèniques**

S'han generat plantes transgèniques que expressen el gen GUS (gen *uidA* de *E. coli*) sota el control dels promotors dels gens *ARV1* i *ARV2*, de manera que mitjançant un senzill assaig es pot determinar en quins teixits i en quin moment del desenvolupament de les plantes s'expressen els gens objecte d'estudi.

### **12.6.1. Construcció dels plasmidis pBIA1GUS i pBIA2GUS per a les fusions traduccionals *ARV1::GUS* i *ARV2::GUS***

El plasmidi recombinant *ARV1::GUS* conté la fusió traducciona entre la regió 5' flanquejant del gen *ARV1* (fins al novè aminoàcid) i el gen *uidA* d'*E.coli*. Per generar aquest plasmidi s'ha amplificat per PCR el fragment de 1574 pb corresponent a regió 5' del gen *ARV1* utilitzant com a motlle ADN genòmic d'*A. thaliana* varietat Columbia 3 i els encebadors A1GUS1 i A1GUS2. El fragment amplificat s'ha digerit amb els enzims de restricció *XbaI* i *KpnI*, i clonat en els llocs corresponents del plasmidi *pBluescript* (Stratagene) donant lloc al cló pBSA2GUS. El fragment clonat conté 1547 pb de la seqüència situada cap a 5' del codó d'inici de traducció i els primers 27 pb de la seqüència que codifica per la proteïna Arv1p, incloent-hi el codó d'inici de traducció de la proteïna més els 8 següents aminoàcids de la proteïna Arv1p.

A1GUS1: 5'-GTCTAGAGATCGGATATGACATAGCGGA-3'. Seqüència del nucleòtid -1547 al -1527 respecte al codó d'inici de traducció.

A1GUS2: 5'-GCGGTACCCACGCATCTGTGTTCACTC-3'. Seqüència complementària del nucleòtid +27 al +9 respecte al codó d'inici de traducció.

Els oligonucleòtids A1GUS1 i A1GUS2 contenen les dianes pels enzims de restricció *Xba*I i *Kpn*I (subratllades).

El plasmidi recombinant *ARV2::GUS* conté la fusió traduccional entre la regió 5' flanquejant del gen *ARV2* (fins al cinquè aminoàcid) i el gen *uidA* d'*E.coli*. Per generar aquest plasmidi s'ha amplificat per PCR el fragment de 1534 pb corresponent a regió 5' del gen *ARV2* utilitzant com a motlle ADN genòmic d'*A.thaliana* varietat Columbia 3 i com a encebadors s'han utilitzat els encebadors A2GUS1 i A2GUS2. El fragment amplificat s'ha digerit amb els enzims de restricció *Xba*I i *Kpn*I, i clonat en els llocs corresponents del plasmidi *pBluescript* (Stratagene) donant lloc al cló pBSA2GUS. El fragment clonat conté 1519 pb de la seqüència situada cap a 5' del codó d'inici de traducció i els primers 15 pb de la seqüència que codifica per la proteïna Arv2p, incloent-hi el codó d'inici de traducció de la proteïna més els 4 següents aminoàcids de la proteïna Arv2p.

A2GUS2: 5'-CGGGTACCTGCCTTCTGTAGCTAAGCTG-3'. Seqüència del nucleòtid -1519 al -1501 respecte al codó d'inici de traducció.

A2GUS1: 5'-GTCTAGACTTCTCTCTCGCCATCTC-3'. Seqüència complementària del nucleòtid +15 al -3 respecte al codó d'inici de traducció.

Els oligonucleòtids A2GUS1 i A2GUS2 contenen les dianes pels enzims de restricció *Xba*I i *Kpn*I (subratllades).

Els plasmidis pBSA1GUS i pBSA2GUS han estat digerits amb els enzims *Xba*I i *Kpn*I. Un cop purificats, els fragments obtinguts (1574 i 1534 pb respectivament) s'han clonat en els llocs corresponents del plasmidi pBI121 (Clontech), substituïnt així el promotor 35S pels promotors dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, i donant lloc als plasmidis recombinants pBIA1GUS i pBIA2GUS, utilitzats per generar les plantes transgèniques, que contenen les fusions traduccionals *ARV1::GUS* i *ARV2::GUS*. Les fusions traduccionals han estat comprovades per seqüenciació.

### **12.6.2. Transformació d'*Agrobacterium tumefaciens***

Un cop obtinguts els plasmidis recombinants pBSA1GUS i pBSA2GUS, s'ha transformat amb ells la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, ja que aquesta és el vehicle utilitzat per transferir el gens químics a la planta de forma estable. El procediment de transformació és una variant de la metodologia utilitzada per a la transformació de cèl.lules d'*E.coli* per xoc tèrmic (An, 1987). Per això s'obtenen primer cèl.lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens*. El procediment per a l'obtenció de la competència és el següent:

1. S'inocula una colònia de la soca C<sub>58</sub>C<sub>1</sub>(pGV2260) d'*Agrobacterium tumefaciens* en 10 ml de medi de cultiu YEP que contingui 100µg/ml de rifampicina, antibiòtic que selecciona aquesta soca. S'incuba la soca a la temperatura de 28°C en agitació constant durant aproximadament 24h.

2. S'inocula 100 mL (dilució 1:1000) del cultiu anterior a 100 ml de medi YEP-rifampicina. S'incuba a la temperatura de 28°C en agitació constant durant aproximadament 18-20h fins arribar a una D.O. de 0,5 ( $\lambda=600$  nm).

3. Es centrifuga el cultiu a 5000 rpm durant 10 min a 4°C.

4. Es resuspen cuidadosament el sediment cel.lular en 10 ml d'una solució de NaCl 0,15M prèviament refredada en gel.

5. Es centrifuguen de nou les cèl.lules en les mateixes condicions i es resuspenen en 2 ml de solució de CaCl<sub>2</sub> 20 mM en gel.

6. Es distribueixen les cèl.lules en alíquotes de 200 µl. En aquest punt tenim les cèl.lules d'*Agrobacterium tumefaciens* competents, que poden guardar-se a -80°C si el procés de transformació no s'ha de realitzar de forma immediata.

El procés de transformació de les cèl.lules competents d'*A.tumefaciens* és el següent:

1. S'afegeix 1 µg d'ADN del plasmidi recombinant (pBIA1GUS o pBIA2GUS) corresponent al tub eppendorf que conté els 200 µl de cèl.lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens*, es mesclen i s'incuba en gel durant 30 min.

2. Es congela en N<sub>2</sub> líquid durant 1 min.

3. Es descongela la mostra en un bany a 37°C durant 5 min.

4. S'afegeix 2 ml de medi de cultiu YEP i s'incuba les cèl.lules a 28°C durant 6h en agitació suau aproximadament a 120 rpm.

5. Es centrifuga el cultiu a 2000 rpm durant 5 min. i es resuspen en 100 µl de medi YEP. S'exten aquest volum en plaques de Petri que continguin medi YEP en presència dels antibiòtics kanamicina (50 µg/ml) i rifampicina (100 µg/ml). La kanamicina seleccionarà aquelles cèl.lules que hagin estat transformades amb el plasmidi recombinant donat que aquest conté el gen NPT II que confereix resistència a kanamicina.

6. S'incuba a 28°C. Les colònies comencen a ser visibles a partir de les 36h de creixement.

A continuació s'ha comprovat que les cèl.lules transformades continguin el plasmidi pBIA1GUS o pBIA2GUS, pel que s'ha analitzat l'ADN plasmídic obtingut de les cèl.lules mitjançant minipreps. Per això, s'ha inoculat la colònia en 3 ml de medi YEP-kanamicina i un cop crescuda durant 16h a 28°C es centrifuga, s'han resuspès les cèl.lules, s'hi ha afegit 20 µl de solució de liozím (20 mg/ml) i s'han deixat actuar l'enzim durant 15 min. a 37°C. La incubació amb liozím facilita el trencament de la paret bacteriana augmentant així el rendiment de l'obtenció de l'ADN plasmídic, que d'una altra manera seria molt baix. Un cop obtingut l'ADN plasmídic d'*Agrobacterium* i degut a que normalment l'ADN obtingut és de baixa puresa o el rendiment és molt baix, s'han retransformat cèl.lules DH5a d'*E.coli*, per obtenir ADN plasmídic de major qualitat. Finalment, un cop comprovat la presència del plasmidi d'interès, dins de les cèl.lules d'*Agrobacterium* s'ha inoculat la colònia en medi YEP i un cop crescut l'inòcul s'ha emmagatzemat una alíquota a -80°C en presència d'un 50% (v/v) de glicerol.

### **12.6.3. Generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana***

La generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* s'ha dut a terme mitjançant la infecció amb *Agrobacterium tumefaciens* C<sub>58</sub>C<sub>1</sub> (pGV22660) utilitzant la tècnica de la imersió floral (*floral dip*), descrita per Clough i Bent (1988), amb algunes modificacions. Aquest mètode es basa en aconseguir que l'*Agrobacterium* infecti algunes cèl.lules germinals de la planta, per a que aquestes originin posteriorment llavors portadores del transgen. Per a això, les tiges florals de la planta s'han submergit en una solució que conté

*Agrobacterium* portador de l'ADN-T quimèric d'interès. Per facilitar la invasió bacteriana s'ha afegit un agent tensioactiu a la solució mencionada. És important l'estat de desenvolupament de les plantes en el moment de ser transfectades. S'ha d'escollir el moment del desenvolupament en el que abundin els botons florals tancats, donat que així augmentarà considerablement el rendiment de la transformació. També és recomanable que les plantes estiguin el més sanes possible, ja que d'aquesta manera resistiran millor l'estrès provocat pel procés d'infecció.

#### 12.6.3.1. Creixement de les plantes a transfectar

1. S'esterilitza en les llavors d'*Arabidopsis thaliana*, ecotip Columbia 3, tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.1.1 de Material i Mètodes.
2. Es sembren les llavors en plaques que continguin medi MS. S'estratifiquen durant 3-4 dies per sincronitzar la germinació, deixant les plaques en una nevera a 4°C.
3. Es creixen en condicions d'il·luminació de dia curt (8h de llum i 16h de foscor).
4. Es transplanten a terra aproximadament als 15 dies de creixement (apartat 1.2 de Material i Mètodes). Es transplanten unes 5 plantes per test i 4 testos per cada construcció que es desitja transfectar. Es mantenen les plantes creixent en condicions de dia curt durant uns 15 dies més.
5. A continuació es traslladen les plantes a condicions de creixement de dia llarg (16h de llum i 8h de foscor). Aproximadament 15 dies després apareixen algunes tiges florals. Es tallen aquestes primeres tiges florals per anul·lar la dominància apical i, per tant, aconseguir un major nombre de tiges laterals i de flors.
6. S'observen les plantes fins que presentin un gran nombre de brots florals que marcarà el moment de realitzar la infecció. És recomanable infectar la planta quan la majoria de les inflorescències estiguin encara tancades.

#### 12.6.3.2. Creixement d'*A.tumefaciens*

Ara ja podem obtenir un cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens* apropiat per a infectar la planta:

1. A partir de la colònia de la soca d'*Agrobacterium* portadora de la construcció d'interès crescuda en plaques YEP-rifampicina-kanamicina, s'inocula un precultiu de 10 ml de medi líquid YEP-rifampicina-kanamicina-carbenicil·lina (100 µg/ml). L'antibiòtic kanamicina selecciona el plasmidi portador de l'ADN-T recombinant d'interès, la rifampicina selecciona la soca C<sub>58</sub>C<sub>1</sub> (pGV2260) i la carbenicil·lina selecciona el plasmidi Helper que conté els gens *vir* d'*Agrobacterium*. S'incuba aquest cultiu en agitació a 28°C durant 48h, ja que en presència de carbenicil·lina el creixement és molt lent.
2. S'inoculen 2 ml de precultiu a 500 ml de medi de cultiu LB en presència de kanamicina i rifampicina. De fet s'inoculen 500 ml de medi de cultiu líquid per cada construcció que es desitgi utilitzar per a infectar.
3. S'incuba el cultiu durant 12-16h en agitació a 28°C fins arribar a una D.O. de 0,5 ( $\lambda=600$  nm).
4. Es centrifuga 15 min. a 5000 rpm i a 10-15°C.

5. Les cèl.lules es resuspenen en 300 ml de solució de sacarosa al 5%. Primer es resuspenen les cèl.lules en aproximadament 10 ml de solució, suaument per a evitar trencar-les mecànicament i una vegada resuspeses, s'afegeix la resta del volum de sacarosa.

Solució de sacarosa al 5%: 15 g de sacarosa en 300 ml d'aigua mQ no estèril

#### 12.6.3.3. Transformació d'*A.thaliana* mitjançant *A.tumefaciens*

Aquest pas consisteix en la incorporació de l'ADN-T al genoma de les cèl.lules d'*A.thaliana* mediada per *Agrobacterium*. El procediment és el següent:

1. Just abans de submergir les plantes en la solució d' *Agrobacterium*, s'afegeix 90 µl de Silwett L-77 a la solució bacteriana. Es tracta d'un agent tensioactiu que desfa la cutícula de la planta i facilita la infecció per l'*A.tumefaciens*. S'agita suaument i es passa la solució que conté les bacteries a un vas de precipitats de 500 ml.

2. S'agafa el test que conté les plàntules d'*A.thaliana* amb abundants tiges florals i s'inverteix de tal manera que els talls i les fulles bassals es submergeixin en la solució d'*Agrobacterium* durant 2-3 min.

3. S'inclina les plantes sobre paper de filtre en una safata i es tapen amb plàstic transparent tipus "*Saran wrap*<sup>®</sup>" per evitar que s'assequin i permetre a la vegada el pas de la llum durant 1-2 dies. Passat aquest temps, es destapen i es retornen a la posició normal de creixement.

Les plantes que han estat en contacte amb la solució d'*Agrobacterium* es mantenen en condicions de creixement de dia llarg durant aproximadament 1 mes, temps durant el qual les cèl.lules germinals infectades donaran lloc a llavors transgèniques.

#### 12.6.3.4. Selecció de les plantes transgèniques

Un cop realitzat el procés de transformació i transcorregut el temps necessari per a la formació de llavors (aproximadament 1 mes), aquestes s'han recollit i s'ha realitzat el procés de selecció de plantes transgèniques. No totes les llavors de les plantes infectades hauran incorporat el transgen, de manera que s'ha de seleccionar aquelles que sí que ho han fet. El vector pBI121, que dins de l'ADN-T conté la seqüència del gen NPT II que confereix resistència a la kanamicina. Així, el procés de selecció consisteix en germinar les llavors en medi de cultiu MS en presència de kanamicina. Aquelles que puguin créixer hauran incorporat el transgen. El procediment de selecció és el següent:

1. S'esterilitzen les llavors que provenen de les plantes infectades, a partir de les quals obtindrem les plantes de la generació T<sub>1</sub> (punt 1.1.1. de Material i Mètodes).

2. Es sembren les llavors en presència de medi de cultiu MS en presència de kanamicina (50 µg/ml).

3. S'estratifiquen durant 2-3 dies a 4°C i es posen les llavors a germinar en condicions de llum de dia llarg (16 h de llum i 8 h de fosc).

4. Després de 10-15 dies s'observa que entre les llavors que han germinat es desenvolupen amb normalitat les plantes transgèniques, mentre que les no transgèniques no arriben a produir fulles veritables ni arrels sinó que només s'observen els dos cotiledons i adquireixen un color verd molt pàlid.

5. Confirmada la resistència de les plantes transgèniques a l'antibiòtic, es passen a terra per completar el seu cicle biològic. Obtenint-se d'aquesta manera les llavors de la generació T<sub>2</sub>.

#### 12.6.3.5. Selecció de línies homozigòtiques pel transgen

Durant el procés de transformació per mitjà d'*Agrobacterium*, la planta incorpora el transgen en una de les dues dotacions cromosòmiques, i per tant, la generació T<sub>1</sub> és hemizigòtica pel transgen. Per autofecundació de la generació T<sub>1</sub> s'obté una descendència heterogènia, que correspon a la generació T<sub>2</sub> en la que es troben plantes homozigòtiques i hemizigòtiques pel transgen, així com plantes salvatges que no presenten cap còpia del transgen. En cas que hagi tingut lloc una sola integració de l'ADN-T, aquests tres genotips es troben representats en una proporció d'1/4, 2/4 i 1/4 respectivament. Des del punt de vista de la normalització de resultats és important disposar de línies homozigòtiques. Per tant s'han de seleccionar aquelles plantes de la generació T<sub>2</sub> homozigòtiques pel transgen, respecte aquelles que no ho són. Per això s'estudia la segregació del caràcter de resistència a l'antibiòtic i per tant del transgen en la descendència de la generació T<sub>2</sub>, obtinguda per autofecundació. Les plantes homozigòtiques pel transgen donaran lloc a una descendència 100% resistent a l'antibiòtic (la generació T<sub>3</sub>) i per tant seràn escollides pel treball experimental. Per altra banda, les plantes hemizigòtiques de la generació T<sub>2</sub> generaran una descendència 3/4 resistent a l'antibiòtic i 1/4 sensible, i finalment, les plantes *wild-type* de la generació T<sub>2</sub> produiran una descendència 100% sensible a l'antibiòtic.

Aquest sistema, a més de permetre la selecció de línies homozigòtiques, permet tenir una idea del nombre d'integracions de l'ADN-T en la planta, donat que les proporcions anteriors només són vàlides en cas d'una sola integració en el genoma. Si hi ha més d'una integració en la generació T<sub>1</sub>, el nombre de plantes sensibles a l'antibiòtic en la generació T<sub>2</sub>, disminueix dràsticament. Per exemple, en el cas de que haguessin dues integracions aquesta proporció baixaria de 1/4 a 1/16.

### **12.7. Anàlisi qualitatiu de l'activitat GUS en plantes transgèniques**

L'estudi del patró d'expressió espacial i temporal de les proteïnes Arv1p i Arv2p d'*A.thaliana* al llarg de tot el desenvolupament s'ha realitzat sobre plantes transgèniques portadores de la construcció de fusió entre la regió 5' flanquejant dels gens *ARV1* i *ARV2* (promotor) i el gen *uidA* d'*E.coli* (Punt 5.3). Aquest estudi s'ha dut a terme gràcies a l'activitat  $\beta$ -glucuronidasa codificada pel gen *uidA*. L'activitat glucuronidasa o GUS s'ha determinat de forma qualitativa mitjançant un assaig colorimètric realitzat *in situ*. Per això, s'ha incubat la mostra de teixit de la planta problema amb el substrat 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-Glucuronid (X-Gluc). Aquest substrat, al ser transformat per l'activitat enzimàtica  $\beta$ -glucuronidasa, dona lloc a una aglicona que al dimeritzar adquireix una coloració blava fàcilment visualitzable (Jefferson et al., 1987).

Pels assaigs realitzats en l'estadi de plàntules, les plantes s'han germinat en medi de cultiu MS en absència de sacarosa en condicions estèrils i s'han agafat de la placa de Petri en el moment de realitzar l'assaig. En canvi, per l'assaig d'òrgans procedents de planta adulta s'han

dut a terme a partir de plantes crescudes en terra. El procediment per a la detecció de l'activitat GUS és el següent:

1. S'introdueix la mostra en un tub eppendorf que contingui la mescla d'assaig GUS. En el cas de les mostres grans, es poden utilitzar recipients alternatius, com un Falcon-50.

2. Es sotmeten les mostres al buit durant 5 min. en un dessecador connectat a una font de buit.

3. A continuació, s'incuben a 37°C el temps necessari fins a l'aparició la coloració blava. Aquest temps varia molt en funció de l'expressió del gen estudiat, de l'estadi de desenvolupament i de l'òrgan de la planta, pel que s'ha d'optimitzar en cada cas. És important no saturar la reacció per evidenciar les possibles diferències d'expressió entre els diferents teixits d'un mateix individu. En el cas de les línies assajades en el present treball aquest temps varia des de les 5h en embrions de 24h a 1 dia en teixits de plàntules de 21 dies.

4. Encara que alguns casos el color blau és visible a simple vista, per una millor visualització de la coloració blava ha estat necessari decolorar el teixit extraient els pigments vegetals, sobretot les clorofil·les amb repetits rentats amb etanol al 70% a T<sup>a</sup> ambient. A més, es pot guardar el teixit tenyit de blau i decolorat en aquesta solució d'etanol al 70% de forma permanent.

L'obtenció d'imatges s'ha dut a terme amb una càmera digital Nikon COOLPIX5000 de 5 megapíxels efectius i un objectiu Nikkor Zoom de 28-55 mm. Per realitzar les fotografies les mostres de teixit s'han col·locat provisionalment en un portaobjectes amb la mateixa solució etanòlica al 70% en la que es guarden. En cas de les imatges més detallades s'ha utilitzat la lupa Olympus SZX7 a la qual s'ha adaptat la mateixa càmera fotogràfica. Les imatges obtingudes s'han editat amb els programes *Exif viewer* i *Adobe Photoshop Elements* (Adobe).

Tampó d'assaig GUS:

Fosfat sòdic pH 7	100 mM
EDTA pH 8	10 mM
Tritó X-100	0,1% (v/v)
β-mercaptoetanol	0,5 mM
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	1 mM
X-Gluc	1 mg/ml

### **13. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LES PROTEINES AtDps1, AtArv1 i AtArv2**

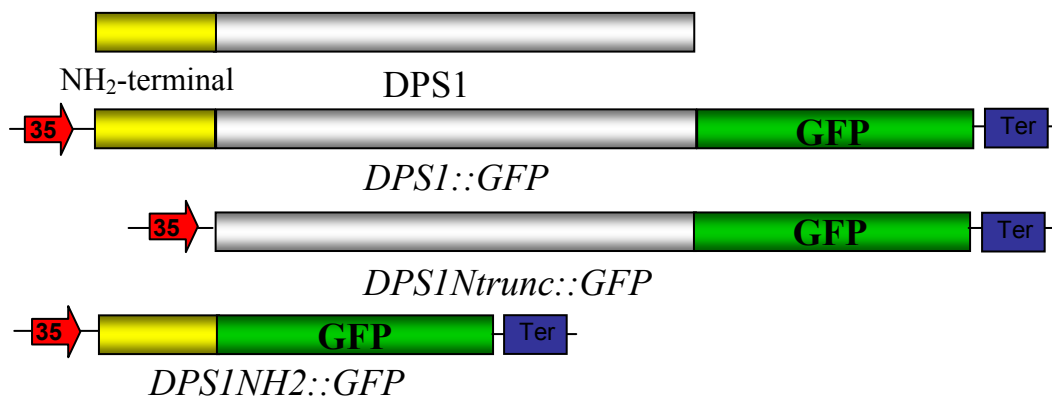
S'han construït gens quimèrics que contenen la fusió de les proteïnes AtArv1 i AtArv2 a l'extrem C-terminal de la proteïna GFP (*GFP::AtArv1* i *GFP::AtArv2*), així com la fusió de la AtArv1p a l'extrem N-terminal de la proteïna GFP (*AtArv1::GFP*). També s'han construït gens quimèrics en els que s'ha fusionat per una banda la proteïna AtArv2 a la que s'ha deleccionat els 68 primers aminoàcids que corresponen al domini AHD (*GFP::AtArv2Δ68*), i per l'altra banda el domini AHD de la proteïna AtArv2 (*GFP::AtArv2AHD*). Com a controls de reticle

endoplasmàtic (RE) s'han utilitzat una proteïna RFP i una GFP modificades que contenen el pèptid senyal de la quitinasa a l'extrem N-terminal i el pèptid KDEL a l'extrem C-terminal (amablement cedits pel Dr. Narciso Campos (del Dept. Bioquímica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona)).

A continuació s'ha transformat transitòriament epidermis de ceba amb aquests gens quimèrics utilitzant la tècnica del microbombardeig i posteriorment s'han observat les cèl·lules transformades al microscopi confocal.

### **13.1. Construcció dels gens recombinants *AtDPS1::GFP*, *AtDPS1-trunc::GFP* i *AtDPS1NH2::GFP***

S'ha realitzat una construcció en la que s'ha clonat els ADNc del gen *AtDPS1* i també una versió que codifica per la proteïna *AtDps1* sense el domini hidrofòbic N-terminal (*AtDps1trunc*) i una altra versió que conté només l'extrem N-terminal de la proteïna *AtDps1* (*AtDps1NH2*). En totes les versions de l'ADNc de l'*AtDPS1* s'ha clonat en posició 5' respecte de l'ADNc de la GFP és a dir a N-terminal respecte a la proteïna GFP, en el plasmidi pGFP-MRC-N sota el control del promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor (**figura 22**).



**Fig. 22. Gens quimèrics utilitzats per l'estudi de la localització subcel·lular de les proteïnes *AtDps1*, *AtDps1trunc* i *AtDps1NH2* mitjançant GFP.** Els ADNc s'han fusionat a 5' de la GFP. **35:** Promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor. **Ter:** Terminador de la nopalina sintasa.

Per obtenir les construccions que codifiquen per les fusions a la GFP de les proteïnes *AtDps1* (*DPS1::GFP*), *AtDps1trunc* (*AtDPS1Ntrunc::GFP*) i *AtDps1NH2* (*AtDPS1NH2::GFP*) s'ha utilitzat com a motlle el plasmidi pBSDPS1. Com a encebadors s'han utilitzat els encebadors DPS15 (sentit) i GFP1 (antisentit) per la construcció *AtDPS1::GFP*, els encebadors GFP2 (sentit) i GFP1 (antisentit) per la construcció *AtDPS1trunc::GFP* i els encebadors DPS15 (sentit) i DPSGFP (antisentit) per la construcció *AtDPS1NH2::GFP*. Per facilitar el clonatge en el vector pGFP-MRC-N els encebadors sentit contenen la diana *SpeI* i els encebadors antisentit contenen la diana *SalI*.

**DPS15:** 5'-GGACTAGTATGTTGTCCTTTCTTTCTTCTGA-3'. Seqüència del nucleòtid 29 al 51 de l'ADNc *AtDPS1*.

**GFP2:** 5'-GGACTAGTATGCCGAGACACGTGGCATTTC-3'. Seqüència del nucleòtid 236 al 256 de l'ADNc *AtDPS1*.

**GFP1:** 5'-GCGTCGACAACCCGACAACCAAATCGTC-3'. Seqüència complementària del nucleòtid 918 a 937 de l'ADNc *AtDPS1*.

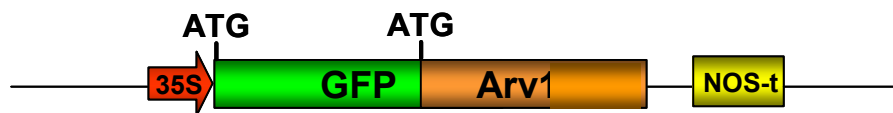


**DPSGFP:** 5'-*GCGTCGACTAGTTCTCTTTGTAACCCATCCTC*-3'. Seqüència complementària del nucleòtid 212 a 235 de l'ADNc AtDPS1.

Un cop amplificats, els ADNc (de 909 pb (AtDPS1), 701 pb (AtDPS1trunc) i 207 (AtDPS1NH2) s'han clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) donant lloc als plasmidis pGTDPS1GFP, pGTDPS1trunc i pGTDPS1NH2. Un cop seqüenciats, s'han digerit amb els enzims *SpeI* i *SallI* i s'han clonat en els llocs corresponents del plasmidi pGFP-MRC-N per obtenir els plasmidis pAtDps1pGFP, pAtDps1pruncGFP i pAtDps1pNH2GFP que contenen els gens quimèrics *AtDPS1::GFP*, *AtDPS1trunc::GFP* i *AtDPS1NH2::GFP*, els quals s'han seqüenciat per comprovar la fusió.

### **13.2 Construcció dels gens recombinants *GFP::AtARV1*, *GFP:: AtARV2*, *AtARV1::GFP*, *GFP::AtArv2Δ68* i *GFP:: AtArv2AHD***

S'han realitzat quatre construccions en les que s'han clonat els ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A.thaliana* i també una versió que codifica per la proteïna AtArv2 a la que s'ha deleccionat els 68 primers aminoàcids corresponents al domini AHD (AtArv2pΔ68) i una altra pel domini AHD de la proteïna AtArv2 (AtArv2pAHD) en posició 3' respecte de l'ADNc de la GFP, és a dir a C-terminal respecte a la proteïna GFP, en el plasmidi pGFP-MRC sota el control del promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor (**figura 19**). També s'ha realitzat una construcció en que s'ha clonat l'ADN AtARV1 en posició 5' respecte de l'ADNc de la GFP és a dir a N-terminal respecte a la proteïna GFP, en el plasmidi pGFP-MRC-N sota el control del promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor (**figura 20**).



**Fig.23.** Gens quimèrics utilitzats per l'estudi de la localització subcel·lular de les proteïnes AtArv1, AtArv2, AtArv2Δ68 i AtArv2AHD mitjançant GFP. Els ADNc s'han fusionat a 3' de la GFP. 35S: Promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor. Nos-t: Terminador de la nopalina sintasa.

Per obtenir les construccions *GFP::ARV1* i *GFP::ARV2* mostrades en la **figura 23**, els ADNc dels gens *ARV1* i *ARV2* s'han amplificat utilitzant com a motlles els plasmidis pGTARV1 i pGTARV2. Com a encebadors s'han emprat els encebadors GFPA1S (sentit) i GFPA1R (antisentit) pel gen *ARV1* i els encebadors GFPA2S (sentit) i GFPA2R (antisentit) pel gen *ARV2*. Per obtenir la construcció *ARV1::GFP*, l'ADNc del gen *ARV1* s'ha amplificat a partir dels plasmidis pGTARV1 amb els encebadors A1SPE (sentit) i A1SALGFP (antisentit). Per obtenir les construccions *GFP::AtArv2Δ68* i *GFP::AtArv2AHD*, els ADNc que codifiquen per les proteïnes AtArv2pΔ68 i AtArv2pAHD s'han amplificat utilitzant com a motlle el plasmidi pGTARV2. En la construcció *GFP::AtArv2Δ68* s'han emprat els encebadors ARV2Δ68S (sentit) i GFPA2R (antisentit) i en la construcció *GFP::AtArv2AHD* s'han emprat els encebadors GFPA2S (sentit) i GFPAHDR (antisentit). Per facilitar el clonatge en el vector pGFP-MRC i pGFP-MRC-N els encebadors sentit contenen, respectivament, les dianes dels enzims *SacI* i *SpeI*, mentre que els encebadors antisentit contenen, respectivament, les dianes dels enzims *BamHI* i *SallI*.

GFP A1S: 5'-CGAGCTCATGGCGGCGAGTGAA-3'. Seqüència des del nucleòtid 72 al 86 de l'ADNc AtARV1.

GFP A1R: 5'-CGGGATCCTGGAAGCTGATGGGA-3'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 808 al 823 de l'ADNc AtARV1.

GFP A2S: 5'-CGAGCTCATGGCGAGAGAGAAG-3'. Seqüència des del nucleòtid 23 al 38 de l'ADNc AtARV2.

GFP A2R: 5'-CGGGATCCCCTTGCAAGAGAAGA-3'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 710 al 724 de l'ADNc AtARV2.

ARV2Δ68S: 5'-CGAGCTCATGGTTGTTAATCAAGAA-3'. Seqüència dels nucleòtids 228 a 243 de l'ADNc AtARV2.

GFP AHDR: 5'-CGGGATCCATTGTAGAGTAAGTG-3'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 213 a 227 de l'ADNc AtARV2.

A1SPE: 5'-CGACTAGTATGGCGAGAGAGAAG-3'. Seqüència des del nucleòtid 23 al 38 de l'ADNc AtARV2.

A1SALGFP: 5'-CGGTCGACCATGACAGATCCTAAGT-5'. Seqüència complementaria des del nucleòtid 691 a 707 de l'ADNc AtARV2.

Un cop amplificats, els ADNc (750 pb (*AtARV1*), 701 pb (*AtARV2*), 523 pb (*AtArv2Δ68*), 219 (*AtArv2Δ68*) i 684 pb (*AtARV1* per clonar a N-terminal de la GFP) s'han clonat en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy vector* (Promega) donant lloc als plasmidis pGTGFPA1, pGTGFPA2, pGTGFPAΔ68, pGTGFPAHD i pGTA1GFP. Un cop seqüenciats, els plasmidis pGTGFPA1, pGTGFPA2, pGTGFPAΔ68, pGTGFPAHD s'han digerit amb els enzims *SacI* i *BamHI* i s'han clonat en els llocs corresponents del plasmidi pGFP-MRC per obtenir els plasmidis pGFPAtArv1p, pGFPAtArv2p, pGFPAtArv2pΔ68 i pGFPAtArv2pAHD, que contenen els gens quimèrics *GFP::AtARV1* i *GFP::AtARV2*, *GFP::AtArv2Δ68* i *GFP::AtArv2AHD*, que s'han seqüenciat per comprovar la fusió. El plasmidi pGTA1GFP s'ha digerit amb els enzims *SpeI* i *Sall* i s'ha clonat en els llocs corresponents del plasmidi pGFP-MRC-N per obtenir el plasmidi pA1GFP que conté el gen quimèric *AtARV1::GFP*, que s'ha seqüenciat per comprovar la fusió.

### **13.3. Expressió transitòria dels gens quimèrics en cèl·lules de fulles de ceba mitjançant microbombardeig**

Per a l'expressió transitòria dels gens quimèrics generats s'han utilitzat fulles de roseta basal de plantes adultes d'*A.thaliana* (aproximadament de 4 setmanes de vida). Les fulles s'han tallat i s'han posat en plaques de Petri en medi MS. També s'ha utilitzat epidermis de ceba (varietat Figueres). S'ha agafat un capa de ceba i s'ha tallat en daus petits, procurant que siguin el més pla possible, i s'han posat en plaques de Petri en medi MS amb la part interior de la capa cap amunt.

Un cop adherit l'ADN corresponent dels diferents gens quimèrics sobre micropartícules de tungstè d'1 µm de gruix, s'han bombardejat les fulles d'*A.thaliana* i les epidermis de ceba amb el sistema *BioRad Biolistic PDS-1000/He*, usant discs de ruptura de 900 psi (*BioRad*). El procés de microbombardeig es detalla a continuació.

### **13.3.1. Preparació de les micropartícules de tungstè:**

Consisteix en netejar-les i guardar-les en una suspensió de glicerol al 50%. El procediment és el següent:

1. Es pesa 60 mg de micropartícules (tungstè M10, 1 µm de diàmetre mig; BioRad) en un tub eppendorf.
2. S'afegeix 1 ml d'etanol al 70% i s'agita 5 min. al vòrtex.
3. S'incuba 15 min. a T<sup>a</sup> ambient.
4. Es centrifuga 5 seg. i es descarta el sobrenedant amb una pipeta.
5. S'afegeix 1 ml d'aigua estèril i s'agita en vòrtex 1 min.
6. Es deixen sedimentar les partícules durant 1 min.
7. Es centrifuguen 5 seg. i es descarta el sobrenedant amb una pipeta.
8. Es repeteix dues vegades més els passos 5 a 7.
9. S'afegeix 1 ml de glicerol 50% estèril i s'agita en vòrtex 1 min.
10. S'emmagatzema la suspensió de micropartícules en glicerol, a la concentració de 60 mg de micropartícules/ml a -20°C.

### **13.3.2. Adsorció de l'ADN a la superfície de les micropartícules:**

S'ha utilitzat el següent protocol que es detalla per a cada bombardeig:

1. S'agita en vòrtex la suspensió de micropartícules preparada anteriorment a la concentració de 60 mg/ml durant 5 min, per resuspendre i trencar els aglomerats que pogués haver-hi.
2. Es passen 10 µl de micropartícules (que corresponen a 600 µg) a un tub eppendorf.
3. Mentre s'agita el tub vortex, s'afegeix:
  - 1-2 µg d'ADN plasmídic corresponent al gen quimèric a assajar
  - 10 µl d'una solució de CaCl<sub>2</sub> 2,5M
  - 4 µl d'espermidina 0,1 M (Sigma)
4. Es continuen agitant en vòrtex durant 10 min.
5. Es deixen sedimentar les partícules durant 1 min.
6. Es centrifuguen durant 5 seg. i es descarta el sobrenedant amb una pipeta
7. S'afegeix 100 µl d'etanol al 70% sense resuspendre les micropartícules.
8. S'elimina el sobrenedant amb una pipeta
9. S'afegeix 8 µl d'etanol absolut i es resuspenen amb una pipeta.

En aquest moment l'ADN del gen quimèric que volem assajar es troba adherit a la superfície de les micropartícules de tungstè. Es pot passar a microbombardejar les partícules sobre el teixit.

### **13.3.3. Microbombardeig o transfecció de teixit de ceba**

S'ha utilitzat el sistema *PDS-1000/He* (BioRad) pel microbombardeig. Aquest sistema utilitza la pressió d'Heli per accelerar les micropartícules de tungstè recoberts d'ADN que incidiran sobre el teixit vegetal. El procediment és el següent:

1. Es posa en marxa la cabina de flux laminar. S'esterilitza amb etanol la superfície de la campana i l'interior de la càmera de bombardeig. S'esterilitzen submergint breument en isopropanol els discs de ruptura i en etanol les membranes portadores, reixetes de parada i les peces metàl·liques i de plàstic que serveixen de suport a aquests elements, en plaques de Petri. Es deixen les peces esterilitzades sobre un paper secant. S'esterilitza de la mateixa manera l'interior de la càmera de bombardeig.

2. S'obra la bombona d'Heli i s'ajusta la pressió a 1100 psi (psi: "pound per square inch"), unitat de pressió en anglès que equival a la pressió d'una lliura per pulsada quadrada). Aquesta pressió és 200 psi més gran que la resistència dels discs de ruptura que s'han utilitzat (900 psi).

3. Es dipositen les micropartícules recobertes d'ADN (8 µl) sobre una de les membranes portadores seca. Es deixa que s'evapori l'etanol, aproximadament durant 1 min. Es posa la membrana portadora en el suport metàl·lic amb les micropartícules cap amunt. S'ajusta utilitzant el tap vermell dissenyat per aquesta funció.

4. Es posa una reixeta de parada en el suport disparador. A continuació, es col·loca el suport amb la membrana en el disparador amb les micropartícules que contenen l'ADN orientades cap a la reixeta. Es tanca el disparador enroscant el tancament metàl·lic. La distància entre la membrana portadora i la reixeta ha de ser de 6 mm.

5. Es posa el disc de ruptura en el seu suport i s'enrosca en el cilindre de gas de la part superior de la càmera. S'apreta amb la vareta metàl·lica dissenyada per a aquesta finalitat. La distància entre el disc de ruptura i la membrana portadora ha de ser de 4,5 cm.

6. Es posa la plataforma amb el disparador montat en el nivell 5, considerant com a nivell 1 el més baix.

7. Es posa la placa de Petri que conté el material vegetal a ser bombardejat en la plataforma del nivell 2 si el material són fulles d'*A.thaliana* i en la plataforma del nivell 3 si és epidermis de ceba. D'aquesta forma la distància entre la membrana portadora i la mostra a bombardejar serà de 12 cm en el primer cas i de 9 cm en el segon. Es tanca la càmera i es posa en marxa la bomba de buit.

8. Es connecta la càmera de bombardeig i s'acciona l'interruptor de buit cap a la posició superior. Quan la pressió de buit arribi a 27-29 mm (0,06 atm), es tanca l'interruptor del buit cap a la posició inferior, de manera que es mantindrà la pressió de buit.

9. Immediatament, es pitja l'interruptor de disparar fins a trencar el disc. En aquest moment s'escolta el soroll corresponent a la fractura del disc i el manòmetre que medeix la pressió d'Heli situat a la part superior de la càmera mostra la caiguda de pressió desde 900 psi a 0.

10. S'obre el buit portant la clau a la posició intermitja fins que la pressió arribi al nivell normal de la pressió atmosfèrica. S'ha de tenir en compte que els passos 8

a 10 s'han de realitzar el més ràpidament possible per evitar que el buit pugui danyar el teixit vegetal.

11. Es recupera la mostra vegetal i s'incuba en una càmera de cultiu en condicions de llum continua (*Arabidopsis*) o de foscor (ceba), i a la temperatura de 22 a 24°C durant 16 h per a que tingui lloc l'expressió del gen quimèric introduït.

12. Es descarta el disc de ruptura utilitzat, que ha d'estar trencat, la membrana portadora i la reixeta. Per a realitzar un nou bombardeig, tornar al pas 3, esterilitzant prèviament la zona de bombardeig.

Un cop acabada la sessió de microbombardeig, es netegen les peces utilitzades i l'interior de la càmera amb etanol. Es tanca la bombona d'Heli, es fa el buit en la càmera fins que s'encengui el botó disparador. Es dispara varies vegades fins a alliberar l'Heli dels conductes, de manera que la pressió vagi disminuint amb cada tret fins arribar a 0. Finalment trencar el buit obrint la càmera.

#### Solucions utilitzades:

Solució de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M: Es pesa 36,75 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O i es dissol en aigua fins a 100 ml. S'autoclava durant 20 min. a 120°C.

Espermidina 0,1 M: Es disposa d'una solució estoc d'espermidina (Sigma) en forma de base lliure a la concentració de 6,33 M, emmagatzemada en alíquotes de 15,8 µl a 20°C sota zero. Utilitzar sempre preparacions fresques d'espermidina, és a dir, alíquotes no descongelades prèviament. La solució de treball a 0,1 M es prepara a partir d'una alíquota de 15,8 µl deixant que es descongeli a T<sup>a</sup> ambient i afegint 986,2 µl d'aigua mQ autoclavada. D'aquesta manera s'obté 1 ml d'espermidina 0,1 M.

### **13.4. Observació de les cèl.lules transfectades al microscopi confocal**

Un cop transcorregut el temps d'incubació, les mostres de teixit transfectat s'han analitzat al *Servei de Microscopia Confocal i Micromanipulació Cel.lular dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona*. El teixit vegetal bombardejat s'ha observat prèviament amb una lupa Olympus per determinar les zones que contenen un nombre més elevat de cèl.lules transformades. Les cèl.lules transformades s'han observat mitjançant un microscopi laser d'escàner confocal model Olympus IX70. La fluorescència verda de les cèl.lules transformades corresponents a la proteïna fusionada a la GFP s'ha detectat utilitzant un filtre BP515-525 després de l'excitació amb llum blava a 488 nm. La autofluorescència vermella de la clorofil·la i la fluorescència vermella de la RFP-RE s'ha detectat utilitzant un filtre LP590 després de l'excitació amb llum verda a 568 nm. L'anàlisi de la superposició d'imatges obtingudes, així com el tractament de les mateixes s'ha efectuat mitjançant l'aplicació *Adobe Photoshop Elements* (Adobe).

## **14. DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA**

### **14.1. ASSAIG D'ACTIVITAT CIS-PRENILTRANSFERASA.**

En aquest treball s'han realitzat assaigs radiomètrics per determinar l'activitat *cis*-preniltransferasa en extractes de la soca mutant de llevat SNH23-7D complementada amb la proteïna. Els resultats s'han comparat amb els de l'activitat *cis*-preniltransferasa en extractes de la soca salvatge SNY9 i la soca muatnt SNH23-7D.

#### **14.1.1. Preparació dels extractes.**

Per realitzar l'assaig d'activitat els llevats es creixen a 23°C en 100 ml de medi YNB complementat amb Leu i Lys per les soques SNY9 i SNH23-7D-pJRDP51 i amb Leu, Lys i Ura per a la soca SNH23-7D fins que l'absorbància del cultiu està entre 1 i 2. Tots els passos posteriors es realitzen a 4°C.

1. Els llevats es centrifuguen a 5000 x g durant 10 minuts.
2. Es renten dues vegades amb 10 mL K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.5.
3. El pellet es resuspèn en 500 µL de buffer de lisi (50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 µg/mL d'aprotinina, 5 µg/mL de pepstatina, 5 µg/mL de leupeptina i 5 µg/mL d'antipaïna).
4. Les cèl.lules són trencades vortejant-les 7 vegades durant 1 minut en presència de boles de vidre de 0.45 µm de diàmetre.
5. S'afegeixen als extractes 500µL més de buffer de lisi i s'homogeneïtza al vòrtex.
6. Es recupera la fase líquida i es centrifuga a 300 x g durant 5 minuts a 4°C.
7. El sobrenedant es centrifuga a 13.000 x g durant 15 minuts a 4°C.
8. El pellet (fracció de membrana) es renta amb 1 ml de buffer de lisi.
9. El pellet es resuspèn en 150 µL de buffer de lisi.
10. Es determina la concentració de proteïna mitjançant el mètode de Bradford.

#### **14.1.2. Assaig d'activitat *cis*-preniltransferasa**

L'activitat *cis*-preniltransferasa es mesura tal com es descriu a Sato et al. (1999), utilitzant 50 µM [1-<sup>14</sup>C] IPP (Amersham, 55 mCi/mmol) i 14 µM FPP (Sigma Chemical Co.) com a substrats:

- 100 µg Proteïna fracció P13
- 25 mM Fosfat sòdic pH 7.4
- 4 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 mM KF
- 20 mM β-mercaptoetanol
- 1,4 nmols FPP
- 5 nmols <sup>14</sup>C-IPP
- q.s.p 100 µL H<sub>2</sub>O destil.lada

1. S'incuba la mescla a 30°C durant 1h.

2. S'atura la reacció afegint 400 µL de MgCl<sub>2</sub> 4mM.
3. Els productes de la reacció s'extreuen amb 2.5 mL d'una mescla de cloroform/metanol 3:2 (v/v).
4. La fase clorofòrmica que conté els isoprenoides hidrofòbics es neteja amb 1 mL de la fase superior d'aigua/metanol/cloroform 1:2:3 (v/v) per eliminar la fase aquosa que les pugui haver arrastrat.
5. La fase clorofòrmica s'evapora a sequedat i es resuspèn en 100 µL de cloroform.
6. Una alíquota (50 µL) de la suspensió clorofòrmica es mescla amb Ecoscint™ (National Diagnostics) i es mesura en un contador de centelleig líquid.
7. Una altra alíquota (50 µL) s'analitza per TLC en una placa de Sílica Gel-60 (Merck) utilitzant com a solvent benzè/acetat d'etil 95:5 (v/v). La distribució dels productes marcats amb <sup>14</sup>C són analitzats mitjançant el Personal Imager® FX (Bio-Rad), i les posicions dels estàndards de dolicol (Sigma Chemical Co.) són visualitzats amb vapors de iode.

#### **14.1.3. Cromatografia en fase reversa dels productes de reacció de l'assaig d'activitat *cis*-preniltransferasa**

Per a realitzar la cromatografia en fase reversa del productes de reacció de l'assaig d'activitat *cis*-preniltransferasa, en primer lloc s'han de defosforilar els productes de la reacció (dolicols-P) per obtenir els productes defosforilats (dolicols) que es poden resoldre amb la cromatografia en fase reversa.

1. Els productes de la fase clorofòrmica de l'assaig *cis*-preniltransferasa s'han evaporat a sequedat es resuspèn amb 500 µL de butanol saturat amb aigua.
2. Es realitza una extracció amb 1 volum d'aigua saturada amb butanol i es recupera la fase butanòlica.
3. S'afegeix a la mostra 2 mL de butanol i 0,5 mL de Tritó X-100 a l'1%.
4. Es dissolen 30 mg de fosfatasa àcida (24 unitats; Sigma) amb 1 mL d'H<sub>2</sub>O i 0,1 mL d'AcNa 1M pH 5.6.
5. A la mescla del punt 3 s'afegeix 0,4 mL d'AcNa 1M pH 5.6 i 1 mL de la solució de fosfatasa àcida del punt anterior.
6. S'incuba tota la nit a 37°C en agitació continua.
7. S'afegeix 0,1 mL de NaOH 6 N
8. S'extreu amb 3 mL d'hexà i es centrifuga 15 minuts a 3000 rpm.
9. Es recupera la fase hexànica, es renta amb 1,5 mL d'aigua i es centrifuga 15 minuts a 3000 rpm.
10. Una alíquota de 100 µL es mescla amb Ecoscint™ (National Diagnostics) i es mesura en un contador de centelleig líquid per tenir una idea de la quantitat de producte marcat que es sembla en la cromatografia en fase reversa.
11. La mostra s'evapora a baixa temperatura fins a sequedat.
12. Es resuspèn la mostra amb 50 µL d'hexà i s'analitza per TLC en una placa de Sílica Gel RP-18F254S (Merck) utilitzant com a solvent acetona:aigua 95:5 (v/v). La distribució dels productes marcats amb <sup>14</sup>C són analitzats mitjançant el Personal

Imager<sup>®</sup> FX (Bio-Rad), i les posicions dels estàndards de dolicol (Sigma Chemical Co.) són visualitzats amb vapors de iode.

## **14.2. Determinació de l'activitat HMGR:**

En aquest treball s'han realitzat assaigs radiomètrics per determinar l'activitat de l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR). Per a això s'han obtingut extractes proteics de les mostres vegetals a assajar triturant els teixits en un morter en presència de N<sub>2</sub> líquid i posterior homogeneització amb tampó d'extracció (veure més endavant l'apartat 14.1) en un morter en gel. Els extractes s'han centrifugat a 200 g per obtenir els extractes crus, amb els quals s'ha dut a terme la reacció enzimàtica, incubant els extractes amb una mescla que conté el substrat de l'enzim marcat radioactivament amb <sup>14</sup>C. Finalment s'ha purificat el producte de reacció marcat i s'ha dut a terme el comptatge de la radioactivitat incorporada d'aquest.

### **14.2.1. Reacció de síntesi de mevalonat**

1. En un tub eppendorf, s'afegeix 26,5 µl de la mostra a assajar a 33,5 µl de la mescla de reacció, de manera que el volum final de la reacció sigui de 60 µl. Es mescla suaument amb la pipeta. Es prepara un blanc de reacció mesclant 26,5 µl de tampó d'extracció amb la mescla de reacció i s'incuba en paral.lel.

2. S'incuba la reacció enzimàtica a 37°C més o menys temps en funció del nivell d'activitat HMGR esperat. Per exemple, les mostres de plàntules o les plantes crescudes en condicions de dia curt presentaran un nivell d'activitat superior a mostres de fulles de roseta basal o crescudes en condicions de dia llarg, ja que l'activitat HMGR disminueix amb l'edat de la planta i a major quantitat de llum rebuda per la planta.

3. S'afegeix 10 µl d'HCl al 25%, per a canviar el pH del medi de reacció i consegüentment inactivar l'enzim.

4. S'incuben les reaccions durant 15 min. a 50°C. L'objectiu d'aquest pas és lactonitzar el mevalonat produït per la HMGR. Aquest pas és necessari per a la separació del [<sup>14</sup>C]mevalonat mitjançant cromatografia en capa fina del [<sup>14</sup>C]HMG-CoA que no ha reaccionat. La separació és possible per la diferència en el caràcter hidrofílic existent entre l'HMG-CoA i la mevalonolactona.

5. Es refreden les mostres durant 4 min. a -20°C. En aquest punt es pot aturar el procés guardant les mostres a -20°C.

6. Es centrifuguen els tubs durant 10 min. a 10000 rpm i es descarta el precipitat proteic blanc format.

### **Solucions utilitzades:**

• <u>Tampó d'extracció</u>	Sacarosa	100 mM
	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> pH 7,2	40 mM
	EDTA pH 8,0	30 mM
	KCl	50 mM



Aquest tampó es prepara com stock i es guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el moment del seu ús s'afegeix:

DTT	10 mM
Tritó X-100	0,2 %
PMSF	0,5 mM
Aprotinina	15 $\mu\text{g/ml}$
E64	1,5 $\mu\text{g/ml}$
Pepstatin A	1,5 $\mu\text{g/ml}$

- Solucions stock dels inhibidors de proteases

Es preparen i es guarden a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Excepte el PMSF que es guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ .

PMSF: 100mM en isopropanol. Estable durant 9 mesos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Pepstatina A: 3 mg/ml en metanol.

Leupeptina: 0,5 mg/ml en aigua. Estable durant 1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Aprotinina: 3 mg/ml en aigua.

E64: 1mM en solució tampó. Estable durant mesos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Composició de la mescla de reacció                      Concentració final en l'assaig

33,5  $\mu\text{l}$  de la mescla de reacció contenen:

2,5 $\mu\text{l}$ HMG-CoA fred 0,8 mM	33,3 $\mu\text{M}$
2,5 $\mu\text{l}$ HMG-CoA ( $^{14}\text{C}$ ) 0,319 mM	13,29 $\mu\text{M}$
1,5 $\mu\text{l}$ DTT 170 mM	4,25 mM
2,0 $\mu\text{l}$ G-6-PdH (0,5 U)	0,017 U/ $\mu\text{l}$
25,0 $\mu\text{l}$ de solució cocktail	

- Composició de la solució cocktail

500 mM Tris-HCl pH 7,2	208,3 mM
120 mM EDTA	50 mM
120 mM Glucosa-6-P	50 mM
6 mM NADP <sup>+</sup>	2,5 mM
1,2 mg/ml BSA	0,5 mg/ml

- G-6-PdH 0,25 U/ $\mu\text{l}$

Es dissolen 1000U de l'enzim Glucosa-6-P-deshidrogenasa liofilitzat (Roche ref. n°197726) en 4 ml de citrat sòdic 5 mM pH 7,4. Es conserva a -20°C.

- Solució d'HCl 25%

Mesclar 10,13 ml d'àcid clorhídric comercial (al 37%) amb 4,87 ml d'aigua.

- Preparació de la solució stock de substrat HMG-CoA 0,8 mM

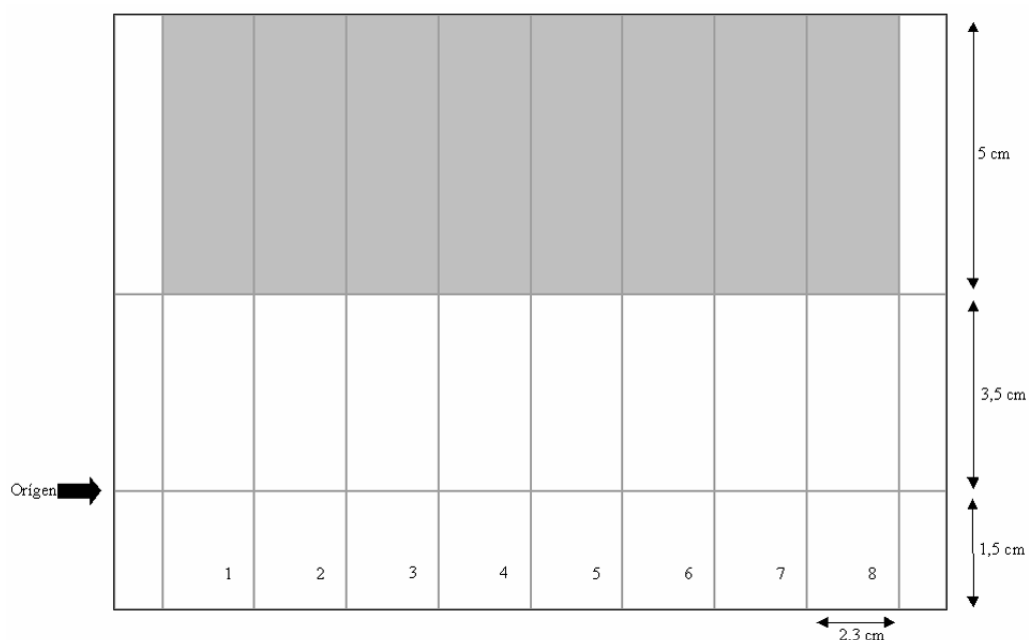
Per preparar la solució stock 4 mM es dissolen els 5 mg d'HMG-CoA (*Sigma*, ref. H-6132) en 1,371 ml d'una solució tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM pH 4,5 i es distribueix en alíquotes de 100  $\mu\text{l}$  que es conserven a -80°C. En el moment d'utilitzar-la es realitza una dilució 1:5 de manera que la concentració de treball és 0,8 mM.

- Substrat marcat ( $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA)

S'ha utilitzat 3-hidroxi-3-metil[3- $^{14}\text{C}$ ]glutaril coenzima A (Amersham-Pharmacia Biotech, ref.CFA732, 20  $\mu\text{Ci/ml}$ ).

#### **14.2.2. Purificació del mevalonat format**

La purificació del mevalonat produït en la reacció enzimàtica de la HMGR es duu a terme mitjançant una cromatografia en capa fina (TLC) de sílica-gel tipus DC-PlastikfolienKieselgel 60 (Merck). La placa, de 20 x 20 cm, es talla en dues parts de 20 x 10 cm. En cada part es marquen 8 carrils de 2,3 cm cada un i s'elimina la sílica de les marques que separen els carrils rasant amb una punta de pipeta. Aquestes discontinuïtats de la sílica eviten la possibilitat que existeix de mescla entre productes de diferents carrils. L'origen de la cromatografia es situa a 1,5 cm de la part inferior de la placa i es marca amb llapis. També es marca amb llapis una línia a 3,5 cm de l'origen (ambdues en sentit horitzontal en el dibuix, veure **figura 24**). En la zona existent sobre aquesta línia es situarà el producte (la mevalonolactona) un cop efectuada la cromatografia (zona de color gris).



**Fig.24.** Esquema de la placa de TLC utilitzada per la purificació del producte de la reacció en l'assaig d'activitat HMGR

Es sembren 35  $\mu\text{l}$  dels 70  $\mu\text{l}$  dels que disposem al llarg de tota la línia d'origen d'un carril i s'assequen amb l'ajuda d'un assecador de cabell. És important evitar tocar la sílica de la placa cromatogràfica amb la punta de la pipeta, ja que aquesta podria deformar la superfície o eliminar la sílica i alterar així el correcte desenvolupament de la cromatografia. El procés de sembra és, per tant, delicat i lent.

El desenvolupament de la cromatografia es du a terme dins d'una cubeta de vidre per a cromatografia, però abans d'iniciar-la s'ha de saturar l'ambient de la cubeta amb vapors de la pròpia fase mòbil que està constituïda per una mescla d'acetona::benzè (1::1) durant com a mínim 50-60 min. Pasat aquest temps, s'introdueix la placa de TLC sembrada. L'evolució de la cromatografia és ràpida. La fase mòbil tarda uns 20 min. en arribar al límit de la placa. Quan ha acabat la cromatografia, es treu de la cubeta, es deixa assecat a sobre de paper d'alumini dins de la campana de gasos.

### 14.2.3. Contatge de la mevalonolactona marcada amb $^{14}\text{C}$

Quan tot el dissolvent s'ha evaporat de la placa cromatogràfica, ja es pot recuperar la mevalonolactona (que es troba en la zona representada en color gris en el dibuix, **figura 24**). La totalitat de sílica d'aquesta regió es rasca, i es traspasa, amb l'ajuda d'una fulla de bisturí, a l'interior d'un vial de centelleig que conté 10 ml de líquid de centelleig *Cytoscint<sup>TM</sup> ES* (ICN). El procés de rascat es duu a terme humitejant prèviament la sílica amb aigua destil·lada mitjançant un pulveritzador. L'humitejament de la placa de sílica és necessària per evitar disseminar pols de sílica radioactiva a l'ambient. Paral·lelament es quantifica una alíquota de la mescla de reacció per determinar la seva activitat específica, que serà necessària per calcular l'activitat HMGR. L'alíquota de la mescla de reacció s'afegeix directament a un vial amb 10 ml de líquid de centelleig. Finalment, es quantifica la radioactivitat en un contador de centelleig Hewlett Packard.

**14.2.4. Càlcul de l'activitat específica**

L'activitat específica s'expressa en pmol d'HMG-CoA transformat en mevalonat per minut i per mg de proteïna. Per obtenir el càlcul d'activitat específica, en primer lloc es calcula el valor de l'activitat en pmol d'HMG-CoA transformat en mevalonat per minut i per ml d'extracte proteic:

$$\text{Activitat (pmols HMGR/ min.ml)} = \text{cpm mostra} \cdot \frac{1}{\text{Eficiència de contatge}} \cdot \frac{1}{\text{Eficiència d'arrossegament}} \cdot \frac{\text{Quantitat total } [^{14}\text{C}]\text{-HMGCoA (pmol)}}{\text{Activitat total } [^{14}\text{C}]\text{-HMGCoA (dpm)}} \cdot \frac{\text{Quantitat total HMG-CoA (pmol)}}{\text{Quantitat total } [^{14}\text{C}]\text{-HMG-CoA (pmol)}} \cdot \frac{1}{\text{temps de reacció}} \cdot \frac{\text{Volum total assaig } (\mu\text{L})}{\text{Volum aplicat a TLC } (\mu\text{L})} \cdot \frac{1}{\text{Volum mostra assajada } (\mu\text{L})} \cdot \frac{1000 (\mu\text{L})}{1 \text{ ml}}$$

Després es calcula l'activitat específica en pmol d'HMG-CoA transformat en mevalonat per minut i per mg de proteïna:

$$\text{Activitat Específica (pmols HMG-CoA/ min.mg)} = \frac{\text{Activitat (pmolsHMG-CoA/min.ml)}}{\text{Concentració proteica}}$$

**15. WESTERN BLOT**

La tècnica de *western blot* permet detectar i comparar entre diferents mostres els nivells d'una proteïna determinada per a la qual s'ha obtingut prèviament anticossos específics. El procediment consisteix en obtenir un extracte proteic del material biològic d'interès i separar les diferents proteïnes segons la seva massa molecular mitjançant electroforesi en un gel d'acrilamida en presència de SDS (PAGE-SDS). A continuació, es transfereixen les proteïnes a una membrana de PVDF i sobre ella es duen a terme les incubacions amb l'anticòs específic o anticòs primari, obtingut de conill, rata o ratolí entre d'altres. Un cop l'anticòs ha reconegut la nostra proteïna, la membrana s'incuba amb l'anticòs secundari (anti immunoglobulines contra l'animal que s'ha utilitzat per generar l'anticòs primari), que reconeix regions constants de l'anticòs primari i que està conjugat a la peroxidasa de rave (RHP). La senyal és finalment detectada mitjançant l'ús del reactiu *ECL* (Amersham) que és transformat per l'activitat catalítica de la peroxidasa de rave provocant una emissió de llum suficient per impressionar una pel·lícula autoradiogràfica. La quantitat de llum emesa serà proporcional a la quantitat d'anticòs unit i per tant a la quantitat de proteïna problema present en la membrana.

**15.1 Obtenció d'extractes proteics d'*A.thaliana***

En aquest treball s'han realitzat extractes de proteïnes de plàntules d'*A.thaliana*. Es poden realitzar tan amb extractes frescos com en extractes congelats amb N<sub>2</sub> líquid, excepte si s'ha de dur a terme un fraccionament de l'extracte, ja que el congelat previ de la mostra danya

el teixit dificultant el correcte fraccionament de l'extracte. El procediment que s'ha utilitzat en aquest treball per l'obtenció d'un extracte cru de proteïnes d'*A.thaliana* és el següent:

1. Es posa la mostra en un morter, que mantindrem en gel, i s'afegeix immediatament el tampó d'extracció fred a la proporció 1:2 (p:v).
2. S'homogenitza el teixit en el tampó d'extracció durant 5 min a 4°C.
3. Es recupera l'extracte obtingut i es passa a un tub eppendorf.
4. Es centrifuga durant 10 min. a 4°C i a 200 g per eliminar les restes cel.lulars.
5. Es descarta el sediment i es recupera el sobrenedant que constitueix l'extracte cru proteic.

<u>Tampó d'extracció/homogeneïtzació:</u>		<u>Cocktail d'inhibidors de proteasas</u>	
KCl	10 mM	Aprotinina	10 µg/ml
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	E64	1 µg/ml
EDTA	1 mM	Leupeptina	0,5 µg/ml
Sacarosa	30% (p/v)	Pepstatina A	1 µg/ml
Tricina pH 7,5	0,1 M	PMSF	0,1 mM

S'afegeixen els inhibidors de proteasas al tampó en el moment del seu ús.

## **15.2. Obtenció d'extractes proteics de *S.cerevisiae***

Les diferents soques de llevat s'han crescut en medi mínim fins a una absorbància d'aproximadament 0,8 i s'han recollit alíquotes d'1,5 ml de cultiu. El procediment que s'ha utilitzat en aquest treball per l'obtenció d'un extracte cru de proteïnes d'*S. cerevisiae* és el següent (Mo et al., 2005):

1. Es centrifuguen les cèl.lules de llevat a 3500 rpm durant 5 minuts.
2. Es resupen dues vegades el pel.let de cèl.lules amb 750 µl de tampó fosfat potàssic 500 mM. Es centrifuguen les cèl.lules a 3500 rpm durant 5 minuts.
3. Es resuspèn el pel.let de cèl.lules amb 50 µl de tampó d'extracció.
4. Es vortegen les cèl.lules resuspeses i es bullen durant 5 minuts.
5. Es deixen atemperar els extractes i es centrifuguen a 10.000 x g durant 10 minuts.
6. Es descarta el sediment i es recupera el sobrenedant que constitueix l'extracte cru proteic.

### Tampó d'extracció/homogeneïtzació:

Tris-HCl pH 6,8      10 mM

SDS	2 %
Glicerol	10 %
$\beta$ -Mercaptoetanol	1 %
Blau de Bromofenol	0,001 %

### **15.3. Determinació de la concentració de proteïna en extractes proteics**

La concentració de proteïna en els extractes proteics s'ha determinat mitjançant el mètode espectrofotomètric de Bradford (1976). S'ha utilitzat el reactiu comercial *BioRad Protein Assay* (BioRad). En tots els casos s'han fet rèpliques de les mostres a mesurar i s'han referit a una recta patró elaborada amb 6 concentracions diferents d'albumina de sèrum boví (BSA) entre 0 i 10  $\mu$ g/ml. Com la quantitat de mostra a assajar és molt petita (entre 1 i 2  $\mu$ l d'extracte), s'ha realitzat una dilució prèvia de la mostra (1:50 o 1:100) per a minimitzar els possibles errors de pipeteig.

### **15.4. Separació de proteïnes mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE**

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE), permet la separació efectiva i senzilla de proteïnes d'una mostra segons la seva massa molecular en condicions desnaturalitzants. El detergent SDS dóna a la proteïna una densitat de càrrega negativa proporcional a la seva massa, pel que la mobilitat de les proteïnes s'aconsegueix aplicant un determinat voltatge al gel, el qual les farà migrar del pol positiu al negatiu.

La tècnica utilitzada en aquesta tesi es basa en el sistema discontinu de resolució de proteïnes desnaturalitzant amb SDS (Laemmli, 1970). Segons aquest mètode, el gel es prepara en dues capes discontinues, la capa apiladora (gel apilador) i la capa separadora (gel separador) que presenten diferent concentració d'acrilamida i pH. Les proteïnes desnaturalitzades per l'SDS migren cap al pol positiu a través del gel apilador (de menor concentració d'acrilamida) i s'acumulen en la interfase dels dos gels. Posteriorment es separen per mida molecular en el gel separador. La concentració en acrilamida del gel separador dependrà del tamany de les proteïnes a separar. En aquesta tesi s'han utilitzat gels d'acrilamida a les concentracions del 9 o 12,5% d'acrilamida. La preparació dels gels i l'electroforesi posterior s'ha dut a terme amb l'equip d'electroforesi *Mini-Protean 3* (BioRad). El procediment és el següent:

1. Es prepara el sistema per a la confecció del gel i s'afegeix aigua al compartiment destinat al gel per assegurar-se que és estanc. Un cop comprovat que és estanc, s'elimina l'aigua i s'asseca la part interior del compartiment.

2. Es prepara el gel separador. Per fer-ho es prepara la solució del gel separador i s'afegeixen els iniciadors de la polimerització, el persulfat amònic (PSA) i el TEMED, en aquest ordre just abans d'utilitzar-la. S'introdueix la solució al compartiment destinat al gel fins a emplenar uns 5,5 cm d'alçada. S'afegeix a continuació un petit volum d'isopropanol de manera que formi una fina capa a sobre del gel separador. Es deixa polimeritzar, que s'aconsegueix aproximadament als 30 min. No s'ha de prolongar aquest pas més d'una hora ja que l'alcohol provocaria la deshidratació del gel.

3. S'elimina l'isopropanol i es neteja l'excés d'alcohol amb aigua, s'asseca l'aigua i s'afegeix el gel apilador, prèvia addició de PSA i TEMED, fins l'extrem superior dels

vidres. Encaixar a continuació la pinta corresponent amb el nombre de pouets adequat al nombre i volum de mostres a carregar. Encara que la polimerització té lloc en uns 30 min, no és fins unes dues hores més tard quan l'homogeneització de la mida del porus del gel està assegurada. En aquest treball s'han utilitzat gels de 0,75 mm de gruix, 10 cm d'ample i 8 cm d'alçada. Hi ha prou amb 10 ml de gel separador i 5 ml d'apilador per preparar 2 gels d'aquestes dimensions.

4. Es posa el gel en el suport corresponent i aquest a la seva vegada en la cubeta d'electroforesi. S'afegeix tampó d'electroforesi fins a cobrir completament els pouets.

5. Es preparen les mostres afegint un volum tampó de càrrega 2X i calentant-les a 100°C durant 5 min. Es carreguen les mostres i un marcador de proteïnes mitjançant una micropipeta amb puntes especials de 0,57 mm d'OD (*Multiflex Round Tips*, Sorenson Bioscience, INC). El marcador que s'ha utilitzat és el *Prestained SDS-PAGE Standards-Low Range* (BioRad). Aquest marcador cobreix el rang de 7,2 a 205 KDa. És suficient sembrar 8 µl del marcador per carril.

6. S'aplica un amperatge constant de 20 o 40 mA, segons el nombre de gels que estiguin corrents en el sistema (1 o 2 respectivament). Es deixa desenvolupar l'electroforesi fins que el front de migració (que es visualitza mitjançant el colorant blau de bromofenol del tampó de desnaturalització), hagi recorregut tot el gel.

Solucions utilitzades:

• Tampó d'electroforesi

Tris HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1% (p/v)

• Solució d'acrilamida:

Acrilamida/N,N'Metilenbisacrilamida 30% (37,5/1) (BioRad)

• Tampó del gel apilador

Tris HCl pH 6,8 0,5 M:	
Tris Base	60,5 g
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.	1 L
Ajustar el pH a 6,8 amb HCl	

Tampó del gel separador

Tris HCl pH 8,8 1,5 M:	
Tris Base	181,5 g
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.	1 L
Ajustar el pH a 8,8 amb HCl	

• Tampó de mostra: Es prepara concentrat 2x

Tampó del gel apilador	2,5 ml
SDS al 10%	4 ml
Glicerol	2 ml

$\beta$ -Mercaptoetanol	1 ml
Bromofenol	0,04%
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.	10 ml

• Recepta per la preparació de dos gels d'acrilamida al 12,5% (9%) de gruix

<u>Gel apilador</u>		<u>Gel separador</u>	
Tampó del gel apilador	1,25 ml	Tampó del gel separador	2,5 ml
Solució d'acrilamida	0,67 ml	Solució d'acrilamida	4,2 ml (3,02)
SDS 10%	50 $\mu$ l	SDS 10%	100 $\mu$ l
PSA 10% (p/v)	37,5 $\mu$ l	PSA 10% (p/v)	75 $\mu$ l
TEMED	3,8 $\mu$ l	TEMED	7,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.	5 ml	H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.	10 ml

**15.5. Transferència de les proteïnes**

Per dur a terme la detecció de la proteïna objecte d'estudi mitjançant l'ús d'anticossos específics, es transfereixen els extractes proteics resolts mitjançant SDS-PAGE a una membrana de PVDF (*Hybond-P*, Amersham Pharmacia Biotech), sobre la que es realitzaran les diferents incubacions amb els anticossos (primari i secundari) i la posterior detecció quimioluminescent. La transferència de les proteïnes a la membrana es realitza immediatament a continuació de l'electroforesi. El procediment és el següent:

1. Es recupera el gel de l'interior dels vidres i amb l'ajuda d'un bisturí s'elimina el gel apilador.

2. Es prepara una membrana de PVDF de la mateixa mida del gel i s'humiteja en metanol durant 10 seg. S'elimina l'excés de metanol i es submergeix la membrana en tampó de transferència fins al moment de preparar el sandwich de transferència.

3. Per a preparar el sistema de transferència, s'ha utilitzat el *Mini Trans-Blot Electrophoretic-Transfer Cell* (BioRad). Aquest sistema consta de dos casets de transferència per a transferir dos gels a la vegada. El muntatge de la transferència es realitza sobre el costat fosc del caset (Pol negatiu). En primer lloc, s'humiteja l'esponja en el tampó de transferència i sobre ella es col.loquen tres papers Whatmann 3 MM humitejats en la mateixa solució. A continuació es posa el gel i sobre aquest, es situa la membrana impregnada de tampó, procurant evitar la formació de bombolles que impedirien la correcta transferència de les proteïnes. En cas de detectar alguna bombolla, s'elimina ajudant-se d'una pipeta Pasteur. Finalment es col.loca tres nous papers Whatmann 3 MM, la segona esponja i es tanca el caset. D'aquesta manera, el gel queda orientat cap al pol negatiu (negre) i la membrana cap al pol positiu (vermell).

4. S'inserta el caset o cassets en un mòdul que els mantindrà entre dos electrodes paral.lels induïnt així la transferència. S'encaixa el mòdul en la cubeta de transferència (*Mini Trans-Blot*<sup>®</sup>, BioRad) i es cobreix totalment amb el tampó de transferència, aproximadament 1 L.



5. S'aplica una intensitat de corrent elèctric constant de 400 mA (per dos gels) durant 1,5 h (o durant 1h en el cas de gels de 0,75 mm) a 4°C. En el procés de transferència es col.loca a la cubeta un recipient que conté aigua congelada per evitar la pujada excessiva de la temperatura del sistema.

6. Un cop realitzada la transferència, es desmonta el casset i es recupera la membrana, realitzant una petita osca en una cantonada que ens permeti orientar la cara on es troben les proteïnes i el sentit de l'electroforesi. Això resulta molt útil posteriorment per identificar la mida de les proteïnes detectades per l'anticòs específic. La membrana pot incubar-se amb l'anticòs immediatament o bé guardar-se seca a T<sup>a</sup> ambient fins el moment del seu ús.

#### Tampó de transferència

Tris HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M

### **15.6. Immunodetecció quimioluminiscent**

La detecció de la proteïna d'interès es duu a terme sobre la membrana de PVDF mitjançant la incubació amb un anticòs específic generat contra aquesta proteïna o contra l'epítip d'Hemaglutinina (HA). Aquest anticòs, denominat primari, és reconegut aleshores mitjançant un anticòs secundari anti-IgG conjugat a la peroxidasa de rave (RHP). L'addició del substrat *Lumigen PS-3* del kit comercial *ECL+Plus* (Amersham), que és degradat per la peroxidasa, provoca l'emissió de llum, permetent la detecció de quimioluminiscència procedent de la proteïna marcada en una placa autorradiogràfica. El procediment és el següent:

1. Es renta la membrana amb PBS (0,01M tampó fosfats, 0,0027 KCl i 0,14M NaCl) 1x durant 10 min. per eliminar possibles restes del gel d'acrilamida.

2. S'incuba la membrana durant 1 h amb una solució de PBS-T-Llet. L'objectiu d'aquest pas és bloquejar els llocs d'unió inespecífica de l'anticòs primari.

3. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari diluït convenientment en la solució PBS-T-Llet durant tota la nit a 4°C. La dilució dels anticòsos utilitzats fou la següent:

-Anti-HMGR: 1:5000

-Anti-HA: 1:200

L'anticòs anti-HMGR utilitzat en aquest treball s'ha obtingut en el laboratori mitjançant la immunització de conills New Zealand amb les proteïnes HMGR. L'anticòs anti-HA és un anticòs policlonal de conill obtingut de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

4. Es renta la membrana tres vegades durant 5 min. amb PBS-T a 4°C

5. S'incuba la membrana durant 30 min. amb l'anticòs secundari (Anti-IgG de conill) diluït en PBS-T-Llet. S'ha utilitzat antisèrum de conill conjugat a la peroxidasa de rave (Amersham) a la dilució 1:10000.

6. Es renta de nou la membrana quatre vegades durant 5 min. amb PBS-T a 4°C.

7. Es renta finalment una vegada amb PBS.

8. A continuació es realitza el procés de detecció. S'ha utilitzat el sistema *ECL+Plus* (Amersham). Es prepara 1 ml de reactiu (per una membrana de 10 x 5 cm) seguint les instruccions del fabricant i s'afegeix a la superfície de la membrana. S'incuba durant 1 min, i es col.loca la membrana dins d'una funda de plàstic transparent. S'elimina l'excés de reactiu amb l'ajuda d'un paper secant evitant la formació de bombolles d'aire entre la membrana i el plàstic. No és necessari realitzar aquest pas en la foscor.

9. S'exposa la membrana a la pel.lícula autoradiogràfica. El temps d'exposició òptim varia segons l'anticòs utilitzat i l'experiment, des de pocs segons a 30 min.

### **15.7. Tinció de les proteïnes de la membrana**

La tinció de la membrana resulta de gran ajuda per confirmar la integritat de les proteïnes presents en la mateixa, així com per avaluar la normalització de la quantitat de proteïna present en els diferents carrils. La membrana s'ha tenyit mitjançant blau de Coomassie, que tenyeix de forma permanent les proteïnes de color blau:

1. Es col.loca la membrana en la solució de tinció amb agitació suau durant 5-10 min. a T<sup>a</sup> ambient.

2. A continuació es destenyeix la membrana submergint-la en la solució de destinció I. En tots els casos es reemplaça el líquid de destinció tantes vegades sigui necessari fins que la relació entre la intensitat de les proteïnes marcades i el soroll de fons resulti òptima.

3. Finalment s'acaba de destenyir la membrana amb solució de destinció II.

- Solucions utilitzades:

- Solució de Coomassie

Blau brillant de Coomassie	0,6 %
Metanol	100 ml
Àcid acètic glacial	25 ml
H <sub>2</sub> O destil.lada q.s.p.	250 ml

- Solució de destinció I

Metanol	40 %
Àcid acètic glacial	7 %
H <sub>2</sub> O destil.lada q.s.p.	500 ml

- Solució de destinció II

Metanol	10 %
Àcid acètic glacial	7 %
H <sub>2</sub> O destil.lada q.s.p.	500 ml

## **16. DETERMINACIÓ DEL LLOC D'INSERCIÓ DE L'ADN-T O DE L'ELEMENT DS EN ELS MUTANTS DELS GENS *ATARVI I ATARV2***

### **16.1. Extracció d'ADN genòmic pel mètode del CTAB**

El protocol d'extracció d'ADN descrit en l'apartat 13.1 permet obtenir grans quantitats d'ADN genòmic amb un elevat grau de puresa, però és un mètode lent, fet que dificulta l'extracció de l'ADN d'un elevat nombre de mostres a la vegada. Per això, en aquest cas s'ha utilitzat un protocol més curt i que permet realitzar l'extracció d'ADN genòmic d'un nombre superior de mostres en un dia:

1. S'homogeneïtzen les mostres en N<sub>2</sub> líquid. Un cop homogeneïtzades les mostres, es transfereixen a un tub eppendorf que es centrifuga 1 min. a 4400 rpm perquè l'homogeneïtzat baixi al fons del tub.

2. S'afegeix 400 µl del tampó d'extracció (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA 0,5M, 100mM Tris-HCl pH8 2M i 0,2% β-Mercaptoetanol) i s'incuba 1 h a 65°C.

3. Es centrifuga 1 min. a 4000 rpm.

4. S'afegeixen 400 µl de cloroform, es mesclen i es centrifuguen 30 min. a 13200 rpm.

5. Es recupera 125 µl de la fase aquosa i es transfereix a un altre tub eppendorf.

6. S'afegeix 1 volum d'isopropanol, es mescla, i es centrifuga 1 h a 13200 rpm a 4°C.

7. S'elimina l'isopropanol, s'afegeix 1 volum d'EtOH 70% i es centrifuga 15 min a 13200 rpm.

8. S'elimina l'EtOH i es deixa assecar. No assecar massa perquè sinó costa molt de resuspendre l'ADN.

9. Es resupen el pellet d'ADN amb 30 µl d'aigua.

10. Es fa un tractament amb RNAsa A (100 µg/ml) per eliminar l'ARN present a la mostra.

11. Es fa una extracció amb fenol/cloroform (1:1).

12. Es recupera la fase aquosa i es fan dues extraccions amb cloroform.

13. Es recupera la fase aquosa i es precipita l'ADN genòmic afegint 1/10 del volum d'acetat sòdic 3M pH 5,2 i 2 volums d'etanol absolut.

14. Es centrifuga 15 min a 8.000 rpm a 4°C per recollir l'ADN.

15. Es resupen l'ADN en 1-2 ml de TE pH 7,5, i es quantifica a l'espectrofotòmetre.

La quantitat final d'ADN obtinguda es quantifica determinant la seva absorbància a 260, 280 i 340 nm, tenint en compte que 1 OD<sub>260</sub>=50 µg DNA/ml, que la relació OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ha de ser propera a 2 .

## **16.2. Identificació de l'ADN-T o de l'element DS inserit per PCR.**

Les reaccions de PCR s'han dut a terme amb 20 ng d'ADN genòmic com a motlle. En el cas del mutant del gen *ATARV1* (Salk\_090151), com a encebadors s'han utilitzat els encebadors A1-5' (sentit) i A1-3' (antisentit) de la seqüència genòmica AC007323 i l'encebador intern del "Left Border" de l'ADN-T inserit LBa1 (sentit). Si la planta és heterozigòtica per la inserció s'amplificaràn dos fragments un de 917 pb, corresponent al fragment que s'amplifica entre l'encebador sentit A1-5' i l'encebador de l'ADN-T (LBa1), i un altre de 566 pb, corresponent al fragment que s'amplifica entre els dos encebadors de la seqüència genòmica d'*AtARV1* (A1-5' i A1-3'). En canvi, si la planta és homozigòtica per a la inserció només s'amplificarà el fragment de 917 pb.

A1-5': 5'-CAGACCCGGACTCTAATTGCT-3'. Seqüència del nucleòtid -72 al -51 respecte el codó d'inici de transcripció del gen ARV1 (posició 8362 de la seqüència genòmica AC007323).

A1-3': 5'-GCTAGAATCAGAAGGAACTAGC-3'. Seqüència complementaria del nucleòtid +484 al +505 respecte el codó d'inici de transcripció del gen ARV1 (posició 8362 de la seqüència genòmica AC007323).

LBa1: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'. Seqüència complementaria del nucleòtid 6479 al 6458 del vector pBIN-pROK2 ([http://signal.salk.edu/tdna\\_protocols.html](http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html)).

En el cas del mutant del gen *ATARV2* (ET8675), com a encebadors s'han utilitzat els encebadors A2-5' (sentit) i A2-3' (antisentit) de la seqüència genòmica AL161492 i l'encebador Ds5.1, corresponent a un dels extrems de l'element DS inserit (antisentit). Si la planta és heterozigòtica per la inserció s'amplificaràn dos fragments un de 750 pb, corresponent al fragment que s'amplifica entre l'encebador sentit A2-5' i l'encebador de l'element DS (Ds5.1), i un altre de 1530 pb, corresponent al fragment que s'amplifica entre els dos encebadors de la seqüència genòmica d'*AtARV2* (A2-5' i A2-3'). En canvi, si la planta és homozigòtica per a la inserció només s'amplificarà el fragment de 750 pb.

A2-5': 5'-CAGACACCATCATCACTAAACGTC-3'. Seqüència del nucleòtid -559 al -546 respecte el codó d'inici de transcripció del gen ARV2 (posició 65320 de la seqüència genòmica AL161492).

A2-3': 5'-CTCGAGATTAAGATCGTTAAAAG-3'. Seqüència complementaria del nucleòtid 496 al 476 de l'ADNc *AtARV2*.

DS5.1: 5'-GAAACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC-3'. Seqüència reversa i complementaria del nucleòtid 216 al 239 del vector pWS31 (número d'accés AF433042).

## **17. DETERMINACIÓ DEL NIVELL D'ESTEROLS EN *A. THALIANA***

### **17.1. Preparació de les mostres:**

1. Les mostres vegetals a analitzar es recullen, es pulveritzen en presència de nitrògen líquid i es guarden a -80°C.
2. Les mostres d'aproximadament 1g de teixit de rosseta basal es liofilitzen durant una nit. Un cop el teixit està liofilitzat es pot conservar a temperatura ambient.

### **17.2. Extracció dels esterols:**

1. Es prepara 50 µl de 5α-colestà (1075 ppm) com a patró intern amb ciclohexà.
2. S'afegeixen a 50 mg de mostra 30 ml d'una solució de diclorometà:metanol (2:1) i 50 µl de la solució de 5α-colestà en un baló. També s'afegeixen a un baló sense mostra que s'utilitzarà com a blanc.
3. Es deixa en un bany d'ultrasons durant 20 minuts i es recull el sobrenedant de l'extracció.
4. Es repeteix l'extracció dues vegades més.
5. Es filtra el sobrenedant amb llana de vidre i s'evapora al rotavapor a 50°C.
6. Es resuspèn el precipitat amb 30 ml d'una solució al 6% (p/v) de KOH en metanol i es deixa saponificant tota la nit a temperatura ambient.
7. S'afegeixen 30 ml d'aigua i s'extreuen els esterols de la mostra 3 vegades amb 30 ml d'hexà.
8. S'evapora la fase hexànica al rotavapor a 50°C fins que queda un volum petit. Aleshores es transfereix a un vial de vidre i s'evapora a sequetat en un corrent de nitrògen.

### **17.3. Anàlisi de les mostres per CG/MS:**

1. L'extracte hexànic assecat es resuspèn amb 150 µl de reactiu [Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (Merck)] i es deixen a 150°C durant 1 hora per silinitzar els esterols.
2. Es deixa refredar i s'evapora en un corrent de nitrògen. Es resuspèn en 300 µl d'hexà.
3. Finalment s'analitzen els esterols en un cromatògraf de gasos acoblat a l'espectòmetre de masses Shimadzu QP2010 en una columna DB-5 MS (5% fenilmetilsilicona, 30m de longitud x 0,25mm de diàmetre intern x 0,25 µM de d.f.).

#### **Condicions de la cromatografia de gasos:**

- Temperatura inicial del forn: 60°C incrementant-se a raó de 6°C/min. fins als 325°C.

- Temperatura del port d'injecció de 300°C, mode d'injecció "Splitless" i un temps d'injecció d'1 min. per mostra.
- Flux de la columna d'1 ml/min. d'Heli.

Condicions de l'espectrometria de masses:

- Mode d'ionització SEI (Ionització electrònica) amb una temperatura de la font d'ions de 200°C.
- 320°C de temperatura d'interfície.
- 4 min. de temps de tall del solvent.
- Mode d'adquisició Scan en un rang de masses entre 50 i 600 uma.

## **18. MARCATGE METABÒLIC I ANÀLISI LIPÍDIC DE *S. CEREVISIAE***

La determinació d'esterols, ceramides, fosfatidilglicerol i l'anàlisi del metabolisme d'esfingolípids en *S.cerevisiae* s'han dut a terme segons s'ha descrit a Swain et al. (2002) en col.laboració amb el laboratori del Dr. J.T.Nickels del Departament de Bioquímica de la Universitat MCP Hahnemann, Filadèlfia, Pennsylvania, USA.

### **18.1. Anàlisi del nivell d'esterols en llevat per GC/MS**

Per analitzar el contingut en esterols de les soques de llevat analitzades, els cultius s'han crescut fins a una densitat de  $1 \times 10^7$  cèl.lules/ml. Les cèl.lules es recullen, es resuspenen en medi de cultiu pre-escalfat a 27°C o 37°C i s'incuben 3 hores més a les temperatures indicades. En aquest moment es recullen les cèl.lules, es resuspenen en 1.5 ml de metanol, 1 ml de KOH al 60% i 1 ml de pirogallol al 0.5%, i s'escalfen durant 2 hores a 85°C. Els esterols s'extreuen dues vegades amb una solució d'èter de petroli/hexà (1:1) i s'analitzen per CG/MS segons s'ha descrit a Swain et al. (2002).

### **18.2. Anàlisi metabòlic d'esfingolípids en llevat**

Els cultius inicials de *S.cerevisiae* per a tots els experiments de marcatge radioactiu de lípids s'han crescut tota la nit fins a la fase exponencial. Els cultius es dilueixen aleshores fins a una densitat de  $5 \times 10^6$  cèl.lules/ml i es pre-incuben a 37°C durant dues hores abans del marcatge. A continuació, les cèl.lules s'han crescut durant 5 hores a 37°C en presència de [<sup>3</sup>H]-inositol. Els esfingolípids s'han extret, deacilats i resolt per cromatografia de capa fina (TLC) unidimensional utilitzant cloroform/metanol/àcid acètic/aigua (16:6:4:1.6, v/v). La distribució dels productes marcats amb <sup>3</sup>H són analitzats per autoradiografia.

### **18.3. Anàlisi metabòlic de ceramides en llevat**

Els cultius de *S.cerevisae* s'han crescut com en l'apartat anterior. Els llevats han estat tractats durant 20 minuts en presència de [<sup>3</sup>H]-dihidroesfingosina a 37°C i s'han deixat créixer 3 hores més en medi en absència de la molècula marcada. Les ceramides s'han extret i s'han separat per cromatografia TLC utilitzant cloroform/metanol/àcid acètic (95:4.5:0.5, v/v) i revelades per autoradiografia.

### **18.4. Anàlisi metabòlic de fosfatidilglicerol en llevat**

Els cultius de *S.cerevisae* s'han crescut com en l'apartat 19.2. Els llevats s'han marcat amb [<sup>32</sup>P]-ortofosfat durant 20 minuts a 37°C. Els fosfolípids s'han extret i posteriorment analitzat per cromatografia TLC. Els percentatges de fosfatidilglicerol són del % del total de fosfolípids.