

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

**DISCUSSION**



## **1. ARABIDOPSIS THALIANA CONTÉ DOS GENS ARV**

L'existència de proteïnes Arv no és exclusiva de les plantes, sinó que també es troben en altres organismes eucariòtics. En el moment d'iniciar el present treball s'havien clonat les seqüències que codifiquen per les proteïnes Arv de *S. cerevisiae* i humans (Tinkelenberg et al., 2000). Addicionalment, en bases de dades informàtiques s'han identificat possibles gens homòlegs en 41 organismes eucariòtics diferents, com per exemple, *Schizosaccharomyces pombe* (AL512562.1), *Caenorhabditis elegans* (Z48795), *Danio rerio* (NC\_007131.2), *Mus musculus* (NC\_026855), *Nicotiana bentamiana* (CK284764), *Medicago truncatula* (AC135795) i en *Oriza sativa* (AC091123) entre d'altres. El gen *ARV1* de llevat fou aïllat en primer lloc en *S. cerevisiae* durant un escrutini en busca de gens essencials pel seu creixement en absència dels gens *ARE* (AcilCoA:colesterol o-aciltransferasa Related Enzymes), que codifiquen els enzims responsables de l'esterificació dels esterols cel·lulars amb l'objectiu d'evitar-ne una acumulació intracel·lular excessiva (Tinkelenberg et al., 2000). La inactivació del gen *ARV1* de llevat comporta una alteració en els nivells intracel·lulars d'esterols, tan lliures com esterificats, i en la seva distribució intracel·lular, produïnt-se un increment en els nivells d'esterols en les membranes vacuolars i una disminució en la membrana plasmàtica. Posteriorment es va determinar que la proteïna Arv1 també està implicada en el manteniment de l'homeostasi d'esfingolípids en llevat (Swain et al., 2002). A més, recentment s'ha descrit que la proteïna Arv1 humana participa també en el metabolisme de triglicèrids (Liu, 2004), de manera que les proteïnes Arv participarien en la homeostasi de tot el metabolisme lipídic. L'existència d'interaccions entre diferents vies de síntesi de compostos lipídics (esterols, esfingolípids i triglicèrids), i per tant, una regulació coordinada de les mateixes ja s'ha observat en llevat (revisat a Veen et al., 2005), humans (revisat a Ridgway, 2000) i plantes (Hartmann et al., 2002) tot i que no es coneixen exactament els mecanismes moleculars implicats.

La caracterització molecular de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* es va iniciar amb la determinació de la complexitat genòmica pels gens *ARV*. Mitjançant una busca amb eines bioinformàtiques, s'ha identificat una petita família multigènica composta pels gens *AtARV1* i *AtARV2*, que corresponen als locus genòmics At1g01020 i At4g01510 respectivament. Aquests dos gens estaven anotats com a gens que podien codificar proteïnes de tipus Arv. Els ADNc d'aquests dos gens han estat clonats per RT-PCR (**figura 38**) i quan es comparen les seqüències amb les dels gens corresponents, s'observa que els dos gens presenten una mateixa organització amb 9 exons i 8 introns d'una mida similar (**figura 41**). A més, els dos gens mostren una elevada similitud en la seva seqüència nucleotídica (**Taula 3**), no només en les regions

codificants (entre un 65 i un 88%) sinó també en les seqüències intròniques (entre un 59 i un 67%). Aquest conjunt d'observacions indica que probablement s'han originat a partir d'una duplicació més o menys recent d'un gen ancestral comú.

La determinació de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes AtArv1 i AtArv2 ha posat de manifest que l'anotació de les dues proteïnes *Arv* d'*A. thaliana* en les bases de dades en el moment d'iniciar el present treball no era correcta. Així, la AtArv1p és una proteïna de 242 aa enlloc dels 128 aa predits, ja que el codó d'aturada predit inicialment no era el correcte. En el cas de la proteïna AtArv2, aquesta té 24 aa menys que la proteïna anotada, perquè la seqüència codificant comença en un codó ATG situat a 3' del codó ATG inicialment predit com a inici de traducció de la proteïna. Per tant, aquest treball ha permès establir una correcta anotació de les proteïnes *Arv* d'*A. thaliana* en les bases de dades. Fins a l'actualitat, els ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* són els únics clonats i caracteritzats en plantes, tot i que s'han identificat possibles gens homòlegs en *Medicago truncatula* (AC135795) i en *Oriza sativa* (NT\_107187). També s'ha identificat un EST de *Nicotiana bentamiana* (CK284764) que codificaria per una possible Arvp.

Un aspecte interessant de la seqüència dels gens *AtARV1* i *AtARV2* és la diferència en la seqüència 5' transcrita no traduïda (5'-UTR) dels dos gens. En la regió 5'-UTR del gen *AtARV1* hi ha quinze repeticions GA/TC. La regió 5'-UTR del gen *AtARV2* també presenta una regió rica en bases puríniques (del nucleòtid -36 al -23 respecte l'ATG), tot i que no hi ha aquesta seqüència (GA/TC)<sub>15</sub>. Les seqüències (GA/TC)<sub>n</sub> presenten un elevat polimorfisme i poden formar tríplex d'ADN tan *in vitro* com *in vivo* (Charlesworth et al.1994). Tot i que aquestes seqüències d'ADN s'associen sobretot a l'heterocromatina, seqüències d'aquest tipus es poden trobar dins o a prop de gens, i en alguns casos s'ha vist que afecten a l'expressió gènica (Croston et al., 1991; Lu et al., 1993; Hodgson et al., 2001). L'unió de les proteïnes d'unió a GAGA (GBP) s'ha vist que estimula la transcripció al provocar una disrupció localitzada del nucleosoma, que fa que el promotor sigui més accessible a la maquinària transcripcional (Tsukuyama et al., 1995). En plantes s'han caracteritzat diferents GBP en soja (Sangwan et al., 2002), ordi (Santi et al., 2003) i *A. thaliana* (Meister et al., 2004). La proteïna HUBP d'*A. thaliana* (*HMGR* 5'-UTR binding protein) és una GBP que s'uneix al motiu 5'-GGAGAGA-3' de la regió 5'-UTR del gen *HMGR1* (Marin 2003), el qual també es troba en la regió 5'-UTR del gen *AtARV2*. Aquestes observacions suggereixen que aquestes seqüències podrien participar en la regulació de l'expressió dels gens *ARV* d'*A. thaliana*, tot i que encara no s'ha estudiat.

## **2. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES AtArv1 I AtArv2**

### **2.1. Les proteïnes AtArv1 i AtArv2 són ortòlogues de la proteïna Arv1 de llevat**

La funcionalitat de les proteïnes AtArv1 i AtArv2 s'ha demostrat expressant-les en la soca mutant de llevat YJN1756, que té inactivat el gen *ARV1*, i comprovant que ambdues proteïnes restauren el creixement d'aquesta soca a la temperatura restrictiva de 37°C (**figura 50**). Per demostrar que aquesta complementació funcional és realment deguda a la capacitat de les proteïnes AtArv de suprimir els defectes en el metabolisme lipídic de la soca YJN1756, s'ha realitzat un anàlisi del contingut lipídic (esterols, esfingolípids i fosfatidilglicerol) de la soca mutant que sobreexpressa la proteïna AtArv2 i els resultats s'han comparat amb els obtinguts amb la soca salvatge W303-A i la soca mutant YJN1756. Aquest anàlisi demostra que la sobreexpressió de la proteïna AtArv2 suprimeix en conjunt els defectes en el metabolisme lipídic de la soca YJN1756, donant a la soca de llevat un perfil lipídic molt similar al de la soca salvatge W303-A (**figures 51 i 52**).

Al analitzar mitjançant GC/MS el perfil d'esterols de la soca salvatge W303-A, de la soca mutant YJN1756 i de la soca mutant YJN1756 que expressa la proteïna AtArv2 s'observa que en general el contingut d'esterols de la soca mutant que expressa la proteïna AtArv2 és molt similar al de la soca salvatge tan a 27°C com a 37°C, tot i que s'observen petites diferències en els nivells d'alguns esterols. Així, a 27°C els nivells de dimetilzimosterol, zimosterol i episterol són més alts en la soca mutant que expressa la AtArv2p respecte la soca salvatge, mentre que els nivells de lanosterol, fecosterol i ergosterol són més baixos. En canvi, a 37°C només els nivells d'ergosterol són més baixos en la soca mutant que expressa la AtArv2p. Aquestes diferències poden ser explicades perquè la proteïna AtArv2, tot i que pot dur a terme la seva funció i complementar la soca de llevat YJN1756, s'està expressant en un organisme heteròleg i per tant pot no ser tan eficient com la proteïna pròpia de llevat, donant lloc a les diferències observades. Aquestes diferències també poden ser explicades per les diferències en l'estructura química dels esterols de llevats i plantes. Així, l'ergosterol, l'esterol majoritari de llevat, té en la cadena lateral un grup metil en la posició 24 i un doble enllaç en la posició 22, mentre que en la cadena lateral dels esterols majoritaris en plantes (**figura 11**), el campesterol no té el doble enllaç de la posició 22, el sitoesterol tampoc té el doble enllaç i presenta un grup etil en posició 24, i l'estigmasterol té el doble enllaç en la posició 22 i un grup etil en posició 24.

En els últims anys s'ha vist que diferències en l'estructura química dels esterols implica diferències en les seves característiques físiques i biològiques (Eisenkolb et al., 2002; Bacia et al., 2004; Vainio et al., 2005).

En relació amb el perfil d'esterols de la soca YJN1756 la variació quantitativament més important en els nivells dels diferents esterols en llevat és dona en els nivells de lanosterol, primer intermediari cíclic de la via de síntesi d'esterols en llevat, els quals s'incrementen en les cèl.lules *arv1Δ* 5 vegades a 27°C i 3,3 vegades a 37°C. Aquest esterol és el substrat de la lanosterol 14 $\alpha$ -demetilasa, codificada pel gen *ERG11*. També incrementen, tot i que en menor grau, els nivells d'escualè, el precursor de tots els esterols. En canvi, els nivells d'intermediaris esteroídics situats en etapes posteriors a la catalitzada per la Erg11p són inferiors en la soca mutant YJN1756 respecte a les cèl.lules W303-A. Recentment s'ha descrit, mitjançant un variació de la tècnica del doble híbrid per detectar interaccions en proteïnes de membrana, una interacció entre les proteïnes Arv1 i Erg11 de llevat (Miller et al., 2005). Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes comparteixen interaccions genètiques i químiques: letalitat del doble mutant *erg11, arv1Δ*, i hipersensibilitat de la soca *arv1Δ* al fluconazol, compost antifúngic que inhibeix Erg11p (Parsons et al., 2004). Aquestes dades suggereixen que la proteïna Arv1 de llevat podria participar en el metabolisme dels esterols interaccionant amb Erg11p. La disrupció del gen *ARV1* tindria com a conseqüència la desaparició d'aquesta interacció, la qual cosa provocaria una alteració en l'activitat de l'enzim Erg11p, i com a conseqüència, una acumulació del substrat, el lanosterol, i una disminució dels nivells dels següents intermediaris de la via. Tot i que la lanosterol demetilasa no està present en la via de síntesi d'esterols en plantes, ja que el primer intermediari cíclic de la via en plantes és el cicloartenol, si que existeix en la via de síntesi d'esterols vegetals un enzim amb l'activitat equivalent a la proteïna Erg11, la obtusifoliol 14 $\alpha$ -demetilasa (Cyp51p) (O'Brien et al., 2005; Kim et al., 2005). Ambdós enzims pertanyen a la família del citocrom P450 i s'integren a la membrana del RE, però Cyp51p té, en general, una major especificitat de substrat que Erg11p i es localitza en una posició relativa diferent en la via de síntesi d'esterols. Així, la Erg11p catalitza la conversió del lanosterol en 4,4-dimethyl-cholesta-8,14,24-trienol, mentre que Cyp51p es localitza varies etapes més endavant i catalitza la conversió de l'obtusifoliol en 4 $\alpha$ -metilergostatrienol (**figura 12**). S'ha proposat que els enzims de la via de síntesi d'esterols poden interaccionar i organitzar-se formant complexes en la membrana de RE. Recentment s'ha revelat que en llevat diversos d'aquests enzims interaccionen físicament formant un complex funcional, anomenat *ergosoma*, en la membrana del RE, en el qual Erg11p, Erg25p, Erg27p i Erg 28p formen el nucli central amb el que poden interaccionar altres enzims de la via (Mo and Bard., 2005). En plantes s'ha observat l'existència d'interaccions genètiques entre diferents gens

de la via de síntesis d'esterols (Schrack et al., 2002). A partir d'aquestes observacions, i a pesar de les diferències existents entre la síntesis d'esterols en llevats, animals i plantes, es raonable pensar que determinades proteïnes/enzims relacionades amb el metabolisme dels esterols vegetals, incloent-hi les proteïnes Arv, poden interaccionar entre si i organitzar-se de forma equivalent en la membrana del RE, encara que de moment no existeixen proves experimentals.

Pel que fa al metabolisme d'esfingolípid, s'observa que l'expressió de la proteïna AtArv2 també retorna els nivells de ceramides i la síntesis d'esfingolípid de la soca mutant YJN1756 a nivells similars als de la soca salvatge W303-A. En conjunt, els resultats de l'anàlisi del metabolisme lipídic demostren que la proteïna AtArv2 és l'ortòloga de la Arv1p de llevat. Al comparar les proteïnes AtArv1 i AtArv2 amb les proteïnes Arv de llevat i humans s'observa un baix grau d'identitat entre elles (**figura 48**). Així la proteïna AtArv1 presenta una identitat del 14% (similitud del 32%) amb la proteïna de llevat i d'un 20% (similitud del 36%) amb la humana, mentre que la proteïna AtArv2 presenta una identitat del 17% (similitud del 33%) amb la proteïna de llevat i d'un 33% (similitud del 39%) amb la humana. El grau més alt d'identitat entre les dues proteïnes d'*A. thaliana* i entre aquestes i la resta de proteïnes Arv caracteritzades fins a la actualitat es dona en l'extrem N-terminal, ja que 15 dels 18 aa conservats entre les quatre proteïnes es localitzen en la regió que corresponen al domini AHD (Tinkelenberg et al., 2000). L'elevat grau d'identitat (66% d'identitat i 76% de similitud) entre les proteïnes AtArv1 i AtArv2 (**figura 47**) i el fet que AtArv1p complementa també el fenotip de termosensibilitat de la soca YJN1756, permeten assumir que la proteïna AtArv1 també és capaç de suprimir els defectes en el metabolisme lipídic de la soca YJN1756, i per tant, que la AtArv2p també és una ortòloga de la Arv1p de llevat. La presència de les proteïnes Arv en llevats, plantes i humans suggereix que participen en el metabolisme lipídic mitjançant algún mecanisme molecular conservat en tots els organismes eucariotes. Fins a l'actualitat les úniques proteïnes que s'ha descrit que estan implicades en el metabolisme lipídic en tots els organismes eucariotes són les "oxysterol binding proteins" (OSBP), proteïnes implicades en el tràfic lipídic intracel·lular i l'homeostasi dels esterols i esfingolípid en humans i llevat (Beh et al., 2004; Olkkonen et al., 2006; Raychaudhuri et al., 2006), que també es troben presents en les plantes (Li et al., 2007). D'acord amb la implicació tan de les OSBP com de la proteïna Arv en el metabolisme lipídic, s'ha vist que en llevat, els mutants dels gens *OSH*, que són els homòlegs dels gens *OSB* humans, presenten, al igual que el mutant *arv1Δ*, una alteració en la distribució subcel·lular d'esterols, defectes en l'endocitosis i la morfologia vacuolar (Beh et al., 2004).



## **2.2. El subdomini C-terminal del domini AHD de les proteïnes Arv és essencial per a la seva funcionalitat**

El domini AHD s'ha considerat desde la identificació de les proteïnes Arv com un domini important per a la funció de la proteïna ja que està conservat en totes les proteïnes Arv identificades (Tinkelenberg et al., 2000), però encara no se n'havia estudiat la funcionalitat. Aquest domini es pot dividir en dos subdominis de característiques diferents. El subdomini N-terminal conté quatre cisteïnes que podrien formar un possible motiu de dit de zinc (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C), que s'han descrit en factors de transcripció i altres proteïnes que s'uneixen a l'ADN o interaccionen amb altres proteïnes (Hahn et al., 2000; Laity et al., 2001; Maret, 2005). El fet que les proteïnes Arv puguin formar un únic dit de zinc suggereix que no es tracta de factors de transcripció, ja que aquests acostumen a contenir múltiples dits de zinc, mentre que les proteïnes amb dits de zinc citoplasmàtiques o de membrana en contenen normalment només un o dos (Mackay et al., 1998). És interessant destacar que estudis de complementació intragènica en llevat suggereixen que Arv1p actua com a multímer, i per tant, el possible dit de zinc de les proteïnes Arv podria participar en la unió entre els diferents monòmers. D'altra banda, el subdomini C-terminal de l'AHD, que presenta una identitat entre les diferents proteïnes Arv superior al del subdomini N-terminal, conté una seqüència altament hidrofòbica, predita com un possible domini de transmembrana, flanquejada per dues seqüències altament hidrofíliques (**figura 53**).

Per estudiar el paper del domini AHD en la funció de la proteïna, s'han generat mutants del domini AHD de la proteïna AtArv2 etiquetats amb un epitop d'hemaglutinina (HA) fusionat a l'extrem C-terminal per a poder detectar l'expressió de les proteïnes (**figura 54**). A continuació s'ha analitzat si l'expressió d'aquestes proteïnes mutants en la soca YJN1756 complementa el fenotip de termosensibilitat d'aquesta soca. En primer lloc, s'ha del·leccionat el subdomini N-terminal de l'AHD sencer (35 aa), obtenint-se la proteïna AtArv2pΔ35, i s'han mutageneïtzat les quatre cisteïnes que formarien el dit de zinc, obtenint-se la proteïna AtArv2pΔZn. El fet que la proteïna AtArv2pΔ35 restauri el creixement de la soca YJN1756 a 37°C (**figures 55 i 56**) demostra que el subdomini N-terminal de l'AHD no és necessari per a la funcionalitat de la AtArv2p. La menor capacitat de la proteïna AtArv2pΔZn per restaurar el creixement a 37°C de la soca mutant YJN1756 en comparació amb les proteïnes AtArv2 i AtArv2pΔ35 (**figures 55 i 56**), no contradiu aquesta conclusió ja que la reducció de la seva activitat correlaciona perfectament amb el seu menor nivell d'expressió respecte les proteïnes AtArv2 i AtArv2pΔ35 (**figura 57**). Per tant, l'aparent activitat reduïda de la proteïna

AtArv2p $\Delta$ Zn probablement és deguda a la seva baixa expressió. Tot i això, no es pot excloure que un plegament incorrecte del possible dit de zinc alteri la conformació de la proteïna, i, com a resultat, la seva activitat es vegi disminuïda. Recentment, s'ha descrit que la mutació del primer dels dos dits de zinc de les proteïnes d'unió al promotor SQUAMOSA (SBP's) d'*A. thaliana* altera l'estructura terciària de la proteïna impedit que es pugui unir a l'ADN mitjançant el segon dit de zinc (Yamasaki et al., 2006). Fins al moment, la funció biològica dels dos subdominis de l'AHD és encara desconeguda, encara que s'ha proposat que l'hipotètic dit de zinc podria estar involucrat en la multimerització de la proteïna o en la unió amb molècules lipídiques (Loland et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Hostager et al., 2000). El fet que aquest motiu de dit de zinc no sigui necessari per la funció de la proteïna, no exclou que pugui tenir un paper important en el mecanisme d'acció de les proteïnes Arv, per exemple, com a modulador de l'activitat de la proteïna. S'ha descrit que l'eliminació del domini d'unió a zinc N-terminal de les ATPases de *E.coli* ClpA, ClpB i ClpX suprimeix la modulació de la funció ATPasa requerida per a la seva activitat com a xaperones, que té lloc a través d'un canvi conformacional de la proteïna en que hi està involucrat el domini d'unió a zinc, però no la activitat xaperona en si (Wojtyra et al., 2003). També s'ha proposat que el domini d'unió a zinc situat a l'extrem C-terminal de la fosfatasa YVH1 de *Plasmodium falciparum* està implicat en la regulació alostèrica de l'activitat fosfatasa i no en la reacció de transferència del grup fosfat, ja que la seva mutació redueix però no suprimeix l'activitat enzimàtica, mentre que la mutació del centre catalític comporta una pèrdua total d'activitat fosfatasa (Kumar et al., 2004).

També s'ha demostrat que el subdomini C-terminal de l'AHD és essencial per a la funció de les proteïnes Arv, ja que qualsevol alteració del domini AHD més enllà de l'aminoàcid 36 en la proteïna AtArv2 dona lloc a proteïnes que no són capaces de complementar la soca YJN1756 (**figures 55 i 56**). Al analitzar aquest subdomini s'observa una regió altament hidrofòbica central de 10 aminoàcids (aa 47 a 56) flanquejada pel costat N per una seqüència d'11 aminoàcids rica en càrregues negatives (aa 36 a 46) i a C-terminal per una seqüència de 12 aminoàcids rics en càrregues positives (aa 57 a 68) (**figura 54**). Al del·leccionar els 56 (AtArvp $\Delta$ 56) i 68 (AtArvp $\Delta$ 68) primers aa i els aa 47 a 56 (AtArvp $\Delta$ 47-56) de l'AtArv2p les proteïnes resultants són inactives, ja que tot i que les proteïnes s'expressen en nivells similars als de la AtArv2p (**figura 57**) no són capaces de complementar la soca YJN1756. En canvi, al del·leccionar els 46 primers aa i els aa 36 a 46 de la proteïna AtArv2 les proteïnes generades (AtArvp $\Delta$ 46 i AtArvp $\Delta$ 36-46) no complementen la soca YJN1756 degut a que les dues proteïnes no s'expressen (**figura 57**). El fet que en absència dels aa 36 a 46 la proteïna AtArv2 no es detecti per Western blot suggereix que aquests aminoàcids són importants per a l'estructura de la proteïna. Al analitzar aquests 11 aminoàcids de la proteïna AtArv2, s'observa que és una seqüència altament hidrofílica rica en aminoàcids carregats (6) amb 1 aminoàcid

bàsic i 5 d'àcids, incloent-hi 4 residus d'àcid glutàmic. Aquesta regió rica en aa àcids es troba en totes les proteïnes Arv identificades fins a la actualitat, i alguns aa (D40, Y42 i E44) estan conservats en totes les Arvp caracteritzades fins al moment, suggerint que alguns d'aquests aminoàcids podrien ser necessaris per al manteniment de la estructura terciària de les proteïnes Arv. S'ha descrit que mutacions en aminoàcids negatius influencien el plegament correcte de la nucleasa estafilococa i les interaccions dels aminoàcids E75 i E129 amb aminoàcids específics carregats positivament són crítics per l'estabilitat local de la estructura proteica i, com a conseqüència, en el manteniment de l'estructura tridimensional i l'estabilitat de la proteïna (Chen et al., 2005). Així, en la proteïna AtArv2, la pèrdua dels aminoàcids àcids (aa del 36 al 46) desestabilitzaria l'estructura terciària del subdomini C-terminal de l'AHD. En canvi, la delecció dels aminoàcids hidrofòbics (aa del 47 al 56) donaria lloc a un subdomini C-terminal de l'AHD estable.

### **3. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LES PROTEÏNES AtARV1 I 2**

La observació en el microscopi confocal de cèl·lules epidèrmiques de ceba que expressen les proteïnes GFP-AtArv1 i GFP-AtArv2, mostra un patró reticulat que és idèntic al patró que mostra la proteïna marcadora de RE T3RE-DsRed (**figura 58**). Aquest resultat mostra semi *in vivo* que les proteïnes AtArv1 i AtArv2 es localitzen de forma exclusiva al RE en cèl·lules epidèrmiques de ceba. En vista de que el domini AHD és essencial per a la funcionalitat de la proteïna i que en tots els estudis de localització subcel·lular de les proteïnes Arv, aquestes s'havien fusionat a la GFP per l'extrem N-terminal (on es troba l'AHD), hem decidit fusionar la AtArv2p a la GFP per l'extrem C-terminal i expressar la proteïna resultant (AtArv2p-GFP) en cèl·lules epidèrmiques de ceba per comprovar si la posició de la GFP en la proteïna de fusió afecta la localització de la proteïna. La observació en el microscopi confocal de la fluorescència generada per la proteïna AtArv2p-GFP demostra que aquesta proteïna es localitza també al RE, i per tant que la posició relativa de l'AHD respecte la GFP en la proteïna de fusió no altera la localització subcel·lular de la proteïna. Prèviament s'havia descrit la localització subcel·lular exclusiva en RE de la proteïna Arv1 humana (Liu, 2004). Per tant, tot i la poca conservació de l'estructura primària de les proteïnes Arv d'humans i *A. thaliana*, aquestes conserven la funció i la capacitat de localitzar-se al RE. En llevat, a part del RE la proteïna Arv es localitza també a l'aparell de Golgi. Aquesta diferent localització cel·lular és dependent de la fase de creixement del llevat, suggerint una possible regulació de la seva

localització subcel.lular dependent del cicle cel.lular (Swain et al., 2002). Per tant, tot i que de moment en humans i *A. thaliana* només s'ha detectat la proteïna al RE no es pot descartar que en algun teixit i/o estadi de desenvolupament les proteïnes Arv es puguin localitzar a l'aparell de Golgi. En cas que en humans i *A. thaliana* les proteïnes Arv es localitzin exclusivament al RE, la diferència amb la proteïna de llevat es podria explicar per la presència d'algún domini no identificat en les proteïnes Arv d'eucariotes superiors que dirigeixi la proteïna exclusivament al RE. Exceptuant el domini AHD la homologia entre la proteïna Arv1 de llevat i les proteïnes d'humans i *A. thaliana* és pràcticament nul.la. En canvi, al comparar la proteïna humana i la d' *A. thaliana* s'observa que tot i que el grau d'homologia és baix, sí que hi ha alguns aminoàcids fora del domini AHD que estan conservats entre elles (i també amb altres possibles proteïnes Arv d'altres organismes eucariotes identificades en bases de dades), incloent-hi els motius (I/L)SSYxK(I/L)xL i (V/L)LTSNxxA(L/I)(K/R)V.

D'acord amb la predicció de la topologia de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* mitjançant el programa TOPPRED, aquestes presenten 6 possibles dominis de transmembrana amb l'extrem N-terminal orientat a la llum del RE i el C-terminal citoplasmàtic, i es poden classificar com a proteïnes amb múltiples segments de transmembrana de tipus III. S'assumeix generalment que és la primera seqüència hidrofòbica de la proteïna, que en el cas de les proteïnes Arv es localitzaria en el subdomini C-terminal de l'AHD, la que localitza la proteïna al RE (revisat a Goder i Spiess., 2001; Higy et al., 2004). Tot i això, la localització de les proteïnes de membrana no només depèn del primer domini de transmembrana, sinó que també depèn d'altres seqüències situades més cap a C-terminal. En tot cas, les proteïnes Arv no presenten cap motiu prèviament descrit de localització en reticle, com per exemple el motiu carboxiterminal KDEL i els motius bàsics RRXX o KKXX de les proteïnes de membrana tipus I (Ellgaard i Helenius, 2003) o els motius bàsics RXR, KR, RRKK i RR de diferents proteïnes de membrana polipèptiques (tipus III) (Zerangue et al., 1999; O'Kelly et al., 2000; Chan et al., 2001).

En qualsevol cas, la localització de la proteïna AtArv2 al RE no depèn de l'hipotètic primer segment de transmembrana, ja que la proteïna GFP-AtArv2pΔ68, que correspon a la fusió de la proteïna AtArv2 a la que s'han deletat el domini AHD sencer (68 aa) amb la GFP (**figura 58**), continua localitzant-se al RE, mentre que en el cas de la proteïna GFP-AtArv2pAHD, que correspon a la fusió del domini AHD amb la GFP, s'observa fluorescència verda en tota la cèl.lula (**figura 58**). El fet que la proteïna AtArv2pΔ68 no complementi la soca mutant YJN1756 però es localitzi al RE com la proteïna AtArv2, suggereix que el domini AHD tindria un paper més funcional que estructural. Així, quan s'analitza la topologia de les proteïnes Arv amb el programa TOPPRED, de les 6 seqüències de transmembrana que prediu, el menor grau de seguretat en aquesta predicció es dona en el primer

fragment de transmembrana, que es localitza en el subdomini C-terminal de l'AHD. Altres programes de predicció de la topologia de proteïnes, com el TMHMM, no prediuen que la seqüència hidrofòbica del subdomini C-terminal sigui un fragment de transmembrana. Per tant, les proteïnes Arv es localitzen en el RE gràcies a algun motiu de localització al RE no descrit prèviament o gràcies a les característiques de longitud i hidrofobicitat d'algun dels segments de transmembrana. Així, s'ha descrit que existeixen motius hidrofòbics de localització al RE, com el motiu CVLF del canal de potassi SV1 (Zarei et al., 2004) i que el motiu de localització al RE de la riboforina II es troba en el domini de transmembrana (Fu et al., 2000). També s'ha vist que la longitud i el perfil d'hidrofobicitat dels segments de transmembrana d'una proteïna pot determinar la seva localització al RE, com és el cas de les isoformes del citocrom b5 d'*Aleurites fordii* (Hwang et al., 2004). L'estudi de la localització subcel·lular de les proteïnes Arv mitjançant la fusió amb la GFP i observació de la fluorescència de les proteïnes en cèl·lules epidèrmiques de ceba no permet excloure, per les diferents proteïnes mutants de la AtArv2p, alteracions més subtils en la localització de la proteïna dins del RE que es tradueixin en una alteració de l'activitat de la proteïna, com per exemple, canvis en la topologia dels dominis de transmembrana o que la proteïna es localitzi en subdominis del RE diferents. Així per exemple, mutacions en aminoàcids carregats de les seqüències pont entre els 12 diferents fragments de transmembrana del transportador de glucosa humà Glut1 alteren la topologia dels fragments de transmembrana més pròxims, però no la dels fragments més allunyats ni tampoc la localització de la proteïna al RE (Sato et al., 1998 i 1999).

#### **4. ELS GENS *AtARV1* I *AtARV2* PRESENTEN PATRONS D'EXPRESSIONO ALTAMENT SOLAPANTS**

El coneixement del patró d'expressió d'un gen pot permetre obtenir informació sobre la seva possible funció. Actualment, es disposa d'informació molt limitada respecte al patró d'expressió dels gens *ARV* dels organismes eucariotes. En humans, el gen *ARV1* s'expressa de forma ubiqüa, sent el fetge i el pàncrees els òrgans on els nivells d'ARNm són més elevats (Liu, 2004) i en la base de dades de microarrays *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004), s'observa que en *M.musculus* el gen *ARV1* també s'expressa en tots els teixits, tot i que els nivells més alts d'expressió es donen en leucòcits (limfòcits i cèl·lules T limfoblàstiques) i espermatòcits.

Mitjançant experiments de Northern blot s'ha comprovat que els ARNm dels gens *AtARV1* i *AtARV2* es detecten majoritàriament en cèl·lules en cultiu de la línia T87 d'*A. thaliana*,

i en menor quantitat en plàntules de 10 dies, mentre que en la resta d'òrgans analitzats es detecta una expressió molt feble (**figura 42**). Tot i les limitacions derivades del baix nivell d'expressió dels dos gens, l'anàlisi per Northern blot mostra que els ARNm dels gens *AtARV1* i *AtARV2* s'expressen en tots els teixits analitzats. L'expressió dels dos gens en els diferents teixits d'*A. thaliana* es va confirmar amb la detecció semiquantitativa dels ARNm mitjançant RT-PCR (**figura 44**). El baix nivell d'expressió dels gens *AtARV* pot ser degut a que s'expressin de forma generalitzada però a un nivell molt baix, o bé que l'expressió sigui en realitat més intensa però estigui restringida a estadis de desenvolupament, teixits o tipus cel.lulars determinats.

Per analitzar més detalladament el patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, es va procedir a l'obtenció i caracterització de plantes transgèniques d'*A. thaliana* portadores dels gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS* (**figura 45**). L'anàlisi de l'expressió del gen *GUS* en aquestes plantes mostra (**figura 46**), en primer lloc, que el patró d'expressió d'ambdós gens és realment molt especialitzat i està restringit a teixits en que es requereix un metabolisme lipídic actiu, com poden ser cèl.lules en divisió i/o elongació (meristems radiculars primaris i secundaris, i la regió del meristem vegetatiu), els grans de pol.len i les llavors. Els patrons d'expressió són concordants amb el fet que és en cèl.lules en cultiu on es detecten els nivells més elevats d'ARNm dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, ja que les cèl.lules del cultiu s'estan dividint de forma activa, i per tant, tenen també un metabolisme lipídic actiu. Aquests anàlisis també revelen que els promotors dels dos gens dirigeixen uns patrons d'expressió altament solapants, com ja suggerien els experiments de RT-PCR i Northern blot, tot i que no absolutament idèntics. L'anàlisi del patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* suggereix que ambdues proteïnes podrien tenir unes funcions redundants, tot i que no es pot descartar que en determinats teixits, com en les cèl.lules del meristem apical vegetatiu i en les fulles en desenvolupament, pogui donar-se una certa especialització funcional.

La poca informació addicional disponible de l'expressió dels gens *ARV* es troba en bases de dades de microarrays com Genevestigator. En *A. thaliana* s'observa que el gen *AtARV2* (Atg01510), l'únic dels dos gens *ARV* d'*A. thaliana* inclòs en els microxips d'Affimetrix, s'expressa en tots els teixits, tot i que els nivells més alts d'expressió es donen en experiments amb ARN obtingut de cultius cel.lulars, especialment en aquells experiments relacionats amb el cicle cel.lular, per exemple experiments de sincronització cel.lular amb aphidicolina i privació de sacarosa. Globalment, aquestes observacions estan d'acord amb els resultats obtinguts en l'anàlisi del patró d'expressió dels dos gens *ARV*.

El patró d'expressió altament especialitzat dels dos gens en teixits on hi ha una divisió cel.lular activa, com és el cas dels meristems radiculars i vegetatiu (**figura 46**), suggereix que la funció de les proteïnes AtArv pot estar relacionada amb la correcta divisió i expansió cel.lular. Aquest fet és coherent amb la funció proposada de les proteïnes Arv com a proteïnes implicades en el manteniment de l'homeostasis lipídica cel.lular, ja que en aquests teixits els nivells dels diferents lípids han d'estar estrictament regulats per garantir un correcte desenvolupament. Les cèl.lules que s'estan dividint i expandint requereixen un aport constant i un transport intracel.lular actiu d'esterols i altres espècies lipídiques per permetre la correcta biogènesi de membranes i de la paret cel.lular, així com l'establiment i el manteniment d'una adequada polaritat cel.lular (revisat a Clouse et al., 2002; Lindsey et al., 2003; Fischer et al., 2004). En relació amb l'expressió dels gens *ARV* en cèl.lules en divisió, cal esmentar que la seqüència codificant de la proteïna Arv humana també ha estat anotada en la base de dades Genebank com una seqüència que codifica per una proteïna implicada en la transició entre les fases G1/S i G2/M (Nº d'accés AF321442). Aquest possible paper de les proteïnes Arv en el cicle cel.lular podria ser coherent amb la seva funció en l'homeostasis lipídica intracel.lular, i en particular en la dels esterols. En humans la falta de colesterol atura el cicle cel.lular en la fase G2 (Martínez-Botas et al., 1999) i en animals el colesterol és necessari per al funcionament de la via de transducció de senyals Hedgehog (Hh) que regula el creixement cel.lular i la proliferació promovent la transcripció de les ciclines D i E (Incardona i Eaton, 2000; Duman-Scheel et al., 2002). En plantes, el tractament amb esqualestatina, inhibidor de la SQS, de cèl.lules de tabac TBV-2 sincronitzades provoca una aturada del cicle cel.lular en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> sense induir citotoxicitat ni mort cel.lular (Hemmerlin et al., 2000), i més recentment s'ha descrit que saponines esteroidals inhibeixen el cicle cel.lular en la fase G2/M (Ohtsuki et al., 2006).

Un altre teixit on s'expressen activament els gens *AtARV* són els grans de pol.len (**figura 46**), el quals requereixen una regulació estricta dels nivells lipídics, que varien al llarg del seu desenvolupament (Hsieh et al., 2005) i dels quals en depèn la viabilitat (Van Bilsen et al., 1994) i el reconeixement pol.len-estigma (Hülkamp et al., 1995). Els tres components lipídics principals dels grans de pol.len en una crucífera com *Brassica napus* són fosfolípids (27%), que són essencials en les primeres etapes de la formació del tub pol.línic, triacilglicerols (22%), que són la font d'energia durant la germinació del gra de pol.len i primeres etapes del creixement del tub pol.línic, i esters d'esterols (21%), que formen la coberta del gra de pol.len (Pifanelli et al., 1997; Hsieh et al., 2005). S'ha descrit que alteracions del seu contingut lipídic, com és el cas de la mutació en el gen *NEF1*, implicat en el metabolisme lipídic, provoquen l'abortament del gra de pol.len (Ariizumi et al., 2001). A més, s'ha observat que diferents lípids són importants per a la germinació del gra de pol.len i el creixement del tub pol.línic degut al

seu paper en l'establiment d'una correcta polaritat cel.lular (Fischer et al., 2004). Per exemple, la mutació dels gens *SETH1* i *SETH2*, implicats en la síntesis de glicosilfosfoinositol (GPI), provoca una alteració en la localització de proteïnes unides a GPIs, fet que podria ser el responsable de la inhibició del creixement del tub pol.línic d'aquests mutants (Lalanne et al., 2004).

També s'ha detectat expressió dels gens *ARV* d'*A. thaliana* en les llavors durant el seu desenvolupament i maduració, i inclús en les llavors madures (**figura 46**). Els nivells lipídics en les llavors han d'estar estrictament regulats per garantir el seu correcte desenvolupament. En el cas dels esterols, aquests són essencials pel desenvolupament embrionari degut al seu paper en la divisió i elongació cel.lulars i l'establiment d'una polaritat cel.lular adequada (revisat a Clouse et al., 2002; Lindsey et al., 2003; Schrick et al., 2004; Schaller., 2004). A més s'ha observat que enzims implicats en la via de síntesis d'esterols com l'HMGR, l'SMT1 i l'esterol-aciltransferasa (ACAT) es regulen de forma coordinada durant les diferents fases del desenvolupament de la llavor tan en *Brassica napus* com en *Nicotiana tabacum* (Harker et al., 2003). Recentment s'ha descrit que el contingut en esfingolípids disminueix al madurar la llavor, fet que probablement està relacionat amb els canvis en les propietats fisicoquímiques al llarg de la maduració i deshidratació de la llavor (Wang et al., 2006). També s'ha descrit que la mutació en el gen *AtLCBI*, que codifica per una subunitat de la serina-palmitoil transferasa, primer enzim de la via de síntesis d'esfingolípids, resulta en un abortament de les llavors (Chen et al., 2006).

La comparació del patró d'expressió dels gens *ARV* d'*A. thaliana* amb els de diferents gens de la via de síntesis d'esterols reforça la relació entre les proteïnes Arv i el metabolisme lipídic. Diferents gens de la via de síntesis d'esterols, tan en el segment pre-escualè [gens *HMGR2* (Enjuto et al., 1995), *MVK* (Lluch et al., 2000) i *FPS2* (Cunillera et al., 2000)] com en el post-escualè [gens *SMT1* (Diener et al., 2000), *HYD1* (Souter et al., 2004), *CYP51* (Kim et al., 2005), *FACKEL* (Jang et al., 2000) i *SMT2* i 3 (Carland et al., 2002)], s'expressen en teixits on també s'expressen els gens *ARV*, com són els grans de pol.len, òvuls fertilitzats, llavors i regions meristemàtiques. El grau més alt de coincidència en el patró d'expressió dels gens *ARV* i els gens implicats en la síntesi d'esterols, s'observa en el cas del gen *FACKEL*, que codifica per una C14-esterolreductasa. Aquest gen s'expressa de forma majoritària en anteres, òvuls fecundats, plàntules recent germinades, extrem de l'arrel, fulles emergents i teixit vascular. La única diferència significativa amb el gen *ARV2* és que l'expressió d'aquest en la zona del meristem apical està restringida a les cèl.lules meristemàtiques, mentre que *ARV1* i *FACKEL*



s'expressen en les fulles emergents. En *A.thaliana* no hi ha un conjunt d'anàlisis tan detallat sobre el perfil d'expressió dels gens implicats en la síntesis d'esfingolípid i no es poden establir tantes comparacions amb els gens *ARV*. Tot i això, el patró d'expressió dels gens *GL8A* i *GL8B*, que codifiquen per dues 3-cetoacilreductases implicades en la síntesis d'àcids grassos de cadena llarga necessaris per a la síntesis de la cutícula de cera i dels esfingolípid, mostra que també s'expressen en teixits amb un alt grau de divisió i/o elongació cel.lular (Dietrich et al., 2005). Recentment s'ha descrit el patró d'expressió del gen *AtLCBI*. Aquest gen s'expressa en tota la planta, però els nivells més alts d'expressió s'observen en les cèl.lules de guarda i teixits en que es requereix un metabolisme lipídic actiu com són els meristems radiculars primaris i secundaris, els grans de pol.len i les silíques (Chen et al., 2006)

## **5. CARACTERITZACIÓ DE MUTANTS D'INSERCIÓ DELS GENS** **AtARV1 I AtARV2**

Per començar a investigar la funció dels gens *AtARV* s'han identificat i caracteritzat els mutants insercionals SALK\_090151 de la col.lecció del Salk Institute (**figura 59**), que segons la seva base de dades té una inserció a +16pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV1*, i ET8675 de la col.lecció "Enhancer Trap" del Cold Spring Harbour (**figura 60**), que segons la seva base de dades té una inserció a -6 pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV2*. Un cop obtingudes plantes homozigòtiques per a cada una de les insercions s'han dut a terme anàlisis per RT-PCR semiquantitativa de l'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2*. Aquests experiments mostren per una banda que el mutant *arv1* és un mutant d'atenuació de l'expressió del gen, ja que tot i que la inserció anul.la l'expressió de l'ARNm sencer del gen *AtARV1* (**figura 61**), si que s'expressa, tot i que molts menys que en les plantes control, un ARNm de menor mida que començaria a 3' de la inserció (**figura 62**). D'altra banda, els anàlisis per RT-PCR mostren que el mutant *arv2* és un mutant de pèrdua total de l'expressió gènica, ja que la inserció anul.la completament l'expressió del gen *AtARV2* (**figura 63**).

L'anàlisi del desenvolupament dels mutants *arv1* i *arv2* al llarg del seu cicle vital tan a dia curt com dia llarg no ha mostrat cap alteració fenotípica, tot i que no es pot descartar la presència de lleugeres alteracions lipídiques que no siguin prou dràstiques per provocar un fenotip visible. L'absència d'un fenotip visible en el mutant *arv1* es podria explicar per la presència d'un ARNm del gen *AtARV1* (**figura 62**), que tot i expressar-se amb menys intensitat i ser més curt que l'ARNm del gen salvatge, podria codificar per una proteïna funcional. Aquest

ARNm conté un codó AUG, que correspon a la Met30 de la AtArv1p, que podria funcionar com a codó d'inici de la traducció d'una proteïna AtArv1 que en el seu extrem N-terminal tindria només els últims 5 aa del subdomini N-terminal del domini AHD i el subdomini C-terminal del domini AHD. El fet que la proteïna AtArv2pΔ35, en que s'ha deletat tot el subdomini N-terminal del domini AHD, complementi el fenotip de termosensibilitat de la soca YJN1756, deficient en activitat ARV, suggereix que la hipotètica proteïna Arv1 que es generaria en el mutant *arv1* seria funcional, fet que podria explicar l'absència de fenotip en el mutant. Una altra explicació de l'absència d'un fenotip visible tan en el mutant *arv1* com en el mutant *arv2* seria l'existència de redundància funcional entre els dos gens, ja que el patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* és altament solapant i les proteïnes AtArv1 i AtArv2 es localitzen al RE. En plantes hi ha exemples d'altres gens que mostren almenys una certa redundància funcional. Per exemple, els mutants del gens *GL8A* i *GL8B* de blat, implicats en la síntesis d'àcids grassos de cadena llarga (AGCL) necessaris per a la síntesis de la cera cuticular i esfingolípid, no presenten cap fenotip visible tot i tenir disminuït el nivell d'AGCL i ceramides, i a més el patró d'expressió dels dos gens són altament solapants (Dietrich et al., 2005). Uns altres gens funcionalment redundants són els gens *SMT2* i *SMT3*, implicats en la via de síntesis d'esterols d'*A.thaliana*. Els dos gens són altament homòlegs, les proteïnes actuen sobre el mateix substrat i la sobreexpressió del gen *SMT3* restaura pràcticament tots els fenotips del mutant *cvp*, que té un ADN-T insertat en el gen *SMT2* (Carland et al., 2002). Per tal d'obtenir plantes mutants pels gens *ARV* que permetin aprofundir en el coneixement de la funció de les proteïnes Arv en el metabolisme lipídic, probablement sigui necessari la generació del doble mutant.

## **6. EFECTES DE LA INHIBICIÓ DE LA SÍNTESIS D'ESFINGOLÍPIDS EN LA VÍA DE SÍNTESIS D'ESTEROLS EN *A. THALIANA***

En els últims anys una sèrie d'experiments han posat de manifest l'existència d'una regulació coordinada entre el metabolisme d'esterols i esfingolípid en llevats i humans (revisat a Veen et al., 2004; Ridgway, 2000). Per exemple, la disminució de la síntesis d'esterols en llevat, degut a l'inhibidor de la HMGR lovastatina o la mutació del gen *ERG26*, provoca una disminució en la síntesis d'esfingolípid (Storey et al., 1998; Swain et al., 2002). També s'ha descrit que el mutant *erg6*, que és viable i utilitza el zimosterol, en lloc de l'ergosterol, com a esterol majoritari en les membranes, esdevé inviable quan es suprimeix el gen *ELO3*, que

codifica per una elongasa d'àcids grassos implicada en la síntesis dels àcids grassos de cadena molt llarga, i per tant no es poden sintetitzar esfingolípid (Eisenkolb et al., 2002).

En plantes aquesta regulació coordinada entre el metabolisme de diferents espècies lipídiques a penes s'ha estudiat, i només s'ha descrit que la inhibició de la via de síntesis d'esterols en porro amb fenpropimorf, un inhibidor de la cicloeucalenol-obtusifoliol isomerasa, dona lloc a una disminució dels nivells d'alguns fosfolípids (fosfatidilserina), esfingolípid (glucosilceramides) i a un increment en el nivell de TAG's (Hartmann et al., 2002). Aquesta observació, i el fet d'estar treballant amb les proteïnes Arv, potencialment implicades en el manteniment de la homeostasi lipídica, ens ha dut a estudiar si la inhibició de la via de síntesi d'esfingolípid podria afectar la síntesi d'esterols en *A. thaliana*. Per una banda hem inhibit amb miriocina la serina-palmitoil transferasa (SPT), que és el primer enzim de la via de síntesi d'esfingolípid (**figura 15**). La SPT catalitza la formació de Bases Esfingoides Lliures (BEL) a partir de palmitoil-CoA i serina i es considera el principal enzim regulador del flux de la via de síntesi d'esfingolípid (Merril i Jones, 1990). D'altra banda hem inhibit amb fumonisina  $\beta$ 1 la ceramida sintasa (CS), enzim que catalitza la condensació de les BEL amb àcids grassos de cadena llarga per donar lloc a les ceramides i que es troba dues etapes més endavant en la via de síntesi d'esfingolípid (**figura 15**). Tot i ser inhibidors de la mateixa ruta biosintètica, s'ha vist que en plantes aquests dos inhibidors tenen efectes oposats. La fumonisina  $\beta$ 1 provoca una disminució en els nivells de ceramides i una acumulació de bases esfingoides lliures (BEL) (Abbas et al., 1994; Soriano et al., 2005), que en tabac provoca l'aparició de símptomes de mort cel·lular programada (MCP) similars als provocats per infeccions fúngiques (Stone et al., 2000). En canvi, la miriocina inhibeix la síntesi de tots els esfingolípid i evita l'aparició dels símptomes de MCP en fulles de tomàquet tractades amb la toxina AAL, compost anàleg a la fumonisina  $\beta$ 1 (Spassieva et al., 2002).

Per analitzar els efectes de la miriocina i la fumonisina  $\beta$ 1 sobre la síntesi d'esterols en *A. thaliana* es plantes s'han crescut a sobre de discs de nylon en medi MS i posteriorment s'han traspasat els discs de nylon amb les plàntules a plaques de petri amb medi MS suplementat amb els inhibidors, ja que la toxicitat dels inhibidors dificulta la obtenció de suficient material vegetal per dur a terme els experiments si les llavors es sembren directament en medi de creixement en presència de l'inhibidor. Com que la HMGR es considera el principal regulador del flux de la via de síntesi d'esterols, hem iniciat l'estudi dels efectes de la inhibició de la síntesi d'esfingolípid sobre la síntesi d'esterols analitzant els efectes del tractament amb miriocina i la fumonisina  $\beta$ 1 sobre l'activitat HMGR. Pel que fa a les plantes crescudes en presència de miriocina, s'observa una disminució de l'activitat HMGR dosi dependent que és màxima, de fins a 2,5 vegades, a 0,5  $\mu$ M (**figura 65**). Aquesta disminució concorda perfectament amb la

disminució d'un 18% en els nivells totals d'esterols en les plantes crescudes en 0,5  $\mu\text{M}$  de miriocina respecte les plantes crescudes sense inhibidor (**figura 69**). Al augmentar la concentració de l'inhibidor (1 i 2,5  $\mu\text{M}$ ) es recupera l'activitat de l'enzim, de forma dosi dependent, fins a la concentració de 2,5  $\mu\text{M}$ , on s'obtenen nivells d'activitat similars als de plantes crescudes sense l'inhibidor. En canvi, en les plantes crescudes amb la dosi màxima de miriocina assajada (10  $\mu\text{M}$ ) els valors d'activitat tornen a disminuir fins a valors similars als obtinguts a 1  $\mu\text{M}$ . L'increment d'activitat HMGR observat a 1 i 2,5  $\mu\text{M}$  respecte l'activitat HMGR de les plantes crescudes en presència de 0,5  $\mu\text{M}$  de miriocina es podria explicar pel fet que és important mantenir uns nivells adequats de l'HMGR per tal de poder satisfer els requeriments d'esterols i tots els altres isoprenoides derivats del MVA (revisat a Goldstein i Brown, 1990). Així, la disminució de l'activitat HMGR provocada per la miriocina donaria lloc a una disminució dels nivells d'esterols i d'altres isoprenoides derivats del MVA, la qual, a dosis superiors a 0,5  $\mu\text{M}$  provocaria que els nivells dels esterols o algun altre isoprenoide derivat del MVA estiguessin per sota dels que necessita la planta. Aquest fet induïria l'activació d'algun mecanisme per incrementar l'activitat HMGR i conseqüentment els nivells de tots els isoprenoides derivats del MVA. A 2,5  $\mu\text{M}$ , aquesta activació de la HMGR seria prou important com per incrementar l'activitat fins a nivells similars als de les plantes control. En aquest sentit, s'ha observat que la inhibició de la escualè sintasa en cèl.lules BY-2 de tabac, dona lloc a una disminució de la síntesi d'esterols i a un increment important de l'activitat de la HMGR (Hartmann et al., 2000). També s'ha vist que una disminució d'isoprenoides no esteroïdals dona lloc a un increment dels nivells de proteïna HMGR en les cèl.lules epitelials de l'ull (Cenedella, 1997) i la inhibició de la HMGR de mamífers amb estatines provoca una retroalimentació positiva de la HMGR (Rudling et al., 2006; Matsuyama et al., 2006). El fet que a 10  $\mu\text{M}$  de miriocina l'activitat HMGR torni a disminuir i sigui similar a la observada a 1  $\mu\text{M}$ , es podria explicar perquè la inhibició de la HMGR induïda per la miriocina a 10  $\mu\text{M}$  seria prou forta com perquè aquest possible mecanisme compensatori que activa la HMGR no pogui, com si succeeix a 2,5  $\mu\text{M}$ , incrementar l'activitat HMGR fins a nivells similars als de les plantes control. Pel que fa en les plantes tractades amb fumonisina  $\beta_1$ , no només no disminueix l'activitat HMGR sinó que en les concentracions més altes s'observa un increment de l'activitat HMGR de fins a dues vegades (**figura 67**). Aquest increment, però, no es tradueix en un increment dels nivells d'esterols probablement degut a l'existència d'altres punts de control de la síntesi d'esterols, o a que l'augment de MVA que es produeix a l'augmentar l'activitat de la HMGR s'utilitzi per a sintetitzar algun compost isoprenoide no esteroïdal.

L'existència d'efectes oposats sobre l'activitat HMGR de la miriocina (**figura 65**), compost que inhibeix la síntesi de tots els esfingolípid (BEL, ceramides i esfingolípid

complexes), i de la fumonisina  $\beta 1$  (**figura 67**), compost que inhibeix la síntesi de ceramides i esfingolípids complexes però incrementa el nivell de BEL (Abbas et al., 1994; Soriano et al., 2005), suggereix que la inhibició de la síntesi d'esfingolípids alteraria l'activitat HMGR a través d'algún mecanisme indirecte en que hi participarien les BEL. Així, una disminució en el nivell de BEL o BEL-P provocaria una disminució de l'activitat HMGR i viceversa. En humans, la BEL més abundant és la esfingosina (SPH), mentre que en llevat i plantes són la dihidroesfingosina o esfinganina (DHS) i la fitoesfingosina (PHS) (Dickson et al., 2002; Sperling et al., 2003). Les investigacions realitzades en els últims anys sobre els esfingolípids en humans han dut a proposar la teoria del reòstat esfingolípíd segons la qual el balanç entre el contingut intracel.lular de ceramides i esfingosina per una banda, i la esfingosina-1-P per l'altra determina la resposta cel.lular en processos d'apoptosis, angiogènesis, etc. (Spiegel et al., 2003; Saba et al., 2004). Com que segons la teoria del reòstat esfingolípíd les ceramides i les BEL tenen funcions biològiques similars, és possible que siguin els nivells de BEL-P els implicats en la regulació de l'activitat HMGR en resposta a la inhibició de la síntesi d'esfingolípids. En plantes s'ha vist que tan la SPH-1P com la PHS-1P, però no la DHS-1P, regulen l'obertura dels estomes mobilitzant el calci intracel.lular de les cèl.lules de guarda a través de la proteïna G heterotrimèrica GPA1 (Ng et al., 2003; Coursol et al., 2003 i 2005). Recentment s'ha descrit que la DHS-1P inhibeix l'alliberament de calci intracel.lular que provoca la SPH-1P (Berdyshev et al., 2006). També s'ha vist que les BEL's poden regular processos biològics, com per exemple la regulació de l'endocitosis en llevat, controlant la fosforilació de proteïnes (Friant et al., 2000). Els efectes biològics de les BEL-P poden ser mediats a través de la seva acció com a lligands intracel.lulars de receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) (Sanchez i Hla, 2004) o com a segons missatgers a través de dianes intracel.lulars (Pyne i Pyne, 2000; Dickson et al., 2002; Spiegel et al., 2003; Chalfant et al., 2005; Gonzalez et al., 2006). Fins fa poc, es creia que en plantes les BEL-P actuaven només com a missatgers secundaris ja que no s'havia identificat cap GPCR homòleg als GPCR 's activats per BEL-1P d'humans i llevat, però recentment s'ha descrit que un possible GPCR d'*A. thaliana* interacciona amb la GPA1 i controla negativament la regulació de l'obertura dels estomes (Pandey et al., 2004).

Al analitzar mitjançant Western blot mostres de les plantes tractades amb miriocina i fumonisina  $\beta 1$  (**figura 68**) no s'observa una correlació entre les variacions en els nivells d'activitat HMGR i els nivells de proteïna HMGR1S i 1L. Aquests resultats suggereixen que la regulació de la HMGR per esfingolípids es dona a nivell post-traducciona. En aquest sentit, és interessant assenyalar que s'ha proposat que la proteïna Arv1 humana, implicada el metabolisme d'esterols, esfingolípids i triglicèrids, regula el metabolisme del colesterol post-transcripcionalment (Liu, 2004). A més, l'anàlisi de l'activitat HMGR en plantes transgèniques

que sobreexpressen la isoforma HMGR1S (Manzano et al., 2004) en presència de 0,5  $\mu$ M de miriocina, que és la concentració a la qual es produeix una major inhibició de l'activitat HMGR, mostra que en les plantes que sobreexpressen la HMGR1S es produeix una disminució d'activitat HMGR del mateix ordre que en les plantes control (**figura 70**). Aquest resultat reforça la idea d'una regulació post-traducciona de la HMGR per esfingolípids, ja que en les plantes transgèniques que sobreexpressen la HMGR1S, l'ADNc que codifica la isoforma 1S de la HMGR està sota el control d'un promotor constitutiu, de manera que no està sota el control dels mecanismes transcripcionals que controlen l'expressió del gen HMGR1 en *A. thaliana*. El fet que l'efecte sobre l'activitat HMGR de la miriocina i la fumonisina  $\beta$ 1 sigui oposat, suggereix que aquest efecte no es deu a un canvi en la fluïdesa de la membrana deguda a una disminució en els nivells dels esfingolípids complexos, sinó que es deuria a algún altre mecanisme post-traducciona que afectaria l'activitat HMGR. S'ha descrit que la HMGR es regula post-traducciona per fosforilació/defosforilació en residus de serina. Per una banda l'HMGR és fosforilada en un residu de serina del domini catalític per serina/treonina quinases (SNF1 de llevat i quinases activades per AMP (AMPK) en mamífers), i això inactiva l'enzim (Stermer et al., 1994). Tot i que no s'ha comprovat *in vivo* que l'HMGR s'inactivi per quinases de la família de SNRK1, s'han purificat fraccions proteiques que fosforilen i inactiven la HMGR en plantes (Dale et al., 1995; Douglas et al., 1997; Halford et al., 1998; Sugden et al., 1999), observació que suggereix que l'HMGR de plantes és inactivada per una cascada de quinases conservada amb animals (Stermer et al., 1994). Aquestes quinases són regulades per fosforilació i la seva activitat s'inhibeix per fosfatases. També s'ha demostrat que l'HMGR es reactiva si es tracta amb la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) bovina (Dale et al., 1995). D'altra banda, evidències recents han permès construir un model de regulació de la HMGR en que la subunitat reguladora B" de la PP2A, en resposta a algún tipus de senyal en que el calci actuaria com a segon missatger, interacciona amb el domini N-terminal de la HMGR i apropa la subunitat catalítica de la PP2A a la HMGR que desfosforilaria un residu de la regió N-terminal, el qual està fosforilat quan l'enzim és actiu, i com a conseqüència s'inactivaria o disminuïra la seva activitat (Antolín, 2005). El fet que el calci participi en la modulació de l'activitat HMGR i que sigui un intermediari en la resposta a les BEL-P en cèl.lules vegetals, obre la possibilitat que les BEL-P participin en un possible mecanisme de regulació post-traducciona de la HMGR a través d'algún mecanisme en que hi podria participar el calci. Així, la inhibició de la via de síntesis d'esfingolípids amb miriocina o fumonisina  $\beta$ 1 alteraria els nivells intracel.lulars de BEL-P, que donarien lloc, ja sigui a través de GPCR o de dianes intracel.lulars, a canvis en els nivells de calci dins de la cèl.lula. A la seva vegada, aquests canvis activarien o inactivarien cascades de fosforilacions/defosforilacions que modificarien l'activitat HMGR.

En conclusió, aquests resultats mostren per primera vegada en plantes una disminució en el flux de la via del MVA, de la qual els esterols en són productes majoritaris, en resposta a una inhibició de la via de síntesis d'esfingolípid, i que en aquest procés hi està implicat algun mecanisme que regula l'activitat HMGR. Aquests resultats reforcen l'existència, també en plantes, d'una regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípid.