



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**ESTUDI DE L'ESPECIALITZACIÓ
FUNCIONAL DELS ISOENZIMS
CITOSÒLICS DE LA FARNESILDIFOSFAT
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana***

Marta Closa Calvo

2007



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de Doctorat de Biotecnologia
Bienni 2002-04

**ESTUDI DE L'ESPECIALITZACIÓ FUNCIONAL DELS
ISOENZIMS CITOSÒLICS DE LA FARNESILDIFOSFAT
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana***

Memòria presentada per Marta Closa Calvo per optar al títol de Doctor per la
Universitat de Barcelona.

Directors:

Autora:

Dr. Albert Ferrer Prats

Dra. Montserrat Arró Plans

Marta Closa Calvo

Marta Closa Calvo, 2007

Als meus pares
A la meva germana

**Nothing in life is to be feared.
It is to be understood.**

Marie Curie

**Perseverance performs
greater works than strength.**

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull mostrar el meu sincer agraïment al Dr. Albert Ferrer per oferir-me la possibilitat de realitzar la tesi en el seu grup de treball, i a la Dra. Montserrat Arró per la seva disponibilitat i ajuda en tot moment.

Vull donar les gràcies al Prof. Wilhelm Gruissem per permetrem fer dues estades al seu laboratori en el Swiss Federal Institute of Technology (ETH) de Zurich, i a la Dra. Eva Vranová per la seva acollida i la seva col·laboració en el projecte que s'està desenvolupant en comú. Així com agrair l'acollida rebuda per tota la gent que forma part dels diferents grups de l'Institute of Plant Sciences de l'ETH. Agrair també a l'Andrea Patrignani del Functional Genomics Centre de Zurich la seva disponibilitat i amabilitat. I a l'Anja Wille per la seva col·laboració en el desenvolupament estadístic.

Voldria agrair també al Dr. Paulino Gómez i a l'Eduardo López del Centre de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Madrid per aportar la seva experiència i per la seva col·laboració en l'elaboració de models moleculars.

M'agradaria donar les gràcies a la Carmen López, la Sonia i l'Elisenda del Servei de Microscopia electrònica i reconeixement molecular *in situ* del Parc científic de Barcelona per l'atenció rebuda en tot moment.

Vull agrair la disponibilitat de la Gemma Brufau i la Dra. Magda Rafecas del Dept. de Nutrició i Bromatologia de Farmàcia per la seva col·laboració en la determinació d'esterols en mostres vegetals.

Voldria fer extensiu el meu agraïment a la gent que ha format part durant tot aquest temps del grup de Bioquímica i Biologia Molecular de Químiques i del grup de Fisiologia Vegetal de Farmàcia, per tots els coneixements i les opinions compartides.

Vull anomenar també a tots els membres del Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular de Farmàcia i agrair-los la seva ajuda sempre que ha estat necessari al llarg de la tesi.

Gràcies a tots els companys/es de departament: Míriam, Mari, Diego, Laura N., Joana, Núria, Xisca, Cris M., Mar, Laia, Cris, Lucía, Fernando, Laura, David L., Evangelina, Sílvia C., Sílvia P., Alícia, Eli, Gisela, Núria, Basu, Sebas, Lilia, Irene, Toni, David, Laura, Assia, Chandru i Yolanda, per haver compartit tants dinars, passadissos, converses, algun que altre sopar i sobretot vivències.

Gràcies també a tots els companys/es amb els que vaig compartir les classes del curs de doctorat de biotecnologia: Montse, Patricia, Jordi, Joan Carles, Marta, Maria, Cristina, Núria, Valeria, ... Junts vam començar amb il·lusió l'aventura del doctorat. Gràcies David per la teva amistat.

I ara sí, la gent amb la que més hores he compartit aquests últims anys. Gràcies als meus companys de laboratori, als d'abans i als d'ara. A la Núria per acollir-me i ensenyar-me en les primeres digestions i PCRs dels meus primers dies al laboratori. Al David, pel seu esperit d'ajuda, d'amistat i de col·laboració. I als d'ara: Oriol, Toni, Benjamín, Albert P., Vero i Jaume. Per les sessions musicals, les discussions poc (o gens) científiques i els bons moments compartits dins i fora del laboratori. Per als que encara us queda un trosset de camí per recórrer: ànims i molta sort!

Gràcies a tots aquells que d'una manera o d'una altra m'heu ajudat en el meu aprenentatge, tant en la ciència com en la vida. I malgrat tot, als que en algun moment hi heu afegit dificultats: els moments difícils són probablement els que més m'han ensenyat.

D'una forma molt especial vull donar les gràcies a la meva família. Agrair als meus pares tot al que han fet i fan per mi, a tots els nivells. I a la meva germana, per ajudar-me a veure que sempre s'ha d'anar endavant. No hi ha paraules que puguin expressar la meva immensa gratitud.

Finalment, voldria expressar el meu agraïment a tota aquella gent de fora del laboratori que ha estat al meu costat i que m'ha donat suport en els moments més difícils, a totes les meves companyes, amics i amigues. Gràcies per la vostra amistat, gràcies per les vostres paraules i per tots els moments que hem compartit.

A tothom GRÀCIES!!!

ABREVIATURES

35S <i>CaMV</i>	promotor 35S del Virus del Mosaic de la Col-i-flor
aa	aminoàcids
AACT	enzim acetoacetyl-CoA tiolasa
ABA	àcid abscísic
AE	activitat específica
BL	brassinòlid
BrEt	bromur d'etidi
BRs	brassinosteroides
BSA	albúmina sèrica bovina
BY-2	cèl.lules <i>Brigth Yellow-2</i> de tabac
CDP-ME	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfat
CMK	enzim 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinasa
CMS	enzim 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
Col.	Columbia
<i>cpd</i>	mutant <i>constitutive photomorphogenesis and dwarfism</i>
cpm	comptes per minut
cRNA	RNA còpia
CTAB	bromur de cetriltrimetilamoni
<i>cvp</i>	mutant <i>cotyledon vascular pattern</i>
D.O.	densitat òptica
Da	Dalton
DEPC	dietilpirocarbonat
<i>det2</i>	mutant <i>de-etiolated 2</i>
DMAPP	dimetilal.lildifosfat
DNA	àcid desoxirribonucleic
DTT	ditiotreitol
<i>dwf</i>	mutant <i>dwarf</i>
DXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat
DXR	enzim 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat reductoisomerasa
DXS	enzim 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat sintasa
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
<i>era-1</i>	mutant <i>enhanced response to ABA-1</i>
<i>fk</i>	mutant <i>fackel</i>
FPP	farnesildifosfat
FPS	enzim farnesildifosfat sintasa
GGPP	enzim geranilgeranildifosfat
GPP	geranildifosfat
HDS	enzim 1-hidroxi-2-metil-2-(<i>E</i>)-butenil 4-difosfat sintasa
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(<i>E</i>)-butenil 4-difosfat
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzim A
HMGR	enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HMGS	enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
HPT	higromicina B fosfotransferasa
<i>hyd</i>	mutant <i>hydra</i>
IDI	enzim IPP isomerasa
IDS	enzim IPP/DMAPP sintasa

IPP	isopentenil difosfat
LD	<i>Long Day</i> , dia llarg, fotoperíode amb 16h de llum/8h de fosc
Ler	Landsberg erecta
MCS	enzim 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat sintasa
ME-cPP	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat
MES	àcid 2-(N-morfolino)etansulfònic
mst	mevastatina
MVA	mevalonat
MVD	enzim difosfomevalonat decarboxilasa
MVK	enzim mevalonat quinasa
NPT	neomicina fosfotransferasa
pb, kb	parells de bases, kilobases
PBS	tampó de fosfat sòdic
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PMK	enzim fosfomevalonat quinasa
PSA	persulfat amònic
q.s.p.	quantitat suficient per
RNA	àcid ribonucleic
RNA _m	RNA missatger
rpm	revolucions per minut
RT	transcripció reversa
SAPE	conjugat d'estreptavidina R-ficoeritrina
SD	<i>Short Day</i> , dia curt, fotoperíode amb 8h de llum/16h de fosc
SDS	dodecilsulfat amònic
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant
SMT	enzim esterol metiltransferasa
smt	mutant sterol methyltransferase
SQS	enzim esqualè sintasa
SSC	sal de citrat sòdica
T-DNA	DNA de transferència
TLC	cromatografia en capa fina
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometà-àcid clorhídric
UTR	regió transcrita no traduïda
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
x g	unitats de força centrífuga relativa

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	17
1. ELS ISOPRENOIDES: CLASSIFICACIÓ I FUNCIONS	19
2. BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES.....	21
2.1. VIES DE SÍNTESI DE L'IPP.....	21
2.1.1 <i>Via del mevalonat</i>	23
2.1.2 <i>Via del metileritritol fosfat</i>	23
2.2. SÍNTESI DE PRENILDIFOSFATS DE LONGITUD CREIXENT	24
2.2.1 <i>Preniltransferases</i>	26
2.2.2 <i>Reaccions de dimerització</i>	28
2.3. REACCIONS DE MODIFICACIÓ DELS ESQUELETS TERPÈNICS	28
2.4. BIOSÍNTESI D'ESTEROLS.....	29
2.5. MUTANTS DEFICIENTS EN LA SÍNTESI D'ESTEROLS I BRASSINOSTEROIDES	34
3. COMPARTIMENTACIÓ SUBCEL·LULAR EN LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES.....	37
4. REGULACIÓ DE LA VIA DEL MEVALONAT DE SÍNTESI D'ISOPRENOIDES	39
4.1. FAMÍLIES MULTIGÈNIQUES I CANALS METABÒLICS	39
4.2. REGULACIÓ DEL FLUX DE LA VIA DEL MEVALONAT	42
5. FARNESILDIFOSFAT SINTASES	46
5.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS I ESTRUCTURA	46
5.2. LES FPS EN PLANTES	48
5.2.1 <i>Localització subcel·lular de les FPS</i>	50
5.2.2 <i>Expressió espacial i temporal de les FPS</i>	51
5.2.3 <i>Paper de la FPS en la regulació de la síntesi d'isoprenoides</i>	54
OBJECTIUS	59
RESULTATS	63
1. GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LÍNIES MUTANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA AMB GUANY DE FUNCIO DE L'ISOENZIM FPS2 I ANÀLISI COMPARATIU AMB MUTANTS AMB GUANY DE FUNCIO DE L'ISOENZIM FPS1S	65
1.1. GENERACIÓ DE PLANTES D'ARABIDOPSIS THALIANA TRANSGÈNIQUES QUE SOBREEXPRESSEN CONSTITUTIVAMENT L'ISOENZIM FPS2	65
1.2. LA SOBREEXPRESSIÓ CONSTITUTIVA DE L'ISOENZIM FPS2 NO CAUSA ALTERACIONS EN EL FENOTIP DE LES PLANTES TRANSGÈNIQUES	67
1.3. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR MITJANÇANT IMMUNOCITOQUÍMICA I MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE L'ISOENZIM FPS2 SOBREEXPRESSAT A <i>A. THALIANA</i>	69
1.4. ANÀLISI DELS PRODUCTES DE LA REACCIÓ CATALITZADA PELS ISOENZIMS FPS1S I FPS2 SOBREEXPRESSATS A <i>A. THALIANA</i>	71

1.5. ESTUDI DEL COMPORTAMENT CINÈTIC DELS ISOENZIMS FPS1S I FPS2 SOBREEXPRESSATS EN <i>A. THALIANA</i>	73
1.6. LA SOBREEXPRESSIÓ DE L'ISOENZIM FPS2 NO ALTERA ELS VALORS D'ACTIVITAT HMGR NI EL CONTINGUT D'ESTEROLS EN PLANTES D' <i>A. THALIANA</i>	75
2. GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LÍNIES MUTANTS D'<i>A. THALIANA</i> QUE SOBREEXPRESSEN SIMULTÀNIAMENT ELS ISOENZIMS FPS1S I FPS2	78
3. SOBREEXPRESSIÓ DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES GENERADES PER INTERCANVI DE REGIONS ENTRE ELS ISOENZIMS FPS1S I FPS2	83
3.1. COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LA SOCA CC25 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> AMB LES PROTEÏNES FPS QUIMÈRIQUES D'ARABIDOPSIS	84
3.2. ANÀLISI DELS PRODUCTES DE REACCIÓ SINTETITZATS PER LES DIFERENTS QUIMERES FPS EXPRESSADES EN LLEVAT	86
3.3. GENERACIÓ I ANÀLISI DE PLANTES D'ARABIDOPSIS TRANSGÈNIQUES QUE SOBREEXPRESSEN CONSTITUTIVAMENT PROTEÏNES QUIMÈRIQUES ENTRE FPS1S I FPS2.....	87
4. MODELS ESTRUCTURALS DELS ISOENZIMS FPS1S I FPS2.....	91
5. IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MUTANTS D'<i>A. THALIANA</i> AMB PÈRDUA DE FUNCIÓ DELS GENS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>	97
5.1. COMPROVACIÓ PER RT-PCR QUE EN LES LÍNIES MUTANTS AMB PÈRDUA DE FUNCIÓ, EL T-DNA O L'ELEMENT DS BLOQUEJA L'EXPRESSIÓ DEL GEN EN EL QUAL S'HA INSERIT.....	99
5.2. DETERMINACIÓ DEL NIVELL D'ACTIVITAT FPS EN ELS MUTANTS <i>FPS</i>	100
5.3. ESTUDI DE LES CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES DELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>	101
5.4. CONTINGUT TOTAL I PERFIL D'ESTEROLS EN ELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i> D' <i>A. THALIANA</i>	105
5.5. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL DOBLE MUTANT <i>FPS1:FPS2</i>	107
5.5.1. <i>Estudi de la letalitat embrionària del doble mutant fps1:fps2</i>	109
5.6. EFECTE DE LA MEVASTATINA SOBRE ELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>	111
5.6.1. <i>Estudi de la sensibilitat a mevastatina en els mutants fps1 i fps2 d'a. thaliana en el moment de la germinació</i>	112
5.6.2. <i>Estudi de la permeabilitat de les llavors dels mutants fps1 i fps2</i>	114
5.7. ESTUDI DE L'ACTIVITAT HMGR EN ELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i> D' <i>A. THALIANA</i>	115
5.8. ESTUDI DE LA SENSIBILITAT A LA MEVASTATINA EN PLÀNTULES DELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i> D' <i>A. THALIANA</i>	117
5.9. ESTUDI DELS NIVELLS DE TRANSCRITS HMGR EN LLAVORS I PLÀNTULES DELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i> D' <i>A. THALIANA</i>	120
5.10. L'EPI-BRASSINÒLID NO REVERTEIX LA HIPERSENSIBILITAT A MEVASTATINA EN EL MUTANT <i>FPS2</i>	121
5.11. EL MUTANT <i>ERA1</i> D'ARABIDOPSIS NO MOSTRA HIPERSENSIBILITAT A MEVASTATINA	122
6. GENERACIÓ I ANÀLISI DE PLANTES TRANSGÈNIQUES PER COMPLEMENTAR ELS MUTANTS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>.....	125

7. ANÀLISI DELS PERFILS D'EXPRESSIONI GÈNICA EN MUTANTS D'A. THALIANA AMB PÈRDUA DE FUNCIO DELS GENS HMG I FPS.....	130
DISCUSSIÓ	133
1. ESTUDI DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS AMB GUANY DE FUNCIO DELS ISOENZIMS <i>FPS</i>	135
2. ESTUDI DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS AMB PÈRDUA DE FUNCIO DELS GENS <i>FPS</i>	147
2.1 <i>Efectes de la pèrdua de funcio dels gens FPS sobre l'activitat HMGR</i>	152
CONCLUSIONS.....	157
MATERIALS I MÈTODES	161
1. MATERIAL VEGETAL.....	163
1.1. GENOTIPAT DE LES LÍNIES AMB PÈRDUA DE FUNCIO DELS GENS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>	164
2. CONDICIONS DE CULTIU DE PLANTES D'ARABIDOPSIS THALIANA.....	165
2.1. CULTIUS ESTÈRILS	165
2.1.1. <i>Esterilització de llavors</i>	165
2.1.2 <i>Sembra de les llavors</i>	165
2.2. CONDICIONS DE CREIXEMENT	166
2.3. CULTIUS EN TESTOS	166
3. MATERIAL BACTERIOLÒGIC.....	167
3.1. SOQUES BACTERIANES	167
3.2. VECTORS PLASMÍDICS	167
3.2.1. <i>Vectors per a la preparació de construccions</i>	167
3.2.2. <i>Vectors per a l'expressió estable de proteïnes en planta</i>	168
3.4. MEDIS DE CULTIU.....	168
3.5. PREPARACIÓ D'ADN PLASMÍDIC.....	168
4. GENERACIÓ DE PLANTES TRANSGÈNIQUES D'ARABIDOPSIS THALIANA	169
4.1. CONSTRUCCIONS UTILITZADES PER GENERAR PLANTES TRANSGÈNIQUES AMB GUANY DE FUNCIO 169	
4.1.1. <i>Construcció del plasmidi p35SFPS2 per a la generació de plantes transgèniques que sobreexpressin l'isoenzim FPS2</i>	169
4.1.2. <i>Construcció del plasmidi pBIBFPS1S per a la generació de plantes dobles transgèniques D2+1S</i>	170
4.1.3. <i>Construcció dels plasmidis pTQ1, pTQ2, pTQ3, pTQ4, pTQ5 i pTQ6 per a la sobreexpressió de proteïnes FPS quimèriques</i>	171
4.2. CONSTRUCCIONS UTILITZADES PER COMPLEMENTAR LA PÈRDUA DE FUNCIO DELS GENS <i>FPS1</i> I <i>FPS2</i>	172
4.2.1. <i>Modificació del vector pCAMBIA 1300</i>	172
4.2.2. <i>Construcció del plasmidi pCGEN1 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funcio del gen FPS1</i>	172

4.2.3. Construcció del plasmidi pTGEN2 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen FPS2.....	173
4.2.4. Construcció del plasmidi pCGEN1-2 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen FPS1.....	174
4.2.5. Construcció del plasmidi pTGEN2-1S per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen FPS2.....	175
4.3. TRANSFORMACIÓ D'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	176
4.3.1. Preparació de cèl.lules competents d' <i>A. tumefaciens</i>	176
4.3.2. Transformació de cèl.lules competents d' <i>A. tumefaciens</i>	176
4.4. INFILTRACIÓ DE PLANTES D'ARABIDOPSIS THALIANA.....	177
4.4.1. Condicions de creixement de les plantes a infiltrar.....	178
4.4.2. Condicions de creixement d' <i>A. tumefaciens</i>	178
4.4.3. Condicions del procés d'infiltració	179
4.4.4. Selecció de plantes transgèniques	179
4.4.5. Selecció de línies homozigòtiques pel transgèn.....	180
5. GENERACIÓ DE PLANTES DOBLES MUTANTS PER POL.LINITZACIÓ CREUADA	180
6. ANÀLISI FENOTÍPIC	181
6.1. ANÀLISI DE L'ELONGACIÓ DEL TUB POL.LÍNIC	181
6.2. ANÀLISI DE LA LONGITUD DE L'HIPOCÒTIL	182
6.3. ANÀLISI DE LA LONGITUD DE LES ARRELS.....	182
6.4. ESTUDI DE LETALITAT EN LES LLAVORS I DE LETALITAT EMBRIONÀRIA.....	183
6.5. ESTUDI DE LA SENESCÈNCIA PER <i>DETACHMENT</i>	183
6.6. ESTUDI DE LA PERMEABILITAT DE LES LLAVORS	184
7. TÈCNiques AMB ÀCIDS NUCLEICS: DNA	184
7.1. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC EN TEIXITS D' <i>A. THALIANA</i>	184
7.1.1. Micropreparació de DNA genòmic en medi bàsic.....	184
7.1.2. Extracció de DNA pel mètode del CTAB	185
7.2. SOUTHERN BLOT GENÒMIC.....	186
7.2.1. Preparació de les sondes NPTII i 35S.....	186
7.2.2. Preparació de les mostres de DNA genòmic	187
7.2.3. Electroforesi i tractament del gel	187
7.2.4. Transferència del DNA.....	188
7.2.5. Fixació del DNA a la membrana	188
7.2.6. Pre-hibridació, hibridació i rentats.....	188
7.2.7. Immunodetecció quimioluminescent.....	189
8. TÈCNiques AMB ÀCIDS NUCLEICS: RNA	190
8.1. EXTRACCIÓ DE RNA EN TEIXITS D' <i>A. THALIANA</i>	190
8.1.1. Extracció de RNA pel mètode comercial RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen.....	190

8.1.2. Extracció de RNA pel mètode del TRIzol.....	191
8.1.3. Extracció de RNA de llavors d' <i>Arabidopsis</i> pel mètode del LiCl.....	191
8.1.4. Quantificació i comprovació de la qualitat del RNA obtingut.....	193
8.2. RT-PCR.....	193
8.3. REAL-TIME PCR	194
8.4. ANÀLISI DE PERFILS D'EXPRESSION GÈNICA MITJAÇANT MICROMATRIUS D'ADN.....	197
8.4.1. Condicions de creixement de les plantes i recolecció de les mostres.....	197
8.4.2. Síntesi de cDNA a partir de RNA total	198
8.4.3. Purificació del cDNA.....	199
8.4.4. Síntesi del cRNA marcat amb biotina	200
8.4.5. Purificació del cRNA biotinitat.....	200
8.4.6. Quantificació i comprovació de la qualitat del cRNA biotinitat.....	201
8.4.7. Càlcul de la quantitat ajustada de cRNA.....	201
8.4.8. Fragmentació del cRNA marcat amb biotina	201
8.4.9. Hibridació.....	202
8.4.10. Rentats i tinció de les micromatrius.....	204
8.4.11. Escanejat de les micromatrius.....	205
8.4.12. Anàlisi de dades.....	205
9. TÈCNiques AMB PROTEÏNES	206
9.1. PREPARACIÓ D'EXTRACTES PROTEICS	206
9.1.1. Quantificació d'extractes proteics d' <i>A. thaliana</i>	206
9.2. WESTERN BLOT.....	207
9.2.1. Separació de proteïnes mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE.....	207
9.2.2. Transferència de les proteïnes a una membrana de PVDF	208
9.2.3. Immunodetecció quimioluminescent.....	210
9.2.4. Tinció de les proteïnes presents a la membrana de PVDF.....	211
10. ASSAIGS D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA	211
10.1. ASSAIG D'ACTIVITAT HMGR.....	212
10.1.1. Substrats i solucions necessàries	213
10.1.2. Reacció de transformació d'HMG-CoA a mevalonat	213
10.1.3. Cromatografia en capa fina.....	214
10.1.4. Contatge de la mevalonolactona marcada amb [¹⁴ C]	215
10.1.5. Càlcul de l'activitat específica de l'enzim HMGR.....	215
10.2. ASSAIG D'ACTIVITAT FPS.....	215
10.2.1. Substrats i solucions necessàries	216
10.2.2. Reacció de síntesi de FPP	216
10.2.3. Càlcul de l'activitat específica de l'enzim FPS.....	217
10.3. APROXIMACIÓ AL CàLCUL DE K_M PER A IPP, GPP I DMAPP	217

10.4. ANÀLISI DELS PRODUCTES DE LA REACCIÓ CATALITZADA PER L'ENZIM FPS MITJANÇANT CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	219
10.4.1. <i>Separació de prenilalcohols per cromatografia en capa fina</i>	220
11. EXTRACCIÓ I ANÀLISI D'ESTEROLS	220
12. PREPARACIÓ DE MOSTRES PER A IMMUNOCITOQUÍMICA I OBSERVACIÓ AL MICROSCOPI ELECTRÒNIC DE TRANSMISSIÓ.....	222
12.1. CRIOSUBSTITUCIÓ.....	223
12.1.1. <i>Fixació química del teixit</i>	223
12.1.2. <i>Crioprotecció</i>	223
12.1.3. <i>Criofixació</i>	224
12.1.4. <i>Criosubstitució</i>	224
12.1.5. <i>Ultramicrotomia</i>	224
12.1.6. <i>Immunocitoquímica</i>	225
12.1.7. <i>Contrastat de les mostres</i>	225
12.1.8. <i>Observació de les mostres al microscopi electrònic de transmissió</i>	225
13. COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE MUTANTS DE LLEVAT	226
13.1. CULTIU DE LA SOCA CC25	226
13.1.1. <i>Medis de cultiu</i>	226
13.1.2. <i>Nutrients complementaris</i>	226
13.2. CONSTRUCCIONS PER LA COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE MUTANTS DE LLEVAT	227
13.3. TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS	227
13.4. ASSAIG DE COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LA SOCA CC25.....	230
13.5. ASSAIG D'ACTIVITAT FPS EN <i>S. CEREVISIAE</i>	230
14. ELABORACIÓ DE MODELS ESTRUCTURALS TRIDIMENSIONALS PER ALS ISOENZIMS FPS1S I FPS2 D'A. THALIANA	231
BIBLIOGRAFIA.....	233

INTRODUCCIÓ

1. Els isoprenoides: classificació i funcions

Els isoprenoides, també coneguts amb el nom de terpens o terpenoides (Chappell, 1995a; b), constitueixen una de les famílies de compostos amb major diversitat d'estructures i funcions, amb més de 30.000 isoprenoides identificats (Lange *et al.*, 2000). Tot i que aquests compostos es troben en tots els éssers vius, les plantes són les que sintetitzen el grup més nombrós d'isoprenoides.

Els isoprenoides vegetals es poden classificar en metabòlits primaris i secundaris. Els isoprenoides considerats metabòlits primaris tenen funcions essencials per al creixement i desenvolupament de les plantes, mentre que els considerats metabòlits secundaris, tot i no ser essencials per la viabilitat de les plantes, desenvolupen funcions importants pel que fa a la interacció de les plantes amb l'entorn (Croteau *et al.*, 2000).

Entre els metabòlits primaris es poden trobar compostos implicats en el manteniment de l'estructura i funció de les membranes (esterols), en la fotosíntesi (clorofil·les i carotenoides), en el transport electrònic (ubiquinona i plastoquinona), en la modificació de proteïnes (dolicol i grups prenil) i en la regulació del desenvolupament vegetal (citoquinines, giberel·lines, àcid abscísic i brassinosteroides). De fet, tot i no ser considerats fitohormones, s'ha vist que els esterols també poden estar implicats en la regulació del desenvolupament (Lindsey *et al.*, 2003).

Malgrat tot, on es troba una varietat molt més gran d'isoprenoides és entre els que es consideren metabòlits secundaris. Aquests compostos són mediadors de la interacció planta-planta, planta-insecte i planta-patògen, ja sigui amb funcions de protecció contra herbívors i patògens (fitoalexines sesquiterpèniques) o com a atraients d'insectes que afavoreixen la pol·linització i la dispersió de les llavors (DellaPenna, 1999). Dins aquest grup trobem també isoprenoides que tenen un gran valor comercial com aromes, pigments, gomes i drogues com per exemple el taxol (Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002).

Tot i la gran varietat d'estructures i funcions existents, Wallach va proposar l'any 1914 la "regla de l'isoprè", segons la qual tots aquests compostos podrien estar formats per la unió d'unitats d'isoprè (2-metil-1,3-butadiè). Aquesta regla unificava sota el nom d'isoprenoides tots els compostos amb un origen biosintètic comú (McGarvey i Croteau, 1995).

Isoprenoides		Exemples	Funcions
C ₅	Hemiterpens	isopentenil-tRNA cadena lateral de citoquinines isoprè	traducció proteica fitohormones termotolerància
C ₁₀	Monoterpens	essències	atraients per la pol.linització activitat antimicrobiana
C ₁₅	Sesquiterpens	grups farnesil fitoalexines	prenilació de proteïnes antifúngiques i antimicrobianes dissuasius d'insectes
C ₂₀	Diterpens	grups geranilgeranil cadenes laterals de clorofil·les, tocoferol i filoquinones fitoalexines gibberel·lines taxol	prenilació de proteïnes transport electrònic activitat antimicrobiana fitohormones defensa contra patògens
C ₃₀	Triterpens	esterols brassinosteroides saponines triterpèniques	estructura i funció de membranes, reguladors del desenvolupament fitohormones defensa contra patògens
C ₄₀	Tetraterpens	carotenoides àcid abscísic	protectors de l'aparell fotosintètic pigments fitohormona
C _{>40}	Politerpens	cadena lateral de la ubiquinona i la plastoquinona dolicols	transport electrònic glicosilació de proteïnes

Taula 1: Classificació estructural dels isoprenoides en funció del nombre d'àtoms de carboni (C_n).

Des del punt de vista estructural, els isoprenoides poden classificar-se en funció del nombre d'unitats d'isoprè que han estat necessàries per formar l'esquelet hidrocarbonat de la molècula. De manera que podem trobar des dels hemiterpens (C₅) constituïts per una única unitat d'isoprè, fins a compostos constituïts per la unió de 2, 3, 4, 6, 8 o més unitats d'isoprè, anomenats respectivament: monoterpens (C₁₀), sesquiterpens (C₁₅), diterpens (C₂₀), triterpens (C₃₀), tetraterpens (C₄₀) i politerpens (C_{>40}).

Cal mencionar també que els compostos de procedència mixta (d'origen isoprenoide parcial) poden ser anomenats meroterpens. En aquest grup podem destacar,

per exemple, les clorofil·les (que tenen una cadena lateral diterpènica), les quinones (amb cadenes laterals politerpèniques), les citoquinines (amb una cadena lateral derivada d'IPP), o bé les proteïnes prenilades (que poder ser farnesilades o geranilgeranilades).

2. Biosíntesi d'isoprenoides

La síntesi d'isoprenoides es pot dividir en tres parts ben diferenciades. En primer lloc es duu a terme la síntesi de l'isopentenildifosfat (2-metil-1,3-butadièfosfat; IPP), el precursor estructural comú de tots els isoprenoides. La segona part inclou la síntesi de geranildifosfat (GPP), farnesildifosfat (FPP) i geranilgeranildifosfat (GGPP), els prenilfosfats de longitud creixent precursors de la síntesi dels monoterpens, sesquiterpens i diterpens, respectivament. També es poden incloure en aquesta part les reaccions de dimerització de FPP i GGPP per donar lloc a l'esquelet de triterpens i tetraterpens, respectivament. Finalment, en la tercera part s'inclourien totes les reaccions de ciclació, isomerització, hidroxilació, metilació i desmetilació, oxidació i reducció que donen lloc a la gran varietat de productes finals de naturalesa isoprenoide existents (Chappell, 1995a).

2.1. Vies de síntesi de l'IPP

La síntesi de l'IPP es pot dur a terme a través de dues vies metabòliques: la via del mevalonat (MVA) i la via del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) (Lichtenthaler *et al.*, 1997a). La via del MVA va ser la primera que es va identificar i per això també es coneix com a via clàssica. Aquesta via està present en animals, fongs, llevats, plantes superiors, arqueobactèries, algunes eubactèries, algunes algues, protozous i insectes. La via del MEP va ser descoberta més recentment en procariotes (Flesch i Rohmer, 1988) i s'ha vist que també està present en plantes superiors i en nombroses algues i eubactèries, així com en alguns paràsits apicomplexes com per exemple *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* o *Cryptosporidium parvum* que, a diferència d'altres paràsits, no disposen de la via del MVA (Eisenreich *et al.*, 2004). Les plantes poden, per tant, sintetitzar l'IPP a través de les dues vies de síntesi conegudes.

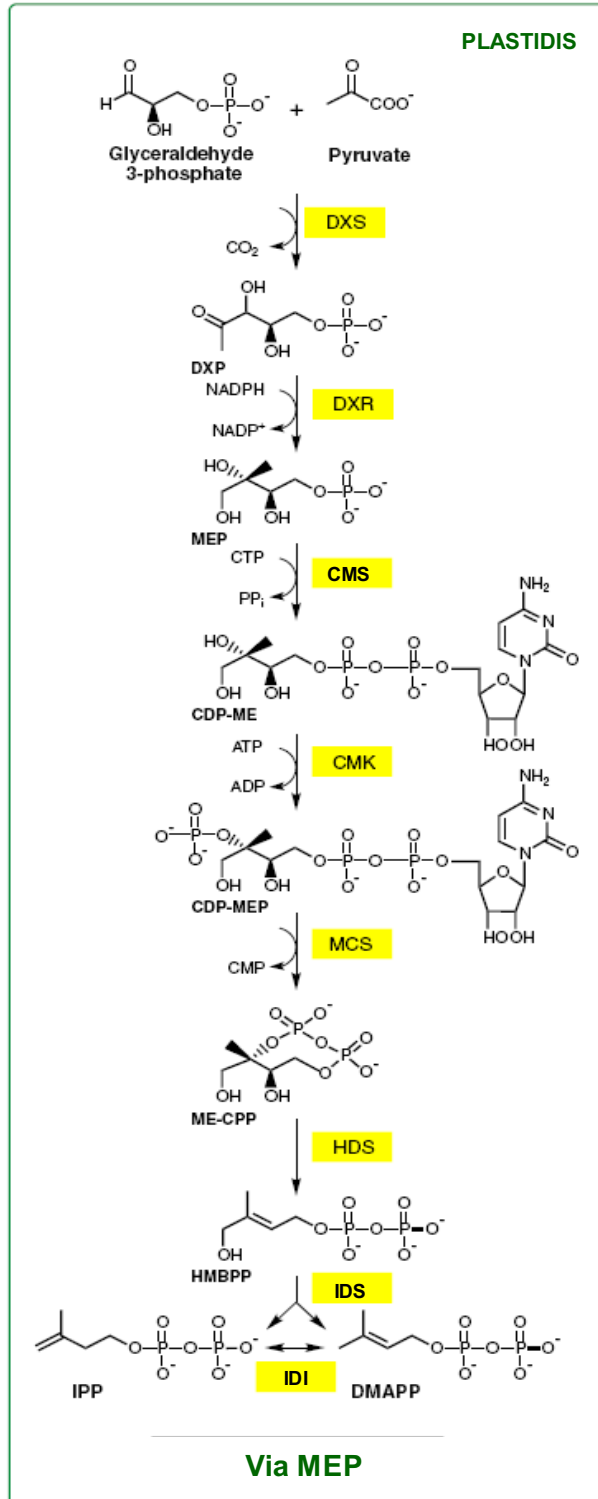
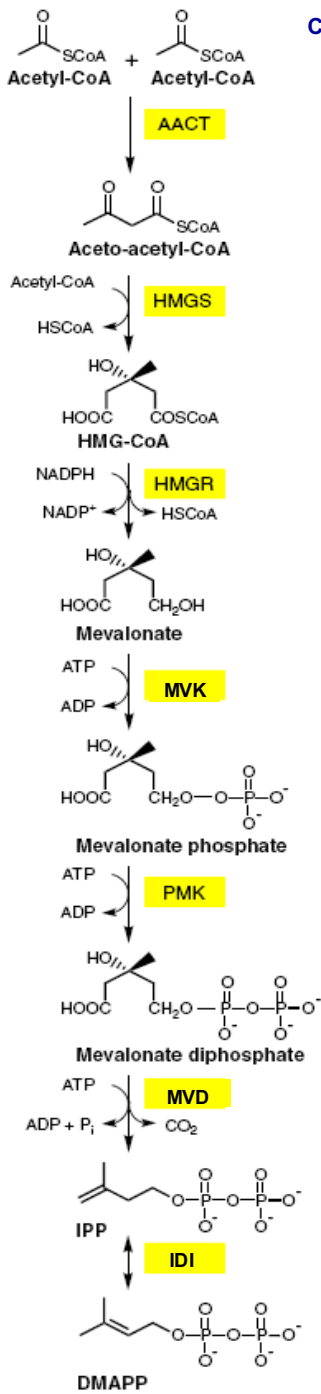


Figura 1: Esquema de la via del MVA i del MEP de síntesi d'IPP. AACT, acetoacetyl-CoA tiolasa; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGS, HMG-CoA sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa; MVK, mevalonat quinasa; PMK, fosfomevalonat quinasa; MVD, difosfomevalonat decarboxilasa; DMAPP, dimetilalilpirofosfat; IDI, IPP isomerasa; DXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat; DXS, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat reductoisomerasa; MEP, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat; CDP-ME, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol; CMS, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa; CMK, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinasa; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat; ME-cPP, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat; MCS, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat sintasa; HMBPP, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat; HDS, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat sintasa; IDS, IPP/DMAPP sintasa (adaptat de Bouvier *et al.*, 2005).

2.1.1 Via del mevalonat

La via del mevalonat (Figura 1), de localització citosòlica, s'inicia amb la condensació de dues molècules d'acetyl-CoA per donar lloc a l'acetoacetyl-CoA, en una reacció catalitzada per l'enzim acetoacetyl-CoA tiolasa (AACT). A continuació, l'addició d'una tercera molècula d'acetyl-CoA dona lloc al 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en una reacció mediada per l'enzim HMG-CoA sintasa (HMGS). L'HMG-CoA resultant és reduït a mevalonat en una reacció irreversible catalitzada per la HMG-CoA reductasa (HMGR). El mevalonat és el primer compost específic de la via i la seva síntesi es considera un dels principals punts de control en la biosíntesi d'isoprenoides. El mevalonat format és sotmés a dos processos de fosforilació mediat per els enzims mevalonat quinasa (MVK) i fosfomevalonat quinasa (PMK). Aquest producte difosforilat pateix una decarboxilació catalitzada per la difosfomevalonat decarboxilasa (MVD) que dona lloc a l'IPP. Finalment, l'IPP pot ser isomeritzat a dimetilalilpirofosfat (DMAPP) a través d'una reacció reversible catalitzada per la IPP isomerasa (IDI) (McGarvey i Croteau, 1995).

2.1.2. Via del metileritritol fosfat

La via del MVA era la única via de síntesi d'IPP coneguda fins que el 1988 Fleisch i Rohmer van proposar una via de síntesi d'IPP independent del mevalonat.

Aquesta, va ser anomenada inicialment via de Rohmer o via alternativa, però després de descobrir el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat com a primer compost específic de la via, es va acceptar el nom de via del MEP per tal de seguir el mateix tipus de nomenclatura que a la via del MVA.

La via del MEP (Figura 1), localitzada als plastidis, s'inicia amb la síntesi de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat (DXP) en una reacció enzimàtica depenent de tiamina, que parteix de piruvat i gliceraldehid-3-fosfat i que és catalitzada per la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa (DXS). La següent reacció, catalitzada per la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat reductoisomerasa (DXR), consisteix en un reordenament intramolecular de la DXP i una reducció depenent de NADPH que dona lloc al primer intermediari específic de la via, el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP). A continuació, a partir de MEP i CTP (citidina-5'-trifosfat) es produeix 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) per acció de l'enzim 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (CMS), seguit d'una fosforilació del CDP-ME depenent d'ATP duta a terme per la 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinasa (CMK) que produeix 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat (CDP-MEP). En el pas següent, el compost fosforilat es cicla eliminant-se CMP (citidina-5'-monofosfat) i convertint-se en 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat (ME-cPP) amb la intervenció de l'enzim 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat sintasa (MCS). Seguidament, s'obre l'anell format per donar lloc l'1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat (HMBPP) en un pas catalitzat per l'enzim 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat sintasa (HDS). Finalment, l'enzim IPP/DMAPP sintasa (IDS) catalitza una reacció en la qual a partir de l'1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat es sintetitzen IPP i DMAPP en una proporció 5:1 (revisat a Lichtenthaler, 2000; Eisenreich *et al.*, 2004).

2.2. Síntesi de prenildifosfats de longitud creixent

Després de la formació d'IPP i DMAPP, la biosíntesi d'isoprenoides continua amb la condensació seqüencial de molècules d'IPP sobre el seu isòmer DMAPP (en primer lloc) i sobre els successius substrats al·lílics de longitud creixent que es van formant. De manera que, la unió d'una molècula d'IPP amb DMAPP dona lloc a geranildifosfat (GPP, C₁₀). La condensació d'una segona unitat d'IPP, genera farnesildifosfat (FPP, C₁₅), i la condensació d'una tercera molècula d'IPP dona lloc a la

síntesi de geranilgeranildifosfat (GGPP, C_{20}). Aquestes reaccions de condensació, que generen l'esquelet bàsic que donarà lloc a la gran varietat d'isoprenoides, són catalitzades per les prenildifosfat sintases o preniltansferases. L'IPP pot ser utilitzat directament per a la síntesi dels hemiterpens (C_5), el geranildifosfat s'utilitza per sintetitzar monoterpens (C_{10}), el farnesildifosfat és la base de la síntesi de sesquiterpens (C_{15}) i el geranilgeranildifosfat serveix de base en la producció de diterpens (C_{20}). La condensació de dues molècules de FPP dóna lloc a un compost de 30 àtoms de carboni (esqualè) que és el precursor estructural en la síntesi dels triterpens. D'altra banda, els tetraterpens (C_{40}) s'originen a partir de la condensació de dues molècules de GGPP. Finalment, els politerpens ($C_{>40}$) tenen el seu origen en l'addició seqüencial de molècules d'IPP al FPP i als següents substrats al·lílics resultants.

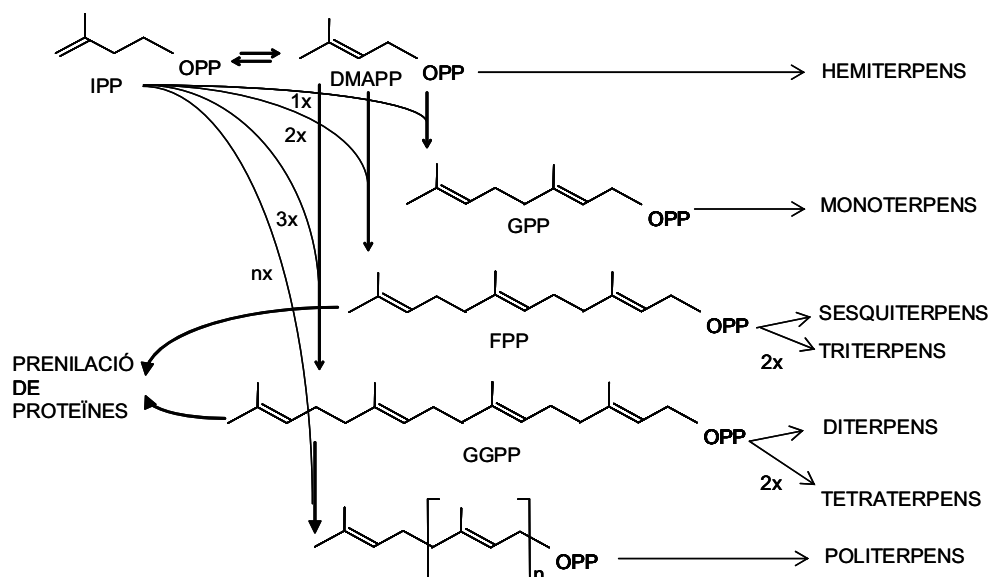


Figura 2: Esquema simplificat de la síntesi d'isoprenoides a partir d'IPP i DMAPP. Condensació seqüencial de molècules d'IPP amb DMAPP i els successius substrats al·lílics de longitud de cadena creixent que es van formant per donar lloc als precursors estructurals de monoterpens, sesquiterpens, triterpens, diterpens, tetraterpens i politerpens. IPP, isopentenildifosfat; DMAPP, dimetilal·lildifosfat; GPP, geranildifosfat; FPP, farnesildifosfat; GGPP, geranilgeranildifosfat (adaptat de McGarvey i Croteau, 1995).

2.2.1. Preniltransferases

Les reaccions de condensació de tipus cap-cua entre l'IPP i els diferents substrats al·lílics estan catalitzades per les prenildifosfat sintases o preniltransferases. La reacció catalitzada per aquests enzims s'inicia amb l'eliminació del grup difosfat de la posició C1' del substrat al·lílic per donar lloc a un catió al·lílic, en un procés activat per un catió divalent com per exemple el Mg^{2+} . El carbocatió resultant és atacat pel carboni de la posició C4 d'una molècula d'IPP per formar un nou enllaç carboni-carboni i un doble enllaç. De manera que es dona una condensació 1'-4 entre el carboni 1 del substrat al·lílic i el carboni 4 de l'IPP (Poulter i Rilling, 1976). Aquestes condensacions de tipus cap-cua es van repetint successivament fins a donar lloc a un prenildifosfat amb la longitud i l'estereoquímica desitjades.

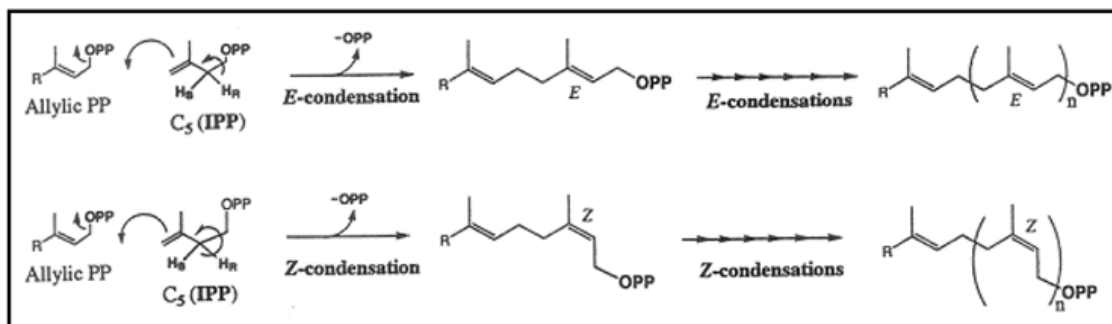


Figura 3: Mecanisme de les reaccions catalitzades per les *trans* o (*E*)-preniltransferases i les *cis* o (*Z*)-preniltransferases (Ogura i Koyama, 1998).

Existeixen dos grans grups de preniltransferases en funció de l'estereoquímica de la reacció de condensació entre l'IPP i el substrat al·lílic corresponent: les *trans* o (*E*)-preniltransferases i les *cis* o (*Z*)-preniltransferases (Ogura i Koyama, 1998). El mecanisme de reacció implica, en ambdós casos, elongacions electrofíliques que difereixen únicament en l'estereoquímica dels productes formats. Les *E*-preniltransferases catalitzen la condensació en *trans* de l'IPP amb els diferents prenilfosfats al·lílics, mentre que les *Z*-preniltransferases catalitzen la condensació en *cis* de l'IPP amb prenilfosfats al·lílics d'estereoquímica *trans* per formar productes d'estereoquímica mixta *E-Z*.

La majoria de les preniltransferases conegudes pertanyen a la família de les *E*-preniltransferases i es classifiquen en funció de la composició de les seves subunitats i de la longitud del producte de reacció resultant (Koyama, 1999).

Les *E*-preniltransferases de tipus I o de cadena curta catalitzen la síntesi de prenilfosfats de fins a 25 àtoms de carboni, funcionen com a homodímers i requereixen cations divalents com el Mg^{2+} o el Mn^{2+} per dur a terme la seva activitat catalítica. Dins d'aquest grup es troben preniltransferases de la part troncal de la síntesi d'isoprenoides com són la GPP sintasa, la FPP sintasa i la GGPP sintasa.

Les *E*-preniltransferases de tipus II o de cadena mitjana catalitzen la síntesi de cadenes preníliques de 30 i 35 àtoms de carboni a partir de FPP o GGPP, formen heterodímers i necessiten la presència de cations divalents com el Mg^{2+} . En aquest grup s'inclouen enzims bacterians com la hexaprenildifosfat sintasa i la heptaprenildifosfat sintasa.

Les *E*-preniltransferases de tipus III o de cadena llarga catalitzen la síntesi de cadenes preníliques de C_{40} , C_{45} i C_{50} a partir de FPP o GGPP, són actives en forma d'homodímers i requereixen un factor proteic per mantenir un recanvi catalític eficient, a més a més de la presència de cations divalents com el Mg^{2+} . En aquest grup es troben enzims com l'octaprenildifosfat sintasa, la solanesildifosfat sintasa i la decaprenildifosfat sintasa.

Les *Z*-preniltransferases són un grup menys caracteritzat d'enzims que es classifiquen en *Z*-preniltransferases de tipus IV o de cadena llarga i *Z*-preniltransferases de tipus V o de cadena curta. La majoria de les *Z*-preniltransferases descrites pertanyen al grup de les *Z*-preniltransferases de tipus IV. Són enzims que sintetitzen *E-Z*-prenildifosfats de cadena llarga mitjançant la condensació successiva d'IPP sobre el substrat *E*-FPP. Aquests enzims són actius en forma d'homodímers i requereixen la presència de cations divalents com el Mg^{2+} i d'un component lipídic o un detergent necessaris per mantenir el recanvi catalític. En aquest grup es troben les undecaprenildifosfat sintases procariotes (Shimizu *et al.*, 1998; Apfel *et al.*, 1999) que sintetitzen undecaprenilfosfat (C_{55}), les dehidrodoliquildifosfat sintases implicades en la síntesi de dehidrodoliquildifosfat (Sato *et al.*, 1999), i l'enzim responsable de la síntesi de cautxú en *Hevea brasiliensis* que és capaç de condensar fins a 1500 molècules d'IPP (Oh *et al.*, 2000). Finalment, existeixen les *Z*-preniltransferases de tipus V o de cadena curta, de les quals es coneix una *cis*-preniltransferasa de *Micobacterium tuberculosis*

que sintetitza *E-Z*-FPP (C₁₅) condensant un IPP en *cis* sobre una molècula de GPP en presència de Mg²⁺ (Schulbach *et al.*, 2000).

2.2.2. Reaccions de dimerització

Els triterpens i tetraterpens són sintetitzats mitjançant la dimerització de dues molècules de FPP (C₁₅) i GGPP (C₂₀), respectivament. La dimerització de dues molècules de FPP dóna lloc a esqualè (C₃₀), el primer precursor específic de la síntesi d'esterols i brassinosteroides, en una reacció catalitzada per l'esqualè sintasa. La dimerització de dues molècules de GGPP dóna lloc a fitoè (C₄₀), precursor específic de la síntesi de carotens i xantofil·les, en una reacció catalitzada per l'enzim fitoè sintasa. Aquestes reaccions difereixen de les reaccions catalitzades per les preniltransferases abans descrites en que són condensacions de tipus cap-cap i tenen lloc en dues etapes. En primer lloc, es formen els intermediaris pre-esqualè i pre-fitoè amb la pèrdua d'un dels grups difosfat i un protó. En el segon pas, té lloc la transformació d'aquests intermediaris en els corresponents productes finals, en una reacció que en el cas de l'esqualè sintasa requereix la presència de NADPH, i en el cas de la fitoè sintasa no el requereix perquè manté un doble enllaç entre els carbonis C1 i C1' (Chappell, 1995a).

2.3. Reaccions de modificació dels esquelets terpènics

En poques ocasions els productes de les reaccions catalitzades per les preniltransferases constitueixen ells mateixos productes finals. En la majoria dels casos, els prenilfosfats són dirigits cap a diferents branques de la via on poden ser ciclats, experimentar nombroses modificacions o ser units covalentment a d'altres constituents cel·lulars mitjançant reaccions de tipus preniltransferasa (Chappell, 1995a).

Els enzims responsables de la ciclació de GPP, FPP i GGPP s'anomenen respectivament monoterpè, sesquiterpè i diterpè sintases o ciclases. Les reaccions que catalitzen tenen un mecanisme molt similar al mecanisme descrit per a les preniltransferases, amb la diferència que catalitzen ciclacions intramoleculares. Les ciclases són altament específiques en quant a substrat, ara bé, existeix la possibilitat que diferents ciclases utilitzin el mateix substrat per generar productes completament diferents. Per exemple, diferents sesquiterpè ciclases utilitzen FPP per donar lloc a

productes molt diversos (Chappell, 1995a; b). D'altra banda també és possible que una mateixa terpè ciclasa doni lloc a diferents productes finals. Aquest és el cas, per exemple, de la llimonè sintasa, que a més a més de generar llimonè també té la capacitat de produir quantitats menors d' α - i β -pinè (McGarvey i Croteau, 1995).

La majoria de les modificacions secundàries (hidroxilacions, metilacions, isomeritzacions, oxidacions i reduccions) tenen lloc després de les dimeritzacions i ciclacions que originen esquelets terpènics més complexos. Un clar exemple d'aquesta complexitat n'és la síntesi d'esterols, que serà tractada amb més detall a l'apartat 2.4 d'aquesta introducció.

Finalment, entre les modificacions covalents podem destacar la unió de cadenes de prenillfosfats a d'altres constituents cel·lulars per donar lloc a citoquinines, quinones, clorofil·les, grups hemo en citocroms i proteïnes prenilades.

2.4. Biosíntesi d'esterols

Els esterols són els metabòlits primaris majoritaris sintetitzats a través de la via del mevalonat (Schaller, 2004). Aquests compostos són essencials en les cèl·lules eucariotes, on són sintetitzats *de novo* o bé incorporats del medi (Hartmann, 1998). Els animals vertebrats i els fongs sintetitzen colesterol i ergosterol respectivament com a esterols majoritaris, mentre que les plantes produeixen una rica barreja d'esterols, entre els quals el colesterol és un dels components minoritaris i el sitosterol, l'estigmasterol i el campesterol en són els components majoritaris (Benveniste, 2002). D'altra banda, els insectes no són capaços de sintetitzar esterols sinó que els incorporen a través de la dieta (Svoboda i Weirich, 1995).

Els esterols són components de les membranes cel·lulars on tenen la funció de regular-ne la fluïdesa i permeabilitat. A més a més de la funció estructural, els esterols estan implicats en la regulació del desenvolupament. S'ha proposat la implicació dels esterols en la modulació de funcions de proteïnes associades a membrana com ara enzims, canals, receptors o components de vies de transducció de senyals (Schaller, 2004). Un exemple n'és la capacitat dels esterols de modular l'activitat de la H^+ -ATPasa en l'arrel de blat de moro (Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1997). En plantes, els esterols també són precursors dels brassinosteroides, compostos implicats en la regulació de diferents processos cel·lulars, i serveixen com a substrat per la síntesi d'una gran

varietat de metabòlits secundaris, com per exemple els glicoalcaloides, els cardenòlids i les saponines (Hartmann, 1998). Finalment, cal destacar l'interès biotecnològic dels esterols com a compostos nutraceutics, ja que s'ha demostrat que l'incorporació de fitoesterols a la dieta disminueix l'absorció de colesterol a l'intestí prim i en conseqüència, redueix els nivells plasmàtics de colesterol-LDL en humans (Weststrate *et al.*, 1998; Nigon *et al.*, 2001).

L'estructura dels esterols (Figura 4) està formada per un anell de perhidro-1,2-ciclopentafenantrè substituït per un hidroxil en configuració β al carboni 3, per un grup metil als carbonis 10 i 13, i per una cadena carbonada d'entre 8-10 unitats al carboni 17 (Hartmann, 1998).

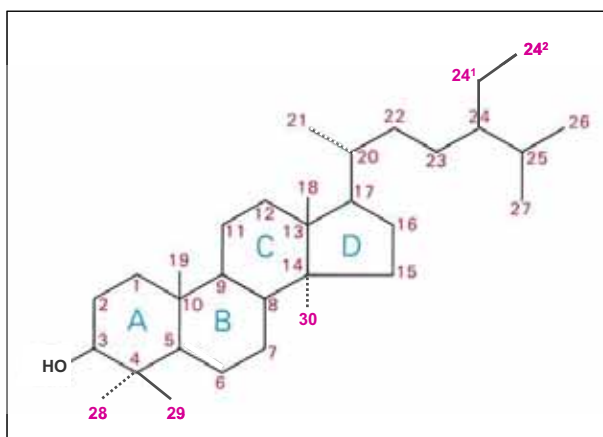


Figura 4: Estructura general dels esterols. Les posicions dels àtoms de carboni estan numerades segons les recomanacions de la IUPAC-IUB (1989).

Des d'un punt de vista estructural, els esterols vegetals es poden classificar en 4-demetil esterols, 4α -monometil esterols i $4,4$ -dimetil esterols, dels quals els esterols metilats en el carboni de la posició 4 són precursors biosintètics dels productes finals de la via (els 4-demetil esterols). Per la seva banda, els 4-demetil esterols es classifiquen en Δ^5 -, Δ^7 - i Δ^{5-7} -esterols en funció de la posició i el nombre de dobles enllaços presents en l'anell B (Piironen *et al.*, 2000). Una característica dels esterols vegetals que els diferencia dels esterols d'origen animal és la presència de grups alquil a la posició C24.

En plantes, el grup més abundant (>60% del total) són els Δ^5 -esterols substituïts amb un grup etil al carboni C24, entre els quals es troben el sitosterol i l'estigmasterol, i a continuació els Δ^5 -esterols substituïts amb un grup metil a la posició C24, entre els

quals destaca el campesterol (Piironen *et al.*, 2000). La formació dels 24-alkil esterols en plantes es realitza mitjançant l'addició d'àtoms de carboni cedits per la S-adenosil metionina (SAM) a les posicions C24 i C24' en reaccions catalitzades per les SAM-esterol-C24-metiltransferases (SMT). Existeixen dos tipus d'esterol metiltransferases, SMT1 i SMT2. SMT1 catalitza la metilació del cicloartenol per donar lloc al 24-metilencicloartenol, mentre que SMT2 és la responsable de la metilació del 24-metilenlofenol per donar 24-etilidenlofenol (Schaller, 2003; Figura 5). Les reaccions catalitzades per les SMTs es consideren punts de control de la biosíntesi d'esterols i han estat extensament estudiades en plantes i llevats (Schaeffer *et al.*, 2001).

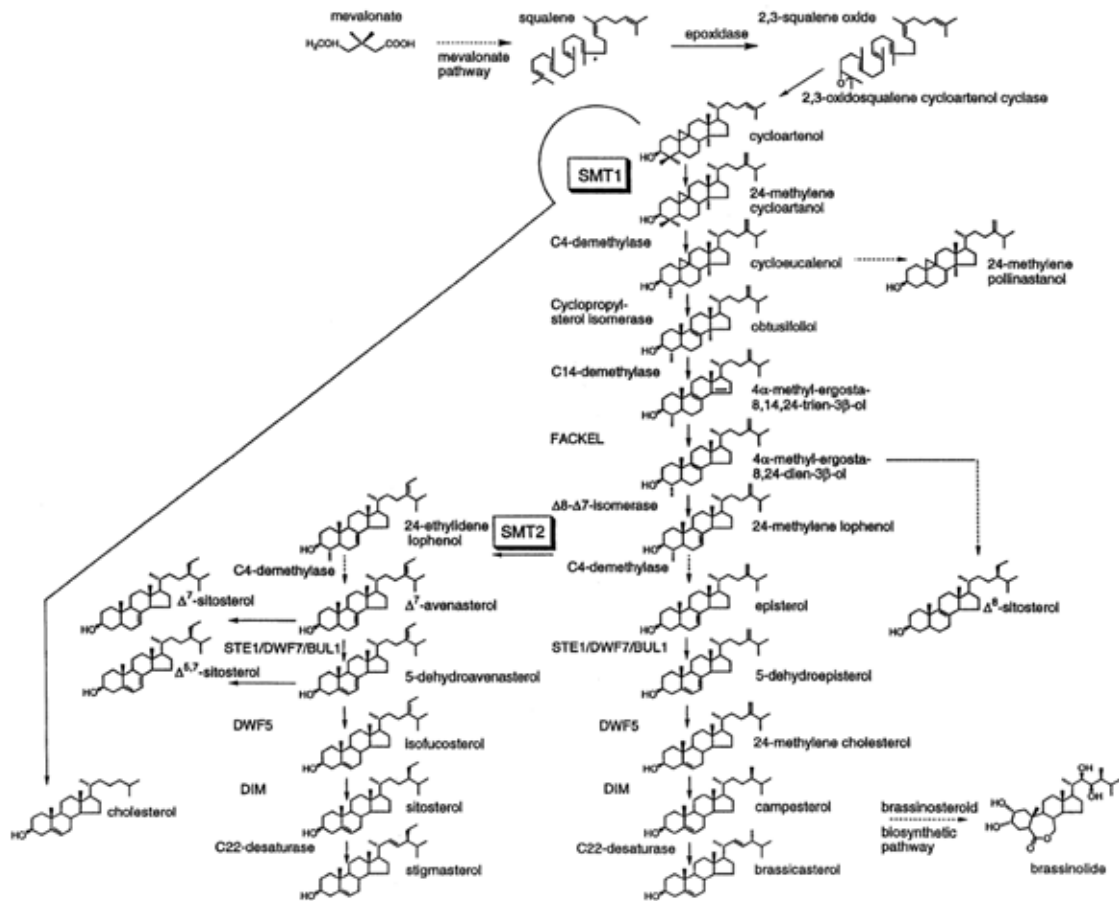


Figura 5: Esquema de la biosíntesi d'esterols (Schaller, 2003).

Els esterols són sintetitzats a través d'una seqüència de més de trenta etapes enzimàtiques associades a membranes (Hartmann, 1998). La síntesi de l'esqualè (C_{30}) a partir de la dimerització de dues molècules de FPP (C_{15}), es considera el primer pas específic cap a la síntesi d'esterols. A continuació, l'esqualè és transformat en

2,3-oxiesqualè mitjançant l'esqualè epoxidasa i tot seguit, aquest compost es cicla per donar lloc al cicloartenol en una reacció específica de les plantes, doncs en mamífers, llevats i fongs el producte de la ciclació és el lanosterol. Posteriorment, el cicloartenol és metilat per acció de l'esterol metiltransferasa1 (SMT1) per donar lloc a 24-metilencicloartenol. Després d'una desmetilació en C4, s'obrirà l'anell de 9 β ,19-ciclopropà per formar obtusifoliol. A partir d'aquest moment, una sèrie de reduccions, demetilacions, isomeritzacions i desaturacions, sense oblidar la reacció catalitzada per l'esterol metiltransferasa 2 (SMT2), donaran lloc a la resta d'intermediaris i productes finals de la via (revisat a Benveniste, 2002, 2004; Schaller, 2003; Bouvier *et al.*, 2005).

Molts dels enzims involucrats en la síntesi d'esterols no presenten una especificitat absoluta pels seus substrats, de manera que en una cèl·lula vegetal poden coexistir diverses vies que convergeixen en la síntesi dels productes finals (Benveniste, 1986). Tot i així, la principal ruta de síntesi d'esterols es pot veure representada en la Figura 5.

En la majoria de plantes superiors els esterols es troben en forma d'esterols lliures, és a dir, amb un grup hidroxil a la posició 3 β . En menors quantitats, els esterols poden trobar-se esterificats amb àcids grassos de cadena llarga per donar èsters d'esterol; glicosilats, generalment amb glucosa, per donar glucòsids d'esterol; o en forma d'acil glucòsids, en el cas de ser glicosilats i de trobar-se esterificada la posició 6 del sucre (Hartmann, 1998).

Els èsters d'esterol són un sistema de reserva d'esterols i, per tant, una forma de mantenir els nivells fisiològics d'esterols lliures a les membranes cel·lulars. Alguns exemples d'aquest fet en són el mutant de tabac *sterov* (*sterol overaccumulation*; Maillot-Vernier *et al.*, 1991) i les plantes transgèniques que sobreexpressen l'enzim HMGR en diferents espècies (Gondet *et al.*, 1992; Schaller *et al.*, 1995; González, 2002; Harker *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2004). En ambdues situacions, l'augment d'activitat HMGR produeix un increment del flux de la via del mevalonat que resulta en una acumulació d'esterols. Aquests plantes, tot i acumular grans quantitats d'esterols, no veuen alterats els seus nivells d'esterols lliures ja que aquests compostos es troben com a èsters d'esterol en vesícules lipídiques, fet que resulta important per l'homeòstasi dels esterols. Tot i l'hiperesterolèmia, les plantes tenen fenotip *wild type* (Schaller, 2003). Els èsters d'esterol també s'han trobat en tipus cel·lulars especialitzats de *Brassica napus* (wt). En aquest cas, s'ha suggerit que els èsters d'esterol que s'acumulen en cossos lipídics dels elaioplasts de cèl·lules tapetals poden facilitar la

germinació dels tubs pol.línics i servir com a components adhesius del pol·len per afavorir la pol·linització mediada per insectes (Wolters-Arts *et al.*, 1998).

Els glucòsids d'esterol i els acil glucòsids són sintetitzats i localitzats a la membrana plasmàtica, on es creu que poden tenir un paper relacionat amb l'adaptació de les plantes a les baixes temperatures (Schaller, 2003). D'altra banda, també s'ha postulat la funció del glucòsid de sitosterol com a iniciador de la síntesi de cel·lulosa en plantes (Peng *et al.*, 2002).

Finalment, els esterols constitueixen els precursors dels brassinosteroides (BRs), hormones implicades en processos com la divisió i elongació cel·lular, la diferenciació vascular, la fotomorfogènesi i escotomorfogènesi, i les respostes a estrès. Aquests compostos s'originen a partir del campesterol a través d'una sèrie d'hidroxilacions de la cadena lateral hidrocarbonada i de reduccions, oxidacions i epimeritzacions en diferents posicions de l'anell.

El primer BR va ser aïllat de pol·len de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979). Actualment es coneixen més de 40 compostos brassinosteroides, dels quals el brassinòlid (BL) [(22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-24-metil-B-homo-7-oxa-5 α -coleston-6-ona] n'és un dels més actius. Els nivells endògens de BRs en una planta varien en funció dels òrgans, l'edat del teixit i l'espècie vegetal, ara bé el pol·len i les llavors immadures es consideren les parts més riques en BRs. En general, els teixits joves contenen quantitats superiors de BRs en comparació amb teixits madurs, i és en els teixits en creixement on els BRs provoquen majors respostes fisiològiques (Clouse i Sasse, 1998).

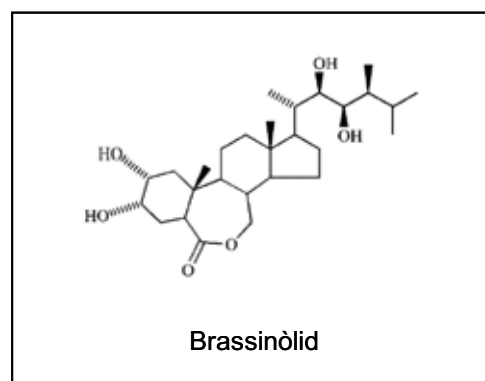


Figura 6: Estructura del brassinòlid (Benveniste, 2002).

2.5. Mutants deficients en la síntesi d'esterols i brassinosteroides

En els darrers anys s'han identificat nombrosos mutants d'*Arabidopsis* defectius en diferents passos de la síntesi d'esterols i brassinosteroides (Figura 7).

El fenotip que desenvolupen els mutants deficients en BRs es caracteritza per enanisme extrem, morfologia foliar alterada, esterilitat masculina o fertilitat reduïda, senescència retardada i desenvolupament vascular alterat. A més a més, aquests mutants mostren característiques de plantes crescudes en llum quan són crescuts en foscor (hipocòtils curts i cotilèdons oberts). Totes aquestes alteracions fenotípiques poden ser rescatades amb l'aplicació exògena de brassinòlid (Clouse, 2000). Entre els mutants de síntesi de BRs trobem *det2* (*de-etiolated 2*) que té afectat el pas de reducció entre campesterol i campestanol (Chory *et al.*, 1991), *dwf4* (*dwarf 4*) que té afectat el gen que codifica per l'enzim responsable de la C22-hidroxilació del 6-oxocampestanol a catasterona (Choe *et al.*, 1998), i *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) que implica el gen CPD en la C23-hidroxilació de catasterona a teasterona (Szekeres *et al.*, 1996).

Degut al fet que els brassinosteroides deriven del campesterol, és d'esperar que mutacions que afectin la síntesi d'aquest esterol generin mutants amb dèficit de BRs i per tant, amb fenotips similars als desenvolupats pels mutants deficients en BRs. Això és el que s'ha observat en els mutants *dwf7/ste1*, *dwf5* i *dwf1/dim/cbb* (Choe *et al.*, 1999a; 1999b; 2000) que estan afectats en tres passos successius en la conversió d'episterol a campesterol. Els fenotips d'aquests mutants, semblants però no tant severs com els dels mutants deficients en BRs, poden ser rescatats per tractament amb brassinòlid. DWF7/STE1, DWF5 i DWF1/DIM també catalitzen les reaccions de conversió d'avenasterol a sitosterol, en una branca de síntesi paral·lela, doncs el sitosterol únicament es diferencia del campesterol en el grup alquil que substitueix C24. El fet que aquests mutants siguin rescatats per BRs pot indicar una major implicació del dèficit hormonal que no pas de la integritat de la membrana en les alteracions fenotípiques observades (revisat a Clouse, 2002).

S'han identificat altres mutants de síntesi d'esterols afectats en 4 etapes anteriors a les prèviament comentades: *smt1/cph*, *fackel/hydra2*, *hydra1* i *cyp1/smt2* (Figura 7). Tots ells manifesten alteracions en el desenvolupament, característiques fenotípiques

diferents al grup descrit anteriorment i no poden ser rescatats per aplicació exògena de brassinosteroides (revisat a Clouse, 2002; Lindsey *et al.*, 2003).

El mutant *smt1* (*sterol methyltransferase1*) està afectat en el pas d'alquilació del C24 del cicloartenol per donar 24-metilencicloartenol i es caracteritza per acumular nivells més elevats de colesterol en detriment dels nivells de sitosterol (Diener *et al.*, 2000). El mutant *fk* (*fackel*), té alterada l'activitat C-14 reductasa (Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000). Ambdós mutants mostren alteracions en estadis primerencs de l'embriogènesi. Les cèl·lules del centre de l'embrió en estadi globular no són capaces de dividir-se de forma asimètrica, de manera que, mentre que els embrions *wild type* progressen cap a l'estadi en forma de cor, els embrions mutants es queden en forma globular i desorganitzada. En aquests mutants es desenvolupen múltiples meristems apicals, amb seedlings que acostumen a tenir més de dos cotilèdons i que queden pràcticament units a l'arrel (sense desenvolupament de l'hipocòtil). A més a més, *fk* mostra un patró vascular alterat.

El mutant *hyd1* (*hydra1*) té afectada la Δ^8 - Δ^7 isomerasa i és fenotípicament molt similar a *smt1* i *fk*, amb el mateix tipus d'alteracions en l'embriogènesi i en la morfologia dels seedlings (Topping *et al.*, 1997).

Finalment, el mutant *cvp1* (*cotyledon vascular pattern 1*) que té afectat el gen que codifica per l'esterol metiltransferasa 2, es caracteritza per un patró de venació alterat (Carland *et al.*, 2002). Al igual que els mutants *dwf7*, *dwf5* i *dwf1*, *cvp1* no mostra alteracions en l'embriogènesi però a diferència d'aquests, el seu fenotip no és rescatat per BRs.

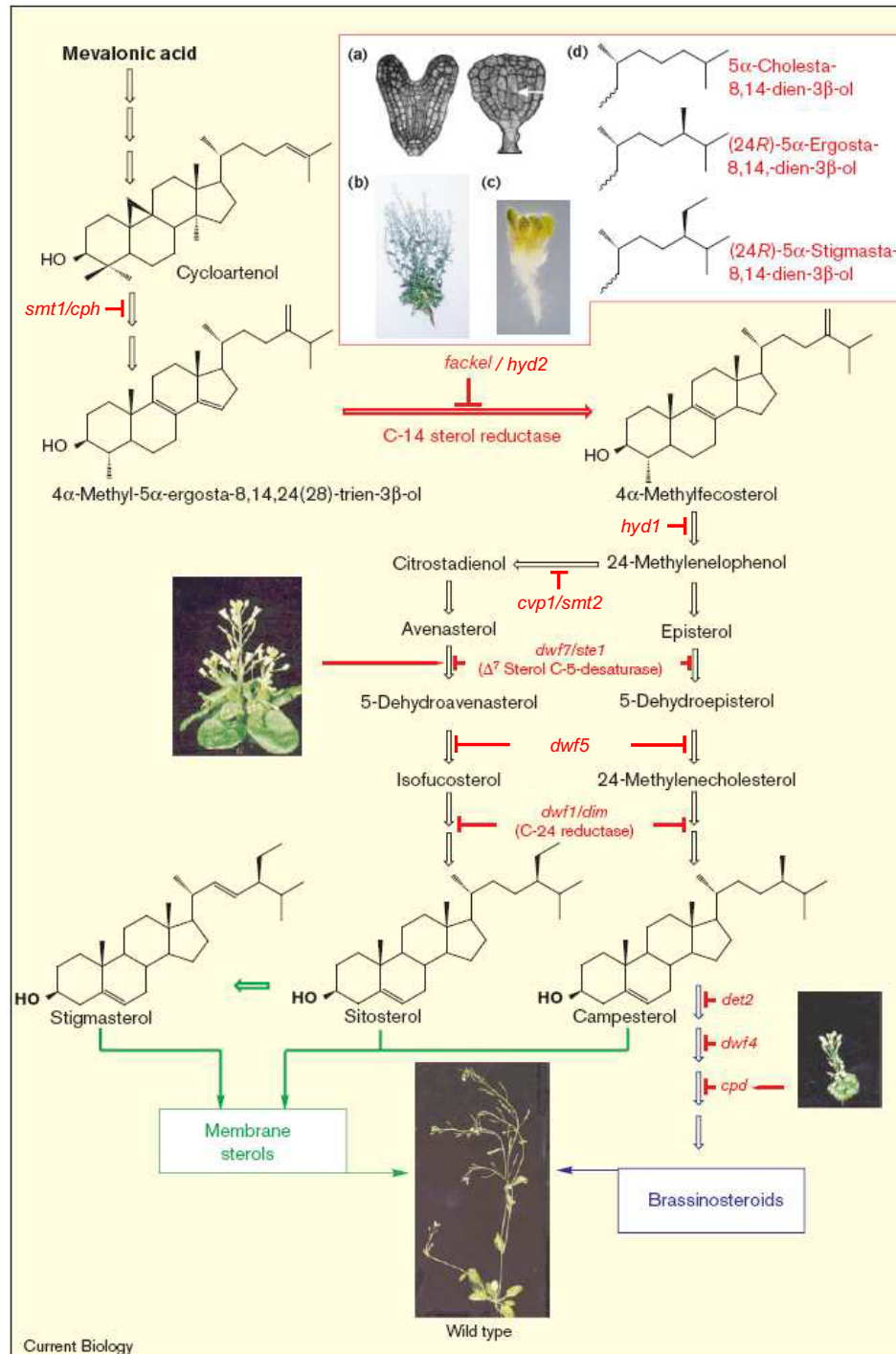


Figura 7: Mutants de síntesi d'esterols i brassinosteroides. En vermell s'indiquen les reaccions afectades i el nom dels mutants. Defectes en l'embriogènesi observats en el mutant *fackel*. a) Diferències morfològiques entre embrions en estadi de cor de *wild type* (esquerra) i mutants *fackel* (dreta). b) Planta adulta del mutant *fackel*. c) Fenotip d'un seedling del mutant *fackel* on s'observen cotilèdons múltiples i absència d'hipocòtil. d) Esterols acumulats en el mutant *fackel* (amb la mateixa estructura d'anell del substrat de la C-14 reductasa) (adaptat de Clouse, 2000).

a la prenilació de proteïnes. A més a més, l'IPP sintetitzat al citòsol és incorporat a les mitocondries per a la síntesi d'isoprenoides mitocondrials (Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984; Disch *et al.*, 1998; Manzano *et al.*, 2006), així com per a la síntesi de FPP i GGPP destinats a la prenilació de proteïnes en aquest orgànul (Shipton *et al.*, 1995). Als plastidis, l'IPP sintetitzat a través de la via del MEP és destinat a la formació de monoterpens, giberel·lines, carotenoides i cadenes laterals de clorofil·les, tocoferols, filoquinones i plastoquinones (Lichtenthaler *et al.*, 1997b).

La via del MVA i la via del MEP funcionen simultàniament en cèl·lules vegetals, però malgrat la seva separació en compartiments subcel·lulars diferents, cada vegada hi ha més evidències de l'existència d'un intercanvi bidireccional de prenilfosfats entre el citòsol i els plastidis en, com a mínim, algunes plantes i sota determinades condicions (Rodríguez-Concepción, 2006).

S'ha descrit que precursors derivats del mevalonat poden ser utilitzats per la síntesi d'isoprenoides plastídics. Un exemple d'aquest fet s'observa en el mutant *CLAI* d'*Arabidopsis* (Mandel *et al.*, 1996). En aquest mutant, que és defectiu en l'enzim DXS (enzim de la via del MEP) i presenta un fenotip albi, el MVA és capaç de revertir-ne parcialment el fenotip. Un altre exemple es troba en cultius de cèl·lules BY-2 de tabac (Hemmerlin *et al.*, 2003a), on s'ha observat que el mevalonat marcat radioactivament és incorporat a un isoprenoide plastídic com és la plastoquinona en cèl·lules tractades amb fosmidomicina. En aquest mateix sistema, s'ha vist que la desoxixilulosa (forma defosforilada del primer precursor de la via del MEP) s'incorpora als esterols quan les cèl·lules es tracten amb mevinolina. Igualment, en d'altres treballs s'ha detectat una clara contribució de la via del MEP en la síntesi d'isoprenoides citosòlics. Per exemple, l'aportació de substrats marcats radioactivament ha posat de manifest que, en l'epidermis dels pètals d'*Antirrhinum majus*, únicament la via del MEP proporciona l'IPP per a la síntesi de terpens volàtils, entre els quals es troben sesquiterpens citosòlics (Dudareva *et al.*, 2005).

Recentment s'ha descrit que el transport d'intermediaris des dels plastidis cap al citòsol està mediat per un transportador (Bick i Lange, 2003). Aquest transportador és capaç de transportar eficientment IPP i GPP, i en menor grau FPP i DMAPP, mentre que el GGPP i el MVA no poden ser transportats de forma eficient.

Tot i l'existència de trànsit d'intermediaris entre compartiments subcel·lulars, en condicions normals de creixement aquesta intercanvi resulta insuficient per rescatar el

bloqueig en una de les dues vies de síntesi d'IPP (Rodríguez-Concepción, 2006). Així, veiem que no és possible rescatar totalment els fenotips derivats d'un bloqueig en la via del MVA com és el cas del mutant *hmg1* d'*Arabidopsis* (Suzuki et al., 2004), que conté la inserció d'un T-DNA en el gen *HMGI* i que es caracteritza per manifestar enanisme, senescència prematura i esterilitat masculina; ni rescatar totalment els efectes del bloqueig en la via del MEP com és el cas anteriorment comentat del mutant *CLAI* (Mandel et al., 1996).

4. Regulació de la via del mevalonat de síntesi d'isoprenoides

La gran quantitat d'isoprenoides sintetitzats per les plantes i la varietat de funcions en les que estan implicats fa pensar en l'existència de complexos mecanismes que permetin regular de forma precisa i coordinada la seva biosíntesi en funció dels teixits, estadis de desenvolupament o condicions ambientals. Donat que els enzims en estudi en aquesta tesi formen part de la via del mevalonat, en aquesta introducció únicament ens centrarem en els aspectes relacionats amb aquesta via.

4.1. Famílies multigèniques i canals metabòlics

Per tal d'optimitzar el creixement i desenvolupament, les activitats metabòliques d'una planta estan altament coordinades a diferents nivells: a nivell de planta sencera, a nivell tissular, cel·lular i molecular (Jørgensen *et al.*, 2005). A nivell tissular, per exemple, es podria destacar l'expressió diferencial de gens en moments i situacions en els quals es requereixen uns determinats compostos en uns teixits específics. A nivell cel·lular, la compartimentació en diferents orgànuls facilitaria la canalització de substrats entre diferents enzims; és a dir, serviria per co-localitzar enzims i optimitzar les concentracions necessàries de substrat. A nivell molecular, aquesta optimització es podria donar a través de la formació de complexos multienzimàtics.

Un dels fets que permet una regulació diferencial i coordinada a diferents nivells és l'existència de famílies multigèniques que codifiquen diferents isoenzims. La presència de diversos isoenzims per una mateixa activitat catalítica és una característica de molts dels enzims implicats en la biosíntesi d'isoprenoides. En *Arabidopsis thaliana*

existeixen 2 gens i 2 isoenzims AACT (Ahumada-Díaz, 2001), 2 gens i 3 isoenzims HMGR (Enjuto *et al.*, 1994; Enjuto *et al.*, 1995; Lumbreras *et al.*, 1995), 1 gen i 2 isoformes GPS (Bouvier *et al.*, 2000), 2 gens i 3 isoenzims FPS (Cunillera *et al.*, 1996; Cunillera *et al.*, 1997), 2 gens i 2 isoenzims SQS (Kribii *et al.*, 1997) i fins a 12 possibles gens GGPS (Lange i Ghassemian, 2003).

L'existència de famílies multigèniques que codifiquen enzims implicats en la síntesi d'isoprenoides no és exclusiva d'*Arabidopsis*, doncs també s'han identificat en moltes altres espècies. Per exemple, en el cas de l'HMGR s'han identificat 3 gens en *Hevea brasiliensis* (Chye *et al.*, 1992), 2 en cotó (Loguercio *et al.*, 1999), 3 en arròs (Nelson *et al.*, 1994; Ha *et al.*, 2001), 4 en blat (Aoyagi *et al.*, 1993), 4 en tomàquet (Narita i Gruissem, 1989) i 7 gens en patata (Bhattacharyya *et al.*, 1995).

Existeixen diversos treballs sobre la regulació diferencial dels gens que codifiquen per l'HMGR. En *Arabidopsis*, l'estudi del patró d'expressió dels gens *HMG1* i *HMG2* ha mostrat que mentre que el RNAm de la isoforma HMGR1S es troba en nivells elevats en tots els teixits estudiats, els RNAm corresponents a HMGR1L i HMGR2 es troben a nivells inferiors i només en plàntules, arrels i inflorescències (Enjuto *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995). En patata, s'ha demostrat que l'acumulació d'esterols provocada per ferides correlaciona amb la inducció de l'expressió del gen *HMG1*, mentre que l'acumulació de fitoalexines sesquiterpèniques provocada pel tractament amb àcid araquidònic correlaciona amb l'expressió dels gens *HMG2* i *HMG3* (Choi *et al.*, 1994). I en tomàquet, s'ha vist que el gen *HMG1* s'expressa més intensament en teixits de creixement ràpid, mentre que l'expressió de *HMG2* s'indueix en resposta a ferides o agents patògens (Weissenborn *et al.*, 1995).

A més a més, l'existència de famílies multigèniques també permet la regulació coordinada de diferents isoenzims implicats en la síntesi de productes específics. Per exemple, estudis realitzats en discos de patata han mostrat que en resposta a ferida s'incrementa la síntesi d'esterols i això correlaciona amb un increment de l'activitat SQS. En canvi, en resposta a un tractament amb elicitors fúngics, la inducció de la síntesi de fitoalexines sesquiterpèniques correlaciona amb una inducció de les sesquiterpè ciclasas i una supressió de l'activitat SQS (Zook i Kuc, 1991). Tant la SQS com les sesquiterpè ciclasas es troben situades immediatament després de la ramificació de la via a nivell de FPP, de manera que aquestes dades poden indicar l'existència d'un mecanisme de control coordinat que regula el flux d'intermediaris entre les diferents branques de la via.

Un altre exemple de regulació coordinada el trobem en cultius cel·lulars de *Tabernaemontana divaricata*, en els quals la síntesi de fitoalexines triterpèniques cíclics degut al tractament amb elicitors fúngics comporta una inducció en l'activitat dels enzims HMGR, IDI, FPS i algunes ciclases específiques de la síntesi de triterpens, i simultàniament, una supressió de l'activitat d'enzims implicats en la síntesi d'esterols (Fulton *et al.*, 1994).

Totes aquestes observacions no serien consistents amb una visió tradicional de la síntesi d'isoprenoides tenint lloc en un entorn homogeni, amb tots els intermediaris mesclats lliurement i accessibles a tot tipus d'enzims, per això l'any 1995 Chappell va proposar l'organització de la via en canals metabòlics o metabolons, doncs aquests exemples serien més conformes amb l'existència de grups d'isoenzims regulats independentment, dedicats a la producció de grups específics d'isoprenoides. De manera que, la regulació de la formació dels productes finals dependria de la regulació de cada canal metabòlic amb l'acumulació d'uns determinats isoenzims, la seva correcta localització i les modificacions post-traduccionals necessàries. Segons aquest model, en el RE existirien agrupacions d'isoenzims específics dedicats a produir grups concrets d'isoprenoides (Chappell, 1995a; 1995b). Aquests metabolons podrien organitzar-se al voltant dels enzims units a la membrana del RE, com la HMGR i la SQS.

Tot i que la formació d'aquests metabolons en plantes encara no s'ha demostrat experimentalment, existeixen varies avantatges que justifiquen l'existència de canals metabòlics. En primer lloc, els canals metabòlics ofereixen la possibilitat de millorar l'eficiència catalítica a través del traspàs d'intermediaris des del centre actiu d'un enzim fins al centre actiu d'un enzim situat molt proper, reduint-ne el temps de trànsit. En segon lloc, es milloren les cinètiques enzimàtiques, doncs els intermediaris no difonen lliurement i per tant no queden diluïts a la cèl.lula, fet que evitaria la competència entre enzims pel mateix substrat, alhora que dificultaria la degradació dels intermediaris que han quedat difosos en la cèl.lula. Finalment, una altra de les avantatges que ofereix aquest sistema, seria el fet de dificultar l'accés de molècules inhibidores als centres actius (Jørgensen *et al.*, 2005). Ara bé, l'estabilitat dels metabolons podria ser molt variable, fet que en dificultaria la seva detecció i estudi. En alguns casos podria tractar-se d'una formació de complexos transitòria i, per tant, la seva existència seria difícil de detectar (Jørgensen *et al.*, 2005).

4.2. Regulació del flux de la via del mevalonat

L'enzim HMGR, que catalitza la reducció irreversible de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonat, es considera un dels punts més importants en el control del flux de la via del mevalonat de síntesi d'isoprenoides en plantes, tal i com ja s'ha demostrat prèviament per a aquest enzim en mamífers i en llevats (Stermer *et al.*, 1994). L'HMGR ha estat àmpliament estudiada degut a la seva importància en la regulació de la síntesi de colesterol en mamífers i s'ha vist que és un dels enzims sotmesos a un major nombre de mecanismes de regulació (Goldstein i Brown, 1990). En plantes, la gran varietat de compostos derivats de la via del mevalonat i la diversitat de funcions que desenvolupen suggereix que fins i tot pot existir una major complexitat en la regulació d'aquest enzim (Stermer *et al.*, 1994), així com la implicació d'altres enzims en el control del flux de la via.

S'ha demostrat que l'activitat HMGR està estrictament regulada per mecanismes de control que actuen tant a nivell transcripcional com post-transcripcional. L'activitat HMGR varia en funció dels teixits i dels estadis de desenvolupament i pot respondre a estímuls tant interns (nivells d'esterols, reguladors del creixement), com externs (llum, ferides i atac per patògens).

Pel que fa referència als estadis de desenvolupament, s'ha observat que en teixits de creixement ràpid, així com en els meristems apicals de tiges i arrels, els nivells d'activitat HMGR són superiors als nivells detectats en teixits madurs (Stermer *et al.*, 1994). Per exemple, en plàntules de pèsol, l'activitat HMGR present en fulles madures només representa un 7% de l'activitat detectada en brots apicals (Brooker i Russell, 1975). I en fruit de tomàquet, l'activitat HMGR es superior en estadis primerencs de desenvolupament, quan hi ha una divisió cel·lular molt elevada, en comparació amb estadis posteriors en els quals se sintetitzen grans quantitats de carotenoides (Narita i Gruissem, 1989). D'altra banda, en llavors de blat de moro, els nivells més alts d'activitat HMGR s'assoleixen entre 10 i 12 dies després de la pol·linització, durant els estadis de divisions mitòtiques ràpides, i decauen fins a valors mínims en llavors madures (Moore i Oishi, 1993). En patata, s'ha observat que els gens *HMG1*, *HMG2* i *HMG3* s'expressen més en fulles en expansió que no pas en fulles madures, i això correlaciona amb els nivells de proteïna i activitat HMGR detectats (Korth *et al.*, 2000).

En fulles d'*A. thaliana* també s'han detectat valors més alts d'activitat HMGR en fulles joves que en fulles madures (Manzano *et al.*, 2004).

S'ha descrit que l'activitat HMGR pot ser modulada per la llum. En plàntules de blat de moro germinades en foscor, s'ha demostrat que l'activitat HMGR en arrels i tiges és fins a cinc vegades superior a l'activitat present en plàntules crescudes en llum (Moore i Oishi, 1993). També s'ha vist que els nivells de RNAm corresponents als gens *HMG1* i *HMG2* d'*A. thaliana* són significativament superiors en plàntules crescudes en foscor en comparació amb plàntules crescudes en llum (Enjuto *et al.*, 1994). En un treball posterior, s'ha estudiat detalladament la regulació per llum de la transcripció del gen *HMG1* d'*Arabidopsis*, i s'ha demostrat que tant en plàntules com en plantes adultes, l'expressió del gen *HMG1* és cinc vegades superior si són cultivades en foscor respecte de si aquestes plantes creixen en llum contínua. En aquest mateix treball, s'han estudiat els canvis d'expressió del gen *HMG1* en resposta a la durada del règim d'il·luminació, la quantitat i la qualitat de la llum (Learned, 1996). Més recentment, s'ha descrit que mutants de diferents tipus de fotoreceptors, *cry1* i *phyB*, mostren increments en els nivells d'activitat HMGR, suggerint que la llum activa cascades de senyalització independents que convergeixen en una regulació negativa de l'expressió i l'activitat HMGR (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004).

El fet que diverses hormones vegetals siguin d'origen isoprenoide (ABA, giberel·lines, citoquinines i brassinosteroides) fa pensar en una possible relació entre la seva síntesi i la regulació de l'activitat HMGR. Per exemple, s'ha vist que l'aplicació d'ABA en plantes de pèsol provoca una reducció de l'activitat HMGR, mentre que l'addició de zeatina (una citoquinina) i de giberel·lines n'incrementen l'activitat (Russell i Davidson, 1982). El mateix passa en fruit d'alvocat, on s'observa que la citoquinina isopenteniladenina és capaç de revertir la inhibició de l'activitat HMGR produïda per l'aplicació d'ABA (Cowan *et al.*, 1997).

Finalment, també hi ha exemples d'una regulació de tipus *feed-back* en relació als nivells intracel·lulars d'esterols. Wentzinger *et al.* (2002) van proposar que la disminució de 4,4-demetil esterols provocada en cèl·lules BY-2 de tabac després de l'aplicació d'esqualestatina (inhibidor de l'enzim SQS) produeix un increment d'entre 3-4 vegades en l'activitat HMGR, molt probablement degut a una activació transcripcional.

La quantitat d'esterols és una de les mesures que millor reflecteixen com els canvis en l'activitat HMGR alteren el flux de la via del mevalonat. No obstant, tal i com es detalla més endavant, hi ha altres enzims que també poden estar implicats en la regulació de la síntesi d'esterols. Existeixen diferents treballs que mostren una correlació directa entre el nivell d'activitat HMGR i la producció d'esterols (Gondet *et al.*, 1992; Chappell *et al.*, 1995a; Schaller *et al.*, 1995; González, 2002; Harker *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2004). De manera que, la disminució o inhibició de l'activitat de la HMGR resulta en una reducció del nivell d'esterols, mentre que un augment de l'activitat HMGR produeix un increment en la quantitat d'esterols acumulats.

Un exemple de disminució d'activitat HMGR el trobem en el mutant *hmg1* d'*Arabidopsis*, en el qual la pèrdua de funció en el gen *HMG1* comporta una reducció de la quantitat d'esterols totals de fins al 47% en seedlings i d'un 25% en inflorescències en comparació amb les plantes control (Suzuki *et al.*, 2004). D'altra banda, hi ha diversos exemples de mutants que veuen incrementada l'activitat HMGR, com seria el cas dels mutants de tabac *sterov* (Maillot-Vernier *et al.*, 1991) i de *LAB1-4* (Gondet *et al.*, 1992), que es caracteritzen per acumular quantitats importants d'esterols, concretament èsters d'esterol, en vesícules lipídiques. I el mateix efecte es dona en plantes transgèniques que sobreexpressen l'enzim HMGR. La sobreexpressió de la HMGR d'*Hevea brasiliensis* en tabac comporta un increment de fins a 6 vegades el nivell d'esterols respecte les plantes control (Schaller *et al.*, 1995). En *Arabidopsis thaliana* s'han sobreexpressat les isoformes HMGR1S i HMGR2 i el seus dominis catalítics observant-se un increment de fins a 3,6 vegades el contingut total d'esterols, fonamentalment dels intermediaris cicloartenol i 24-metilencicloartanol (González, 2002). Prèviament, s'havia vist que en la sobreexpressió del domini catalític de la HMGR de hàmsster en plantes de tabac, l'augment d'esterols afectava bàsicament als nivells de cicloartenol i no tant als productes finals de la via (Chappell *et al.*, 1995a).

Aquests resultats suggereixen l'existència de punts de control addicionals en la síntesi d'esterols. Diversos treballs assignen a l'enzim SMT1 un paper limitant en la biosíntesi d'esterols (Figura 5). En plantes amb nivells disminuïts de l'enzim SMT1 en tabac s'observa una acumulació de cicloartenol (Schaeffer *et al.*, 2000) mentre que en mutants amb pèrdua de funció en el gen *SMT1* d'*Arabidopsis* es detecta una acumulació de colesterol enlloc de sitosterol o de cicloartenol (Diener *et al.*, 2000). D'altra banda, la sobreexpressió de la SMT1 en tabac comporta un augment de l'activitat HMGR (probablement per la disminució en els nivells de cicloartenol) i un increment en la

producció d'esterols (Holmberg *et al.*, 2002). La coexpressió del domini catalític de la HMGR d'*H. brasiliensis* i de la SMT1 de *N. tabacum* en tabac resulta en l'acumulació d'aproximadament 2,5 vegades més esterols que en les plantes control, nivells superiors als aconseguits al sobreexpressar cadascun dels enzims per separat, on s'obtenien increments de 2,2 o 1,2 vegades respectivament (Holmberg *et al.*, 2003). Aquests treballs confirmen que tant la HMGR com la SMT1 participen en la regulació del flux de la via cap a la síntesi d'esterols.

Com ja s'ha mencionat en l'apartat 2.4 d'aquesta introducció, l'enzim SMT2 també es considera important en la regulació del flux de la via cap a la formació de 24-etil esterols. Les plantes que sobreexpressen SMT2 acumulen més sitosterol en detriment dels nivells de campesterol. Aquestes plantes són més petites del normal, possiblement degut a que la reducció en els nivells de campesterol afecta la síntesi de brassinosteroides, doncs aquest fenotip és revertit mitjançant l'aplicació exògena de BRs (Schaeffer *et al.*, 2001).

Un altre punt de control addicional en la via podria ser l'esqualè sintasa (SQS), que produeix esqualè, primer intermediari específic en la síntesi d'esterols, i per tant, canalitza el flux de la via del mevalonat cap a la síntesi d'aquests compostos. En relació a aquest enzim s'ha observat, per exemple, que l'addició d'el·licitors fúngics a cèl·lules de tabac correlaciona amb una important disminució de l'activitat SQS i el manteniment constant dels seus nivells de mRNA, fet que porta als autors a suggerir que la supressió en l'activitat SQS és deguda a modificacions post-transcripcionals (Devarenne *et al.*, 2002).

Finalment, un altre dels enzims potencialment importants en la regulació de la síntesi d'esterols és la FPS. Això és degut al fet que el FPP sintetitzat per aquest enzim no només pot ser canalitzat cap a la síntesi d'esterols, sinó que també pot ser destinat a la producció de molts altres compostos a través de les múltiples ramificacions de la via que parteixen d'aquest intermediari. Per aquest motiu es creu que la concentració tant del producte com dels substrats de la reacció catalitzada per les FPS ha d'estar finament regulada. El possible paper d'aquest enzim en la regulació de la via del mevalonat es tracta d'una forma més detallada en l'apartat 5.2.3 d'aquesta introducció.

5. Farnesildifosfat sintases

5.1. Característiques generals i estructura

Les farnesildifosfat sintases (EC 2.5.1.1/ EC 2.5.1.10) són (*E*)-preniltransferases que catalitzen la condensació seqüencial 1'-4 d'una molècula d'isopentenildifosfat (IPP) amb dimetilal·lildifosfat (DMAPP) per donar lloc a geranildifosfat (GPP), intermediari de la reacció, i seguidament, la condensació d'una segona molècula d'IPP amb GPP (que en aquesta ocasió actua com a substrat al·lílic de la reacció), per donar lloc al farnesildifosfat (FPP; C₁₅).

Les primeres purificacions de la FPS de diversos organismes eucariòtics com *Saccharomyces cerevisiae* (Eberhardt i Rilling, 1975), pollastre (Reed i Rilling, 1975), porc (Yeh i Rilling, 1977) i humans (Barnard i Popjak, 1981) van permetre establir que en tots aquests casos l'enzim es troba formant un dímer d'entre 80-84 kDa.

El desenvolupament de la biologia molecular a finals dels anys 80 va fer que s'aconseguís el clonatge dels gens que codifiquen per la FPS de fetge de rata (Clarke *et al.*, 1987), de llevat (Anderson *et al.*, 1989) i humana (Wilkin *et al.*, 1990). Des de llavors fins ara, nombrosos cDNA de les FPS han estat clonats. En plantes, podríem anomenar el clonatge dels cDNA de les diferents isoformes de la FPS d'*Arabidopsis thaliana* (Delourme *et al.*, 1994; Cunillera *et al.*, 1996; Cunillera *et al.*, 1997), de *Lupinus albus* (Attucci *et al.*, 1995a, b), *Parthenium argentatum* (Pan *et al.*, 1996), blat de moro (Li i Larkins, 1996), arròs (Sanmiya *et al.*, 1997), tomàquet (Gaffe *et al.*, 2000), *Abies grandis* (Tholl *et al.*, 2001), *Artemisia annua* (Souret *et al.*, 2003) i *Ginkgo biloba* (Wang *et al.*, 2004), entre d'altres.

L'alineament de les seqüències de les FPS de diferents organismes ha mostrat l'existència de set regions conservades, I a VII, on destaca la presència de dos dominis rics en aspartat (Koyama *et al.*, 1993; Szkopinska i Plochocka, 2005; Figura 9). S'ha vist que aquests dominis són una característica conservada en totes les (*E*)-preniltransferases (Chen *et al.*, 1994), mentre que no es troba en les *cis*- o (*Z*)-preniltransferases (Shimizu *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2002).

Els dominis rics en aspartat estan localitzats en les regions II i VI. El primer d'ells es denomina FARM (*First Aspartate Rich Motif*) i té una seqüència consens DDxx(xx)D (essent D aspartat i x qualsevol aminoàcid). Aquest motiu ha estat designat com la regió CLD (*Chain Length Determination*), doncs determina la longitud del

prenilfosfat resultant. El segon motiu, localitzat a la regió VII, es denomina SARM (*Second Aspartate Rich Motif*) i conté la seqüència DDxxD.

	I	II	FARM	III	IV	
<i>G.g.</i>	69..GGKCNRGLT	107..ELFQAFFLVA	DDI--MD	QSLTRRG	142..AINDSFLLLES	184..GQMLD
<i>H.s.</i>	55..GGKYNRGLT	93..ELLQAFFLVA	DDI--MD	SSLTRRG	128..AINDANLLEA	170..GQTLD
<i>S.c.</i>	50..GGKLNRLS	90..ELLQAYFLVA	DDM--MD	KSITRRG	125..AINDAFMLEA	167..GQLMD
<i>A.t.</i>	46..GGKLNRLS	84..EWLQAYFLVL	DDI--MD	NSVTRRG	119..AINDGILLRN	161..GQMID
<i>B.s.</i>	45..GGKRIRPLI	76..EMIHTYSLIH	DDLPSMD	NDDLRRG	115..A-GDGLLTYA	159..GQAAD

	V	VI	SARM	VII	
<i>G.g.</i>	214..KT	250..GEYFQIQ	DDYLD	CFGDPALTGK-VGTD	355..FLGLAQKIYKRQK
<i>H.s.</i>	200..KT	236..GEFFQIQ	DDYLD	LFGDPSVTGK-IGTD	341..FLGLARKIYKRRK
<i>S.c.</i>	197..KT	233..GEYFQIQ	DDYLD	CFGTPEQIGK-IGTD	340..LTAFLNKVYKRSK
<i>A.t.</i>	191..KT	226..GIYFQVQ	DDYLD	CFADPETLTK-IGTD	331..LKSFLAKIYKRQK
<i>B.s.</i>	183..KT	217..GLAFQIR	DDILD	IEGAEKIGKPVGSD	285..LAYICELVAARDH

Figura 9: Alineament de les seqüències aminoacídiques de les set regions conservades entre diverses FPS. Les set regions conservades estan enumerades I-VII, mentre que els quadres denominats FARM i SARM indiquen el primer i segon motiu ric en aspartat, respectivament. Els nombres de l'esquerra de les seqüències indiquen la posició del primer aminoàcid mostrat i en negreta s'indiquen els aminoàcids conservats en totes les seqüències. *G.g.*, *Gallus gallus*; *H.s.*, *Homo sapiens*; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *A.t.*, *Arabidopsis thaliana*; *B.s.*, *Bacillus stearothermophilus* (Szkopinska i Plochcka, 2005).

Per avaluar el paper dels aminoàcids d'aquestes regions es van dur a terme nombrosos experiments de mutagènesi dirigida. Els experiments realitzats per Joly i Edwards (1993) van mostrar que els aspartats conservats al domini FARM i les arginines de la regió II resulten aminoàcids crítics per l'eficiència catalítica de l'enzim, doncs la seva substitució produïa reduccions significatives en els valors de $V_{m\grave{a}x}$ sense afectar els valors de K_m per a GPP i IPP. Marrero *et al.* (1992) van mostrar que una mutació en el primer residu d'aspartat del domini SARM en la FPS de rata reduïa dràsticament el valor de K_m per l'IPP. Posteriorment, Song i Poulter (1994) van mostrar que mutacions en el primer i segon aspartat del SARM en la FPS de *S. cerevisiae* comportaven també reduccions en l'activitat catalítica. En conjunt, tots aquests resultats indicaven que els aspartats dels dominis FARM i SARM són crucials per l'activitat de l'enzim.

L'estructura tridimensional de la FPS de fetge de pollastre amb una resolució de 2,6 Å va ser la primera estructura 3D publicada d'una preniltransferasa (Tarshis *et al.*, 1994). Aquest enzim existeix com a homodímer, on cada monòmer presenta un plegament format exclusivament per 10 hèlix- α unides per *loops*, un tipus d'estructura que actualment es considera el plegament típic de les terpè sintases. El més característic d'aquesta estructura és la formació d'una cavitat central envoltada per les 10 hèlix- α , on es localitza el centre actiu de l'enzim. Cadascuna de les subunitats conté una cavitat que permet l'elongació de C₅ a C₁₅. En aquesta estructura, les regions II i VI on es troben els dominis FARM i SARM, queden situades en cares oposades de la cavitat central amb els residus d'aspartat orientats cap al seu interior. En la paret on es situa el centre actiu es localitzen dues depressions hidrofòbiques, la més profunda de les quals estaria adjacent al primer domini ric en aspartat (FARM) i podria ser el lloc d'unió a DMAPP i GPP; i l'altra, propera al SARM constituiria el lloc d'unió a IPP (Tarshis *et al.*, 1996). La mida de la cavitat hidrofòbica on es troba el centre actiu és la determinant de la longitud del producte resultant, doncs la substitució dels anells aromàtics de la Phe112 i la Phe113 de la FPS de pollastre (situades a les posicions -4 i -5 respecte del FARM) per l'hidrogen d'una alanina i el grup hidroxil d'una serina, resulten en la formació de productes de longitud superior (de fins a C₇₀). Aquests canvis comporten l'eliminació de l'impediment estèric dels anells aromàtics donant lloc a la formació d'un canal que augmenta la mida de la cavitat destinada al prenilfosfat sintetitzat (Tarshis *et al.*, 1994; Tarshis *et al.*, 1996). De forma contrària, les substitucions Ala116Trp i Asn144Trp que produeixen una reducció en la mida de la cavitat pel substrat al·lílic, comporten un increment en la $K_m(GPP)$ de fins a 1200 i 700 vegades respectivament, i resulten en una síntesi majoritària de GPP en lloc de FPP (Stanley Fernandez *et al.*, 2000).

5.2. Les FPS en plantes

Una de les característiques de les FPS de plantes, tal i com passa en altres gens de la via de síntesi d'isoprenoides, és la presència de petites famílies multigèniques. Alguns exemples són els següents: en *Artemisia annua* s'han aïllat fins a tres cDNAs que codifiquen FPS (Souret *et al.*, 2003), mentre que en *A. tridentata* s'han descrit 2 isoformes FPS i s'ha trobat una tercera seqüència altament homòloga però que presenta activitat crisantemildifosfat sintasa (Hemmerlin *et al.*, 2003b). En *Lupinus albus* s'han

clonat dos cDNAs que codifiquen FPS i que presenten un alt grau d'homologia a nivell de seqüència aminoacídica (Attucci *et al.*, 1995a). En *Parthenium argentatum* s'han clonat dos cDNAs per a FPS (Pan *et al.*, 1996). En tomàquet s'ha clonat un cDNA que codifica per una FPS, però per Southern blot s'ha detectat com a mínim una altra seqüència amb un alt grau d'homologia (Gaffe *et al.*, 2000). En *Ginkgo biloba* s'ha clonat un cDNA que codifica per la FPS, però les anàlisis de Southern blot indiquen la presència d'una petita família multigènica que codifica FPSs en aquesta espècie (Wang *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis thaliana*, model utilitzat en aquest estudi, existeixen dos gens que codifiquen per farnesildifosfat sintases: *FPS1* i *FPS2*. El gen *FPS1* conté 12 exons i 11 introns, mentre que *FPS2* conté 11 exons i 10 introns. Tal i com s'observa a la Figura 10, ambdós gens mostren una organització d'exons i d'introns molt similar, a excepció de l'exó 4 del gen *FPS2* que correspondria als exons 4 i 5 del gen *FPS1*. L'alineament de les seqüències entre els dos gens mostra que comparteixen un alt grau de similitud tant en les regions codificants (87% d'identitat) com en les seqüències intròniques (identitat >57%) (Cunillera *et al.*, 1996).

Mentre que el gen *FPS2* dona lloc a una única població de mRNA i a una única proteïna de 342 aminoàcids, el gen *FPS1* és un gen bifuncional amb inicis de transcripció alternatius que dona lloc a dues poblacions de RNAm diferents que generen les proteïnes FPS1S i FPS1L, de 343 i 384 aminoàcids respectivament. Les isoformes FPS1S i FPS1L són idèntiques en la seva seqüència a excepció de la regió NH₂-terminal, doncs la isoforma FPS1L conté una extensió de 41 aminoàcids en comparació amb FPS1S (Cunillera *et al.*, 1997). Les proteïnes FPS1S i FPS2 tenen una seqüència aminoacídica altament conservada amb una identitat del 90,6% i una similitud del 94,5% (Cunillera *et al.*, 1996).

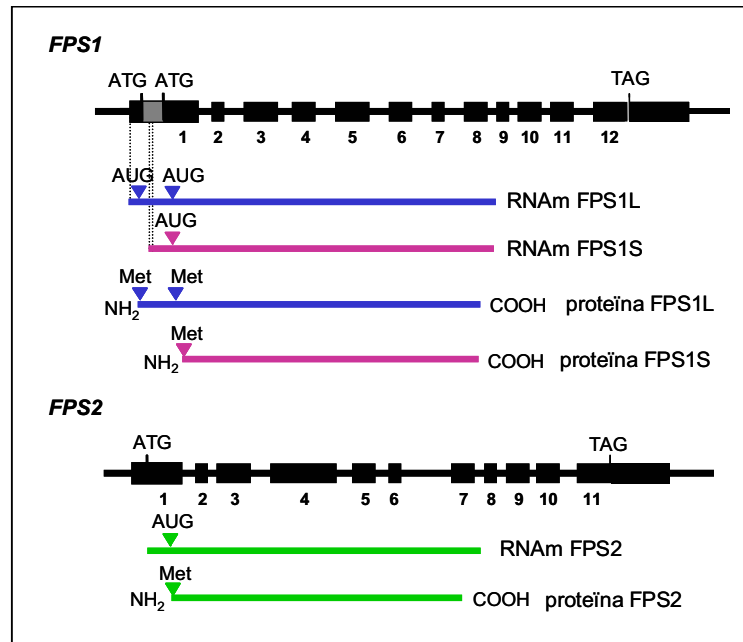


Figura 10: Representació esquemàtica de l'organització estructural dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*A. thaliana*. Les caixes negres representen els exons. La caixa grisa situada a l'exó 1 del gen *FPS1* representa la seqüència de nucleòtids que codifica l'extensió NH₂-terminal de l'isoenzim FPS1L. A sota de cada gen es representen els RNA_m i les proteïnes que codifiquen.

5.2.1. Localització subcel·lular de les FPS

Malgrat haver-se considerat una proteïna citosòlica, diversos estudis han mostrat que en mamífers, la FPS està localitzada majoritàriament als peroxisomes (Krisans *et al.*, 1994), tot i que també s'han detectat valors significatius d'activitat FPS en mitocondries de fetge de rata (Runquist *et al.*, 1994). En plantes, sembla que existeixi una major varietat pel que fa a la localització subcel·lular d'aquest enzim, tot i que en la majoria de casos s'ha proposat una localització citoplasmàtica de la FPS. En cultius cel·lulars de *Vitis vinifera* s'havia detectat activitat FPS en fraccions citosòliques però no en fraccions plastídiques (Feron *et al.*, 1990). En fruit de pebrot (*Capsicum annuum*) s'havia detectat, mitjançant anticossos anti-FPS, la presència de la proteïna FPS en la fracció citosòlica i no en la fracció plastídica (Hugueney *et al.*, 1996). En el cas de les isoformes FPS1 de tomàquet (Gaffe *et al.*, 2000) així com en les isoformes FPS1S i FPS2 d'*A. thaliana* no s'han detectat seqüències que suggereixin una localització que no sigui citosòlica.

En altres casos però, s'ha detectat en la seqüència de les FPS alguns dominis amb característiques de pèptids de trànsit, que dirigeixen la proteïna a orgànuls específics. Aquest és el cas de la isoforma FPS1L d'*A. thaliana*, que conté una extensió NH₂-terminal de 41 aminoàcids que és un pèptid de trànsit a mitocondries (Cunillera et al., 1997). Recentment, s'ha demostrat que aquest pèptid de trànsit és capaç de dirigir de forma específica la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*) a mitocondries en cèl·lules de fulles d'*A. thaliana*. També s'ha demostrat la localització mitocondrial d'aquesta proteïna *in planta* mitjançant experiments d'immunocitoquímica i microscopia electrònica en plantes d'*A. thaliana* que sobreexpressen constitutivament FPS1L (Manzano et al., 2006).

Altres estudis han demostrat la presència de FPS en cloroplastes d'arròs, blat de moro i tabac. Per una banda s'han aplicat tècniques d'immunocitoquímica i microscopia electrònica utilitzant anticossos generats contra pèptids sintètics corresponents a la FPS d'arròs, que han mostrat la presència de FPS en til·lacoides de fulles d'arròs. D'altra banda, mitjançant experiments de western blot utilitzant els mateixos anticossos s'ha detectat FPS en la fracció plastídica (i no en les fraccions citosòliques, mitocondrials ni microsomals) en protoplastes procedents de fulles de blat de moro i tabac. Concretament en el cas de l'arròs, el fet que l'isoenzim FPPS1 s'expressi en teixits verds i l'isoenzim FPPS2 en arrel, suggereix que el primer isoenzim seria el que es detecta en cloroplastes i el segon probablement tindria una localització citosòlica (Sanmiya et al., 1999). Finalment, s'ha immunodetectat la proteïna FPS en extractes proteics obtinguts a partir de partícules de làtex de *Parthenium argentatum*. Aquestes partícules s'acumulen en citòsol i vacuoles i són capaces de sintetitzar FPP (Pan et al., 1996).

5.2.2. Expressió espacial i temporal de les FPS

Diversos estudis mostren que els gens que codifiquen FPSs en plantes s'expressen de forma diferencial (Gaffe et al., 2000; Souret et al., 2003; Hugueney et al., 1996; Cunillera et al., 2000b).

En *A. thaliana*, l'expressió espacial i temporal de FPS1S i FPS2 es va analitzar fusionant les regions promotores dels gens *FPS1* i *FPS2* al gen reporter *uidA*, que codifica per la β -glucuronidasa (GUS) d'*E. coli*, per generar les construccions

quimèriques *FPS1S:GUS* i *FPS2:GUS*. En el cas del gen *FPS1* es va mutagenitzar el codó ATG de *FPS1L* per evitar la formació de transcrits *FPS1L-GUS*. Aquestes anàlisis van mostrar que el gen *FPS1* té una expressió molt intensa i generalitzada al llarg de tot el desenvolupament vegetatiu i de la fase reproductiva, mentre que el gen *FPS2* té un patró d'expressió més especialitzat en funció dels òrgans i dels estadis de desenvolupament (Figura 11 i Figura 12).

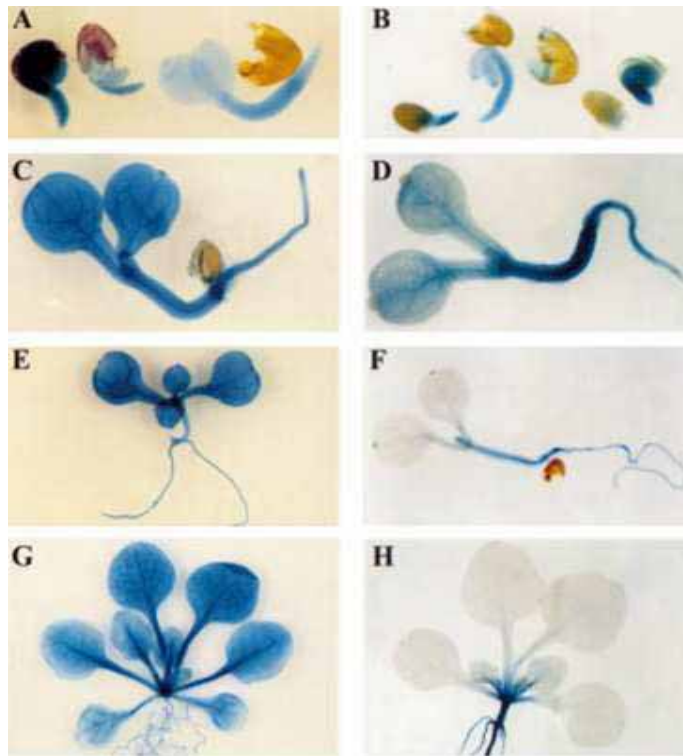


Figura 11: Anàlisi histoquímica d'activitat GUS durant el creixement vegetatiu de plantes d'*A.thaliana* transgèniques transformades amb els gens quimèrics *FPS1S:GUS* i *FPS2:GUS*. Les imatges A, C, E i G pertanyen a plantes portadores de *FPS1S:GUS* incubades 6h amb substrat GUS, mentre que les imatges B, D, F i H pertanyen a plantes portadores de *FPS2:GUS*, incubades 16h amb substrat GUS. A i B, seedlings d'entre 24-48 h després de la germinació. C i D, plàntules de 3 dies. E, plàntula de 5 dies. F, plàntula de 4 dies. G i H, plàntules de 15 dies (Cunillera *et al.*, 2000b).

Durant el desenvolupament vegetatiu, l'expressió del gen *FPS2* comença a desaparèixer dels cotilèdons uns 3 dies després de germinar i es manté a nivells molt baixos, pràcticament indetectables en fulles de roseta basal (Figura 11). En la fase

reproductiva, l'expressió de *FPS2* en estadis inicials de desenvolupament de les flors queda restringida bàsicament als grans de pol·len i apareix en la resta d'òrgans florals en el moment de la germinació, incrementant en la llavor durant la seva formació (Figura 12). Tot i que sembla no detectar-se expressió en llavors madures intactes, sí que es detecta una coloració blava intensa en seccions de llavors incubades amb substrat GUS (Cunillera *et al.*, 2000b).

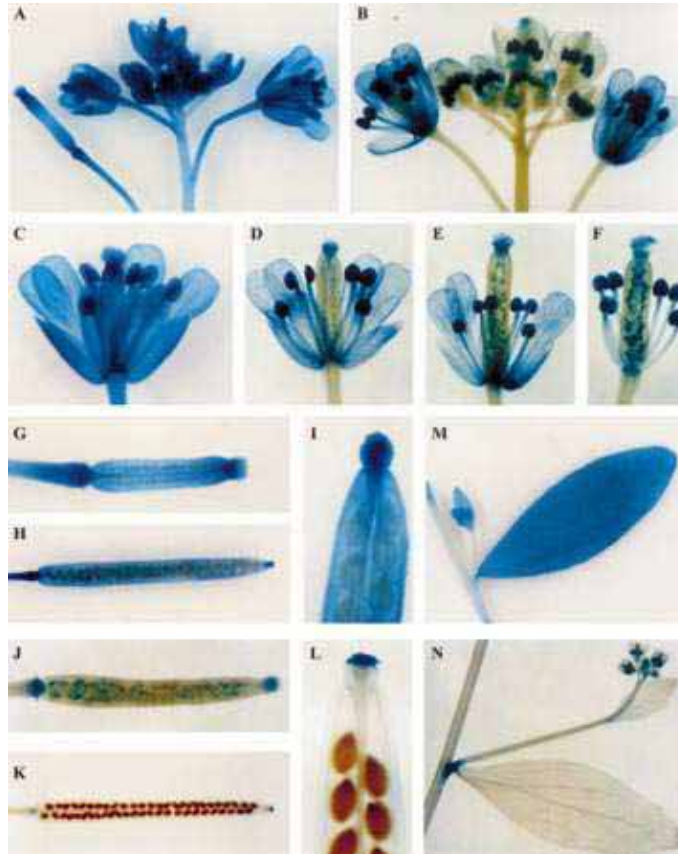


Figura 12: Anàlisi histoquímic d'activitat GUS durant la fase reproductiva de plantes d'*A.thaliana* transgèniques transformades amb els gens quimèrics *FPS1S:GUS* i *FPS2:GUS*. Les imatges A, C, G, H, I i M pertanyen a plantes portadores de *FPS1S:GUS* incubades 6h amb substrat GUS, mentre que les imatges B, D, E, F, J, L i N pertanyen a plantes portadores de *FPS2:GUS*, incubades 16h amb substrat GUS. A i B, inflorescències amb flors en diferents estadis de desenvolupament. C, D, E i F, flors en diferents estadis de maduració. G i J, siliques immadures. H i K, siliques madures. I i L, detall de la part superior de siliques madures. M i N, tiges secundàries i fulles caulinars (Cunillera *et al.*, 2000b).

5.2.3. Paper de la FPS en la regulació de la síntesi d'isoprenoides

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'HMGR és el principal enzim regulador del flux de la via del mevalonat, ara bé, no es descarta que altres enzims puguin estar implicats en el control de la via. El fet de proposar que la FPS en plantes pot desenvolupar un paper important en la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides es basa en que tant el substrat com el producte de la reacció catalitzada per la FPS són el punt de partida cap a nombroses ramificacions de la via que donen lloc a la síntesi d'una gran varietat de compostos isoprenoides. L'IPP citosòlic pot destinar-se a la síntesi de citoquinines, isopentenil-tRNAs, formar FPP, ser incorporat a les mitocondries per a la formació d'isoprenoides mitocondrials o fins i tot, en algunes situacions, pot formar part de l'intercanvi entre les vies del MVA (citosòlica) i del MEP (plastídica). Mentre que el FPP pot destinar-se a la síntesi d'esterols, brassinosteroides, fitoalexines sesquiterpèniques, dolícols, poliprenols o proteïnes prenilades. De manera que, variacions en l'activitat dels isoenzims FPS podrien alterar el repartiment dels substrats i del producte entre les diferents ramificacions.

Diversos treballs publicats suggereixen per a la FPS un paper regulador en la síntesi de determinats metabòlits secundaris d'origen isoprenoide, com ara les fitoalexines sesquiterpèniques. En dues espècies de cotó (*Gossypium arboreum* i *Gossypium australe*), i en resposta al tractament amb un el·licitor fúngic, s'han detectat increments en els nivells de RNAm de la FPS i en els nivells d'activitat FPS i de cadinè sintasa (sesquiterpè ciclasa) (Liu *et al.*, 1999). Un fet similar s'ha observat en fruits de pebrot després d'un tractament amb cel.lulasa. En aquest cas es produeix un increment dels nivells de RNAm, proteïna i activitat FPS, així com un augment en els nivells de RNAm de la 5-epiaristolòquè sintasa, enzim implicat en la síntesi de capsidiol. Paral·lelament, quan es tracten els fruits amb cel.lulasa es produeix una disminució de la incorporació de mevalonat cap a la síntesi d'esterols, probablement per una disminució en l'activitat SQS (Hugueney *et al.*, 1996).

En cultius d'arrels d'*Artemisia annua* s'ha observat un increment dels nivells de RNAm de FPS a mesura que el cultiu entra en fase exponencial, moment que coincideix amb el contingut màxim d'artemisina en arrels, una lactona sesquiterpènica efectiva en el tractament de la malària (Souret *et al.*, 2003). En concordança amb aquests resultats hi ha dos estudis en els quals s'ha sobreexpressat la FPS de *Gossypium arboreum* (Chen *et al.*, 2000) i la FPS endògena (Han *et al.*, 2006) en plantes d'*A. annua*. En ambdós

casos s'ha incrementat el contingut d'artemisina fins a un 1-0,9% (pes sec) respecte als 0,3% i 0,65% inicials, respectivament.

Són menys abundants les publicacions en les quals s'analitza el paper de la FPS en la regulació de la síntesi dels metabòlits primaris. S'havia vist que la sobreexpressió de la FPS de *S. cerevisiae* en plantes transgèniques de tabac provoca un increment de fins a 4 vegades en la síntesi d'esterols. En aquestes plantes però, incrementen paral·lelament els nivells de carotenoides i xantofil·les (Daudonnet *et al.*, 1997). També s'havia observat que la sobreexpressió de la FPS endògena en llevat dóna lloc a un increment en els nivells d'ergosterol sense que hi hagi alteracions en l'activitat HMGR (Szkopinska *et al.*, 2000). Posteriorment, i mitjançant experiments de mutagènesi dirigida, s'ha aconseguit modular el nivell d'activitat FPS en *S. cerevisiae*. Aquests experiments han mostrat que la pèrdua d'un 80% d'activitat FPS respecte el control, resulta en una disminució en la síntesi d'ergosterol d'aproximadament el 50%. En soques que presenten entre 3-20% d'activitat FPS, tot i mantenir els mateixos nivells d'ergosterol, s'observa una afectació gradual en les seves taxes de creixement. Aquests resultats mostren una correlació entre l'activitat FPS, els nivells d'ergosterol i la fisiologia de la cèl·lula de llevat (Karst *et al.*, 2004).

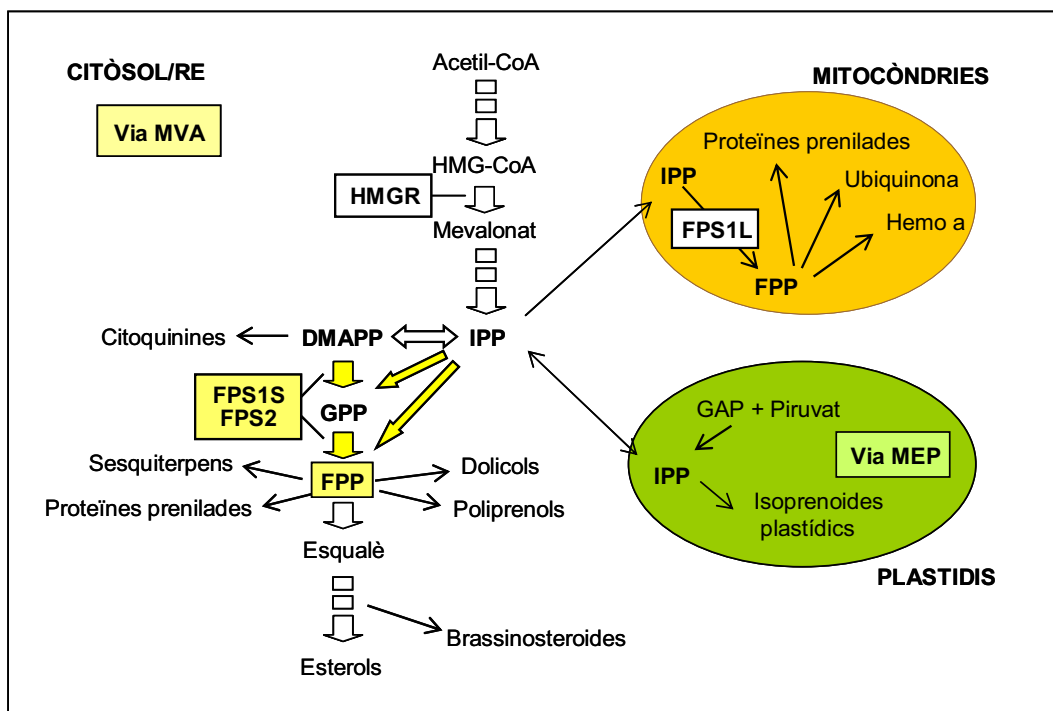


Figura 13: Esquema simplificat de la síntesi d'isoprenoides en plantes.

En *Arabidopsis thaliana*, s'han realitzat estudis utilitzant plantes transgèniques que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS1L d'*Arabidopsis* (Masferrer *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2004; 2006). En les plantes que sobreexpressen l'isoenzim FPS1S, malgrat assolir nivells d'activitat FPS notablement superiors en comparació amb les plantes control, els nivells d'esterols no pateixen alteracions. Les plantes que sobreexpressen FPS1S es caracteritzen per mimetitzar un fenotip de resposta hipersensible en absència d'atac per patògens. Presenten l'aparició de lesions necròtiques en fulles, senescència prematura en fulles separades de la planta i una reducció considerable de la mida de la roseta basal. El fenotip de senescència prematura va acompanyat de la inducció en fulles verdes del gen *SAG12*, que codifica per una cisteïna-proteasa i és considerat un marcador de senescència natural. Aquest fenotip pot ser explicat per la devallada en els nivells de citoquinines del tipus zeatina que es produeix en aquestes plantes. A partir dels resultats obtinguts es va proposar que el consum d'IPP degut a la sobreexpressió de FPS1S, juntament amb el fet que no incrementés l'activitat HMGR, estava provocant una devallada en els nivells d'IPP/DMAPP disponibles per a la síntesi de citoquinines.

D'altra banda, també es va detectar que en la sobreexpressió de FPS1S, l'aparició de les lesions necròtiques a les fulles correlacionava amb l'acumulació d'H₂O₂, l'expressió dels gens *PR-1* (*Pathogenesis Related-1*) i la inducció del gen *AOX 1a* (*Alternative OXidase-1a*). A partir d'aquests últims resultats, es va proposar que la disminució de l'IPP citosòlic degut a la sobreexpressió de FPS1S redueix la quantitat d'IPP que pot ser incorporat a les mitocondries, de manera que això resulta en un dèficit d'isoprenoides mitocondrials, ja sigui com a components de les cadenes de transport electrònic o per a la prenilació de proteïnes. Aquesta alteració es considera la responsable de l'acumulació d'H₂O₂, la formació d'espècies d'oxigen reactives (ROS) causants del fenotip necròtic i la inducció de *AOX 1a*.

L'aparició de les lesions necròtiques a les fulles correlaciona amb els nivells d'activitat FPS, doncs es va veure quant més alt era el valor d'activitat, abans es manifestava el fenotip. A més a més, es va veure que la lesió es produeix sempre a partir d'un cert estadi de desenvolupament, mai en fulles joves. Donat que es coneix que l'activitat HMGR disminueix a mida que la fulla va madurant, i queda restringida als marges foliars en les fulles madures, es va poder establir una correlació entre l'activitat HMGR i el patró espacial i temporal d'aparició de les lesions. De fet, en aquestes

plantes, el moment en el que es desencadena la lesió ve donat pel desequilibri que produeix la disminució d'activitat HMGR en front d'uns nivells molt alts d'activitat FPS. El fet que tant la sobreexpressió simultània de la isoforma HMGR1S en les plantes que sobreexpressen FPS1S, com l'aportació de MVA al medi reverteixi tots els fenotips descrits anteriorment, concorda amb les hipòtesis proposades en aquests treballs.

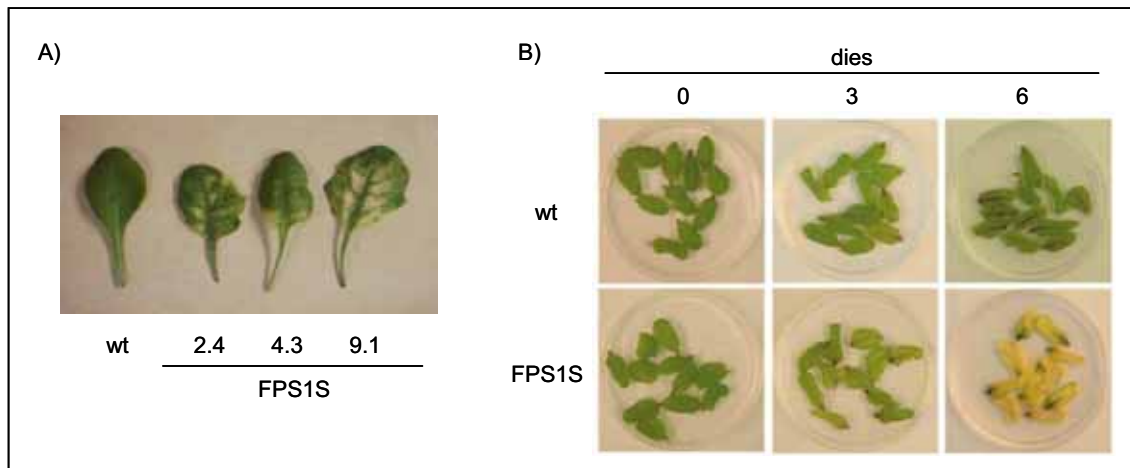


Figura 14: Fenotip de les plantes que sobreexpressen FPS1S. A) Lesions necròtiques en fulles de plantes que sobreexpressen FPS1S (línies 2.4, 4.3 i 9.1) en comparació amb plantes control (adaptat de Masferrer *et al.*, 2002). B) Experiment de *detachment* en fulles verdes en estadis de desenvolupament equivalents incubades en aigua destil·lada durant els temps indicats (adaptat de Manzano *et al.*, 2004).

Treballs més recents del nostre grup han demostrat que les plantes d'*Arabidopsis* que sobreexpressen l'isoenzim FPS1L manifesten símptomes de clorosi i mort cel·lular que correlaciona amb una acumulació d' H_2O_2 (Manzano *et al.*, 2006). Aquestes plantes també presenten senescència prematura i alteració del perfil de citoquinines. La disminució en els nivells de certs tipus de citoquinines i el fenotip de senescència prematura desapareixen quan se sobreexpressa simultàniament la isoforma HMGR1S i per tant s'incrementa el flux d'intermediaris de la via. Això estaria d'acord amb que la seva aparició podria ser deguda també a una reducció dels nivells d'IPP/DMAPP disponibles per a la síntesi de citoquinines. Ara bé, l'increment d'intermediaris en plantes dobles transgèniques que sobreexpressen HMGR1S i FPS1L no reverteix el fenotip cloròtic, possiblement produït per l'acumulació de quantitats tòxiques de FPP o

derivats a la mitocòndria. En les plantes que sobreexpressen FPS1L no es produeix cap alteració en els nivells d'esterols.

Totes aquestes observacions destaquen novament la importància de la regulació del repartiment d'intermediaris entre les diferents branques de la via, i no descarten un possible paper regulador de les FPS en la via del mevalonat en *A. thaliana*.

OBJECTIUS

Les farnesildifosfat sintases catalitzen la condensació de dues molècules d'IPP amb una molècula de DMAPP per produir FPP (C₁₅). Tant els substrats com el producte de la reacció catalitzada per les FPS ocupen una posició molt important en la via del mevalonat de síntesi d'isoprenoides, ja que són punt de partida de nombroses ramificacions cap a la síntesi de diversos productes finals. A *A. thaliana* existeix una petita família multigènica integrada pels gens *FPS1* i *FPS2*, que codifiquen tres isoenzims FPS: FPS1S, FPS1L i FPS2. L'isoenzim FPS1L conté un pèptid de trànsit que li confereix una localització mitocondrial, mentre que FPS1S i previsiblement FPS2, tenen una localització citosòlica. A l'inici d'aquest treball, en el nostre laboratori s'havien clonat els gens *FPS1* i *FPS2*, i s'havien definit els seus patrons d'expressió espacial i temporal mitjançant l'anàlisi de plantes transgèniques portadores de gens quimèrics formats pels promotors d'ambdós gens fusionats al gen reporter *uidA* d'*E. coli*. També s'havia estudiat el paper dels isoenzims FPS1S i FPS1L en la via del mevalonat a través de la caracterització de plantes transgèniques que sobreexpressaven aquests isoenzims. La localització de l'isoenzim FPS1L a les mitocòndries ja és, en sí mateixa, una evidència d'especialització funcional. En el cas dels isoenzims FPS1S i FPS2, el fet de pensar en l'existència d'una especialització funcional deriva dels seus patrons d'expressió especialitzats.

Tenint en compte aquests antecedents, els objectius que ens vam plantejar en aquesta tesi van ser analitzar el paper de l'isoenzim FPS2 en la via del mevalonat, obtenir evidències de la possible especialització funcional dels isoenzims FPS1S i FPS2, i eventualment, establir les bases moleculars i bioquímiques d'aquesta especialització.

Per tal d'assolir els objectius proposats, es van plantejar uns abordatges experimentals basats en l'obtenció i caracterització de mutants d'*Arabidopsis thaliana* amb guany i pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*. Per una banda, mitjançant l'estudi dels efectes de la sobreexpressió de l'isoenzim FPS2 i de la sobreexpressió simultània dels isoenzims FPS1S i FPS2. D'altra banda, a través de l'anàlisi de mutants *knock-out* per als gens *FPS1* i *FPS2* i del doble mutant *fps1:fps2*. Aquests abordatges es van complementar amb l'estudi dels efectes de l'expressió de proteïnes FPS quimèriques en *A. thaliana* (*domain swapping*), l'elaboració de models estructurals

Objectius _____

tridimensionals dels isoenzims FPS1S i FPS2 i l'anàlisi dels perfils d'expressió gènica en mutants amb pèrdua de funció dels enzims HMGR i FPS.

RESULTATS

1. Generació i caracterització de línies mutants d'*Arabidopsis thaliana* amb guany de funció de l'isoenzim FPS2 i anàlisi comparatiu amb mutants amb guany de funció de l'isoenzim FPS1S

1.1. Generació de plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques que sobreexpressen constitutivament l'isoenzim FPS2

Amb l'objectiu d'estudiar els efectes de la sobreexpressió de l'isoenzim FPS2 d'*Arabidopsis thaliana*, es van generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis* amb sobreexpressió constitutiva d'aquest isoenzim. Les plantes transgèniques es van generar utilitzant la tècnica del *floral dip* (Clough i Bent, 1998) i una soca d'*Agrobacterium tumefaciens* prèviament transformada amb el plasmidi p35SFPS2. Aquest plasmidi conté el cDNA de FPS2 clonat sota el control del promotor constitutiu *35S CaMV* en el vector pBI121 (apartat 4.1.1 de materials i mètodes). Per tal de seguir els mateixos criteris que es van utilitzar en la construcció realitzada per generar plantes transgèniques amb sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S (Masferrer *et al.*, 2002), en el plasmidi p35SFPS2 es van afegir a l'extrem 3' del cDNA FPS2, 525 pb de la seqüència genòmica flanquejant per tal d'incorporar els senyals de poliadenilació.

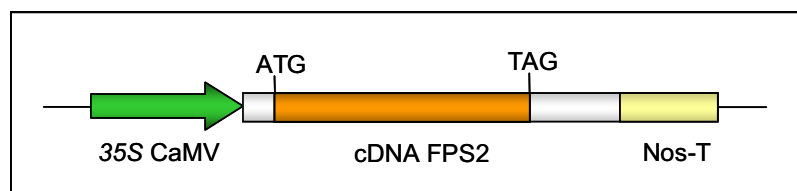


Figura 15: Esquema de la construcció utilitzada per a la generació de plantes transgèniques que sobreexpressen constitutivament l'isoenzim FPS2. En color taronja s'indica la regió codificant FPS2. Les caixes blanques indiquen les regions 5' i 3' flanquejants. 35S CaMV: promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor. Nos-T: terminador del gen de la Nopalina sintasa.

Un cop realitzat el procés d'infiltració de plantes de l'ecotip Columbia 3 (Col. 3) amb la construcció desitjada, es van seleccionar línies portadores del transgèn gràcies a la capacitat de créixer en presència de kanamicina, donat que el T-DNA inserit

incorpora el gen *NPTII* que confereix resistència a aquest antibiòtic. Posteriorment, es va estudiar la segregació del caràcter de resistència per tal d'escollir línies homozigòtiques per al transgèn.

En les plantes resistents es va comprovar que hi hagués un augment de la quantitat de proteïna FPS2 mitjançant experiments de western blot utilitzant anticossos anti-FPS d'*Arabidopsis*. Aquests anticossos havien estat generats contra l'isoenzim FPS1S però tenen la capacitat de reconèixer els tres isoenzims FPS d'*Arabidopsis*. Els experiments de western blot es van realitzar en el sobrenedant de 200 x g d'extractes proteics de plàntules de 2 setmanes. Tal i com s'observa a la Figura 16, en tots els carrils, l'anticòs reconeix una proteïna d'aproximadament 40 kD, que es correspon amb la massa molecular predita per als isoenzims FPS1S i FPS2. En la majoria d'extractes corresponents a les línies transgèniques s'observa un increment de la proteïna detectada per l'anticòs, en comparació amb la proteïna detectada en l'extracte de la mostra control. De manera que, tot i que l'anticòs no és específic per a FPS2, l'increment de proteïna detectat és atribuïble a la sobreexpressió d'aquest isoenzim.

A partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi per western blot, es van seleccionar 4 línies transgèniques que mostraven increments notables de proteïna FPS2 per realitzar els assajos d'activitat enzimàtica i comprovar així que la proteïna sobreexpressada era funcional. Les línies transgèniques escollides van ser les següents: 1.10, 3.6, 6.1 i 7.2.

Els assaigs d'activitat FPS es van realitzar en el sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes de 6 setmanes. Les 4 línies transgèniques assajades van mostrar nivells superiors d'activitat FPS en comparació amb les plantes control, assolint entre 3 i 6 vegades l'activitat detectada en extractes de plantes *wild type* (Figura 16).

A partir d'aquests resultats es van seleccionar les línies 3.6 i 7.2 per continuar l'estudi. Mitjançant experiments de Southern blot genòmic es va confirmar la integració del T-DNA en un únic locus del genoma en les dues línies seleccionades (resultats no mostrats).

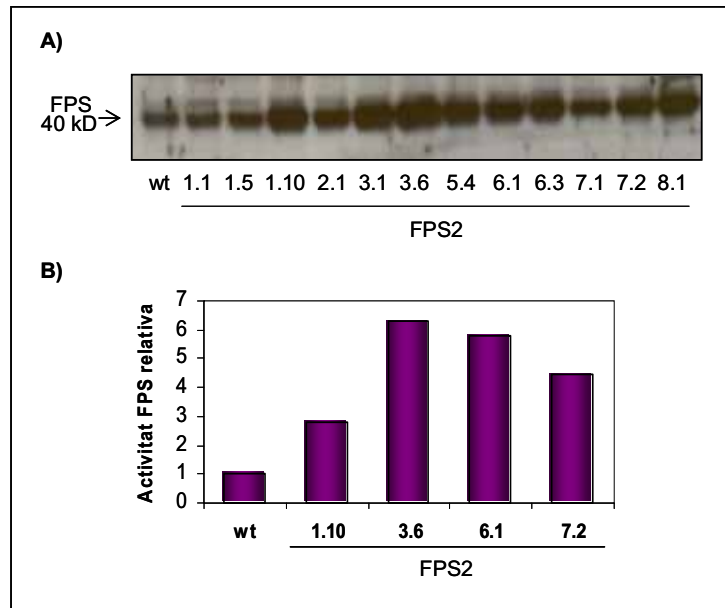


Figura 16: Caracterització de les línies transgèniques que sobreexpressen constitutivament l'isoenzim FPS2. A) Anàlisi per western blot realitzat en el sobrenedant de 200 x g d'extractes de plàntules de 2 setmanes de diferents línies que sobreexpressen l'isoenzim FPS2, i de plantes control. B) Activitat FPS relativa en el sn 16.000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes de 6 setmanes de les línies transgèniques 1.10, 3.6, 6.1 i 7.2 i de plantes control. L'activitat FPS de les plantes transgèniques s'expressa en relació a l'activitat FPS de les plantes control, a la qual s'ha atribuït el valor d'1.

1.2. La sobreexpressió constitutiva de l'isoenzim FPS2 no causa alteracions en el fenotip de les plantes transgèniques

Tal i com s'ha descrit a la introducció, les plantes que sobreexpressen l'isoenzim FPS1S mostren un fenotip que mimetitzava la resposta hipersensible, que es caracteritza per l'aparició de lesions necròtiques a les fulles (Figura 14) i per una disminució de la mida de la roseta basal. A més, s'observa senescència prematura quan les fulles verdes es separen de la planta (experiments de *detachment*). Les lesions necròtiques s'han relacionat amb un increment de la producció d' H_2O_2 a les fulles (Manzano *et al.*, 2004), mentre que la senescència prematura està relacionada amb la davallada de citoquinines, concretament les formes actives de les citoquinines de tipus zeatina (Masferrer *et al.* 2002).

Amb l'objectiu de veure si al sobreexpressar l'isoenzim FPS2 es produeixen fenotips similars als descrits anteriorment, es van analitzar les característiques fenotípiques de plantes de les línies FPS2 3.6 i 7.2 cultivades sota diferents condicions d'il·luminació (dia curt, dia llarg i llum contínua).

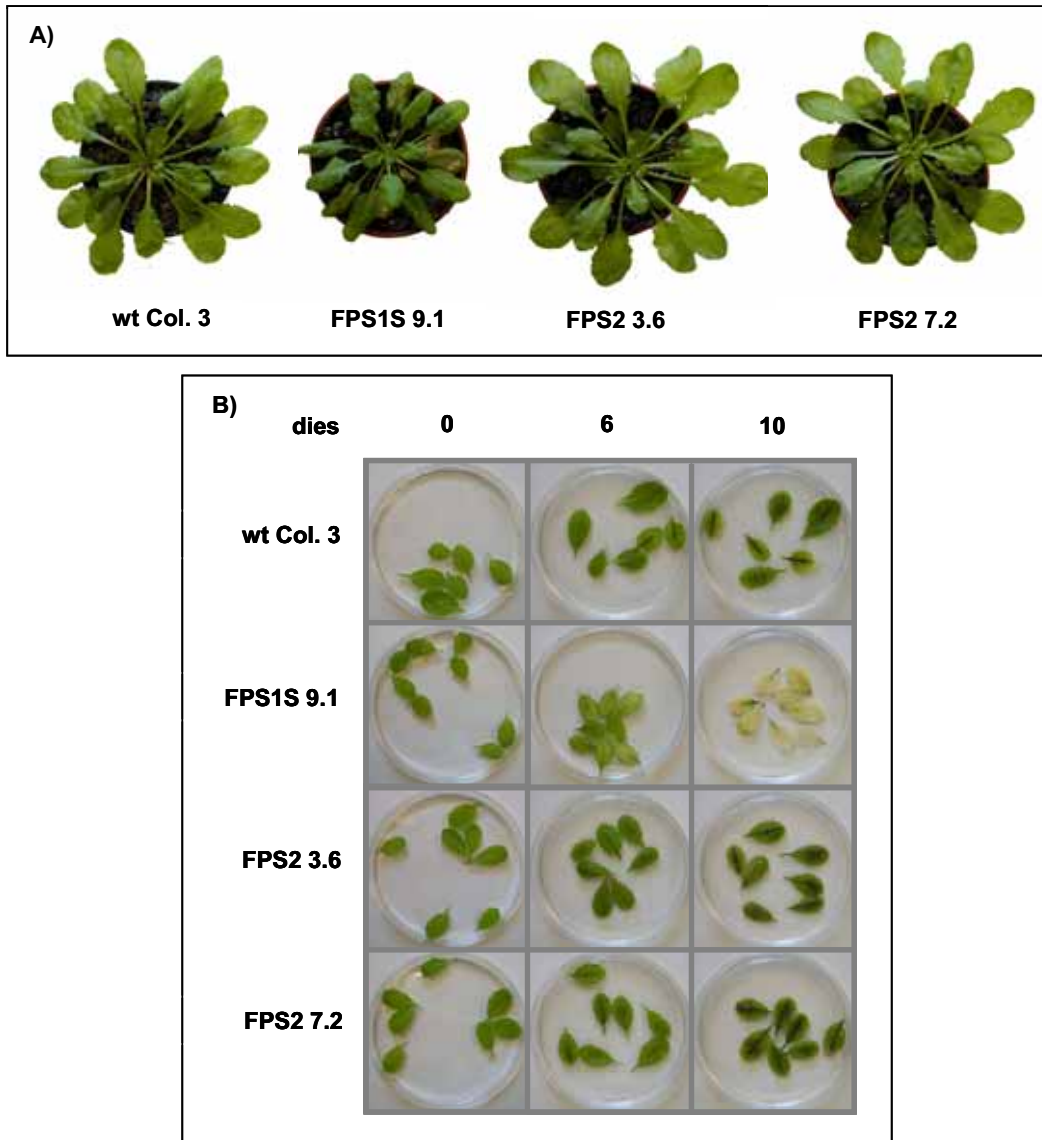


Figura 17: Caracterització fenotípica de plantes transgèniques que sobreexpressen FPS2. A) Imatge de la roseta basal de plantes que sobreexpressen FPS2 en comparació amb les de plantes que sobreexpressen FPS1S i de plantes *wild type*, crescudes sota un fotoperíode de dia curt. Totes les imatges estan a la mateixa escala. B) Fulles completament verdes de roseta basal en un estadi de desenvolupament equivalent van ser tallades de plantes *wild type* (Col.3) i de plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S (línia 9.1) i FPS2 (línies 3.6 i 7.2), i incubades en aigua destil·lada en condicions de dia curt durant els intervals de temps indicats.

L'observació detallada d'aquestes plantes no va permetre detectar l'aparició de lesions necròtiques a les fulles ni alteracions en la mida de la roseta basal sota cap de les condicions lumíniques provades, així com tampoc es va detectar l'aparició de qualsevol altre tipus d'alteració del fenotip que pogués diferenciar les plantes que sobreexpressen FPS2 de les plantes control (Figura 17; A).

Paral·lelament, amb l'objectiu d'investigar la possible aparició de senescència prematura, es van dur a terme experiments de *detachment* en fulles verdes de roseta basal en un estadi de desenvolupament equivalent. Tal i com s'observa a la Figura 17; B, després de 10 dies d'incubació en aigua destil·lada, les fulles de les plantes que sobreexpressen FPS2 es mantenen verdes com les fulles de les plantes *wild type*, i a diferència de les fulles de les plantes que sobreexpressen FPS1S, que ja han entrat clarament en senescència.

Totes aquestes observacions permeten concloure que els efectes de la sobreexpressió de l'isoenzim FPS2 són totalment diferents als efectes de la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S.

1.3. Localització subcel·lular mitjançant immunocitoquímica i microscopia electrònica de l'isoenzim FPS2 sobreexpressat a *A. thaliana*

En la seqüència aminoacídica dels isoenzims FPS1S i FPS2 no s'ha identificat la presència de cap senyal que pugui donar pistes sobre la localització d'aquestes proteïnes en un compartiment subcel·lular concret, a diferència del que passa amb l'isoenzim FPS1L que conté un pèptid de trànsit a mitocòndries. Estudis previs realitzats en el nostre laboratori, ja havien confirmat la localització citosòlica de FPS1S (Manzano, 2003). Amb l'objectiu d'establir si l'isoenzim FPS2 sobreexpressat té la mateixa localització subcel·lular que FPS1S, es van realitzar estudis d'immunolocalització en microseccions de fulles de plàntules que sobreexpressen constitutivament FPS2. Microseccions de fulles de plantes que sobreexpressen FPS1S i de plantes *wild type* van ser utilitzades com a controls.

Talls inferiors a 1 mm³ de fulles de plàntules cultivades 15 dies en medi estèril es van sotmetre a un procés de criofixació i criosubstitució en la resina Lowicryl HM20. A continuació, seccions de 50 nm obtingudes per ultramicrotomia van ser tractades per

immunocitoquímica utilitzant l'anticòs policlonal anti-FPS com a anticòs primari i l'anticòs secundari unit a Proteïna A conjugada amb partícules d'or. Finalment, les mostres, un cop contrastades amb acetat d'uranil, van ser observades en un microscopi electrònic de transmissió JEOL 1010. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 18.

En les imatges obtingudes en les mostres *wild type* s'observen les partícules d'or que identifiquen les FPS endògenes tant en el citòsol com a les mitocondries [localització subcel.lular de l'isoenzim FPS1L (Manzano *et al.*, 2006)]. D'altra banda, en les mostres de plantes amb sobreexpressió de FPS1S i FPS2 s'observa un clar increment del nombre de partícules d'or en el citòsol amb una distribució aparentment uniforme. Cal destacar que, quantitativament, l'increment detectat tant en les plantes que sobreexpressen FPS1S com en les que sobreexpressen FPS2, és coherent amb els increments d'activitat FPS mesurats en aquestes plantes transgèniques en comparació amb les plantes *wild type*.

Dels resultats obtinguts es pot concloure que l'isoenzim FPS2 sobreexpressat té la mateixa localització subcel.lular que l'isoenzim FPS1S, doncs ambdós es detecten distribuïts uniformement en el citòsol.

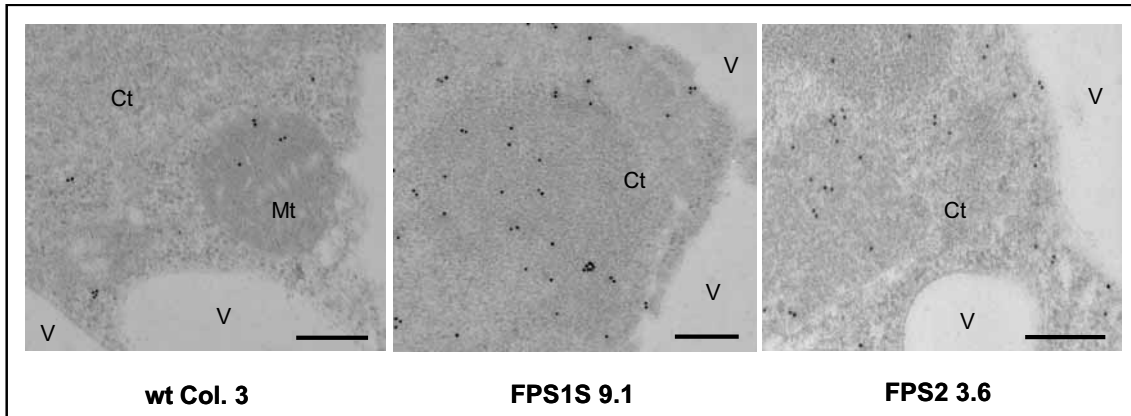


Figura 18: Localització subcel.lular de la proteïna FPS mitjançant immunocitoquímica en microseccions de fulles de plantes *wild type* i de plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS2. Ct, citòsol; Mt, mitocondria; V, vacuola. Les barres representen 200 nm.

1.4. Anàlisi dels productes de la reacció catalitzada pels isoenzims FPS1S i FPS2 sobreexpressats a *A. thaliana*

Amb l'objectiu d'investigar si els dos isoenzims citosòlics de la FPS sobreexpressats a *A.thaliana* catalitzen la síntesi del mateix producte, i que en ambdós casos el producte generat és FPP, es van dur a terme assaigs d'activitat FPS *in vitro* en extractes de fulles de plantes que sobreexpressaven FPS1S, FPS2 i de fulles de plantes control, i es van analitzar els productes de reacció. Els productes de reacció es van defosforilar enzimàticament amb fosfatasa àcida i es van separar per cromatografia en capa fina utilitzant un suport de Silicagel 60 com a fase estacionària i una mescla de benzè:acetat d'etil (7:1) com a fase mòbil (apartat 10.4 de materials i mètodes.). Simultàniament, es van cromatografiar patrons de geraniol (C₁₀), farnesol (C₁₅) i esqualè (C₃₀), la detecció dels quals es va dur a terme revelant la placa cromatogràfica amb vapors de iode.

En el panell B de la Figura 19 es mostra el resultat que prové d'assaigs d'activitat realitzats en el sn 16000 x g. En aquesta cromatografia s'observa la presència d'un únic producte generat en mostres provinents d'extractes tant de les plantes control com de les línies de sobreexpressió de FPS2 i FPS1S analitzades. El producte generat presenta la mateixa mobilitat relativa que el patró de farnesol. La quantitat de farnesol detectada és molt més elevada en les mostres FPS1S i FPS2, tal i com és previsible per tractar-se de mostres de línies sobreexpressores.

Per tal d'excloure la possibilitat que en el sn 16000 x g es pogués haver perdut alguna proteïna o factor que contribuís a metabolitzar de forma diferencial el FPP sintetitzat pels isoenzims FPS1S i FPS2, es van repetir els assaigs d'activitat FPS, però en aquest cas emprant el sn 200 x g d'extractes de fulles de les línies FPS1S 4.3 i FPS2 3.6. El resultat mostrat en el panell C de la Figura 19 demostra que en ambdós casos té lloc la síntesi d'un únic producte amb la mateixa mobilitat que el patró de farnesol.

En conjunt, aquests experiments permeten concloure que els isoenzims FPS1S i FPS2 sobreexpressats a *A. thaliana* catalitzen la síntesi del mateix producte de reacció, el farnesildifosfat.

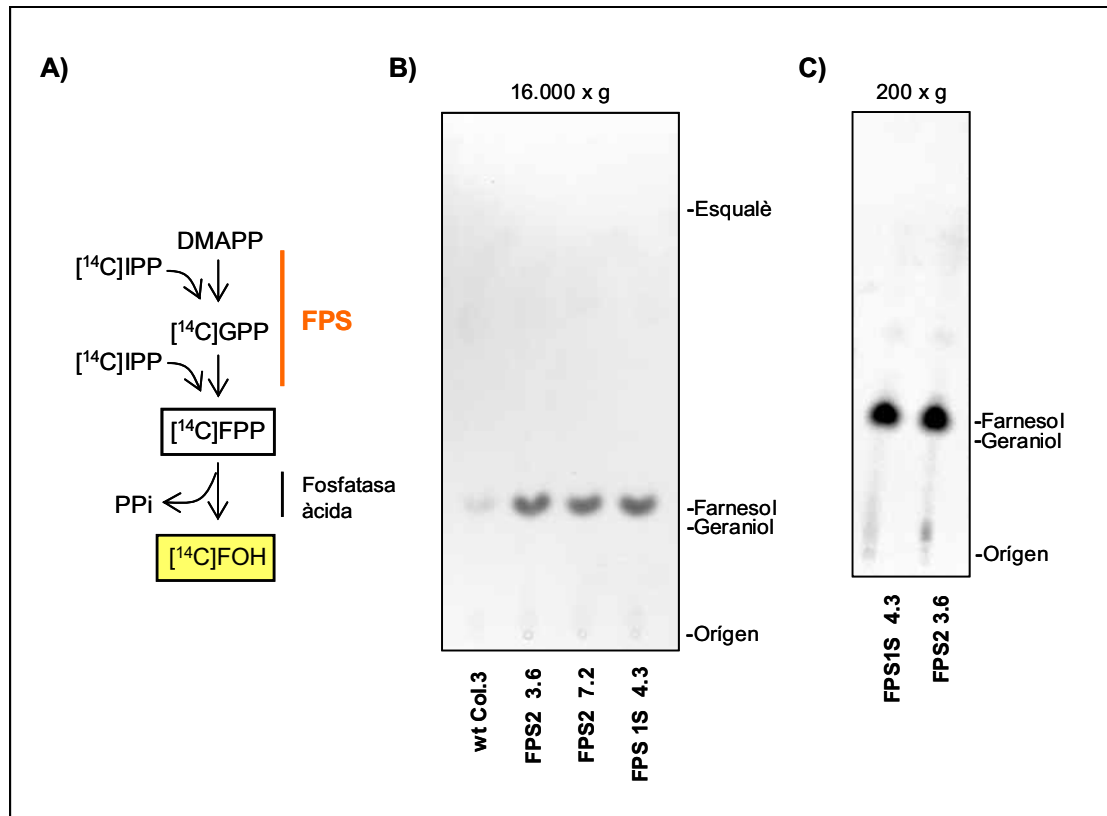
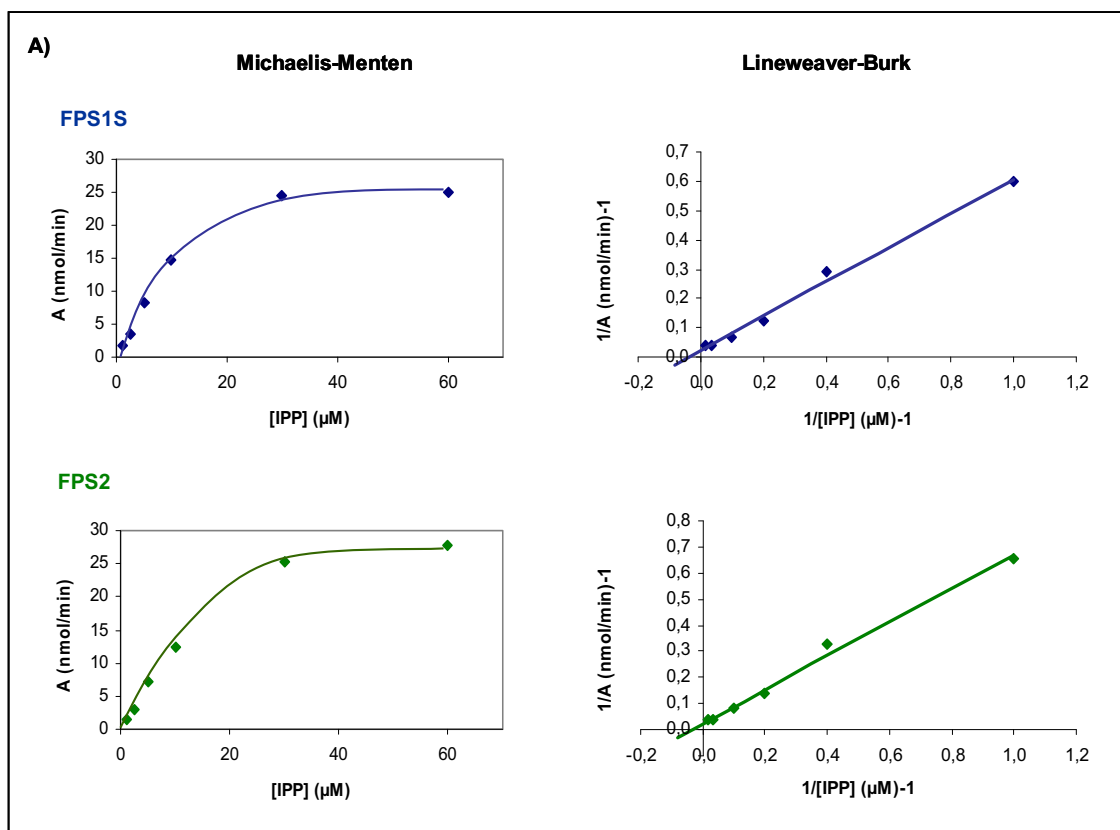


Figura 19: Anàlisi per cromatografia en capa fina (TLC) dels productes derivats de la reacció catalitzada pels isoenzims FPS1S i FPS2. A) Esquema de la reacció catalitzada en l'assaig *in vitro* de l'activitat FPS, incloent la posterior defosforilació del FPP per produir farnesol (FOH). B) Anàlisi per TLC dels productes generats en un assaig d'activitat FPS de 10 min en el sn 16.000 x g. C) Anàlisi per TLC dels productes generats en un assaig d'activitat FPS de 2h en el sn 200 x g. Per a la TLC s'han utilitzat plaques de Silicagel 60 (*Merck*) com a fase estacionària i una mescla de benzè/acetat d'etil (7:1) com a fase mòbil. A la dreta de les imatges s'indica la mobilitat dels patrons de geraniol (C₁₀), farnesol (C₁₅) i esqualè (C₃₀). La detecció dels productes radioactius s'ha realitzat mitjançant un *Phosphorimager STORM 840* (*Molecular Dynamics*).

1.5. Estudi del comportament cinètic dels isoenzims FPS1S i FPS2 sobreexpressats en *A. thaliana*

Per tal d'obtenir informació sobre si les diferències fenotípiques observades entre les plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS podrien atribuir-se a un comportament cinètic diferencial d'aquests isoenzims, es va procedir a determinar els valors de K_m aparents pels substrats IPP, GPP i DMAPP. Amb aquest objectiu es van realitzar determinacions d'activitat FPS en presència de concentracions creixents dels substrats IPP (1-2,5-5-10-30-60 μM), GPP (6,25-12,5-25-50-100 μM) i DMAPP (7,5-15-30-60-120-200 μM), mantenint constant la concentració del segon substrat de la reacció (IPP variable amb GPP 200 μM , GPP variable amb IPP 60 μM i DMAPP variable amb IPP 120 μM). Aquests experiments es van dur a terme en sobredants de 16.000 x g obtinguts a partir d'extractes de fulles de roseta basal de plantes que sobreexpressen FPS1S i FPS2. A partir de les corresponents representacions de dobles recíprocs (Lineweaver-Burk) (Figura 20) es van calcular els valors de K_m aparents que es mostren a la Taula 2.



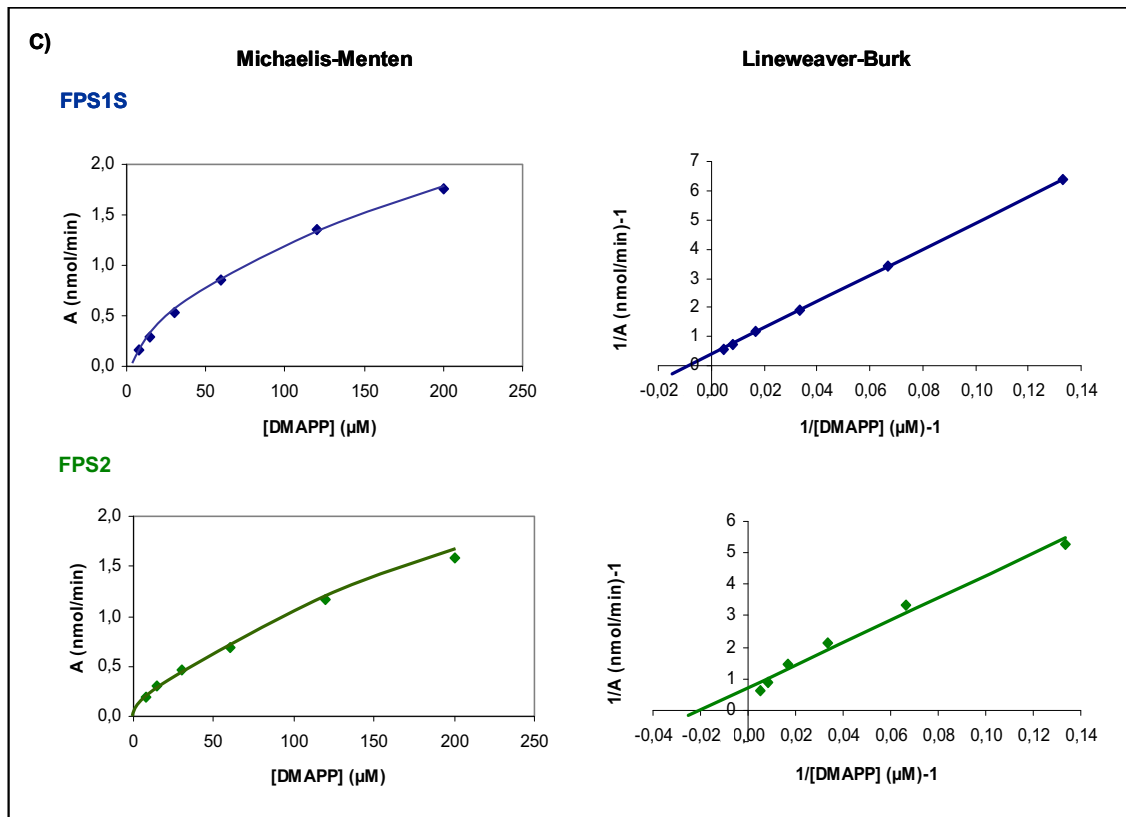
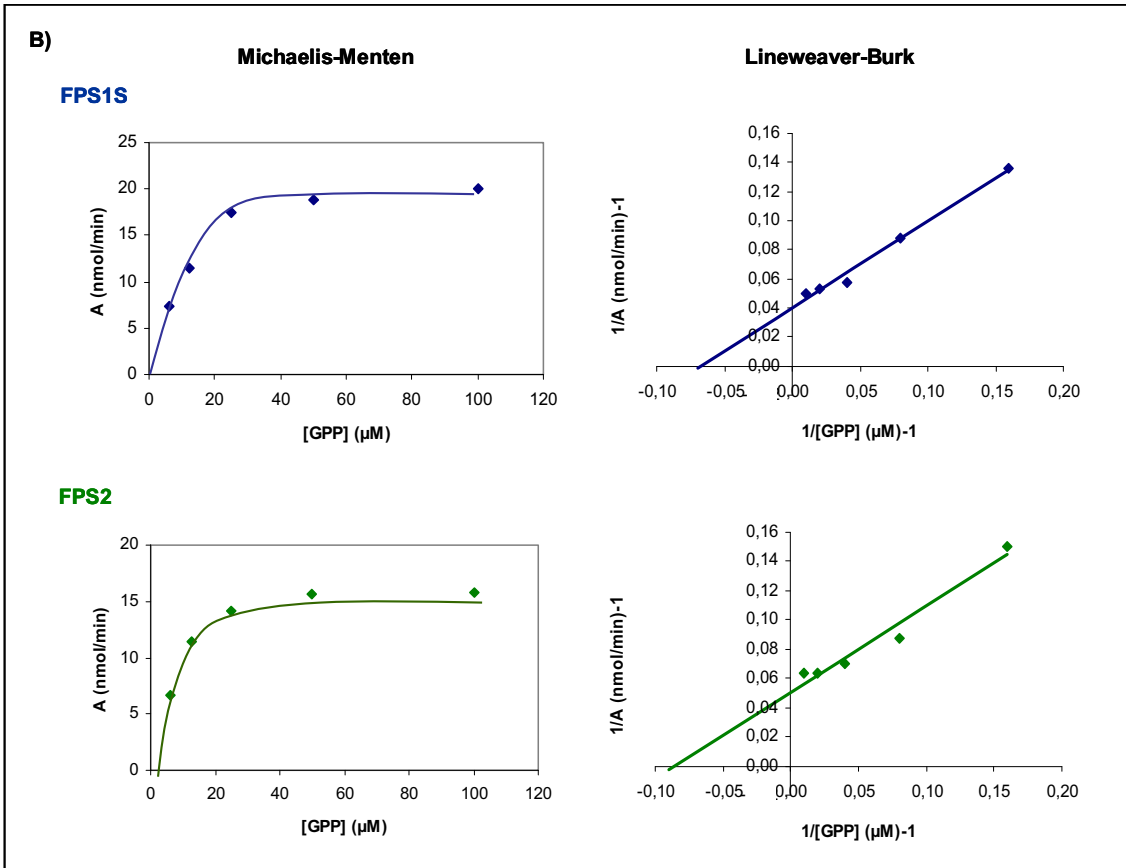


Figura 20: Representacions de Michaelis-Menten i Lineweaver-Burk per als substrats IPP (A), GPP (B) i DMAPP (C) en les mostres corresponents a les plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS2.

Com es pot apreciar a la Taula 2, els valors de K_m pels substrats IPP i GPP són molt similars en els dos extractes, mentre que els valors obtinguts per al substrat DMAPP són lleugerament més diferents, tot i que es mantenen dins del mateix ordre de magnitud.

K_m (μM)			
	<u>IPP</u>	<u>GPP</u>	<u>DMAPP</u>
FPS1S	25,1	14,9	116,7
FPS2	25,8	11,6	49,4

Taula 2: Valors de K_m aparents pels substrats IPP, GPP i DMAPP en extractes de plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS2. Aquests valors han estat calculats a partir de les representacions de Lineweaver-Burk mostrades a la Figura 20.

Aquests resultats semblen indicar que els dos isoenzims FPS no presenten diferències significatives d'afinitat pels diferents substrats que puguin explicar les diferències fenotípiques observades al sobreexpressar-los en *Arabidopsis*. En qualsevol cas, s'ha de tenir present que aquests valors de K_m no s'han obtingut utilitzant preparacions purificades de cadascun dels isoenzims, sinó que s'han emprat extractes de fulles que contenen una mescla dels dos isoenzims, tot i que un d'ells és el majoritari com a conseqüència de la sobreexpressió. Per aquesta raó, es considera que les dades obtingudes tenen valor a efectes comparatius entre els dos extractes, però en cap cas es poden utilitzar per definir les constants cinètiques de cada isoenzim.

1.6. La sobreexpressió de l'isoenzim FPS2 no altera els valors d'activitat HMGR ni el contingut d'esterols en plantes d'*A. thaliana*

La reacció catalitzada per l'enzim HMGR es considera el punt més important en el control de la via del mevalonat. Per aquesta raó es va investigar si la sobreexpressió de FPS2 tenia algun efecte sobre els nivells d'activitat enzimàtica HMGR. Amb aquest

objectiu es van dur a terme assaigs d'activitat HMGR en el sn 200 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes que sobreexpressen FPS2 i de plantes control. Els resultats obtinguts van indicar que la sobreexpressió de FPS2 no causa alteracions en els valors d'activitat HMGR en comparació amb les plantes control (resultats no mostrats).

Tenint en compte, com ja s'ha comentat anteriorment, que els esterols són els productes finals majoritaris de la via del mevalonat, i amb l'objectiu d'investigar si l'isoenzim FPS2 té un paper limitant en la síntesi d'aquests compostos, es va determinar el perfil i el contingut d'esterols totals acumulats en fulles de les plantes que sobreexpressen FPS2. Les mostres analitzades van ser obtingudes a partir de fulles de roseta basal de plantes crescudes durant 8 setmanes sota un fotoperíode de dia curt. L'anàlisi es va dur a terme per cromatografia de gasos després de l'extracció d'esterols totals (lliures i esterificats) tal i com es detalla en l'apartat 11 de materials i mètodes.

Els resultats obtinguts (Taula 3) indiquen que la sobreexpressió de FPS2 no es tradueix en un increment significatiu del contingut total d'esterols respecte al contingut de les plantes control, ni tampoc provoca canvis en quant a la proporció relativa dels diferents intermediaris i esterols finals identificats.

	wt Col. 3	FPS2 3.6
	%	%
colesterol	5,4	5,1
24-metilencolesterol	0,5	0,7
campesterol	10,8	10,7
estigmasterol	0,8	1,2
obtusifoliol	2,5	2,4
β-amirina	2	1,4
sitosterol	67,2	67,4
isofucosterol	4,4	4,9
cicloartenol	1,9	2,2
24-metilencicloartanol	2	1,3
24-etilidenlofenol	2,5	2,7
Esterols totals		
(mg/g pes sec)	2,46	2,77

Taula 3: Contingut total (mg/g p.s.) i perfil d'esterols (% p/p) en fulles de plantes d'*A. thaliana wild type* i de plantes transgèniques que sobreexpressen FPS2. Les anàlisis s'han realitzat per duplicat, utilitzant en cada cas fulles de roseta basal de la mateixa edat procedents de 8 plantes diferents cultivades sota un fotoperíode de dia curt durant 8 setmanes. Es mostra el resultat d'un experiment representatiu.

Resultats previs obtinguts anteriorment en el nostre grup havien demostrat que la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S tampoc causa alteracions en el nivell total i el perfil d'esterols, ni en els nivells d'activitat HMGR (Masferrer *et al.*, 2002). En conseqüència, aquestes dades, juntament amb els resultats obtinguts en aquest treball, permeten concloure que la reacció catalitzada per les FPS, ja sigui FPS1S o FPS2, no és limitant per la síntesi d'esterols en *A. thaliana*.

2. Generació i caracterització de línies mutants d'*A. thaliana* que sobreexpressen simultàniament els isoenzims FPS1S i FPS2

Donat que les plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS2 per separat mostren fenotips diferents, i amb la finalitat d'investigar els efectes de la sobreexpressió simultània d'ambdós isoenzims FPS, es van obtenir plantes doblement transgèniques amb sobreexpressió simultània de FPS1S i FPS2 mitjançant la introducció del transgèn *35S::FPS1S* en plantes que ja sobreexpressaven l'isoenzim FPS2 (apartat 4.1.2 de materials i mètodes). Les línies dobles transgèniques van ser seleccionades per la seva resistència als antibiòtics kanamicina i higromicina, resistències associades a cadascun dels transgens. Mitjançant l'estudi de la segregació del caràcter de resistència a higromicina es van seleccionar plantes homozigòtiques que havien incorporat el segon T-DNA en un únic locus del genoma. Aquestes plantes es van anomenar D2+1S.

Per tal de comprovar que en les plantes seleccionades, hi havia sobreexpressió dels dos cDNAs FPS, es va procedir a analitzar l'expressió dels corresponents mRNAs per RT-PCR. Es va extreure RNA total de fulles de diferents línies D2+1S (1.1, 13.1, 15.1, 15.4 i 19.1), que va ser retrotranscrit i del qual se'n van amplificar dos fragments de 1110 pb i 1083 pb corresponents als cDNAs de FPS1S i FPS2 respectivament, utilitzant les parelles de *primers* anomenats FPS1fwd/FPS1rev i FPS2fwd/FPS2rev (apartat 8.2 de materials i mètodes). En paral·lel, es va extreure i processar de la mateixa manera RNA total de fulles de plantes *wild type* i de plantes de sobreexpressió dels isoenzims FPS1S i FPS2 per separat, que va ser utilitzat com a control. Tal i com es pot veure en la Figura 21, després de 35 cicles d'amplificació, les bandes corresponents als fragments de cDNA de FPS1S i FPS2 són clarament visibles en totes les línies dobles transgèniques seleccionades. Ara bé, el nombre de cicles de PCR utilitzats no és suficient per detectar l'amplificació dels transcrits FPS endògens en les mostres corresponents a plantes *wild type*, així com tampoc es detecta el cDNA FPS2 en la línia FPS1S 9.1, ni el cDNA FPS1S en la línia FPS2 3.6.

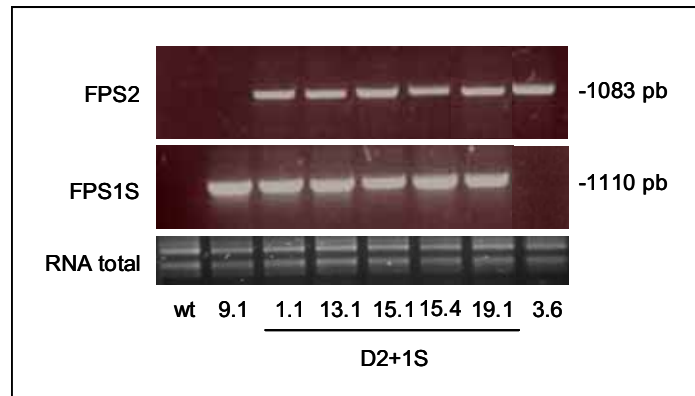


Figura 21: Amplificació per RT-PCR de fragments de cDNA corresponents a FPS1S i FPS2 en plantes dobles transgèniques D2+1S. En la imatge superior es mostra l'amplificació d'un fragment de 1083 pb del cDNA FPS2 amb la parella de *primers* FPS2fwd/FPS2rev. En la imatge central es mostra l'amplificació d'un fragment de 1110 pb del cDNA FPS1S amb la parella de *primers* FPS1fwd/FPS1rev. En la imatge inferior es mostra el RNA total obtingut de plantes control (wt), plantes transgèniques FPS1S (línia 9.1) i FPS2 (línia 3.6) i plantes de diferents línies dobles transgèniques D2+1S (1.1, 13.1, 15.1, 15.4 i 19.1) tenyit amb bromur d'etidi. Els resultats corresponen a l'amplificació obtinguda després de 35 cicles de PCR.

Un cop comprovada l'expressió dels dos transgens en les línies dobles transgèniques seleccionades, es van mesurar els nivells d'activitat FPS. Es van realitzar assaigs d'activitat FPS en fraccions de sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes dobles transgèniques cultivades durant 8 setmanes en condicions de dia curt. Els resultats obtinguts (Figura 22) mostren que en totes les línies analitzades s'assoleixen uns valors d'activitat enzimàtica FPS superiors als valors obtinguts en les línies transgèniques simples que sobreexpressen els isoenzims FPS2 (línia 3.6) i FPS1S (línia 9.1) per separat. Els valors d'activitat FPS en les línies D2+1S són entre 1,5-2,6 vegades superiors als valors d'activitat de la línia FPS2 3.6 (fons genètic en el qual s'ha introduït el transgèn *35S::FPS1S*). D'altra banda, és interessant destacar que els valors d'activitat específica total en els extractes de les 5 línies dobles transgèniques assajades superen, en tots els casos, el valor d'activitat FPS assolit en la línia FPS1S 9.1 (Figura 22; B).

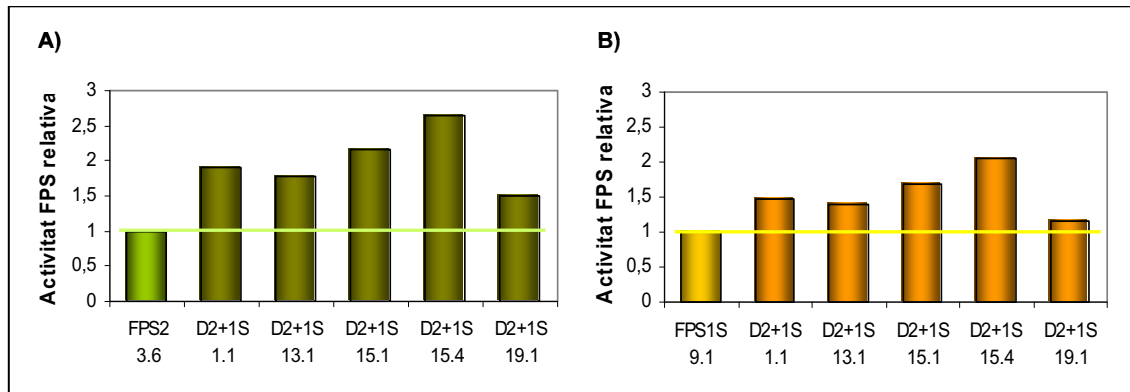


Figura 22: Activitat FPS relativa en plantes dobles transgèniques D2+1S, respecte a les plantes que sobreexpressen individualment FPS2 (línia 3.6) (A) i FPS1S (línia 9.1) (B). L'activitat FPS ha estat mesurada en el sn 16.000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes cultivades durant 8 setmanes en condicions de dia curt. L'activitat FPS de les línies D2+1S s'expressa en relació a l'activitat FPS de les plantes transgèniques simples a les quals s'ha atribuït el valor d'1.

Pel que fa referència al fenotip, en totes les línies transgèniques D2+1S es van detectar lesions necròtiques amb el mateix aspecte i el mateix patró espacial d'aparició que les produïdes per la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S (Figura 23). Les lesions s'iniciaven a la zona central de les fulles, entre els nervis, i avançaven progressivament cap als marges foliars.

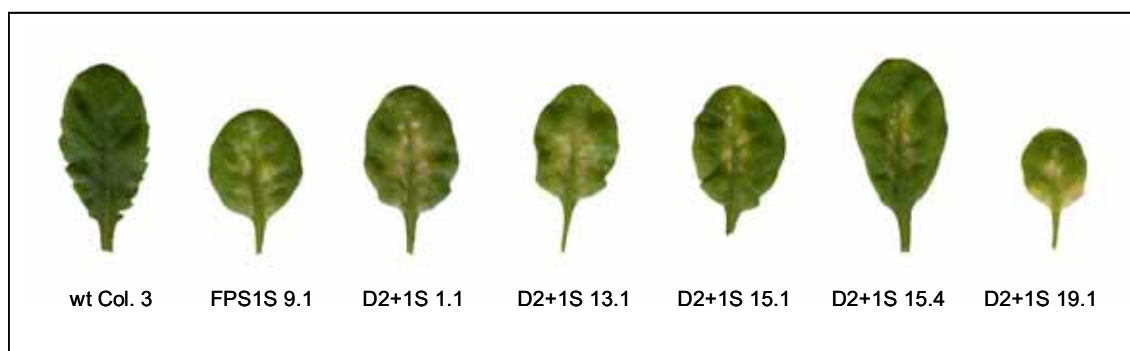


Figura 23: Detall de les lesions necròtiques observades a les fulles de les plantes dobles transgèniques D2+1S en comparació amb fulles de plantes *wild type* (Col.3) i FPS1S (línia 9.1).

Aquestes línies, a més a més de les lesions necròtiques presents a les fulles, mostraven diferents mides de la roseta basal. En plantes que sobreexpressaven l'isoenzim FPS1S s'havia observat una correlació directa entre els increments d'activitat FPS de les plantes sobreexpressores, la intensitat de les lesions necròtiques a les fulles i la reducció de la mida de les rosetes basals (Masferrer *et al.*, 2002). En el cas de les plantes D2+1S, s'ha vist que aquests fenotips no correlacionen amb l'activitat FPS total, tot i que s'ha pogut establir una relació entre la mida de les rosetes basals i l'increment d'activitat atribuïble a l'isoenzim FPS1S sobreexpressat. Per establir aquesta relació s'han fet els següents càlculs: als valors d'activitat específica obtinguts per a cada línia doble transgènica, se n'ha restat el valor d'activitat deguda a les FPS endògenes (valor obtingut en les mostres control *wt*) i el valor d'activitat degut a la sobreexpressió de FPS2, doncs totes les línies D2+1S s'han generat a partir de plantes de la línia 3.6 que sobreexpressen l'isoenzim FPS2. S'ha considerat que els valors resultants corresponien a l'activitat atribuïble a la sobreexpressió de FPS1S. Finalment, per tal de facilitar-ne la comparació, els valors d'activitat atribuïts a la sobreexpressió de FPS1S s'han expressat en relació a l'activitat FPS de la línia transgènica FPS1S 9.1, a la que s'ha atribuït el valor d'1 (Figura 24).

Els resultats mostren novament l'existència d'una correlació directa entre la mida de la roseta basal i el nivell de sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S. Tal i com podem observar a la Figura 24, la línia D2+1S 13.1 (Activitat FPS relativa: x 0,7) i la línia 19.1 (x 0,5) amb valors d'activitat deguda a la sobreexpressió de FPS1S sensiblement inferiors als assolits per la línia FPS1S 9.1, mostren un diàmetre de la roseta basal més similar a les plantes que sobreexpressen FPS2 que no pas a les que sobreexpressen FPS1S. D'altra banda, les línies D2+1S 1.1 (Activitat FPS relativa: x 1,1), D2+1S 15.1 (x 1,6) i D2+1S 15.4 (x 2,5), amb increments d'activitat similars o sensiblement superiors als assolits per la línia FPS1S 9.1, mostren unes rosetes basals amb una reducció considerable de mida en comparació amb les plantes FPS2. En el cas de la línia D2+1S 15.4, la reducció de la mida de la roseta basal s'aprecia fins i tot quan es compara amb les plantes FPS1S 9.1.

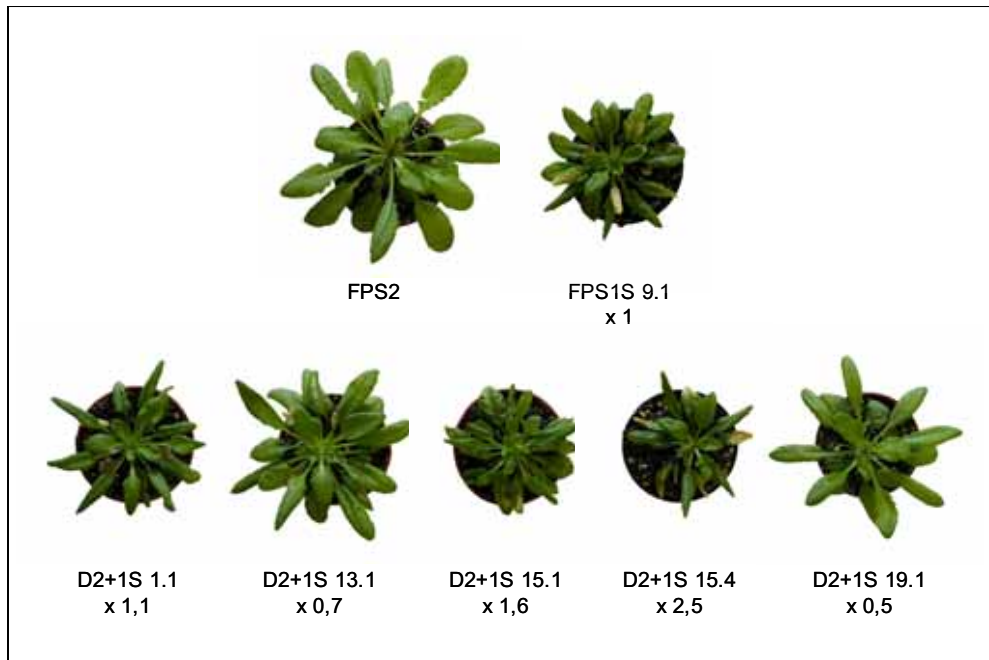


Figura 24: Relació entre el fenotip de les plantes dobles transgèniques D2+1S i l'increment d'activitat atribuïble a la sobreexpressió de FPS1S. A sota de cada planta s'indiquen els valors d'activitat FPS atribuïts a la sobreexpressió de FPS1S, expressats en relació a l'activitat FPS de la línia FPS1S 9.1 a la que s'ha donat el valor d'1. Totes les imatges estan a la mateixa escala.

D'aquest bloc de resultats podem concloure que la sobreexpressió simultània dels isoenzims FPS2 i FPS1S no accentua el fenotip característic de la sobreexpressió de FPS1S, és a dir, no el fa més sever ni el fa aparèixer abans, així com tampoc fa aparèixer cap altre tipus de fenotip diferent. El fenotip que apareix en les dobles transgèniques correlaciona perfectament amb l'increment d'activitat atribuïble a l'enzim FPS1S sobreexpressat.

3. Sobreexpressió de proteïnes quimèriques generades per intercanvi de regions entre els isoenzims FPS1S i FPS2

Els resultats presentats fins aquest punt indiquen que els isoenzims FPS1S i FPS2 sobreexpressats en plantes catalitzen *in vitro* la síntesi del mateix producte (FPP), tenen la mateixa localització subcel·lular (citòsol) i mostren un comportament cinètic molt similar. Malgrat tot, els efectes de la seva sobreexpressió són marcadament diferents. Per aquest motiu, i amb l'objectiu de començar a investigar les possibles causes dels efectes diferencials observats, es van generar construccions per sobreexpressar proteïnes FPS quimèriques obtingudes per intercanvi de diferents regions entre els isoenzims FPS1S i FPS2 (*domain swapping*).

Per tal de generar les construccions quimèriques, es van dividir de forma arbitrària els cDNA que codifiquen per FPS1S i FPS2 en 3 regions, aprofitant les dianes de restricció internes Hind III i Pst I. La regió situada més cap a 5' codifica l'extrem NH₂-terminal (regió A) i comprèn els 86 primers aminoàcids de FPS1S (85 aa en el cas de FPS2), constituint el 25% de la proteïna. Aquesta regió conté 13 aa diferents entre FPS1S i FPS2 (85% d'identitat). La regió central codifica, en ambdós casos, per 181 aminoàcids (el 53% de la proteïna, regió B). En aquesta regió hi ha 12 aa diferents entre els dos isoenzims i per tant una identitat del 93%. La tercera regió codifica l'extrem C-terminal (regió C), consta de 74 aa i representa el 22% de la proteïna. Amb la presència de 9 aa diferents entre FPS1S i FPS2, en aquesta regió hi ha un 88% d'identitat en la seqüència aminoacídica.

	(Hind III)		(Pst I)
regions	A	B	C
aminoàcids	86/85 aa	181 aa	74 aa
identitat	85%	93%	88%

Figura 25: Representació esquemàtica de les tres regions en que s'han dividit els isoenzims FPS1S i FPS2. Entre parèntesi s'indiquen les dianes de restricció utilitzades per dividir els corresponents cDNAs. A sota s'indica el nombre d'aminoàcids i el percentatge d'identitat entre cada regió dels dos isoenzims.

Es van generar 3 quimeres en les quals les regions A, B i C de la proteïna FPS1S es van substituir per les corresponents regions de FPS2, donant lloc a les quimeres Q1, Q3 i Q5; i 3 quimeres en les quals les regions A, B i C de FPS2 es van substituir per les regions corresponents de FPS1S, donant lloc a les quimeres Q2, Q4 i Q6. En la Figura 26 es representen esquemàticament les quimeres FPS generades.

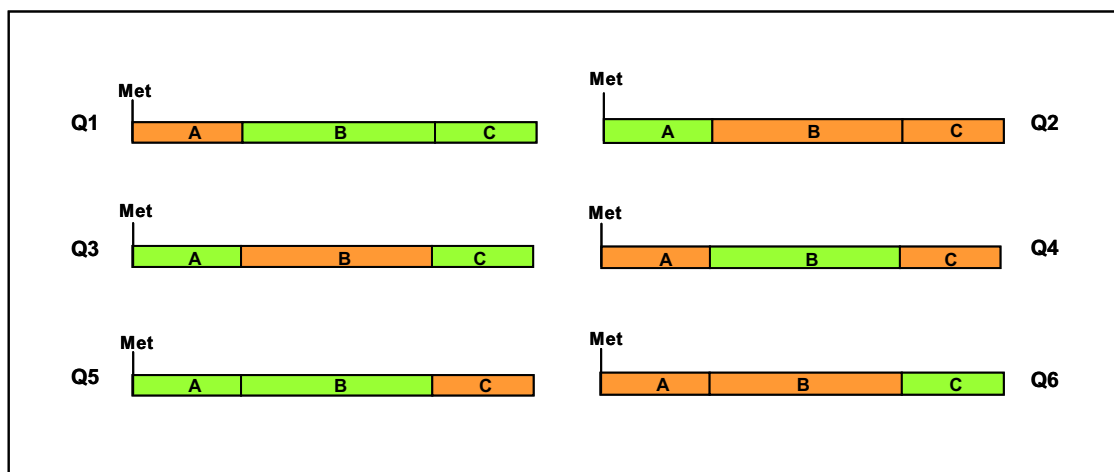


Figura 26: Representació esquemàtica de les 6 FPS quimèriques resultants d'intercanviar les regions A, B i C entre FPS1S i FPS2. En color taronja es representen les regions corresponents a FPS1S i en color verd, les corresponents a FPS2.

3.1. Complementació funcional de la soca CC25 de *Saccharomyces cerevisiae* amb les proteïnes FPS quimèriques d'*Arabidopsis*

Abans d'estudiar els efectes de la sobreexpressió de les quimeres FPS en plantes d'*A. thaliana* es va comprovar que les sis construccions generades donaven lloc a proteïnes catalíticament actives. Al nostre laboratori es disposava de la soca CC25 de *Saccharomyces cerevisiae*, defectiva en activitat farnesildifosfat sintasa degut a una mutació en el gen *ERG20*. Aquesta mutació impedeix que es produeixi la segona etapa de la reacció catalitzada per la FPS de llevat, de manera que aquesta soca adquireix la capacitat de secretar geraniol al medi (Blanchard i Karst, 1993). Degut a la mutació *erg20-2*, la soca CC25 és un mutant termosensible auxotròfic per l'ergosterol a 36°C. Així doncs, aquesta soca permetia comprovar la funcionalitat de les quimeres FPS

mitjançant un assaig de complementació de l'auxotrofia per l'ergosterol a la temperatura restrictiva de 36°C.

En primer lloc, es van clonar els sis cDNAs quimèrics i el cDNA de FPS2 (com a control positiu de complementació) en el vector d'expressió en llevat pJR1133 (Cunillera *et al.*, 2000a). La soca CC25 es va transformar amb els plasmidis resultants, denominats pJQ1, pJQ2, pJQ3, pJQ4, pJQ5, pJQ6 i pJFPS2, i amb el mateix vector pJR1133 buit, com a control negatiu de complementació. Per tal de seleccionar els llevats transformats es van utilitzar plaques de medi YNB suplementat amb triptòfan i ergosterol, però sense uracil ja que el vector pJR1133 incorpora el marcador de selecció URA3 (apartat 13 de materials i mètodes).

El test de complementació funcional es va fer analitzant la capacitat de creixement dels diferents llevats transformats a 28°C i 36°C en medi complet (YPG) sense ergosterol.

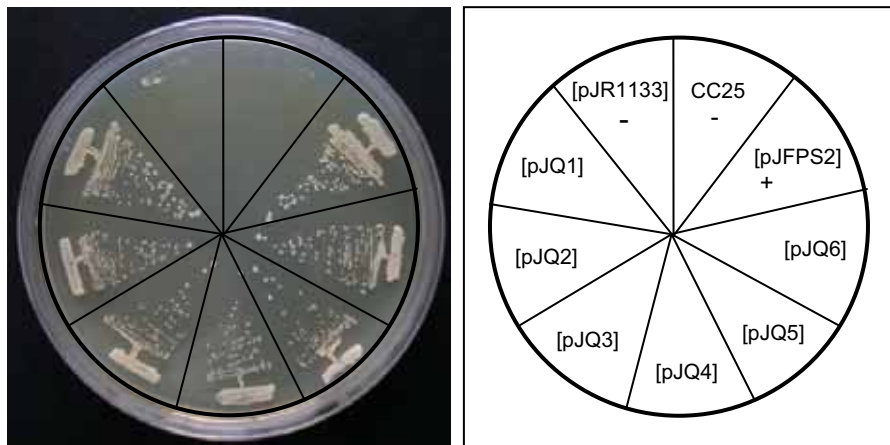


Figura 27: Complementació funcional de la soca CC25 de *S. cerevisiae* amb les quimeres FPS d'*Arabidopsis*. A l'esquerra es mostra el creixement a 36°C de les diferents soques en medi YPG sense ergosterol. A la dreta s'indica la posició que ocupa cada soca en la placa. CC25, soca sense transformar; [pJR1133], soca CC25 transformada amb el vector pJR1133, emprada com a control negatiu de complementació; [pJFPS2], soca CC25 transformada amb el cDNA que codifica l'isoenzim FPS2, emprada com a control positiu de complementació; [pJQ1], [pJQ2], [pJQ3], [pJQ4], [pJQ5] i [pJQ6], soca CC25 transformada amb els cDNA que codifiquen cadascuna de les 6 FPS quimèriques.

Com era d'esperar, a 28°C es va detectar creixement de totes les soques CC25 transformades, incloent la soca transformada amb el vector buit, així com de la soca CC25 sense transformar (resultat no mostrat). A 36°C no hi va haver creixement de la soca CC25 sense transformar ni de la soca transformada amb el vector pJR1133 (controls negatiu). En canvi, la soca transformada amb el cDNA de l'isoenzim FPS2 (utilitzada com a control positiu) i les soques transformades amb els vectors d'expressió de totes les proteïnes FPS quimèriques (pJQ1-pJQ6) van créixer a 36°C, indicant que les 6 quimeres FPS tenen la capacitat de complementar la mutació *erg20-2* i per tant, són formes de FPS catalíticament actives.

3.2. Anàlisi dels productes de reacció sintetitzats per les diferents quimeres FPS expressades en llevat

Un cop demostrat que les 6 quimeres FPS complementaven la soca de llevat CC25 i amb l'objectiu de confirmar la seva activitat FPS, es van realitzar assaigs d'activitat FPS en extractes de llevat de les soques CC25[pJR1133], CC25[pFPS2] i CC25[pJQ1-pJQ6], i es van analitzar els productes de reacció per cromatografia en capa fina prèvia defosforilació enzimàtica (apartat 10.4 de materials i mètodes).

El resultat de la cromatografia (Figura 28) mostra que tant la soca CC25 que expressa FPS2 com les soques que expressen les 6 FPS quimèriques han recuperat la capacitat de sintetitzar FPP. En aquesta imatge s'observa el farnesol, com a producte majoritari derivat de la reacció catalitzada, i una petita proporció de geraniol que prové de la defosforilació de l'intermediari GPP. Per tant, es pot concloure que les quimeres FPS complementen la mutació *erg20-2* i conserven l'activitat farnesildifosfat sintasa, doncs restableixen la capacitat de síntesi de FPP en la soca CC25.

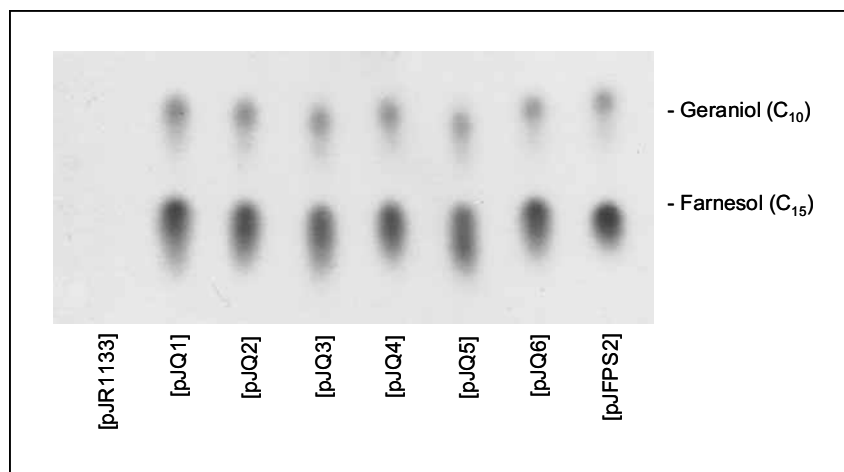


Figura 28: Anàlisi per cromatografia en capa fina dels productes de reacció de l'assaig prenilttransferasa en extractes de les soques del mutant CC25 de *S. cerevisiae* transformades amb els plasmidis indicats. Per a la TLC s'han utilitzat plaques HPTLC RP-18F_{254S} (Merck) com a fase estacionària i una mescla de metanol/aigua (95:5) com a fase mòbil. A la dreta de la imatge s'indica la mobilitat dels patrons de geraniol (C₁₀) i farnesol (C₁₅). La detecció dels productes radioactius s'ha realitzat mitjançant un *Phosphorimager STORM 840* (*Molecular Dynamics*).

3.3. Generació i anàlisi de plantes d'*Arabidopsis* transgèniques que sobreexpressen constitutivament proteïnes quimèriques entre FPS1S i FPS2

Amb l'objectiu de començar a investigar les bases estructurals dels efectes diferencials causats per la sobreexpressió de FPS1S i FPS2, es van generar plantes transgèniques d'*A. thaliana* amb sobreexpressió constitutiva de les proteïnes FPS quimèriques (Q1-Q6).

La tècnica del *floral dip* (Clough i Bent, 1998) va ser el mètode utilitzat per a la infiltració de plantes d'*A. thaliana* amb soques d'*A. tumefaciens* transformades amb els plasmidis pTQ1 a pTQ6, on hi havia clonats els cDNAs corresponents a les diferents FPS quimèriques sota el control del promotor constitutiu *35SCaMV* en el vector d'expressió pBI121 (apartat 4.1.3 de materials i mètodes).

Les plantes que havien incorporat les construccions quimèriques es van seleccionar per la seva resistència a kanamicina. Estudis de segregació del caràcter de resistència a l'antibiòtic van permetre seleccionar línies homozigòtiques que mostraven

percentatges de segregació indicatius de la integració del transgèn en un únic locus del genoma en cada cas. En aquestes línies, es va mesurar l'activitat FPS en el sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes cultivades 8 setmanes sota un fotoperíode de dia curt. Els resultats es mostren a la Figura 29.

En el cas de la quimera Q1, només va ser possible aïllar una única línia resistent a kanamicina en la que no es va detectar un increment d'activitat FPS respecte el nivell d'activitat de les plantes control. Entre les plantes portadores dels transgens que codifiquen les quimeres Q2 a Q6 es van poder seleccionar, en tots els casos, línies que mostraven valors d'activitat FPS superiors als obtinguts en les plantes control (Figura 29). Concretament, en el cas de les quimeres Q3, Q4 i Q5 es van obtenir línies transgèniques que presentaven valors d'activitat FPS superiors als de les plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S (línia 9.1) i FPS2 (línia 3.6) individualment. En el cas de les quimeres Q2 i Q6, tot i que les línies seleccionades no assolien valors d'activitat FPS superiors als de la sobreexpressió de FPS1S (9.1) i FPS2 (3.6), mostraven valors d'activitat FPS de fins a 3 vegades superior al de les plantes *wt*, en el cas de Q2, i de fins a 4 vegades superior en el cas de les plantes que sobreexpressen Q6.

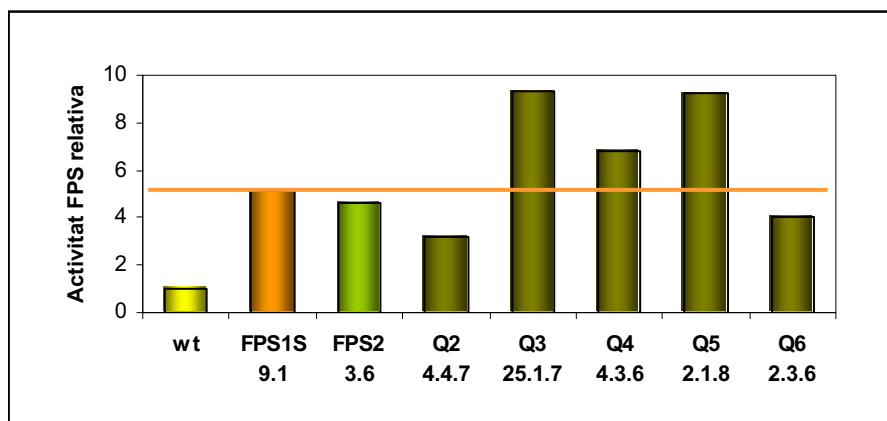


Figura 29: Activitat FPS relativa en plantes que sobreexpressen les quimeres Q2-Q6 en comparació amb l'activitat de plantes *wild type* i de plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS1S i FPS2. Les mesures s'han realitzat en el sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal de plantes cultivades durant 8 setmanes en condicions de dia curt. Els valors d'activitat FPS s'expressen en relació a l'activitat FPS de les plantes *wild type* al qual s'ha atribuït el valor d'1.

Un cop determinats els nivells d'activitat FPS derivats de la sobreexpressió de les quimeres Q2 a Q6, es va procedir a analitzar el seu fenotip comparant-lo amb el de les plantes que sobreexpressen FPS1S (línia 9.1) i FPS2 (línia 3.6). Els fenotips que presenten les plantes que sobreexpressen les diferents proteïnes FPS quimèriques cultivades durant 8 setmanes en condicions de dia curt es mostren en la Figura 30.

En les plantes que sobreexpressen les quimeres Q2, Q3 i Q6 s'observa una reducció en la mida de la roseta basal en comparació amb la de les plantes *wt* i la de les plantes que sobreexpressen FPS2. D'altra banda, les plantes que sobreexpressen les quimeres Q4 i Q5 tenen una roseta basal de mida similar a la de les plantes *wt* i les plantes FPS2. Pel que fa referència a les lesions necròtiques, únicament les quimeres Q3, Q5 i Q6 mostren lesions en algunes fulles de la roseta basal, però en cap cas el fenotip és tan accentuat com en les plantes que sobreexpressen FPS1S.

Quan es relacionen els valors d'activitat FPS amb els fenotips observats, resulta interessant destacar que, tot i haver obtingut línies transgèniques amb valors d'activitat FPS superiors als obtinguts en la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S (Q3, Q4 i Q5), quan apareix el fenotip de necrosi a les fulles de la roseta basal, ho fa amb menys intensitat (Q3 i Q5). I fins i tot, es dona el cas de la quimera Q4, en el qual les plantes no manifesten cap de les característiques fenotípiques associades a la sobreexpressió de FPS1S. El fenotip que s'observa en aquest cas és totalment equiparable al de les plantes que sobreexpressen FPS2 i, en definitiva, al de les plantes *wt*. Les plantes corresponents a la sobreexpressió de les quimeres Q2 i Q6, assoleixen uns valors de sobreexpressió lleugerament inferiors als obtinguts en les plantes transgèniques FPS1S i FPS2, tot i així, en ambdós casos s'observa una reducció en la mida de les seves rosetes basals en comparació amb les plantes control. Ara bé, només en el cas de la quimera Q6 es posa de manifest l'aparició de lesions necròtiques.

Tot i que el conjunt de resultats obtinguts fins aquest moment no permeten establir una relació entre l'aparició del fenotip característic de la sobreexpressió de FPS1S i la presència d'unes determinades regions de la proteïna, sí que indiquen que, malgrat que FPS1S i FPS2 són dues proteïnes amb un 90,6% d'identitat en la seva seqüència aminoacídica, la substitució d'alguna regió de FPS1S per la regió equivalent de FPS2 és suficient per anular o, com a mínim atenuar l'aparició de lesions necròtiques i l'alteració de la mida de la roseta basal. Aquests resultats novament confirmen que el fenotip associat a la sobreexpressió de FPS1S no depèn de l'increment d'activitat FPS total de les plantes.

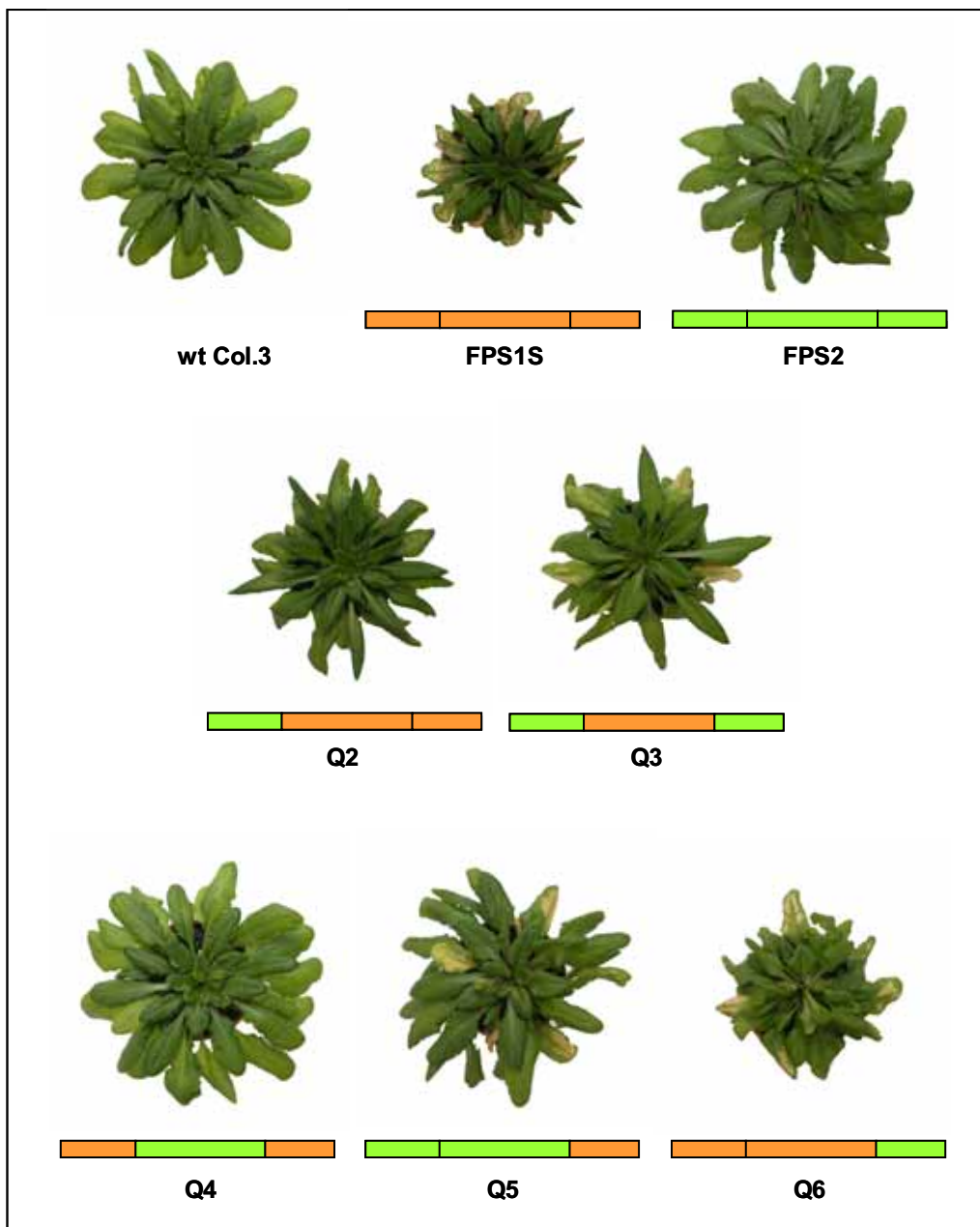


Figura 30: Fenotip de les plantes que sobreexpressen les proteïnes quimèriques Q2-Q6. Plantes wt i plantes que sobreexpressen FPS1S (línia 9.1) i FPS2 (línia 3.6) s'han utilitzat com a control. A sota de les plantes transgèniques s'indica de forma esquemàtica l'estructura de cada quimera. En color taronja es representen les regions corresponents a FPS1S i en color verd les corresponents a FPS2. Les plantes que sobreexpressen les proteïnes quimèriques corresponen a les línies Q2 4.4.7, Q3 25.1.7, Q4 4.3.6, Q5 2.1.8 i Q6 2.3.6. Les imatges corresponen a plantes cultivades durant 8 setmanes sota un fotoperíode de dia curt. Totes les imatges estan a la mateixa escala.

4. Models estructurals dels isoenzims FPS1S i FPS2

Una altra de les aproximacions que s'han dut a terme amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi comparatiu entre els isoenzims FPS1S i FPS2, ha estat l'elaboració i l'anàlisi dels models estructurals d'ambdues proteïnes. Aquesta part del treball ha estat realitzada en col·laboració amb el Dr. Paulino Gómez Puertas del Centre de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Madrid.

Reed i Rilling van aconseguir l'any 1975 la cristal·lització de la FPS de fetge de pollastre, però no va ser fins l'any 1994 quan Tarshis *et al.* en van publicar la seva estructura tridimensional (la primera d'una FPS), amb una resolució de fins a 2,6 Å. De manera que, disposant de l'estructura tridimensional de la FPS de pollastre obtinguda per difracció de raig X i de les seqüències aminoacídiques dels enzims d'*Arabidopsis*, es va procedir a l'elaboració dels models estructurals tridimensionals per a FPS1S i FPS2 tal i com es descriu a l'apartat 14 de materials i mètodes.

Dels models 3D obtinguts es pot afirmar que FPS1S i FPS2 són estructuralment equivalents, es troben formant homodímers i presenten el plegament típic de les terpè sintases, que es caracteritza per la presència d'hèlix α unides per regions sense estructura secundària definida (*loops*) (Szkopinska i Plochocka, 2005). Concretament, l'estructura de FPS1S i FPS2 està definida per 15 hèlix α (Figura 32; A). Quatre d'aquests segments helicoïdals es troben a la superfície de contacte entre els dos monòmers, concretament l'hèlix 2 (**H2**) contacta amb les hèlix H6 i H7 del segon monòmer, l'hèlix 5 (**H5**) contacta amb l'hèlix H6, i per tant **H6** es troba en contacte amb H2 i H5, i finalment l'hèlix **H7** contacta amb H2 (Figura 31).

La similitud estructural no és sorprenent ja que els isoenzims FPS1S (343 aa) i FPS2 (342 aa) només es diferencien en 33 aminoàcids. La comparació de les seqüències també indica la presència en FPS1S i FPS2 dels VII dominis conservats entre les FPS de diferents organismes (veure Figura 9 de la introducció; Koyama *et al.*, 1993; Szkopinska i Plochocka, 2005), regions en les quals les FPS d'*A. thaliana* mantenen un 100% d'identitat entre elles (caixes grises de la Figura 31). Tampoc hi ha diferències en els residus que es troben a una distància inferior a 4 Å del complex GPP-2 Mg²⁺ (essent el GPP el substrat utilitzat en els models estructurals) tal i com es pot veure en la imatge tridimensional del centre actiu (Figura 32; B); ni en els residus que, tot i pertànyer a un

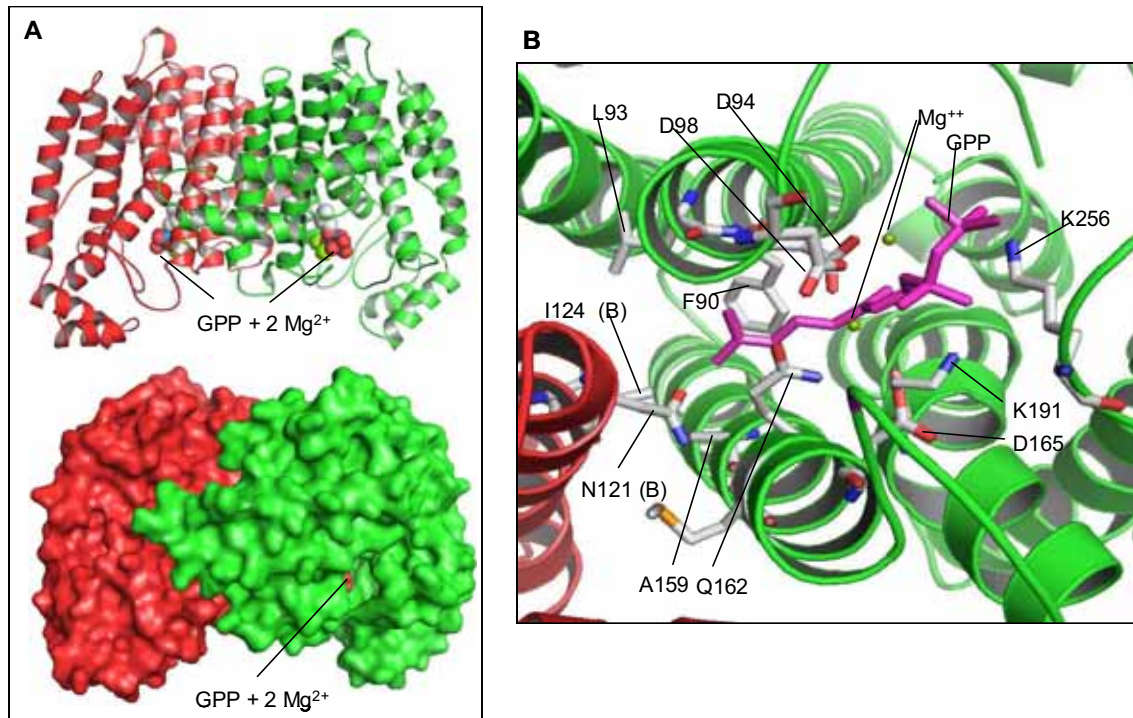


Figura 32: Model estructural en 3D de l'homodímer format per l'isoenzim FPS1S (estructuralment equivalent a l'homodímer format per FPS2). A) en verd es mostra el monòmer A i en vermell el monòmer B. En la figura s'observa l'isoenzim complexat amb GPP-2Mg²⁺. B) detall del centre actiu del dímer format per FPS1S on s'indiquen els residus situats a una distància inferior a 4 Angstroms del complex GPP-2Mg²⁺.

Per una altra banda quan s'analitza la posició ocupada pels aminoàcids diferents entre FPS1S i FPS2 es detecta la presència de 4 d'aquests residus en la interfície de dimerització:

- La valina de la posició 36 (V36) de la FPS1S correspon a una leucina en la posició 35 (L35) de FPS2 (Figura 33; A). És possible que V36 contacti amb la M163 situada en el monòmer oposat. A la vegada M163 contacta amb Q162 del mateix monòmer i N121 del monòmer oposat, ambdós situats al centre actiu.
- V118 en FPS1S correspon a I117 en FPS2 (Figura 33; B). V118 està en contacte amb M163 i L166 de l'altre monòmer. L166 forma part de la cavitat del substrat.
- L156 en FPS1S correspon a F155 en FPS2 (Figura 33; C). L156 contacta amb R33, N128 i R132 situats a la superfície del monòmer oposat.
- H190 en FPS1S correspon a Y189 en FPS2. H190 contacta amb F28 i T29, ambdós residus situats en el *loop* que uneix les hèlix H1 i H2.

Una altra de les diferències detectades és la presència d'aspàrtic en la posició 170 (D170) en FPS2 en lloc del glutàmic en la posició 171 (E171) en FPS1S (Figura 33; D). Aquest aminoàcid es troba localitzat al centre actiu de l'enzim, en una posició molt propera al punt d'entrada del substrat.

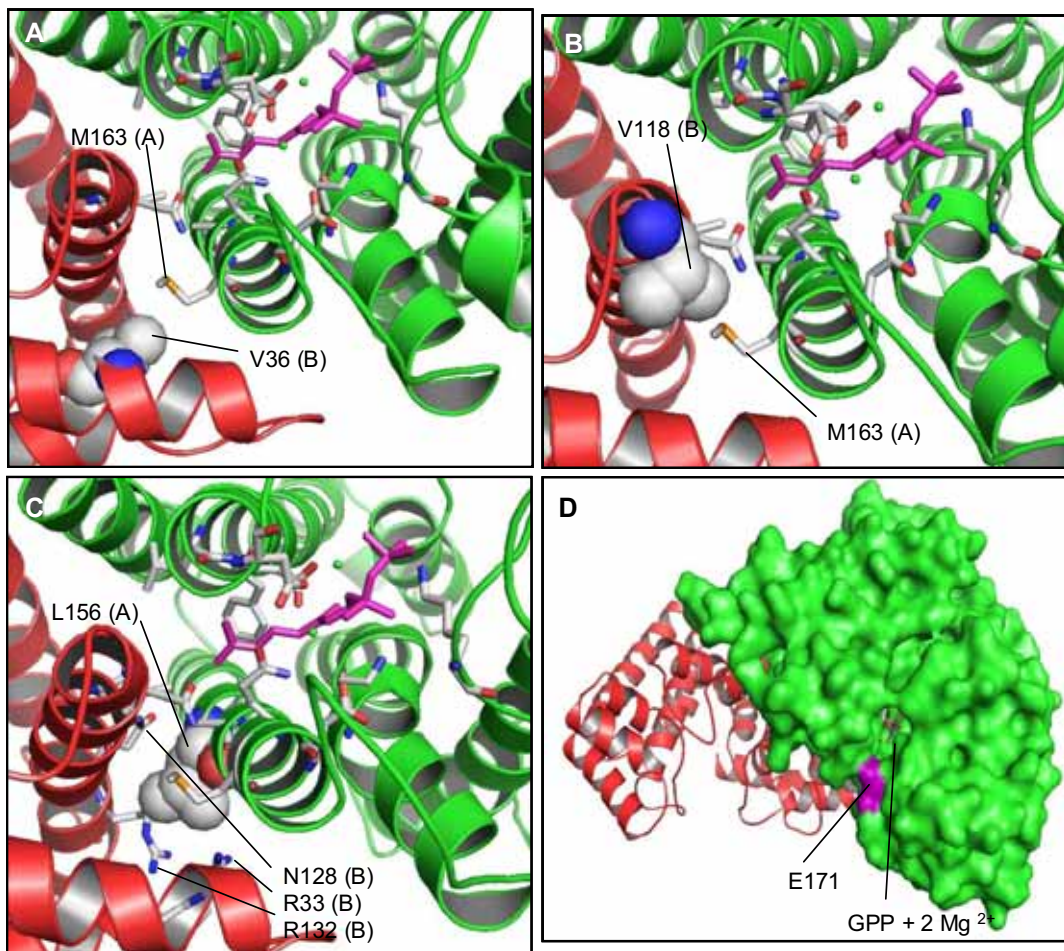


Figura 33: Localització de residus diferents entre FPS1S i FPS2 situats a la interfície de dimerització (A, B i C). En verd es mostra el monòmer A i en vermell el monòmer B. En la figura es pot observar l'isoenzim complexat amb GPP-2Mg²⁺. D) Dímer de FPS1S en el qual s'observa la localització del residu de glutàmic de la posició 171 (E171) en una zona molt propera a l'entrada de la cavitat del centre actiu.

Al localitzar la posició de la resta d'aminoàcids diferents entre FPS1S i FPS2 en l'estructura tridimensional s'ha pogut observar que la gran majoria d'aquests es troben situats a la superfície externa dels isoenzims (Figura 34). Aquests residus es poden

agrupar en funció de si es troben en una regió propera a la interfície de dimerització entre els dos monòmers però exposats la superfície externa (esferes grogues), o bé si es localitzen en una zona més allunyada al grup comentat anteriorment (esferes blaves). El primer grup està format pels residus (s'indiquen els corresponents a FPS1S): N11, H22, N30, L34, D37, N66, Q71, V112, Q114, D140 i K141, i el segon grup està compost per: S182, T283, D284, D293, V303, S309, K310 i G317.

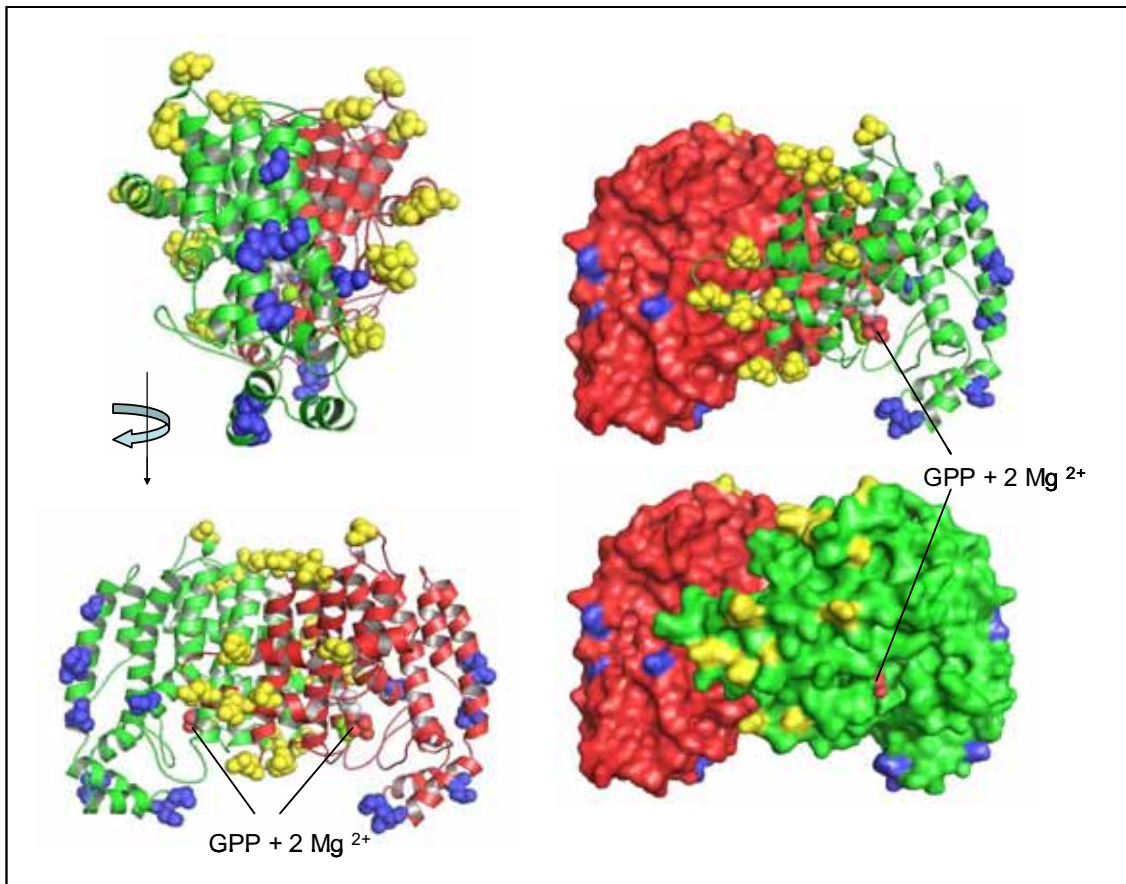


Figura 34: Model estructural en 3D de l'homodímer FPS1S amb el complex GPP-2Mg²⁺ unit al centre actiu, en el qual s'indiquen els residus diferents entre FPS1S i FPS2 localitzats a la superfície externa de l'isoenzim. Les esferes de color groc representen els residus: N11, H22, N30, L34, D37, N66, Q71, V112, Q114, D140 i K141. Les esferes de color blau representen els residus: S182, T283, D284, D293, V303, S309, K310 i G317.

En síntesi, el més destacable de les dades obtingudes en aquest apartat és el fet que gairebé dues tercers parts dels aminoàcids diferents entre FPS1S i FPS2, es troben agrupats en dues regions localitzades a la superfície externa del dímer que formen

cadascun d'aquests isoenzims. La seva localització suggereix la possibilitat que aquests aminoàcids puguin estar implicats en l'establiment d'interaccions diferencials entre els dos isoenzims FPS i altres proteïnes que poguessin ser l'origen de les diferències observades en la sobreexpressió.

5. Identificació i caracterització de mutants d'*A. thaliana* amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*

Les col·leccions de mutants d'*Arabidopsis thaliana* amb pèrdua de funció de gens concrets per inserció de T-DNA o bé per inserció d'elements mòbils (element Ds) són una eina molt útil per a l'estudi de diferents processos metabòlics. En aquesta tesi s'ha procedit a l'estudi dels següents al·lels mutants amb pèrdua de funció per inserció de T-DNA o per inserció d'un element Ds en els gens *FPS1* (At5g47770) i *FPS2* (At4g17190) d'*A. thaliana*:

GEN	NOM DEL MUTANT	LÍNIA D'INSERCIÓ	ECOTIP	POSICIÓ
At5g47770	<i>fps1-1</i>	SAIL 310 D07	Col. 0	+1032 pb (6è exó)
At5g47770	<i>fps1-2</i>	SALK 073576	Col. 3	+535 pb (3r exó)
At4g17190	<i>fps2-1</i>	SAIL 328 G06	Col. 0	+615 pb (4rt exó)
At4g17190	<i>fps2-2</i>	GT 7041	Ler	-12 pb de l'ATG

Taula 4: Mutants d'*A. thaliana* amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* (At5g47770) i *FPS2* (At4g17190). S'indiquen les posicions respecte el codó ATG de cada gen. En el cas del gen *FPS1*, s'ha assignat la posició +1 a la primera base del codó ATG que dona lloc a la isoforma FPS1L.

La caracterització d'aquests mutants forma part d'un projecte realitzat en col·laboració amb la Dra. Eva Vranová del grup del Professor Wilhelm Gruissem de l'Institute of Plant Sciences del Swiss Federal Institute of Technology (ETH) de Zurich (Suïssa).

Els al·lels mutants de la col·lecció SAIL de Syngenta (*fps1-1* i *fps2-1*) han estat els d'elecció en el present estudi perquè ens oferien la possibilitat de disposar d'ambdós mutants *fps* en un mateix fons genètic i això ens facilitava la comparació de resultats entre ells. L'al·lel mutant *fps1-2* ha estat caracteritzat per la Dra. Eva Vranová i únicament s'ha utilitzat en aquesta tesi per confirmar les mesures de longitud

d'hipocòtils i tubs pol.lítics i per la generació del doble mutant *fps1:fps2*, tal com es veurà més endavant.

En tots els casos, els mutants han estat genotipats per tal de comprovar la posició de la inserció del T-DNA o de l'element Ds. Per genotipar es va utilitzar DNA genòmic extret de fulles de roseta basal de cada línia, a partir del qual es van realitzar dues reaccions de PCR emprant els *primers* representats a la Figura 35. En una de les reaccions de PCR es van utilitzar *primers* específics de cadascun dels gens que hibridaven a 5' i a 3' del lloc d'inserció, de manera que només hi hauria amplificació en el cas que no hi hagués inserció. En l'altra reacció de PCR es va utilitzar un dels *primers* específics de cadascun dels gens i un *primer* que hibridava a un extrem del T-DNA, de manera que només s'amplificaria un producte de PCR si el gen contenia la inserció del T-DNA (la seqüència dels *primers* utilitzats es troba a l'apartat 1.1 de materials i mètodes). Es va procedir de la mateixa manera per genotipar el mutant que contenia la inserció d'un element Ds. Els resultats de les PCRs van confirmar la presència de la inserció i van permetre seleccionar individus homozigòtics per a cadascuna de les línies mutants (resultats no mostrats).

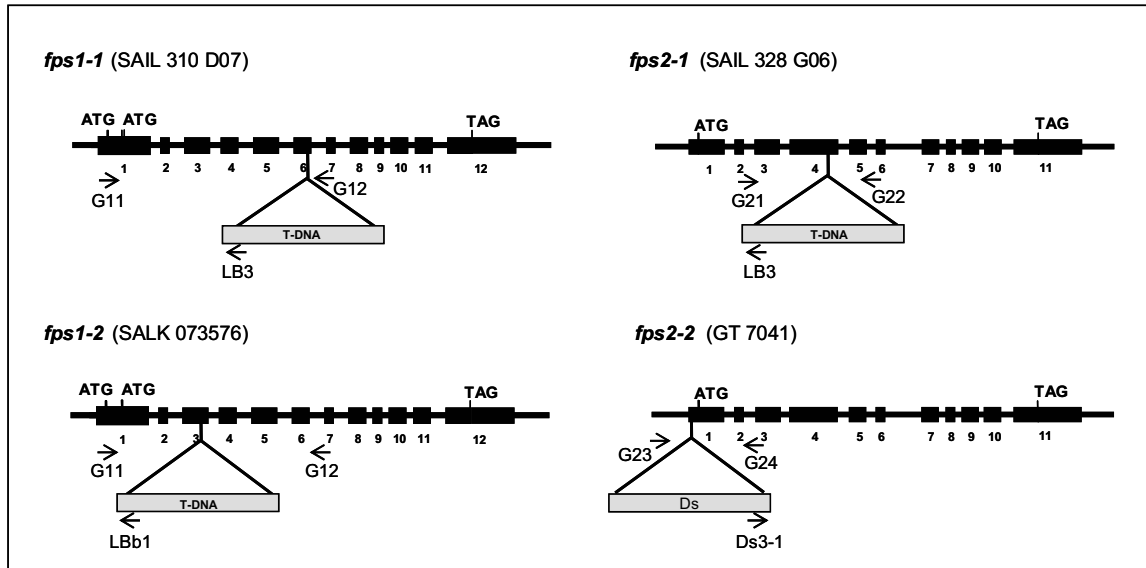


Figura 35: Esquema de la localització de la inserció (T-DNA o element Ds) en els gens *FPS1* i *FPS2* dels diferents mutants caracteritzats. Els exons estan representats per les caixes negres numerades. Els introns i les regions flanquejants s'indiquen amb línies. Els segments ombrejats representen els T-DNA i l'element Ds inserits. Les fletxes indiquen la posició i l'orientació dels primers utilitzats per genotipar cadascun dels mutants.

5.1. Comprovació per RT-PCR que en les línies mutants amb pèrdua de funció, el T-DNA o l'element Ds bloqueja l'expressió del gen en el qual s'ha inserit

Una vegada obtinguts individus homozigòtics per a cadascun dels al·lels dels mutants *fps* d'*A. thaliana*, es va analitzar l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* per RT-PCR.

Degut a l'alt grau d'homologia entre les seqüències d'ambdós gens, es van dissenyar oligonucleòtids específics en les regions de màxima divergència que permetien l'amplificació de dos fragments corresponents a la pràctica totalitat dels cDNA de *FPS1S* i *FPS2*. Per a la detecció de l'ARN missatger del gen *FPS1* es van utilitzar els *primers* *FPS1fwd*, situat a -39 pb de l'ATG que inicia la traducció de *FPS1S*, i *FPS1rev*, situat 41 pb cap a 3' del codó de parada. Com a resultat de la RT-PCR s'havia d'obtenir un amplicó de 1110 pb. Per a la detecció de l'ARNm del gen *FPS2* es van utilitzar els *primers* *FPS2fwd*, situat a -29 pb de l'ATG, i *FPS2rev*, situat 23 pb cap a 3' del codó de parada. En aquesta ocasió, el fragment resultant de l'amplificació havia de tenir 1083 pb.

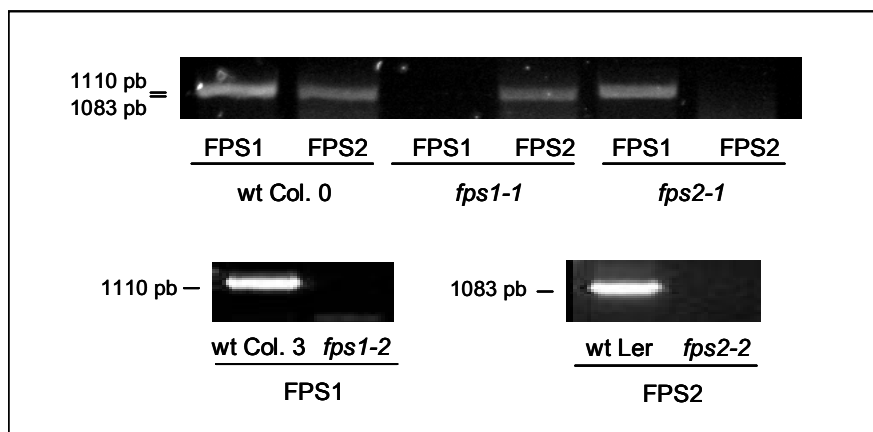


Figura 36: Anàlisi de l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* per RT-PCR en els mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*. Per a les reaccions de RT-PCR es va utilitzar RNA total obtingut de plàntules de 10 dies de les línies en estudi. A l'esquerra de les imatges s'indica la mida dels fragments amplificats. *FPS1*: fragments amplificats utilitzant la parella de *primers* *FPS1fwd*/*FPS1rev*. *FPS2*: fragments amplificats utilitzant la parella de *primers* *FPS2fwd*/*FPS2rev*.

Tal i com es pot observar a la Figura 36, en els carrils corresponents a les mostres *wild type* s'obtenen els amplicons de les mides esperades per a l'amplificació del transcrit dels gens *FPS1* i *FPS2*. En el cas dels mutants *fps1-1* i *fps1-2* no es detecta la presència de transcrit del gen *FPS1*. Igualment, no és possible detectar la presència de transcrit del gen *FPS2* en els mutants *fps2-1* i *fps2-2*. Això ens demostra que la inserció del T-DNA o l'element Ds en aquestes línies mutants està bloquejant l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* respectivament.

5.2. Determinació del nivell d'activitat FPS en els mutants *fps*

Després de demostrar l'absència d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* en els mutants *fps1* i *fps2* respectivament, es va procedir a analitzar l'efecte de la pèrdua de funció d'aquests gens sobre els nivells d'activitat enzimàtica FPS en aquests mutants.

Tenint en compte els patrons d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* en els diferents òrgans de la planta (Cunillera *et al.*, 2000b) i amb l'objectiu de poder detectar les disminucions d'activitat associades a la pèrdua de funció de cadascun dels gens *FPS*, els assaigs d'activitat enzimàtica es van realitzar en inflorescències. El fet de realitzar les mesures d'activitat FPS en inflorescències, on l'expressió dels dos gens *FPS* és molt intensa, hauria de permetre detectar clarament una disminució de l'activitat enzimàtica tant en el mutant *fps1* com en *fps2*. En tots els casos, els assaigs d'activitat FPS es van realitzar en el sn 16000 x g d'extractes d'inflorescències. Els resultats obtinguts (Figura 37) posen de manifest una reducció del 58% de l'activitat FPS en el mutant *fps1-1* i del 70% en el mutant *fps1-2*. Pel que fa referència als mutants *fps2*, es va observar una reducció del 45% en l'al·lel mutant *fps2-1* i del 31% en el mutant *fps2-2*.

Els assaigs enzimàtics d'activitat FPS no permeten discriminar entre l'activitat que prové de l'isoenzim FPS1S o bé de l'isoenzim FPS2. De manera que, tenint en compte que s'ha demostrat que els al·lels mutants són autèntics *knock-outs*, és raonable pensar que l'activitat FPS remanent en cada cas és atribuïble a l'isoenzim codificat per l'altre gen *FPS* que resta funcional.

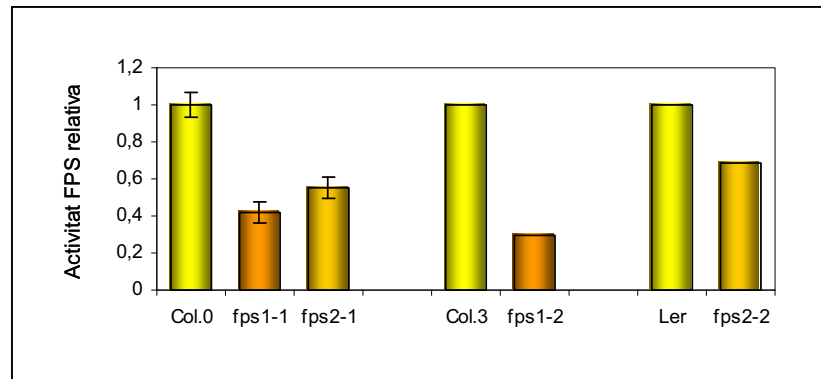


Figura 37: Activitat FPS dels mutants *fps1* i *fps2*. L'assaig d'activitat enzimàtica es va realitzar en el sn 16.000 x g d'extractes d'inflorescències. L'activitat s'expressa en relació a l'activitat FPS de les corresponents mostres *wild type*, a la qual s'ha donat el valor d'1.

5.3. Estudi de les característiques fenotípiques dels mutants *fps1* i *fps2*

En un primer anàlisi dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* cultivats sota diferents condicions de creixement (dia curt, dia llarg i llum contínua), no es va detectar cap alteració fenotípica en comparació amb les plantes control, ni en la fase vegetativa ni en la fase reproductiva (Figura 38). Ambdós mutants mostren un creixement i desenvolupament equiparable al de les plantes control, són fèrtils i en definitiva, tenen la capacitat de completar el cicle vital amb total normalitat.

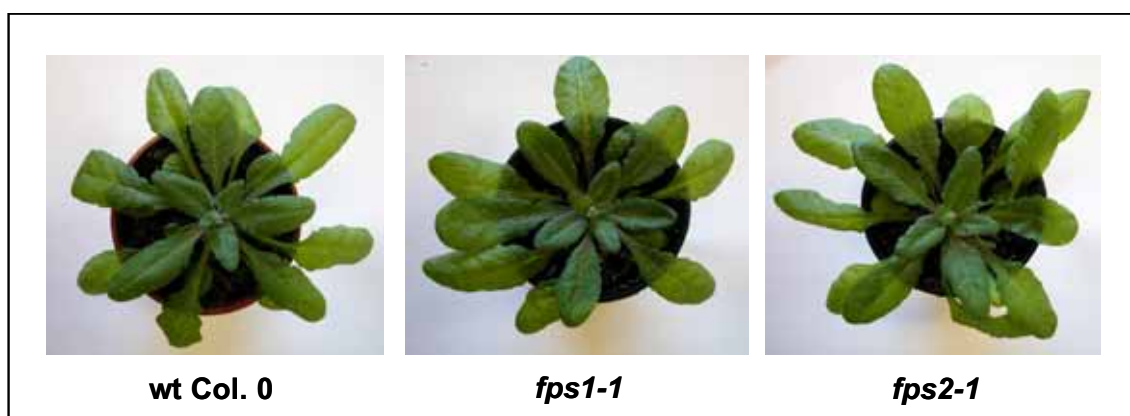


Figura 38: Fenotip dels mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*. Les imatges corresponen a plantes *fps1-1*, *fps2-1* i *wt Col.0* que han estat cultivades durant 8 setmanes sota un fotoperíode de dia curt (8h llum/16h foscor).

En *A. thaliana* hi ha publicats nombrosos estudis de mutants amb pèrdua de funció d'enzims de la via del mevalonat, tant d'etapes anteriors a la catalitzada per la FPS, com per exemple els mutants *hmg* (Suzuki *et al.*, 2004; Antolín, 2005); com d'etapes posteriors, com per exemple els mutants afectats en diferents enzims implicats en la síntesi d'esterols, concretament, en etapes posteriors a la síntesi d'esqualè (revisat a l'apartat 2.5 de la introducció). Degut al fet que en els mutants *fps* els enzims inactivats estan situats a la part troncal de la via del mevalonat, podríem pensar en que es manifestin fenotips similars als detectats en el mutant *hmg1-1* (que conté la inserció d'un T-DNA al primer exó del gen *HMG1*). Entre les característiques que presenta el mutant *hmg1-1* d'*Arabidopsis* podríem destacar l'enanisme, una reducció en l'elongació cel.lular, esterilitat masculina i senescència prematura (Suzuki *et al.*, 2004).

En un examen fenotípic més detallat dels mutants *fps*, es van dur a terme mesures de la longitud de les arrels, de la longitud dels hipocòtils i de l'elongació dels tubs pol.línics, així com experiments de *detachment* per posar de manifest possibles alteracions del procés de senescència.

Mesures de la longitud de les arrels realitzades en 3 experiments independents (60 plàntules de cada línia/experiment) no van revelar diferències significatives pel que fa a la longitud de les arrels entre cap dels mutants *fps* i les corresponents plantes control.

Les mesures de la longitud de l'hipocòtil es van realitzar en plàntules de 9 dies cultivades sota diferents condicions d'il·luminació (dia llarg, dia curt i foscor). Tal i com es pot observar a la Figura 39, en els al.lels *fps1-2* i *fps2-2* es va detectar una reducció lleugera però significativa en la longitud dels hipocòtils tant en foscor com en les dues condicions d'il·luminació assajades. En el cas dels al.lels mutants *fps1-1* i *fps2-1* no es van detectar diferències en els hipocòtils de les plantes cultivades en foscor. Ara bé, sota un règim de 8 h de llum/ 16 h de foscor (dia curt) en els quatre al.lels mutants es van posar de manifest els mateixos efectes, detectant-se reduccions estadísticament significatives en la longitud dels hipocòtils. En tots els casos, les diferències eren més marcades en l'al.lel mutant *fps2-2*.

L'esterilitat masculina detectada en el mutant *hmg1-1*, juntament amb el fet que els gens *FPS1* i *FPS2* es troben fortament expressats en grans de pol·len, ens van portar a realitzar mesures de l'elongació dels tubs pol.línics en els mutants *fps*. Aquestes mesures es van fer seguint el protocol descrit en l'apartat 6.1 de materials i mètodes. Els resultats de les mesures realitzades en els quatre al.lels mutants *fps* (Figura 39) posen de

manifest que tant en els mutants *fps1* com en els *fps2* hi ha una reducció significativa en l'elongació dels tubs pol.línics, essent més evident en els mutants *fps2* i, en particular en l'al·lel mutant *fps2-2*.

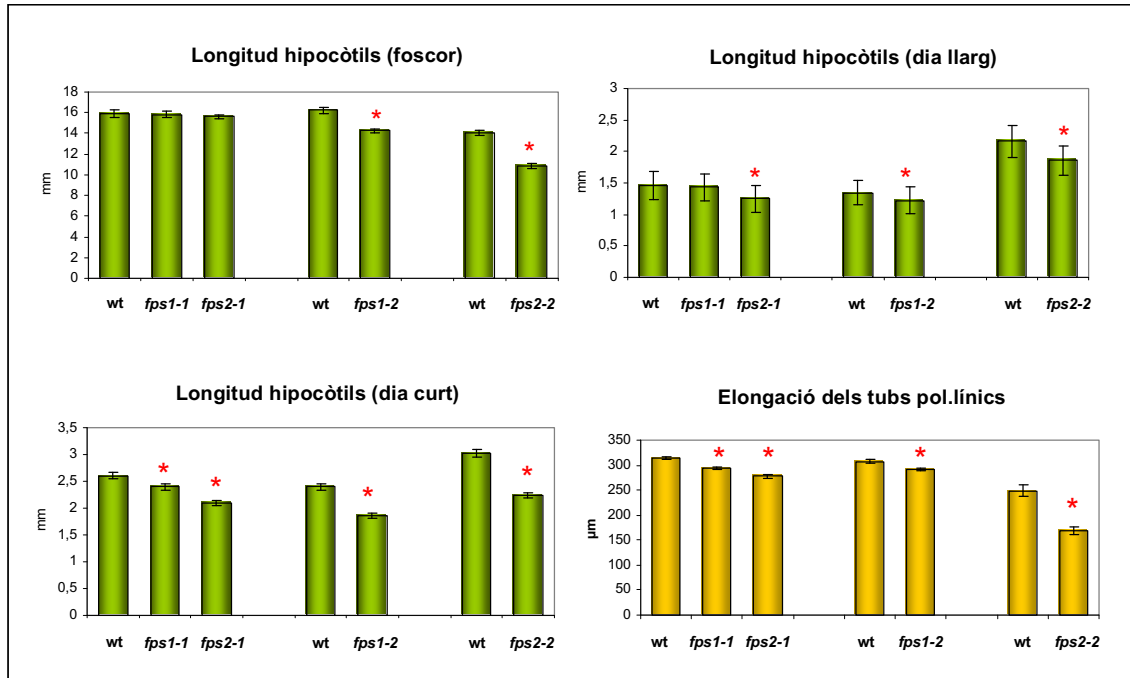


Figura 39: Mesures de la longitud dels hipocòtils i de l'elongació dels tubs pol.línics en els mutants *fps* d'*A. thaliana*. Les mesures de la longitud dels hipocòtils han estat realitzades sota 3 condicions d'il.luminació diferents (fosc, dia curt i dia llarg). Els resultats obtinguts provenen de tres experiments independents amb mesures de 70 plàntules de cada línia en cada experiment. Les mesures de l'elongació dels tubs pol.línics provenen de 2 experiments independents en els quals s'han mesurat 400 tubs pol.línics de cada línia en cada experiment. En tots els casos, les gràfiques mostren les dades d'un dels experiments. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat aplicant el test t-Student i assumint com a diferències estadísticament significatives $P \leq 0,05$. L'asterisc vermell indica que les diferències en relació al control són estadísticament significatives.

Finalment, es van dur a terme estudis de *detachment* (apartat 6.5 de materials i mètodes). El resultat que es mostra a la Figura 40 ens indica que les fulles dels mutants *fps1-1* i *fps2-2* d'*A. thaliana* tenen un comportament equiparable al de les fulles de les plantes control i no mostren ni un avançament ni un endarreriment en el procés de senescència.

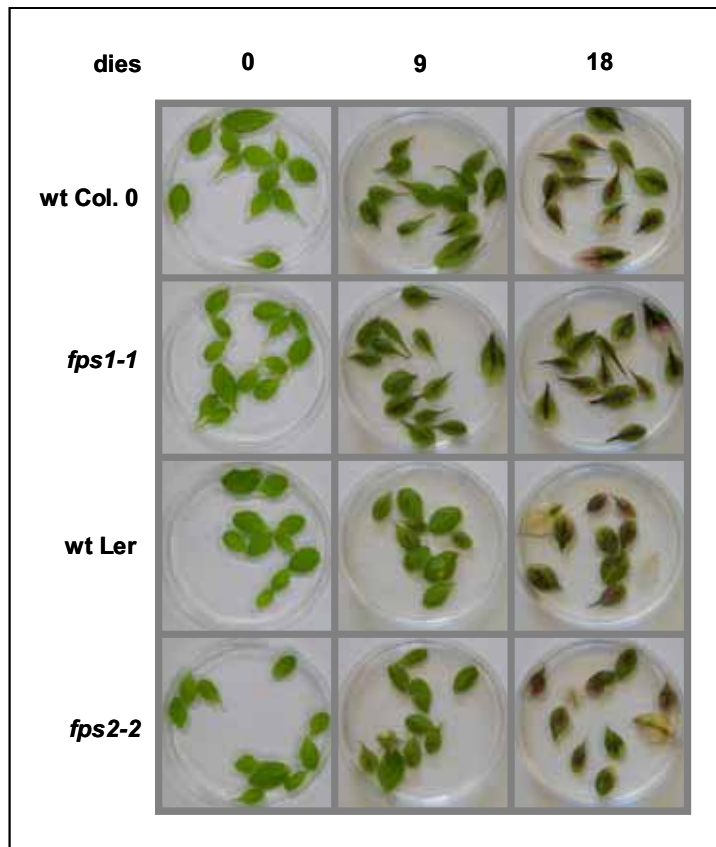


Figura 40: Estudi de la senescència en fulles dels mutants *fps1-1* i *fps2-2* d'*A. thaliana*. Experiment de *detachment* realitzat en fulles completament verdes de roseta basal en un estadi de desenvolupament equivalent, tallades de plantes dels mutants *fps1-1* i *fps2-2*, així com dels respectius controls. Aquestes fulles han estat incubades en aigua destil·lada durant els intervals de temps indicats sota un fotoperíode de dia curt.

En conjunt, tots aquests resultats ens mostren que, malgrat les petites diferències detectades en l'elongació dels tubs pol·línics i la longitud dels hipocòtils dels mutants *fps1* i *fps2*, les plantes poden desenvolupar-se normalment tant en la fase vegetativa com en la fase reproductiva. Això indica que cap dels dos gens *FPS* en particular resulta essencial per al desenvolupament de les plantes, ja que són completament viables amb un sol gen *FPS* funcional.

5.4. Contingut total i perfil d'esterols en els mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*

Els esterols són els productes majoritaris sintetitzats a través de la via del mevalonat, de manera que era raonable pensar que la pèrdua de funció dels isoenzims FPS pogués provocar una reducció del flux de la via que es tradueix en una disminució del contingut total d'esterols. S'ha descrit que en el mutant *hmg1-1* d'*A. thaliana* hi ha una disminució de la quantitat d'esterols acumulats de fins al 47% en plàntules i del 25% en inflorescències (Suzuki *et al.*, 2004).

L'anàlisi del contingut d'esterols en els mutants *fps* es va dur a terme per cromatografia de gasos prèvia extracció dels esterols totals detallada en l'apartat 11 de materials i mètodes.

Les primeres mesures d'esterols es van realitzar utilitzant fulles de roseta basal de plantes cultivades en terra durant 8 setmanes sota un fotoperíode de dia curt. Els resultats derivats d'aquestes determinacions (Figura 41; A) van mostrar que la quantitat total d'esterols acumulats en fulles de plantes del mutant *fps2-1* era comparable als valors obtinguts en fulles de plantes *wild type*. No obstant, en els extractes corresponents a fulles de plantes del mutant *fps1-1* s'observava una reducció de la quantitat d'esterols d'entre el 10-15% respecte a les plantes control.

Amb la intenció de potenciar l'aparició d'efectes diferencials, es va incrementar el flux de la via mitjançant l'addició de mevalonat al medi de cultiu, pensant que d'aquesta manera els efectes del bloqueig a nivell del pas catalitzat per les FPS podrien accentuar-se i fer-se més evidents en forma d'una diferència més acusada dels esterols acumulats entre algun dels mutants *fps* i les plantes wt. En aquesta ocasió, i per tal de facilitar l'incorporació de mevalonat al medi de cultiu, les mesures es van realitzar en plàntules crescudes en condicions estèrils durant 6 setmanes. La concentració de mevalonat afegida al medi va ser 5 mM, doncs es coneix que concentracions superiors poden causar toxicitat. L'aportació de mevalonat al medi de cultiu va significar, en tots els casos, l'acumulació del doble d'esterols totals en comparació amb les quantitats acumulades en les plàntules crescudes sense mevalonat (Figura 41; C). Tot i així, tant en les plàntules crescudes sense mevalonat al medi, com en les crescudes en presència de mevalonat, els esterols acumulats en el mutant *fps1-1* es van mantenir al voltant d'un 15% per sota dels nivells acumulats en les plàntules *wild type*, mentre que en les

mostres corresponents a plàntules del mutant *fps2-1* es van assolir els mateixos nivells que en les plàntules *wild type*.

L'estudi del patró d'expressió del gen *FPS2* indica que l'expressió d'aquest gen en fulles i plàntules de més de 4 dies és molt dèbil (Cunillera *et al.*, 2000b). De manera que podem pensar que, en les plàntules i fulles del mutant *fps1-1*, la quantitat d'enzim generat a partir de l'expressió del gen *FPS2* no resulta suficient per produir la quantitat de FPP necessari per a la síntesi dels nivells normals d'esterols. Per aquest motiu, es van repetir les anàlisis utilitzant inflorescències com a teixit de partida, on ambdós gens *FPS* s'expressen de forma intensa. Les determinacions realitzades en inflorescències (Figura 41; B) no van posar de manifest diferències en la quantitat total d'esterols acumulats en els mutants *fps* en comparació amb el *wild type*, confirmant que tant *FPS1S* com *FPS2* tenen la capacitat de produir el FPP necessari per a la síntesi de nivells normals d'esterols.

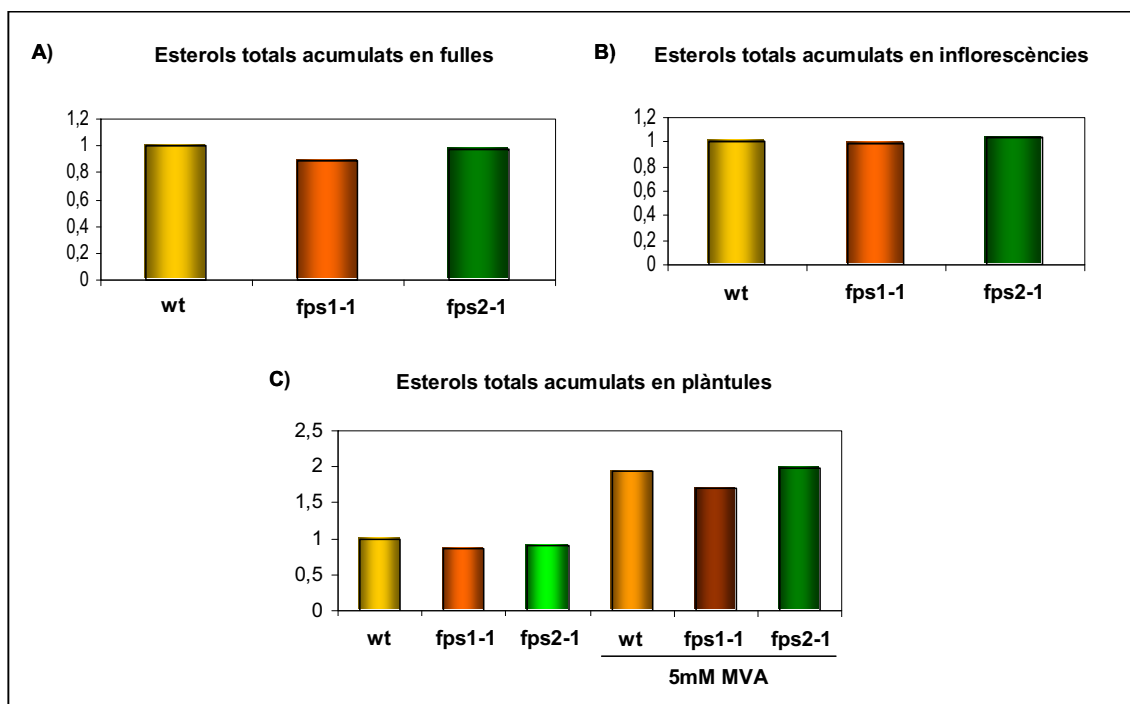


Figura 41: Determinació de la quantitat total d'esterols acumulats en fulles, plàntules i inflorescències dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* d'*A. thaliana*. A) Fulles de roseta basal de plantes crescudes durant 8 setmanes en condicions de dia curt. B) Inflorescències. C) Plàntules crescudes durant 6 setmanes en condicions estèrils en medi MS o bé en medi MS suplementat amb 5 mM mevalonat. Es mostren les dades d'un experiment representatiu.

En cap dels teixits ni les condicions analitzades es van detectar diferències en quant al perfil d'esterols entre els dos mutants *fps* i les corresponents mostres control (resultats no mostrats), fet previsible tenint en compte les petites variacions detectades pel que fa referència a les quantitats totals d'esterols acumulades.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que el FPP sintetitzat pels dos isoenzims citosòlics de la FPS d'*A. thaliana* pot ser canalitzat cap a la síntesi d'esterols. Ara bé, en el cas del mutant *fps1-1*, la lleugera disminució d'esterols detectada en les mesures fetes en plàntules i fulles de roseta basal, ens indica que en absència de FPS1S, la quantitat total d'esterols acumulada pot veure's lleugerament limitada en alguns òrgans o teixits per la baixa expressió del gen *FPS2*.

5.5. Obtenció i caracterització del doble mutant *fps1:fps2*

Els resultats derivats de la caracterització dels mutants simples amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2* han demostrat que la planta pot desenvolupar-se i completar el seu cicle vital amb tota normalitat amb un únic gen *FPS* funcional. Amb l'objectiu d'investigar els efectes de la inactivació simultània dels dos gens *FPS* es va procedir a la obtenció del doble mutant *fps1:fps2*.

La generació de dobles mutants *fps1:fps2* es va dur a terme mitjançant pol.linització creuada entre plantes homozigòtiques dels mutants *fps1-1*, *fps1-2*, *fps2-1* i *fps2-2* (P). Les llavors resultants del creuament (F₁) contindrien necessàriament un al.lel mutat per als gens *FPS1* i *FPS2*. A la Taula 5 s'indiquen els genotips de P i de la descendència F₁, i tots els genotips possibles de la generació F₂ resultant de l'autopol.linització de les plantes F₁.

Després de realitzar les primeres pol.linitzacions creuades entre plantes amb els diferents al.lels mutats i permetre l'autopol.linització de la generació F₁, es va observar la presència sistemàtica de llavors avortades en les silíquies de la descendència F₂ de tots els creuaments realitzats. El nombre de llavors que veia aturat el seu procés de maduració oscil.lava entre el 4,1% i el 6,1% (Taula 6). Suposant que entre ambdós isoenzims citosòlics pot existir una redundància en les seves funcions i que un únic al.lel silvestre dels gens *FPS1* o *FPS2* seria suficient per a la viabilitat de la planta, només el 6.25% de llavors haurien de ser inviàbles, doncs és el nombre de llavors de la generació F₂ que heretarien en homozigosi les mutacions en els gens *FPS1* i *FPS2*

(Taula 5). Per tant, els percentatges de letalitat obtinguts s'ajustaven al percentatge de dobles mutants en homozigosi que seria esperable (1/16; 6,25%).

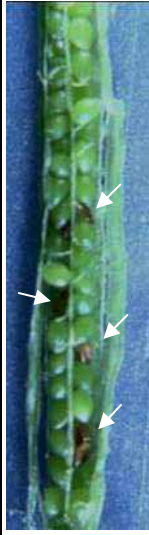
P *fps1fps1 FPS2FPS2* x *FPS1FPS1 fps2fps2*

F₁ *FPS1fps1 FPS2 fps2* x *FPS1 fps1 FPS2fps2*

F₂	<i>FPS1 FPS1</i>	<i>FPS1 fps1</i>	<i>FPS1 fps1</i>	<i>fps1 fps1</i>
<i>FPS2 FPS2</i>	<i>FPS1 FPS1</i> <i>FPS2 FPS2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 FPS2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 FPS2</i>	<i>fps1 fps1</i> <i>FPS2 FPS2</i>
<i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 FPS1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>fps1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>
<i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 FPS1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>	<i>fps1 fps1</i> <i>FPS2 fps2</i>
<i>fps2 fps2</i>	<i>FPS1 FPS1</i> <i>fps2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>fps2 fps2</i>	<i>FPS1 fps1</i> <i>fps2 fps2</i>	<i>fps1 fps1</i> <i>fps2 fps2</i>

Taula 5: Quadre de Punnet que il.lustra el resultat del creuament entre plantes dels mutants *fps1* i *fps2*. En majúscula s'indiquen els al.lels silvestres i en minúscula, els al.lels mutats. Les línies parentals (P) són homozigòtiques per a cadascun dels gens. Tota la descendència en la primera generació (F₁) serà heterozigòtica en ambdós locus (*FPS1fps1 FPS2 fps2*). La descendència en la segona generació (F₂) prové de l'autopol.linització de F₁ i dona lloc a nou genotips diferents. El doble mutant en homozigosi s'obtindria en un 6,25% (1/16) de la descendència F₂.

El percentatge de llavors avortades, juntament amb el fet de no trobar cap doble mutant homozigòtic en el genotipat realitzat per PCR de més de 80 plantes de la generació F₂, posa de manifest que la letalitat es produeix a nivell embrionari. Aquest resultat permet afirmar que a *Arabidopsis* no hi ha cap altre FPS ni cap altre preniltransferasa amb capacitat d'assumir la síntesi de FPP en el citòsol quan els dos gens *FPS* estan inactivats. També indica que, almenys en aquest estadi de desenvolupament, la via del MEP no pot aportar el FPP necessari al citòsol. Així doncs, aquests resultats permeten concloure que la presència d'almenys un dels dos gens *FPS* és necessària i, a la vegada, suficient per a la viabilitat de les plantes d'*Arabidopsis*.

Acceptador de pol.len x donador de pol.len	Nº total de llavors	Nº llavors avortades	% llavors avortades	
wt	1127	5	0,4	
<i>fps1</i>	1040	5	0,5	
<i>fps2</i>	1076	4	0,4	
<i>fps1-1 x fps2-1</i>	1010	50	5	
<i>fps2-1 x fps1-1</i>	1189	73	6,1	
<i>fps2-2 x fps1-1</i>	2480	105	4,1	
<i>fps1-2 x fps2-1</i>	1118	58	5,2	
<i>fps1-2 x fps2-2</i>	1467	62	4,2	
Letalitat esperada			6,25	

Taula 6: Anàlisi del percentatge de llavors avortades de la generació F₂ resultant del creuament entre els mutants *fps1* i *fps2*. A la dreta de la taula es mostra la imatge d'una siliqüa on s'observen llavors de color verd que es desenvolupen normalment i llavors avortades (de color marró, indicades amb fletxes) que han vist aturat el seu desenvolupament.

5.5.1. Estudi de la letalitat embrionària del doble mutant *fps1:fps2*

Durant l'embriogènesi es poden distingir diferents estadis de desenvolupament. El primer estadi que es veu representat en la Figura 42 correspon a un embrió format per 8 cèl·lules (Figura 42; A), que es continuen dividint donant lloc a un embrió d'estructura globular (Figura 42; B). Progressivament, aquesta estructura evoluciona cap a la formació d'un embrió en forma de cor (Figura 42; C) i a continuació en forma de torpede (Figura 42; D). Finalment, l'embrió en forma de torpede continua desenvolupant-se passant per l'estadi que es coneix com a "walking-stick embryo" (Figura 42; E), fins a completar la seva maduració en un estadi on poden distingir-se els cotilèdons plegats que ja adquireixen una coloració verdosa (Figura 42; F) (Bowman, 1994).

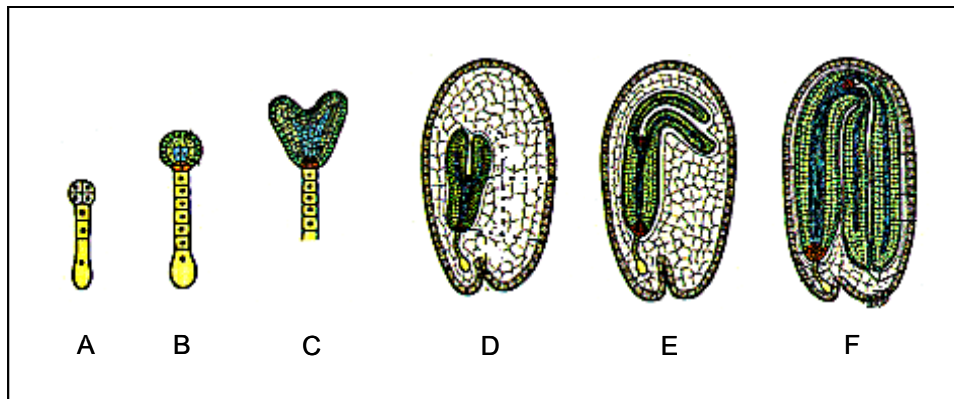


Figura 42: Representació esquemàtica dels diferents estadis del desenvolupament embrionari en *A. thaliana*. Es mostra un embrió format per 8 cèl·lules (A), un embrió en forma globular (B), en forma de cor (C), en forma de torpede (D), un embrió en un estadi conegut com a “walking-stick embryo” (E) i finalment, un embrió madur (F) on ja es distingeixen els cotilèdons plegats.

Per analitzar l'estadi de desenvolupament de la llavor en el qual es produeix la letalitat, es van observar per microscopia de contrast diferencial de fases, llavors de la generació F_2 obtingudes per autopollinització de F_1 i sotmeses a un procés de clarificació amb hidrat de cloral (apartat 6.4 de materials i mètodes).

L'observació al microscopi de llavors de plantes *wild type* en diferents estadis de maduració va permetre la identificació dels estadis anteriorment descrits. En les 3 imatges superiors de la Figura 43 podem observar llavors *wild type* on es distingeixen un embrió en forma de cor (Figura 43; A), un embrió en forma de torpede (Figura 43; B) i finalment, una llavor on ja es pot observar la forma dels cotilèdons plegats (Figura 43; C). D'altra banda, l'observació llavors avortades del doble mutant *fps1:fps2*, va permetre detectar que el desenvolupament embrionari havia quedat aturat en l'estadi globular (Figura 43; D, E, F i G). En algun cas (Figura 43; H) es va observar un embrió amb un nombre superior de cèl·lules que s'havien dividit de manera desorganitzada sense arribar en cap cas a l'estadi en forma de cor.

Aquests resultats permeten concloure que la letalitat embrionària en les llavors del mutant *fps1:fps2* es produeix en fases molt inicials del desenvolupament embrionari, doncs en cap cas s'arriba a assolir l'estadi en que l'embrió es troba en forma de cor.

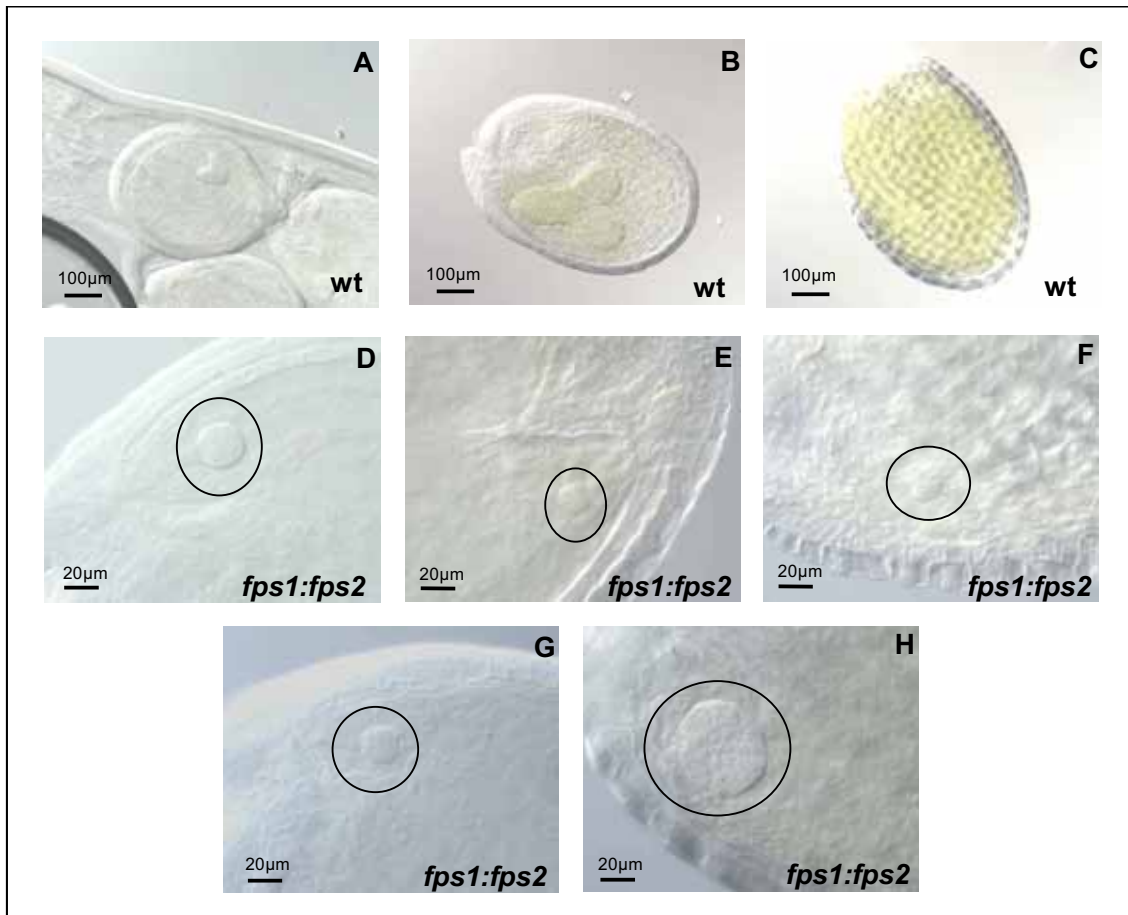


Figura 43: Estudi del desenvolupament embrionari en llavors del doble mutant *fps1:fps2*. A, B i C: llavors *wild type* que mostren embrions en estadi de cor, torpede i cotilèdons plegats, respectivament. D, E, F, G i H: llavors corresponents al doble mutant *fps1:fps2* que mostren l'embrió aturat en la fase globular. H: llavor corresponent al doble mutant *fps1:fps2* en el qual s'observa l'embrió amb una estructura desorganitzada.

5.6. Efecte de la mevastatina sobre els mutants *fps1* i *fps2*

L'HMGR pot ser inhibida específicament mitjançant inhibidors de la família de les estatines (mevastatina, lovastatina, mevinolina, etc.). Està descrit que, en les plantes *wild type*, les estatines produeixen una inhibició en el desenvolupament de l'arrel i una aturada en el desenvolupament de les fulles vertaderes. Estudis del grup han posat de manifest l'existència d'una bona correlació entre els nivells d'activitat HMGR i la sensibilitat de les plantes a aquests inhibidors (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). D'altra banda, s'ha vist que quan s'inhibeixen etapes posteriors de la via del mevalonat es produeix un efecte d'activació de l'HMGR (Wentzinger *et al.*, 2002). De manera que,

l'anàlisi de la sensibilitat a la mevastatina seria una forma ràpida i simple per detectar possibles efectes de la pèrdua de funció dels gens FPS sobre l'activitat HMGR.

5.6.1. Estudi de la sensibilitat a mevastatina en els mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana* en el moment de la germinació

Els experiments de sensibilitat a la mevastatina es van realitzar fent germinar les llavors dels mutants *fps1* i *fps2* en plaques de Petri amb medi MS al que s'havien afegit diferents concentracions de l'inhibidor. Cada experiment es va dur a terme per triplicat, amb 50 llavors de cada línia per a cada concentració.

Tal i com es pot veure en les imatges de la Figura 44, en el mutant *fps1-1* no es van observar diferències respecte el seu control de planta silvestre dins del rang de concentracions de mevastatina assajades (0,5-1-1,5-2 μM), és a dir, tant el mutant com el *wt* mostraven el mateix grau d'inhibició del desenvolupament de l'arrel i de les fulles vertaderes. En canvi, en el mutant *fps2-1* es va detectar una marcada hipersensibilitat a l'efecte inhibidor de la mevastatina, que es manifestava per una aturada en el desenvolupament del *seedling* just després de la germinació, amb una marcada inhibició de l'elongació de l'hipocòtil i del desenvolupament dels cotilèdons. Aquesta hipersensibilitat es manifestava de forma gradual des de les concentracions més baixes d'inhibidor assajades.

L'efecte d'hipersensibilitat a mevastatina es manifestava d'una forma encara més intensa en la germinació de les llavors del mutant *fps2-2* de la varietat *Landsberg erecta*. Com es pot veure en la Figura 44; B, el fenotip en *fps2-2* és molt més sever fins i tot a concentracions d'inhibidor (0,05-0,1-0,5 μM) notablement inferiors a les utilitzades en el cas dels mutants de la varietat Col. 0.

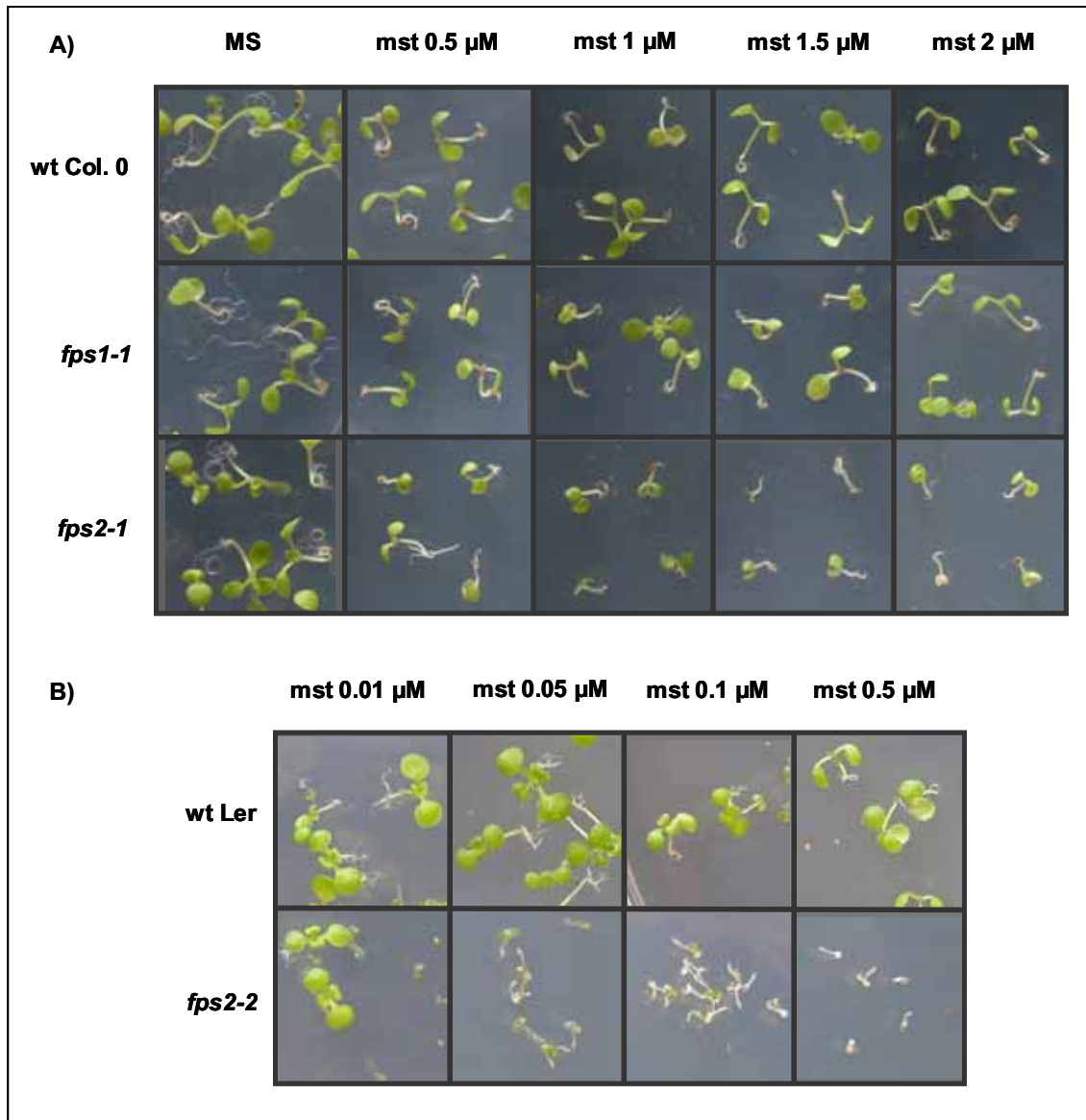


Figura 44: Efecte de la mevastatina sobre la germinació i el desenvolupament de les plàntules dels mutants *fps1* i *fps2*. A) Mutants *fps1-1* i *fps2-1* (Col. 0). B) Mutant *fps2-2* (Ler). MS: medi Murashige i Skoog. mst: medi MS suplementat amb mevastatina a les concentracions indicades. Les imatges mostren l'aspecte de les plàntules al cap de 8 dies de cultiu.

Tots els efectes de sensibilitat a mevastatina observats, eren revertits quan el medi amb l'inhibidor es suplementava des del moment de la germinació amb mevalonat (5 mM), el producte de la reacció catalitzada per l'enzim HMGR (Figura 45). Aquest fet demostra que la hipersensibilitat a la mevastatina dels mutants *fps2* és deguda al bloqueig del flux de la via i no a qualsevol altre efecte de la mevastatina.

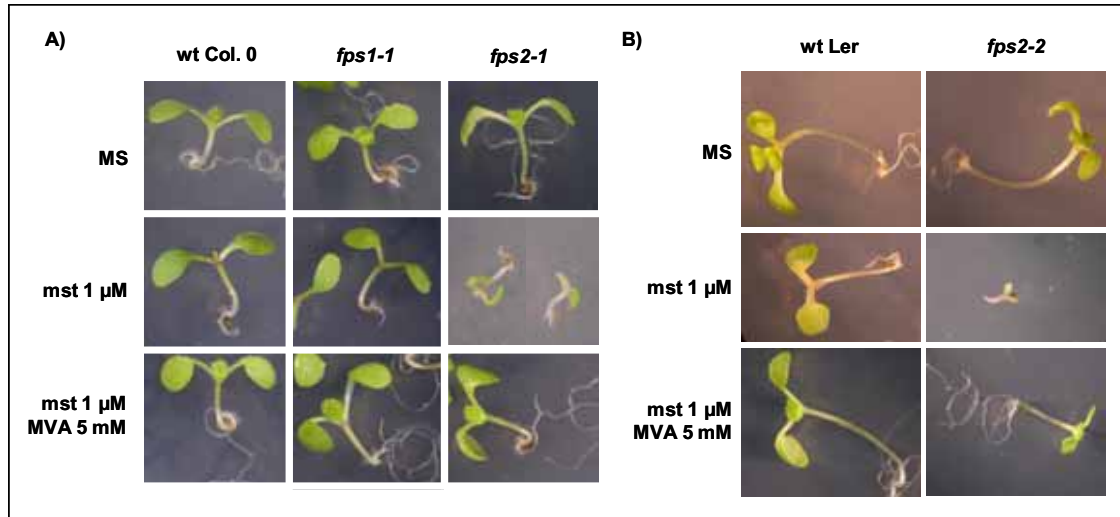


Figura 45: Reversió amb mevalonat del fenotip de sensibilitat a la mevastatina en els mutants *fps*. A) Mutants *fps1-1* i *fps2-1* (Col. 0). B) Mutant *fps2-2* (Ler). MS: medi Murashige i Skoog. mst: medi MS suplementat amb mevastatina 1 μM. MVA: plaques MS amb mevalonat a una concentració 5 mM. Les imatges mostren l'aspecte de les plàntules al cap de 8 dies de cultiu.

5.6.2. Estudi de la permeabilitat de les llavors dels mutants *fps1* i *fps2*

La resposta diferencial dels mutants *fps1* i *fps2* davant la mevastatina podria ser deguda a diferències en la permeabilitat de la coberta de la llavor que fessin, per exemple, que la mevastatina pogués penetrar més fàcilment en les llavors dels al·lels mutants *fps2* que en les del mutant *fps1-1* i el control. S'ha descrit que les sals de tetrazoli poden ser utilitzades per tal d'estudiar la permeabilitat de les llavors (Debeaujon *et al.*, 2000). La tècnica de tinció utilitzant sals de tetrazoli es basa en el fet que quan aquestes sals penetren a l'interior de la llavor, són metabolitzades per reductases NADH-dependents del reticle endoplasmàtic donant lloc a formazans colorejats (Berridge *et al.*, 1996). De manera que, l'observació de diferències en la coloració de les llavors tenyides es considera indicativa de diferències en la permeabilitat de les llavors.

Les tincions amb sals de tetrazoli realitzades en llavors dels mutants *fps1-1*, *fps2-1* i *fps2-2* (Figura 46) no van posar de manifest diferències en la permeabilitat de les llavors dels mutants en comparació amb les llavors dels respectius controls *wild type*. Les úniques diferències observades en la coloració de les llavors tenyides són les

degudes al fons genètic utilitzat, doncs la permeabilitat de la varietat *Landsberg erecta* és diferent a la de la varietat Columbia 0, independentment de la presència o absència de la mutació *fps*. Per tant, l'efecte diferencial d'hipersensibilitat a la mevastatina en les llavors dels mutants *fps2* no sembla degut a una major penetració de l'inhibidor en aquestes llavors.

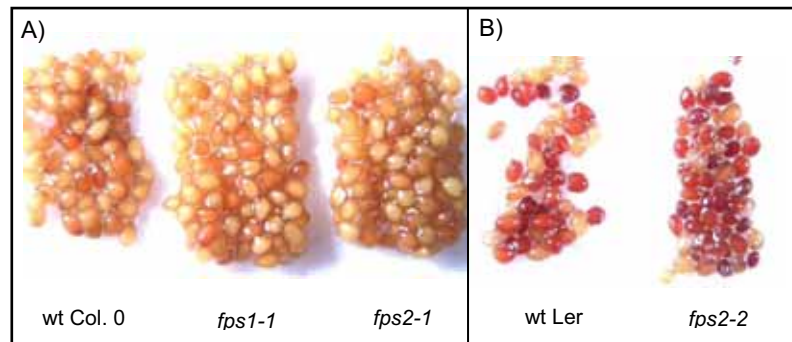


Figura 46: Anàlisi de la permeabilitat de les llavors dels mutants *fps1* i *fps2* mitjançant tinció amb sals de tetrazoli. A) Llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* de la varietat Columbia 0. B) Llavors del mutant *fps2-2* de la varietat *Landsberg erecta*.

5.7. Estudi de l'activitat HMGR en els mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*

La hipersensibilitat a la mevastatina del mutant *fps2* suggeria l'existència d'alteracions en l'activitat HMGR en aquest mutant, doncs es coneix l'existència d'una bona correlació entre l'activitat HMGR i la sensibilitat a les estatines. De manera que es va decidir confirmar aquesta possibilitat mesurant directament l'activitat HMGR en els mutants *fps*.

Els primers assaigs d'activitat HMGR (apartat 10.1 de materials i mètodes) es van realitzar en extractes de llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* estratificades durant 3 dies en foscor i a 4°C, que posteriorment havien estat 24h en condicions de dia curt per tal que iniciessin el procés de germinació. En el moment de la recol·lecció de les mostres, en la majoria de les llavors s'havia iniciat l'emergència de la radícula. Els resultats van mostrar que, contràriament al que es podia esperar, els valors d'activitat HMGR en les llavors del mutant *fps2-1* eren al voltant de 2 vegades més elevats que els de les llavors de les plantes *wild type* i de les plantes mutants *fps1-1* (Figura 47; A). Per

tal de confirmar la correlació entre la hipersensibilitat a la mevastatina i l'increment d'activitat HMGR, també es van dur a terme mesures d'activitat HMGR en extractes de llavors del mutant *fps2-2* (Ler) tractades en les mateixes condicions que les descrites anteriorment. L'activitat HMGR mesurada en el mutant *fps2-2* va resultar ser aproximadament 3,8 vegades superior al valor d'activitat de la mostra *wild type* (Figura 47; A). Cal tenir present que el mutant *fps2-2* s'havia mostrat més sensible a l'efecte de la mevastatina que el mutant *fps2-1*.

A continuació, i amb l'objectiu d'investigar si l'activació de l'enzim HMGR es produeix quan s'inicia la germinació o bé ja es manifesta en les llavors abans de germinar, es van dur a terme mesures d'activitat enzimàtica en llavors seques (no imbibides). Novament, es va detectar un increment molt considerable d'activitat HMGR en les llavors del mutant *fps2-1*, de l'ordre de 2,5 vegades els valors obtinguts en les llavors *wild type* (Figura 47; B).

Finalment, i per tal d'estudiar si l'HMG-CoA reductasa es manté permanentment activada durant el desenvolupament de les plàntules, es va mesurar l'activitat HMGR en extractes obtinguts a partir de plàntules de 5, 10 i 15 dies. Tal i com es pot observar en la gràfica C de la Figura 47, ni en el mutant *fps1-1* ni en *fps2-1* no es va detectar un increment significatiu de l'activitat HMGR en comparació amb els extractes de plàntules *wild type*.

En conjunt, aquests resultats mostren que en les llavors dels mutants *fps2* es produeix una activació de l'HMGR que, en canvi, no es detecta en les llavors del mutant *fps1*. Aquesta activació es produeix amb anterioritat al moment de la germinació, tal i com demostra el fet que l'increment d'activitat HMGR es detecti tant en llavors germinades, com en llavors seques (no imbibides). D'altra banda, l'activació de l'HMGR deixa de produir-se pocs dies després de que les llavors germinin, tal i com indiquen els nivells inalterats d'activitat HMGR d'ambdós mutants (*fps1* i *fps2*) en comparació amb els valors dels controls, en les mesures realitzades en plàntules. Per tant, es posa de manifest que l'activació de l'HMGR es produeix únicament en determinats estadis del desenvolupament. A més a més, tots aquests resultats indiquen l'existència d'una regulació diferencial entre els mutants *fps1* i *fps2*.

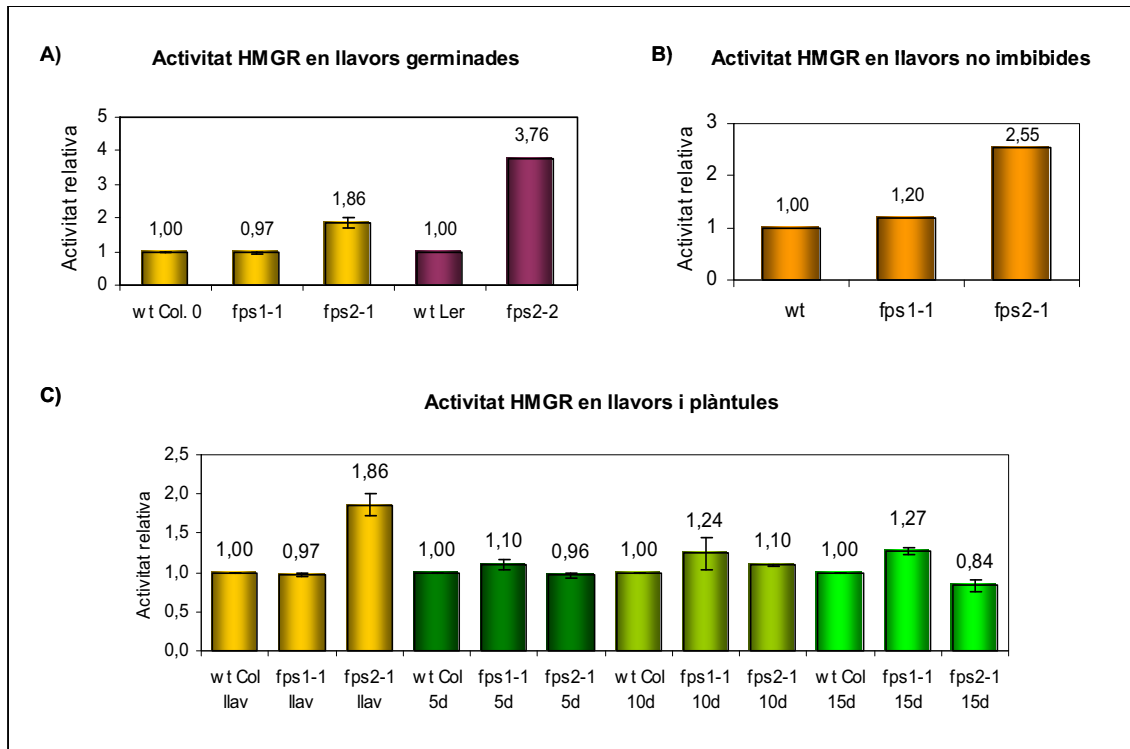


Figura 47: Activitat enzimàtica HMGR en llavors i en els primers estadis de desenvolupament dels mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*. A) Activitat HMGR en extractes de llavors dels mutants *fps1-1*, *fps2-1* i *fps2-2* que han iniciat el procés de germinació. B) Activitat HMGR en extractes de llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* no imbibides. C) Activitat HMGR en llavors i plàntules de 5, 10 i 15 dies dels mutants *fps1-1* i *fps2-1*. Les dades provenen de dos experiments independents. L'activitat HMGR s'expressa en relació a l'activitat dels respectius controls *wild type*, als quals s'ha atribuït el valor d'1.

5.8. Estudi de la sensibilitat a la mevastatina en plàntules dels mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*

Les mesures d'activitat HMGR en extractes de llavors d'ambdós mutants *fps2* (*fps2-1* i *fps2-2*) mostren una correlació entre l'activació de l'HMGR i la hipersensibilitat a la mevastatina. Per acabar de confirmar-ho, es va investigar si el restabliment dels valors control d'activitat HMGR observats a partir dels 5 dies post-germinació en el mutant *fps2-1* anava acompanyat d'una normalització del grau de sensibilitat a la mevastatina.

Llavors dels mutants *fps* i llavors *wild type* es van sembrar en plaques amb medi MS sobre les que prèviament s'havien dipositat membranes de nylon permeables que permeten l'absorció de nutrients i el creixement de les plàntules però eviten que les arrels penetrin en l'agar. D'aquesta manera, les plàntules es poden canviar de medi de creixement amb facilitat i sense provocar lesions a les arrels. Després de 5 dies de creixement en medi MS, les membranes de nylon que contenen les plàntules es van traspasar a plaques amb medi MS suplementat amb mevastatina 1µM (dia 0). El cultiu de les plàntules en medi suplementat amb mevastatina es va continuar durant 10 dies.

El resultat obtingut en aquest experiment ens permet observar que l'aplicació de mevastatina en plàntules de 5 dies produeix el mateix bloqueig en el desenvolupament de les fulles vertaderes i en el creixement de l'arrel tant en les plantes control com en ambdós mutants *fps*. En aquesta ocasió, no s'observa hipersensibilitat a mevastatina en les plàntules del mutant *fps2* (Figura 48), a diferència del que s'observa quan la mevastatina està present en el medi des del moment de la germinació.

En conjunt, tots aquests resultats confirmen la correlació entre la hipersensibilitat a la mevastatina i els valors d'activitat HMGR. És a dir, en els estadis de desenvolupament dels mutants *fps2* en els quals s'alteren els valors d'activitat HMGR respecte les plantes *wild type*, també es veu alterada la sensibilitat a la mevastatina. En canvi, en les línies mutants (*fps1*) o en els estadis de desenvolupament (*fps2*) en els quals no es detecten variacions en els nivells d'activitat HMGR, tampoc es detecta hipersensibilitat a l'inhibidor.

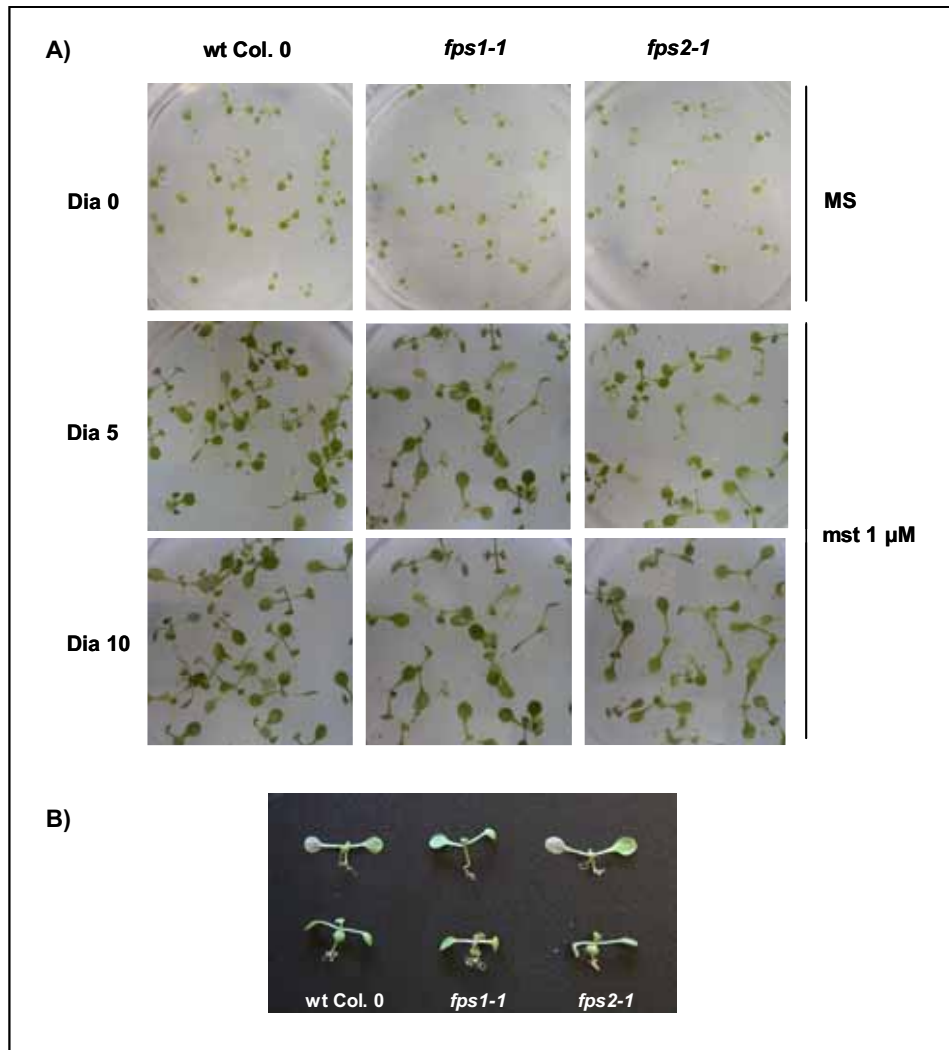


Figura 48: Efecte de la mevastatina en plàntules dels mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*. A) Llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* i llavors *wild type* sembrades en medi MS van ser traspassades a plaques amb medi MS suplementat amb mevastatina 1 μM 5 dies després de la germinació (dia 0). Les imatges corresponents a Dia 5 i Dia 10 mostren l'aspecte de les plàntules després de 5 i 10 dies de creixement en medi suplementat amb mevastatina 1 μM, respectivament. B) Efecte de la mevastatina sobre el desenvolupament de l'arrel i de les fulles vertaderes en plàntules de 15 dies (5 dies en MS i 10 dies en mst 1 μM) dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* i en plàntules *wild type*.

5.9. Estudi dels nivells de transcrits HMGR en llavors i plàntules dels mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana*

Per tal d'investigar si l'increment d'activitat HMGR en les llavors va acompanyat d'una activació a nivell transcripcional, es van dur a terme mesures de la quantitat de transcrits HMGR mitjançant experiments de PCR quantitativa a temps real. Aquestes anàlisis es van realitzar utilitzant *primers* degenerats que permeten amplificar simultàniament el cDNA sintetitzat a partir dels transcrits dels 3 isoenzims HMGR (HMGR1S, HMGR1L i HMGR2), ja que hibriden en una zona conservada dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*A. thaliana* que codifica pel domini catalític de l'HMGR.

Es van obtenir mostres de RNA total, tant de llavors germinades (24 h després de posar-les a germinar) com de plàntules de 10 dies, que es van retrotranscriure i es van amplificar per PCR quantitativa a temps real. En tots els casos, l'abundància dels transcrits HMGR es va normalitzar en relació als nivells d'expressió del gen que codifica per la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). La quantificació relativa respecte l'expressió detectada en les mostres de les plantes control es va realitzar amb el mètode del $\Delta\Delta C_t$ (apartat 8.3 de materials i mètodes).

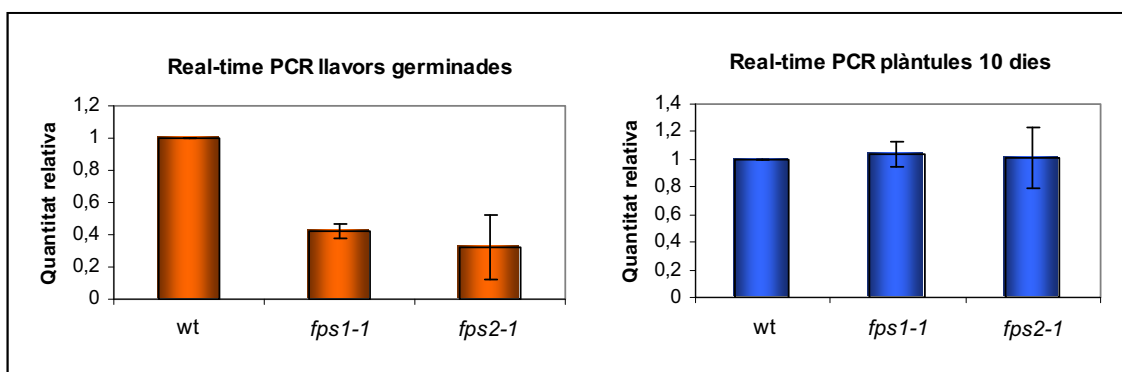


Figura 49: Anàlisi de l'expressió dels gens *HMG* d'*A. thaliana* per PCR quantitativa a temps real. Quantitats relatives d'expressió dels gens *HMG* detectats en llavors germinades (vermell) i en plàntules de 10 dies (blau) cultivades en medi MS en condicions de dia curt. L'abundància dels transcrits HMGR està normalitzada en relació als nivells d'expressió del gen que codifica per la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). Les expressions s'indiquen en relació a l'expressió en les mostres de les plantes control, a les que s'ha atribuït el valor d'1. La

quantificació relativa s'ha realitzat amb el mètode del $\Delta\Delta Ct$. Els resultats provenen de dos experiments independents.

Els resultats obtinguts (Figura 49) mostren l'existència d'una davallada en els nivells de transcrits dels gens *HMG* en les mostres de RNA de llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1*, fins al voltant d'un 40% i 30%, respectivament, en comparació amb els nivells de transcrits mesurats en el RNA de llavors *wild type*. D'altra banda, els mateixos experiments realitzats amb RNA obtingut a partir de plàntules de 10 dies, indiquen que en aquest estadi no hi ha diferències en els nivells de transcrits de l'HMGR entre els mutants *fps* i les plantes control.

Aquests resultats posen de manifest l'existència d'una regulació transcripcional negativa sobre l'expressió dels gens *HMG* en les llavors com a conseqüència de la pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*.

5.10. L'epi-brassinòlid no reverteix la hipersensibilitat a mevastatina en el mutant *fps2*

Donat que les llavors, juntament amb el pol·len, constitueixen una font important de brassinosteroides en les plantes (Schmidt *et al.*, 1997), i que aquestes fitohormones són sintetitzades a partir de la via del mevalonat, es va considerar la possibilitat que els mutants *fps* fossin deficientes o presentessin alguna disminució en el contingut de brassinosteroides, que pogués ser responsable de l'activació de l'HMGR en les llavors del mutant *fps2*.

Amb l'objectiu d'investigar si la presència de brassinosteroides en el medi era capaç de revertir els efectes d'hipersensibilitat a mevastatina observats en el mutant *fps2*, es van germinar llavors dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* i llavors *wild type* en plaques de medi MS suplementades amb mevastatina a una concentració de 0,5 μM en presència o absència d'epi-brassinòlid 0,2 μM . Prèviament, es va comprovar que aquest compost per sí sol no produïa efectes diferencials en els mutants *fps* en comparació amb plantes control.

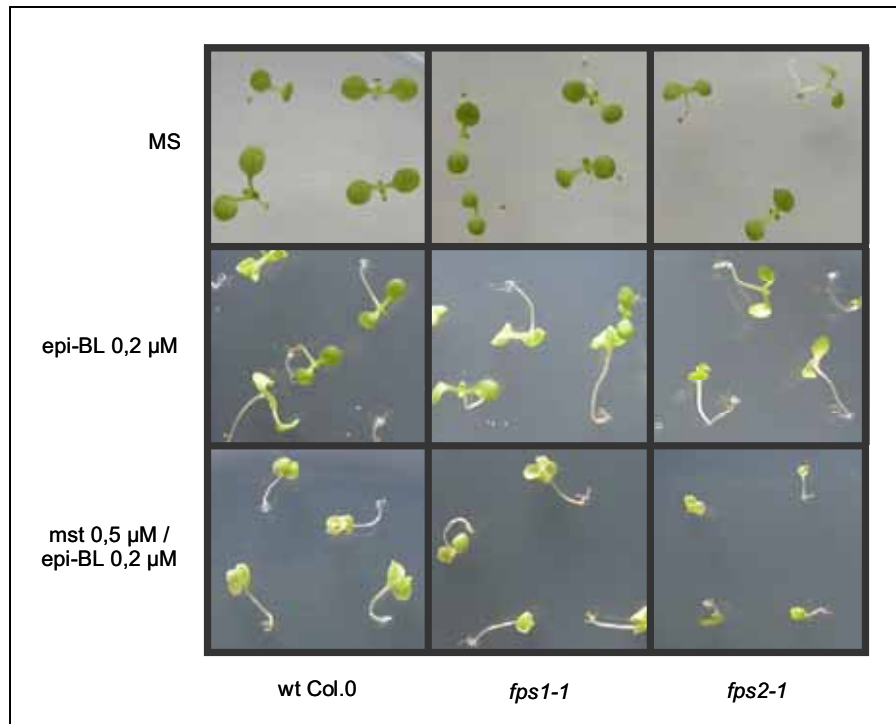


Figura 50: Efecte de l'epi-brassinòlid sobre la hipersensibilitat a la mevastatina del mutant *fps2-1*. MS: medi Murashige i Skoog. epi-BL 0,2 μM : medi MS amb epi-brassinòlid 0,2 μM . mst 0,5 μM / epi-BL 0,2 μM : medi MS que conté mevastatina 0,5 μM i epi-brassinòlid 0,2 μM .

Els resultats obtinguts (Figura 50) posen de manifest, per una banda, que tant ambdós mutants *fps* com el *wt* són capaços de respondre a epi-brassinòlid, ja que s'observa una marcada elongació dels hipocòtils en totes les plantes. D'altra banda, s'observa que la presència d'epi-brassinòlid a una concentració de 0,2 μM és incapaç de revertir la hipersensibilitat a la mevastatina del mutant *fps2*, la qual cosa indica que un possible dèficit en brassinosteroides no és el responsable de desencadenar el fenotip d'hipersensibilitat a mevastatina en aquest mutant.

5.11. El mutant *eral* d'Arabidopsis no mostra hipersensibilitat a mevastatina

El mutant *eral* (*enhanced response to ABA*) és un mutant deficient en la farnesilació de proteïnes degut a una mutació que afecta la subunitat β de la farnesiltransferasa I. Degut a l'existència d'una o més proteïnes farnesilades implicades en la regulació negativa de la senyalització de l'àcid abscísic (ABA), aquest mutant

resulta més sensible als efectes d'aquesta fitohormona. De fet, el mutant *eral* va ser identificat per la seva incapacitat de germinar en presència de 0,3 μM d'ABA (Crowell, 2000; Cutler *et al.*, 1996).

En els mutants *fps* es podria produir una reducció en els nivells del FPP derivat cap a la prenilació de proteïnes. Per intentar obtenir alguna evidència de la possible relació entre l'activació de l'HMGR en els mutants *fps2*, i per tant, la hipersensibilitat a la mevastatina, i un possible dèficit en la farnesilació de proteïnes, el mutant *eral* es va sotmetre a un test de sensibilitat a aquest inhibidor. Es van germinar llavors del mutant *eral-2*, dels mutants *fps1-1* i *fps2-1*, i del control *wt* en plaques de medi suplementat amb mevastatina a una concentració de 1 μM . Donat que les llavors *eral-2* mostren un endarreriment en la germinació d'aproximadament 2 dies respecte a les llavors *wt*, les llavors d'aquest mutant es va posar a germinar dos dies abans per tal d'aconseguir que totes les llavors germinessin a la vegada i facilitar la comparació del desenvolupament de les plàntules.

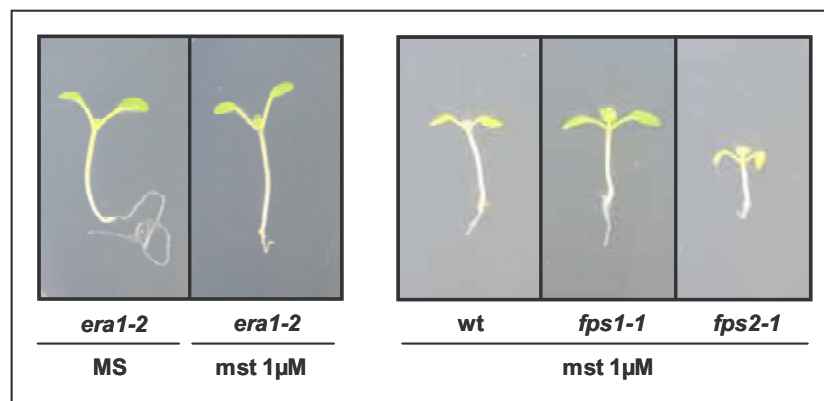


Figura 51: Efecte de la mevastatina sobre el mutant deficient en farnesilació de proteïnes *eral*. En les imatges es mostra el fenotip representatiu de plàntules del mutant *eral-2* crescudes durant 11 dies en medi MS i en medi MS suplementat amb mevastatina 1 μM ; i de plàntules *wild type* i dels mutants *fps1-1* i *fps2-1* crescudes durant 9 dies en medi MS suplementat amb mevastatina 1 μM .

Els resultats que es poden observar en la imatge de la Figura 51 mostren que, en presència de mevastatina, el mutant *eral-2* no manifesta hipersensibilitat a aquest inhibidor, ja que el seu comportament és igual al de les plàntules *wt* i les del mutant *fps1-1*.

Tot i que aquests resultats no constitueixen una evidència directa, semblen indicar que un dèficit en la farnesilació de proteïnes no seria responsable de l'activació de l'enzim HMGR en el mutant *fps2* d'*A. thaliana*.

6. Generació i anàlisi de plantes transgèniques per complementar els mutants *fps1* i *fps2*

Amb l'objectiu d'investigar la capacitat dels isoenzims FPS1S i FPS2 de complementar-se mútuament, és a dir, si l'isoenzim FPS1 complementa la pèrdua de funció de l'isoenzim FPS2 i a l'inrevés, es van generar les construccions pCGEN1-2 i pTGEN2-1S esquematitzades a la Figura 52. En paral·lel, i per comprovar que els efectes fenotípics observats en els mutants *fps* es reverteixen al reintroduir una còpia *wild type* del gen disruptat, es van generar les construccions pCGEN1 i pTGEN2.

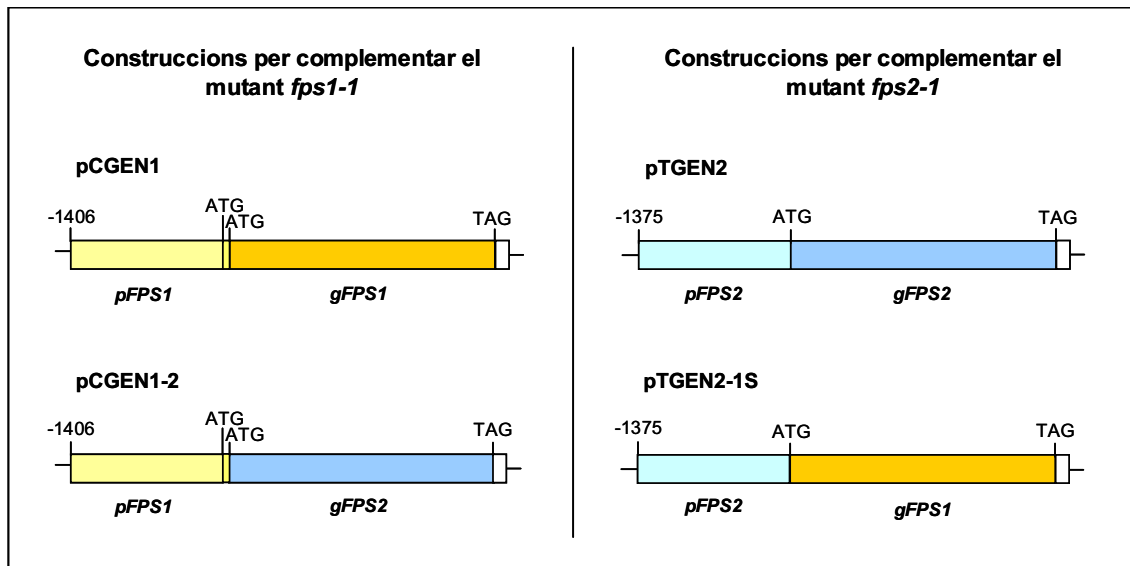


Figura 52: Representació esquemàtica de les construccions utilitzades per complementar el mutant *fps1-1* (esquerra) i el mutant *fps2-1* (dreta). Els promotors (*p*) consten de 1406 pb en el cas de *pFPS1* i de 1375 pb en el cas de *pFPS2*. Els fragments denominats *gFPS1* i *gFPS2* inclouen els exons i els introns dels gens *FPS1* i *FPS2*, respectivament. Les caixes blanques representen les regions 3' flaquejants.

En totes les construccions, el fragment comprès entre el codó d'inici i el codó de parada està format pels exons i els introns del gen corresponent en cada cas. Les construccions generades per complementar el mutant *fps1-1* inclouen l'ATG que dona lloc a l'isoenzim FPS1L i la seqüència del pèptid de transcrit que permet generar l'isoenzim FPS mitocondrial. Els promotors consten de 1406 pb en el cas de *pFPS1* i de

1375 pb en el cas de *pFPS2* i les regions flaquejants situades a 3' dels gens consten de 339 pb en el gen *FPS1* i de 441 pb en el gen *FPS2* (apartat 4.2 de materials i mètodes).

Mitjançant la tècnica del *floral dip* (Clough i Bent, 1998) es van introduir les construccions pCGEN1 i pCGEN1-2 en el mutant *fps1-1* i les construccions pTGEN2 i pTGEN2-1S en el mutant *fps2-1*. Un cop infiltrades les plantes dels mutants amb les construccions desitjades, es van seleccionar les línies portadores del transgèn pel seu caràcter de resistència a higromicina. La segregació de la resistència a higromicina va permetre la selecció de plantes homozigòtiques per a cadascun dels transgens inserits.

Per tal de comprovar que els transgens incorporats s'estaven expressant i que en aquestes plantes es restablien els valors d'activitat FPS de les plantes *wild type*, es van realitzar assaigs d'activitat FPS en les línies transgèniques seleccionades.

En el cas de les línies generades per complementar el mutant *fps1-1*, es van realitzar les mesures d'activitat FPS en el sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal. Extractes de fulles de plantes *wild type* i del mutant *fps1-1* es van utilitzar com a controls. Cal recordar que l'expressió del gen *FPS1* en fulles de roseta basal és prou intensa perquè es pugui detectar en aquest teixit la disminució d'activitat produïda per la inactivació del gen *FPS1* i, conseqüentment, la possible recuperació de la mateixa. Tal i com es pot veure a la gràfica de la Figura 53;A, en les plantes que expressen tant el gen *FPS1* com el gen *FPS2* sota el control del promotor del gen *FPS1*, anomenades *fps1Gen1* i *fps1Gen1-2* respectivament, es recupera l'activitat FPS, superant fins i tot en aproximadament 1,7 vegades els valors d'activitat mesurats en les plantes *wild type*.

Pel que fa referència a les línies generades per complementar el mutant *fps2-1*, les mesures d'activitat FPS es van realitzar utilitzant el sn 16000 x g d'extractes d'inflorescències (Figura 53; B). En aquest cas, en les mostres de plantes en les que s'ha reintroduït el gen *FPS2*, anomenades *fps2Gen2*, s'observa que l'activitat del mutant s'incrementa fins a assolir 2,7 vegades l'activitat de les mostres de plantes *wild type*. Mentre que en els mutants que incorporen el gen *FPS1* sota el control del promotor del gen *FPS2*, anomenades *fps2Gen2-1S*, es restableixen els mateixos valors d'activitat FPS que els assolits en les mostres de plantes *wild type*.

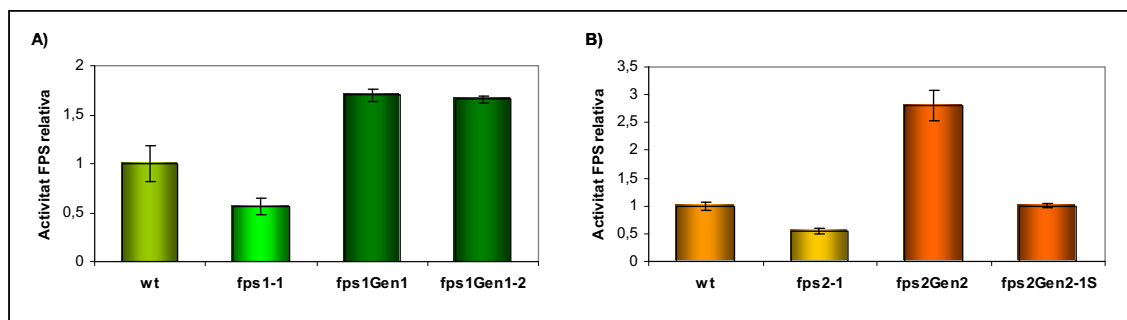


Figura 53: Activitat FPS de plantes transgèniques per complementar els mutants *fps1-1* i *fps2-1*. Les mesures es van realitzar en el sn 16000 x g d'extractes de fulles de roseta basal (A) i d'inflorescències (B). Les dades corresponen als resultats de dos experiments independents. L'activitat FPS s'expressa en relació a l'activitat de les mostres *wild type*, a les que s'ha atribuït el valor d'1. *fps1Gen1* i *fps1Gen1-2*: plantes del mutant *fps1-1* que incorporen les construccions pCGEN1 i pCGEN1-2, respectivament. *fps2Gen2* i *fps2Gen2-1S*: plantes del mutant *fps2-1* que incorporen les construccions pTGEN2 i pTGEN2-1S, respectivament.

La característica més destacable que diferencia als mutants *fps1* i *fps2* d'*A. thaliana* és l'activació de l'enzim HMGR que es produeix únicament en les llavors dels mutants *fps2* (apartat 5.7 de resultats). Com ja s'ha descrit amb anterioritat (apartat 5.6.1. de resultats), aquesta activació és fàcilment detectable per l'aparició d'hipersensibilitat a la mevastatina quan les llavors del mutant *fps2* es fan germinar en presència d'aquest inhibidor. Amb l'objectiu d'investigar la capacitat tant de FPS1 com de FPS2 per complementar la pèrdua de funció del gen *FPS2*, es va analitzar si en les plantes *fps2Gen2-1S* i *fps2Gen2* es revertia el fenotip d'hipersensibilitat a mevastatina.

Tal i com es pot veure en les imatges de la Figura 54, en medi MS suplementat amb mevastatina 1 μ M, tant les plantes *fps2Gen2* com les plantes *fps2Gen2-1S* presenten els mateixos efectes que les plantes *wild type*. És a dir, s'observa la típica inhibició del creixement de l'arrel i del desenvolupament de les fulles vertaderes, però, en cap cas, s'altera el desenvolupament dels cotilèdons ni el creixement o elongació dels hipocòtils tal i com passa en el mutant *fps2*. Per tant, en ambdós casos es reverteix clarament el fenotip d'hipersensibilitat a la mevastatina. Això confirma que el fenotip d'hipersensibilitat a aquest inhibidor està causat específicament per la pèrdua de funció del gen *FPS2*. D'altra banda, demostra que l'expressió de l'isoenzim FPS1 és capaç de complementar la pèrdua de funció del gen *FPS2* i suggereix que l'especialització funcional en les llavors pot venir donada pels patrons d'expressió d'ambdós gens.

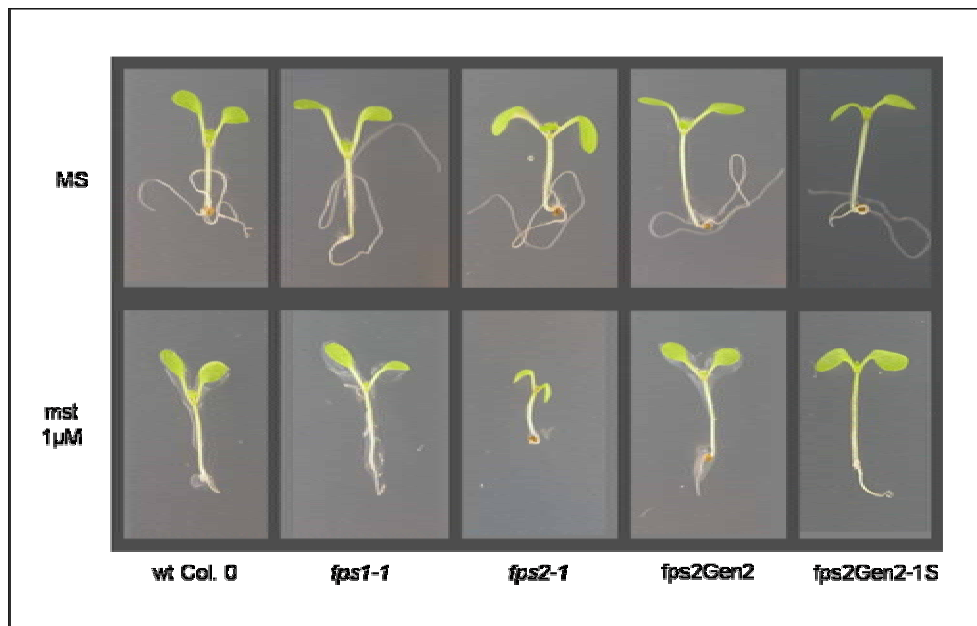


Figura 54: Anàlisi de la sensibilitat a la mevastatina en les plantes *fps2Gen2* i *fps2Gen2-1S*. Les imatges mostren l'aspecte de les plàntules després de 8 dies de cultiu en medi Murashige i Skoog (MS) i en medi MS suplementat amb mevastatina 1µM (mst 1µM).

En el cas del mutant *fps1-1*, es va considerar que l'anàlisi de l'elongació dels tubs pol.línics era un bon indicador per tal d'investigar la capacitat de FPS2 de complementar la pèrdua de funció en el gen *FPS1*. Per això es van realitzar mesures d'elongació de tubs pol.línics en mostres de pol.len de les plantes *fps1Gen1-2*. Igualment, es van fer mesures en mostres de plantes *fps1Gen1* per tal d'analitzar si la reintroducció del gen *FPS1* restablí la pèrdua de funció en el mutant *fps1-1*.

Els resultats obtinguts (Figura 55), mostren una evident recuperació de la longitud dels tubs pol.línics, més marcada en les mostres de pol.len corresponents a plantes *fps1Gen1* que en les mostres de plantes *fps1Gen1-2*. Tot i que estadísticament, les diferències respecte el *wt* continuen sent significatives, en ambdós casos s'observa que l'elongació dels tubs pol.línics és superior que en el cas del mutant *fps1-1*. De manera que, tot i que en aquest cas la reversió del fenotip observada no és total, podem considerar que hi ha una certa complementació. La mesura de les quantitats d'esterols acumulades i de la longitud dels hipocòtils en les plantes *fps1Gen1* i *fps1Gen1-2* pot aportar dades interessants per acabar de confirmar el grau de complementació.

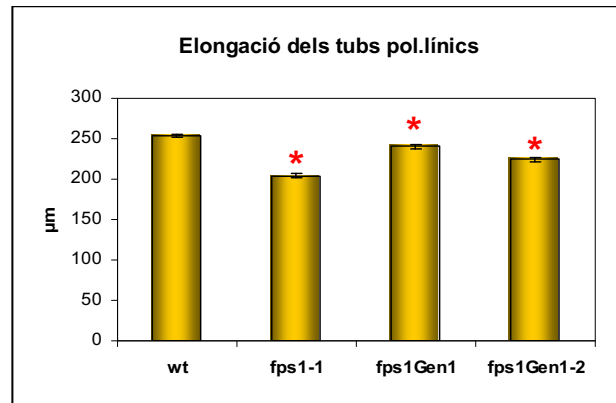


Figura 55: Mesures de l'elongació dels tubs pol.línics en les plantes fps1Gen1 i fps1Gen1-2. Les dades de l'elongació dels tubs pol.línics provenen d'un total de 590 mesures de cada línia. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat aplicant el test t-Student i assumint com a diferències estadísticament significatives $P \leq 0,05$. L'asterisc vermell indica que les diferències són estadísticament significatives.

7. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica en mutants d'*A. thaliana* amb pèrdua de funció dels gens *HMG* i *FPS*

Com a complement als estudis realitzats en els mutants *fps1* i *fps2* d'*Arabidopsis*, ens vam proposar l'estudi dels perfils d'expressió gènica d'ambdós mutants mitjançant micromatrius d'ADN, amb l'objectiu d'estudiar la resposta transcripcional global davant d'una pertorbació en aquest punt de la via del mevalonat. La disponibilitat dels mutants *hmg* va permetre incloure'ls a l'estudi amb l'interès que l'HMGR és el principal enzim regulador del flux d'aquesta via metabòlica. L'ús de les micromatrius possibilitava l'estudi dels efectes del bloqueig en cadascun dels gens *FPS* i *HMG* tant en la resposta sobre els gens que codifiquen per altres enzims de la mateixa via metabòlica, com en la regulació a nivell transcripcional sobre gens implicats en altres processos cel·lulars.

Aquesta part del treball es va realitzar a l'Institute of Plant Sciences del Swiss Federal Institute of Technology (ETH) i al Functional Genomics Center de Zurich (Suïssa) en el marc d'una estada en el grup del Professor Wilhelm Gruissem.

Els resultats que es presenten a continuació corresponen a les anàlisis que es van dur a terme amb els mutants *hmg1-1* i *hmg2-1* (Suzuki *et al.*, 2004), mutants amb pèrdua de funció en els gens *HMG1* i *HMG2*, respectivament; i els mutants *fps1-1* i *fps2-1*, amb pèrdua de funció en els gens *FPS1* i *FPS2*, respectivament. Les micromatrius utilitzades van ser les *GeneChip*[®] *Arabidopsis ATH1 Genome Array* d'*Affymetrix* que contenen més de 22.000 sets d'oligonucleòtids cobrint la majoria de cDNAs identificats en *Arabidopsis thaliana*.

El RNA dels diferents mutants en estudi es va extreure de plàntules de 7 dies cultivades en medi MS sota un fotoperíode de 12h llum/12h fosc, condicions prèviament estandaritzades pel grup del Prof. Gruissem. Aquest RNA es va processar segons es descriu en l'apartat 8.4 de materials i mètodes per tal d'obtenir els fragments de cRNA necessaris per hibridar amb les micromatrius d'ADN d'*Affymetrix*. Un cop hibridades, les micromatrius es van tenyir amb un conjugat d'estreptavidina-ficoeritrina, que finalment permet detectar la quantitat de llum emesa en cada cel·la a 570 nm i establir-ne una relació proporcional a la quantitat de cRNA hibridat. Aquests experiments es van fer per duplicat a partir de mostres totalment independents.

Un cop obtinguts els valors d'intensitat del senyal emès a partir de l'escanejat de les micromatrius, es van realitzar diferents controls de qualitat de les dades obtingudes. En primer lloc es van comprovar una sèrie de paràmetres proporcionats pel GCOS (*GeneChip® Operating Software*), com per exemple: % de gens detectats, soroll de fons, valors obtinguts per als controls no eucariòtics afegits, etc. Tots aquests paràmetres permeten detectar si s'ha produït algun problema durant el procés d'hibridació i tinció de les micromatrius. En segon lloc, es va utilitzar el RACE (*Remote Analysis Computation for gene Expression data*) desenvolupat per la Universitat de Lausanne (<http://race.unil.ch>) que permet assegurar la qualitat dels valors obtinguts realitzant una sèrie de controls basats en l'aplicació de diversos algorismes estadístics.

Per dur a terme l'anàlisi de les dades, s'ha aplicat un nou mètode estadístic que estan desenvolupant les Dres. Anja Wille i Eva Vranová. Aquest mètode permet identificar els gens expressats de forma diferencial tenint en compte no només els gens que canvien el seu grau d'expressió de forma individual en cada mutant analitzat en comparació amb el corresponent control, sinó també tenint en compte la informació de la resta de mutants per establir si un determinat canvi pot resultar significatiu.

Mitjançant l'aplicació d'aquest mètode als valors derivats de les micromatrius dels mutants *hmg1-1*, *hmg2-1*, *fps1-1* i *fps2-1*, s'ha pogut identificar 1070 gens que tenien alterat el seu nivell d'expressió en, com a mínim, un dels mutants (Figura 56). D'aquests, 455 veien alterada la seva expressió com a conseqüència de les pertorbacions ocasionades en les dues etapes enzimàtiques, és a dir, el seu nivell d'expressió variava en almenys un dels mutants *hmg* i un dels mutants *fps* (Figura 56; A). També es va identificar un segon grup de gens que modificaven els seus nivells d'expressió quan la pertorbació es produïa en només una de les etapes enzimàtiques (Figura 56; B). Dins d'aquest grup, 46 gens veien modificada la seva expressió en els mutants *hmg* però no en els *fps* i 10 gens veien alterada la seva expressió en els mutants *fps* però no en els *hmg*. Finalment, es va definir un tercer grup de gens que alteraven la seva expressió únicament en un dels mutants analitzats (Figura 56; C). En aquest tercer grup trobem que es modifica l'expressió de 396 gens en el mutant *hmg1-1*, de 138 gens en el mutant *hmg2-1*, de 9 gens en el mutant *fps1-1* i de 16 gens en el mutant *fps2-1*.

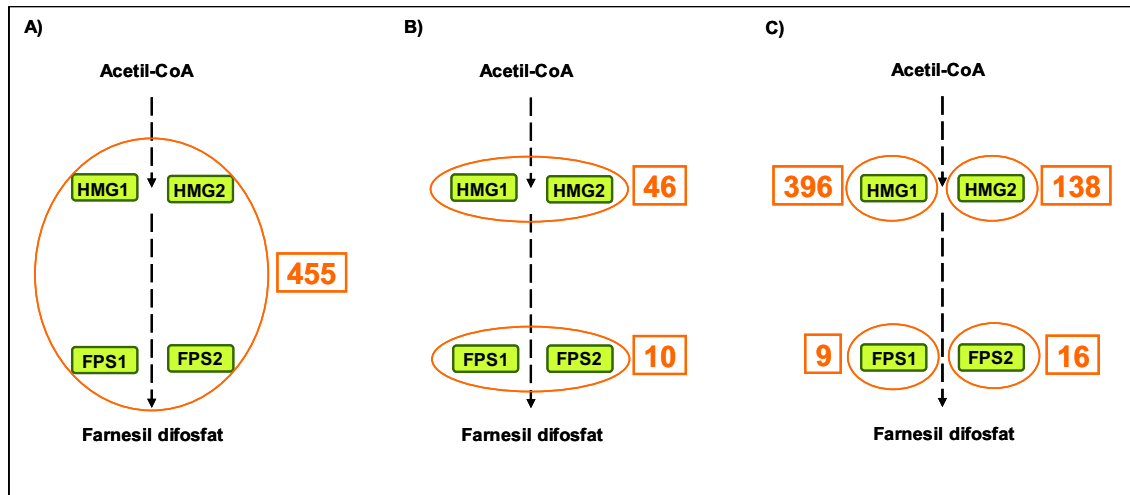


Figura 56: Nombre de gens amb canvis significatius en els nivells d'expressió. A) Nombre de gens que veuen alterats els seus nivells d'expressió en almenys un mutant *hmg* i un mutant *fps*. B) Nombre de gens l'expressió dels quals està alterada en ambdós mutants *hmg* però no varia en els mutants *fps*, i a l'inrevés. C) Nombre de gens que veuen alterats els seus nivells d'expressió únicament en un dels quatre mutants analitzats.

El nombre de gens que alteren la seva expressió en els mutants *hmg* (ja sigui en els dos mutants a la vegada o només en un d'ells) és clarament molt superior al nombre de gens alterats en els mutants *fps*. El fet que el nombre de gens alterats en els mutants *fps* sigui relativament baix ens mostra que una pertorbació de la via a nivell d'un dels isoenzims de la FPS té poc impacte en la resta de processos cel·lulars i suggereix que FPS1 i FPS2 poden complementar-se entre sí.

D'altra banda, el fet que hi hagi gens que veuen alterats els seus nivells d'expressió únicament en un dels mutants (Figura 56; C) és coherent amb l'existència d'especialització funcional dels isoenzims HMGR i FPS, i concorda amb els resultats publicats dels mutants *hmg1-1* i *hmg2-1* (Suzuki *et al.*, 2004), i amb els resultats de la caracterització de cadascun dels mutants *fps* presentats en aquest treball.

DISCUSSIÓ

1. Estudi de mutants d'*Arabidopsis* amb guany de funció dels isoenzims *FPS*

Els objectius dels estudis realitzats en aquesta tesi han estat analitzar el paper de l'isoenzim FPS2 en la via del mevalonat, obtenir evidències experimentals de la possible especialització funcional dels isoenzims FPS1S i FPS2 d'*A. thaliana*, i eventualment, establir les bases moleculars i bioquímiques d'aquesta especialització. L'interès d'estudiar les FPS radica en el fet que la reacció que catalitzen es troba en una posició clau de la via del mevalonat de síntesi d'isoprenoides. Com s'ha comentat a la introducció, tant els substrats (IPP/DMAPP), com el producte (FPP) de la reacció catalitzada per les FPS són punts de partida cap a la síntesi de grups d'isoprenoides diferents (Figura 13). Tenint en compte el gran nombre de ramificacions que parteixen d'aquests intermediaris, sembla raonable pensar que els seus nivells han d'estar estrictament controlats per garantir la correcta disponibilitat de cadascun d'ells. Conseqüentment, les farnesildifosfat sintases, podrien estar implicades en la regulació dels nivells d'aquests compostos. De fet, s'ha proposat un paper regulador per les FPS en la síntesi d'isoprenoides en llevat (Szkopinska *et al.*, 2000; Karst *et al.*, 2004) i en diferents espècies vegetals tals com pebrot (Hugueney *et al.*, 1996), cotó (Liu *et al.*, 1999), i *Artemisia* (Chen *et al.*, 2000; Souret *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006).

En *A. thaliana* existeixen dos gens *FPS* (*FPS1* i *FPS2*) que donen lloc a tres isoenzims (FPS1S, FPS1L i FPS2) (Cunillera *et al.*, 1996; Cunillera *et al.*, 1997). La disponibilitat de la seqüència completa del seu genoma (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) ha confirmat aquest fet i per tant, fa d'*Arabidopsis* un bon sistema per a aquests estudis, ja que permet descartar l'existència de cap altre gen que codifiqui una FPS.

L'existència de petites famílies multigèniques és una característica molt comú dels enzims de la via del mevalonat tant en *Arabidopsis* (Ahumada-Díaz, 2001; Enjuto *et al.*, 1994; Bouvier *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2000; Kribii *et al.*, 1997), com en d'altres espècies vegetals (Chye *et al.*, 1992; Aoyagi *et al.*, 1993; Bhattacharyya *et al.*, 1995; Attucci *et al.*, 1995a, b; Gaffe *et al.*, 2000). Les famílies multigèniques, a més de permetre la regulació independent entre diferents isoenzims, possibiliten una regulació coordinada entre enzims que catalitzen diferents reaccions en una mateixa via metabòlica. L'any 1995, Chappell va proposar l'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics o metabolons, constituïts per grups específics

d'isoenzims que formarien unitats metabòliques independents dedicades a la síntesi de determinats tipus d'isoprenoides. Cada unitat metabòlica estaria regulada de forma independent mitjançant l'agrupació i acumulació d'uns determinats isoenzims o bé mitjançant diverses modificacions post-transcripcionals per tal de modular-ne l'activitat (Chappell, 1995a). Avui en dia, aquesta hipòtesi encara no ha pogut ser demostrada experimentalment.

L'expressió diferencial de gens, la compartimentació subcel·lular entre isoenzims o la formació de diferents complexos multienzimàtics serien formes de regulació a diferents nivells (Jørgensen *et al.*, 2005). Concretament, en el cas de les FPS d'Arabidopsis, l'isoenzim FPS1S i, previsiblement FPS2, tindrien localització citosòlica, ara bé, s'ha descrit que els gens *FPS1* i *FPS2* tenen patrons d'expressió clarament diferenciats. El gen *FPS1* mostra una expressió intensa i generalitzada, mentre que el gen *FPS2* té una expressió més específica en determinats òrgans i estadis de desenvolupament (Cunillera *et al.*, 2000b). Aquests patrons d'expressió diferenciats suggerien una possible especialització funcional dels isoenzims FPS.

En el grup de recerca, el primer abordatge experimental que es va dur a terme per tal d'investigar l'especialització de les FPS citosòliques d'Arabidopsis, va ser la generació i l'estudi de plantes d'Arabidopsis que sobreexpressaven constitutivament l'isoenzim FPS1S. Aquestes plantes es caracteritzen per mimetitzar un fenotip de resposta hipersensible en absència d'atac per patògens. A partir d'un cert estadi de desenvolupament, presenten l'aparició de lesions necròtiques a les fulles, senescència prematura en fulles separades de la planta (Figura 14) i una reducció considerable de la mida de la roseta basal. El fenotip de senescència s'ha relacionat amb la davallada dels nivells de citoquinines del tipus zeatina que es produeix en aquestes plantes, mentre que les lesions necròtiques correlacionen amb una acumulació d'H₂O₂ que podria estar causada per una alteració de la funció mitocondrial (Masferrer *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2004).

Amb aquests antecedents i per tal d'avaluar l'especialització funcional entre els isoenzims FPS1S i FPS2, s'han obtingut plantes d'Arabidopsis que sobreexpressen el transgèn *35S::FPS2*. Aquestes plantes acumulen quantitats de proteïna FPS2 superiors a les plantes control, i assoleixen valors d'activitat FPS d'entre 3-6 vegades l'activitat FPS de les plantes *wild type*. Els resultats mostren que el transgèn s'expressa de forma eficient donant lloc a un enzim FPS2 funcional (Figura 16). Ara bé, malgrat disposar de plantes que presenten uns increments d'activitat FPS degut a la sobreexpressió de FPS2,

similars als de les plantes que sobreexpressen FPS1S, s'ha vist que a nivell fenotípic, les plantes que sobreexpressen FPS2 no desenvolupen cap dels fenotips associats a la sobreexpressió de FPS1S: no manifesten senescència prematura, ni lesions necròtiques a les fulles, ni alteracions en la mida de la roseta basal. De fet, el seu fenotip és idèntic al de les plantes control (Figura 17) en tots els fotoperíodes assajats. En aquest sentit, el seu comportament és més semblant a l'observat en la sobreexpressió de l'enzim FPS en altres espècies vegetals, com per exemple en la sobreexpressió de la FPS de *Saccharomyces cerevisiae* en plantes de tabac (Daudonnet *et al.*, 1997) o en la sobreexpressió de la FPS endògena en *Artemisia annua* (Han *et al.*, 2006), espècies en les quals tampoc s'han descrit alteracions fenotípiques. Tenint en compte els marcats efectes causats per la sobreexpressió tant de FPS1S com de FPS1L (Manzano *et al.*, 2006) i especialment, tenint en compte que FPS1S i FPS2 són dos isoenzims amb una identitat del 90,6% en la seqüència aminoacídica, el fet que la sobreexpressió de FPS2 no produeixi cap fenotip dóna suport a la idea d'un comportament diferencial entre els isoenzims FPS1S i FPS2.

En plantes, les FPS són enzims majoritàriament citosòlics (Feron *et al.*, 1990; Hugueney *et al.*, 1996), tot i que hi ha estudis que han demostrat la seva localització en d'altres compartiments subcel·lulars. Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica i microscopia electrònica s'ha demostrat la presència de l'enzim FPS en til·lacoides de fulles d'arròs. D'altra banda, en protoplastes procedents de fulles de blat de moro i tabac s'ha detectat FPS en la fracció plastídica, i no en les fraccions citosòliques, mitocondrials ni microsomals, (Sanmiya *et al.*, 1999). Existeixen altres casos en els quals s'ha trobat FPS localitzades en partícules de làtex, com és el cas d'*Hevea brasiliensis* (Adiwilaga *et al.*, 1996), *Parthenium argentatum* (Pan *et al.*, 1996) i *Lactarius chrysorreus* (Mekkriengkrai *et al.*, 2004). En el cas d'*Arabidopsis*, en el nostre laboratori s'havia demostrat que la regió N-terminal de l'isoenzim FPS1L és un pèptid de trànsit a mitocondries (Cunillera *et al.*, 1997; Manzano *et al.*, 2006), però en les seqüències aminoacídiques de FPS2 i FPS1S no s'havia identificat cap senyal que pogués indicar la seva localització específica en un orgànul determinat. En aquest treball, i mitjançant l'aplicació de tècniques d'immunocitoquímica i microscopia electrònica, s'ha comprovat que l'isoenzim FPS2 sobreexpressat té la mateixa localització subcel·lular que l'isoenzim FPS1S, i s'ha confirmat que en ambdós casos es tracta d'una localització citosòlica (Figura 18). Aquests resultats suggereixen que les

diferències fenotípiques existents entre aquestes plantes no semblen ser desencadenades com a conseqüència d'una diferent compartimentació entre els isoenzims FPS1S i FPS2.

Com ja s'ha comentat a l'apartat 5.1 de la introducció, les farnesildifosfat sintases catalitzen la condensació 1'-4 d'una molècula d'IPP amb una de DMAPP per produir GPP i, seguidament, una segona condensació d'IPP amb el GPP per generar el producte FPP (C₁₅). L'alineament de les seqüències aminoacídiques entre enzims que catalitzen aquesta reacció en diferents organismes ha mostrat l'existència de set dominis conservats que els identifica com a FPS (Koyama *et al.*, 1993; Szkopinska i Plochocka, 2005; Figura 9). Tot i així, s'ha descrit algun cas en el qual un enzim prèviament identificat com a FPS ha mostrat un altre tipus d'activitat enzimàtica. Hemmerlin *et al.* (2003b) van descriure l'existència de tres cDNAs FPS en *Artemisia tridentata* que presentaven entre ells una identitat de seqüència superior al 69% i una similitud superior al 89%. D'entre aquests cDNAs, el denominat FDS-5 codifica un enzim que genera compostos formats per 10 àtoms de carboni, que van ser reconeguts com crisantemol, lavandulol i geraniol. De manera que, tot i ser identificat inicialment com una FPS, aquest enzim mostrava el comportament d'una crisantemildifosfat sintasa. D'altra banda, recentment s'ha descrit una FPS de blat de moro que manifesta, almenys *in vitro*, un comportament bifuncional, és a dir, que té la capacitat de produir tant FPP com GGPP (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006). Aquesta FPS, aïllada a partir de cDNAs d'endosperm de blat de moro per complementació de cèl·lules d'*E. coli* que contienien un cluster que codificava tots els enzims necessaris per la síntesi de carotenoides a excepció de la GGPS, presentava una alta homologia així com els motius conservats característics de les FPS. En el cas de les FPS d'*A. thaliana*, s'ha comprovat que els isoenzims FPS1S i FPS2 catalitzen *in vitro* la síntesi d'un únic producte de reacció, el FPP (C₁₅), tal i com demostra la detecció de la seva forma defosforilada, el farnesol (Figura 19), tant en els assaigs fets amb el sn de 16000 x g, com en els assaigs fets utilitzant el sn de 200 x g per tal de minimitzar la possible pèrdua de components que poguessin afectar a l'activitat d'algun dels isoenzims. Per tant, s'ha confirmat que, almenys *in vitro*, l'isoenzim FPS2 presenta únicament activitat farnesildifosfat sintasa.

Es podria pensar que alguna diferència en el comportament cinètic d'aquests dos isoenzims fos la responsable de la presència o absència de manifestacions fenotípiques.

En el cas que FPS2 tingués una afinitat més baixa que FPS1S per algun dels substrats, podria donar-se el cas que, tot i la sobreexpressió d'aquest isoenzim, no es veiés alterat el repartiment d'IPP/DMAPP entre les diferents branques que parteixen d'aquest punt, és a dir, entre la síntesi de FPP, la síntesi de citoquinines i la síntesi d'isoprenoides mitocondrials, tal i com passa en la sobreexpressió de FPS1S. Per tal d'investigar aquesta hipòtesi, es van comparar els comportaments cinètics d'ambdós isoenzims en extractes de plantes que sobreexpressaven FPS1S i FPS2. Els resultats obtinguts mostren uns valors aparents de les K_m per als diferents substrats molt similars en ambdós isoenzims (Taula 2), de manera que no sembla que existeixin grans diferències en les seves respectives afinitats pels diferents substrats de la reacció que catalitzen. En aquest punt, cal tenir en compte les limitacions dels experiments realitzats, doncs el fet d'utilitzar extractes de plantes sobreexpressores en lloc d'enzims purificats per fer les determinacions no ens permet parlar de K_m com a tal, tot i que sí que ens pot oferir una idea del comportament d'aquests dos isoenzims.

Com ja s'ha comentat en diverses ocasions, l'HMGR es considera el principal enzim regulador de la via del mevalonat, on els esterols en són els productes finals majoritaris. En diferents estudis s'ha vist que hi ha una correlació molt directa entre els nivells d'activitat HMGR i els nivells d'esterols totals acumulats en plantes. De fet, sempre que s'incrementa l'activitat HMGR (Chappell *et al.*, 1995; Schaller *et al.*, 1995; González, 2002; Holmberg *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2004; Enfissi *et al.*, 2005) o que es mimetitza un increment d'activitat HMGR subministrant el producte de la reacció (Wilkinson *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 2002), s'aconsegueix incrementar la quantitat total d'esterols acumulats en plantes. Tot i el principal paper regulador que exerceix l'HMGR, també s'ha demostrat la implicació d'altres enzims en la regulació de la síntesi d'esterols, com ara les esterol metiltransferases SMT1 i SMT2 (Schaeffer *et al.*, 2001; Holmberg *et al.*, 2002; 2003). Pel que fa referència a les FPS, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, diversos treballs suggereixen que té un paper regulador en la síntesi de determinats metabòlits secundaris, com per exemple les fitoalexines sesquiterpèniques, en pebrot (Hugueneu *et al.*, 1996), cotó (Liu *et al.*, 1999), i Artemisia (Chen *et al.*, 2000; Souret *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006). Ara bé, no està tan clar el paper que poden tenir les FPS en la regulació de la síntesi de metabòlits primaris com per exemple els esterols. En aquest sentit, s'ha descrit que al sobreexpressar la FPS de *S. cerevisiae* en plantes de tabac es produeix un increment de 12 vegades en els valors

d'activitat FPS respecte de les plantes control, que correlaciona amb un increment de 4 vegades en la síntesi tant d'esterols com de carotenoides (Daudonnet *et al.*, 1997). El resultat és sorprenent, sobretot pel que fa a l'increment de carotenoides, compostos que deriven del GGPP plastídic sintetitzat a través de la via del MEP. En aquest mateix sentit, també s'ha descrit que la sobreexpressió d'una FPS endògena en un altre organisme eucariota pot alterar la quantitat d'esterols. Aquest és el cas del llevat *S. cerevisiae*, on un increment d'activitat FPS de fins a 6 vegades, altera lleugerament els nivells d'activitat HMGR i dona lloc a un increment d'aproximadament el 30% en els nivells d'ergosterol i del 80% en els nivells de dolicol (Szkopinska *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis*, anàlisis realitzades en plantes que sobreexpressaven l'isoenzim FPS1S havien mostrat que no es produïen alteracions en els valors d'activitat HMGR ni increments en la quantitat d'esterols acumulats en les fulles d'aquestes plantes, tot i el notable increment d'activitat FPS que s'assolia (Masferrer *et al.*, 2002). Igualment, en les plantes que sobreexpressen l'isoenzim FPS2, s'ha vist que ni els nivells d'activitat HMGR ni la quantitat i el perfil d'esterols acumulats presenten diferències respecte a les plantes control (Taula 3). Així doncs, l'isoenzim FPS2 no resulta limitant en la síntesi d'esterols. Per tant, podem concloure que la síntesi de FPP no és limitant per la producció d'esterols en *Arabidopsis thaliana*. Tot i així, no es pot descartar que les FPS tinguin un paper regulador en la síntesi d'altres productes finals de la via tal i com passa en d'altres espècies, com per exemple en *Artemisia annua*, on un increment de 2-3 vegades en l'activitat FPS comporta un increment d'aproximadament el 30% en el contingut d'artemisina, una lactona sesquiterpènica sintetitzada a partir del FPP citosòlic (Han *et al.*, 2006).

Amb la finalitat d'explicar els fenotips observats en les plantes que sobreexpressen FPS1S, es va proposar que l'increment d'activitat FPS1S pot estar causant una davallada significativa en els nivells d'IPP/DMAPP disponibles per a la síntesi de citoquinines i altres isoprenoides mitocondrials (Masferrer *et al.*, 2002). En aquestes plantes, els valors d'activitat HMGR es mantenen similars als valors d'activitat de les plantes control, de manera que al no ser compensat el consum excessiu d'IPP/DMAPP degut a la sobreexpressió de FPS1S, s'estaria produint un desequilibri en el repartiment d'aquests intermediaris, considerat responsable de l'aparició dels fenotips descrits. En els extractes de les plantes que sobreexpressen FPS2 s'ha comprovat que els nivells d'activitat FPS són similars als mesurats en els extractes de les plantes que

sobreexpressen FPS1S, i que els valors d'activitat HMGR es mantenen sense alteracions en comparació amb les plantes control. De manera que, sembla que s'estaria donant la mateixa situació metabòlica que altera el repartiment d'IPP/DMAPP en les plantes sobreexpressores de FPS1S. Malgrat tot, en les plantes que sobreexpressen FPS2 no apareix cap tipus de fenotip, indicant que, o bé no es produeix l'esmentat desequilibri metabòlic, o bé acaba afectant a un tipus de productes que no són capaços de desencadenar conseqüències fenotípiques.

Tot i que no s'han mesurat els nivells de citoquinines en les plantes FPS2, el fet de no detectar alteracions en el procés de senescència en experiments de *detachment* (Figura 17), sembla indicar que la síntesi d'aquests compostos no està afectada, doncs s'associa la senescència prematura a una disminució de les citoquinines (Gan i Amasino, 1995; Van Staden, 1996). De la mateixa manera, el fet que en aquestes plantes no apareguin lesions necròtiques a les fulles suggereix que el metabolisme mitocondrial tampoc pateix alteracions, com és el cas de la sobreexpressió de FPS1S (Masferrer *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2004).

Les plantes d'*Arabidopsis* dobles transgèniques que sobreexpressen simultàniament els dos isoenzims citosòlics de la FPS confirmen les diferències de comportament entre la sobreexpressió de FPS1S i FPS2. Donat que la sobreexpressió de FPS2 és l'objecte d'estudi d'aquest treball, i que sempre és més clara l'aparició de fenotip en plantes que prèviament no en manifesten, les plantes dobles transgèniques es van generar incorporant el transgèn *35S::FPS1S* en plantes que ja sobreexpressaven FPS2. En les línies dobles transgèniques (D2+1S) es va demostrar que s'assolien nivells totals d'activitat FPS superiors als valors d'activitat de la línia que sobreexpressa únicament FPS2 (Figura 22), per tant, és raonable pensar que l'increment d'activitat FPS de les plantes D2+1S respecte les plantes FPS2, era degut a l'isoenzim FPS1S sobreexpressat.

La caracterització de línies que sobreexpressen FPS1S havia permès establir una relació directa entre l'increment d'activitat FPS i la intensitat d'aparició de les lesions necròtiques a les fulles (Masferrer *et al.*, 2002). Tenint en compte la hipòtesi del desequilibri metabòlic, existia la possibilitat que en les línies que sobreexpressen simultàniament FPS1S i FPS2, el fenotip es manifestés de manera encara més severa que en les plantes que sobreexpressen únicament FPS1S o, fins i tot, que pogués aparèixer algun altre fenotip prèviament no detectat. En les plantes D2+1S es detecta

l'aparició del fenotip característic de les plantes que sobreexpressen FPS1S, ja que totes les línies mostren lesions necròtiques amb el mateix patró espacial d'aparició, que s'inicia entre els nervis en la zona central i s'estén progressivament cap als marges de la fulla (Figura 23). No obstant, en aquestes plantes es perd la correlació entre els increments d'activitat FPS total i la severitat del fenotip. Malgrat que en les 5 línies transgèniques D2+1S els valors totals d'activitat FPS mesurats són superiors als valors més alts d'activitat FPS assolits en la sobreexpressió de FPS1S, hi ha línies dobles transgèniques que presenten el fenotip amb més intensitat, i d'altres que, en comparació amb la línia FPS1S 9.1, el presenten amb una intensitat molt menor. Una segona característica que pot ser considerada un indicador de la severitat de les manifestacions fenotípiques és la reducció en la mida de la roseta basal. Aquesta característica ens indica clarament que el fenotip de les plantes D2+1S no correlaciona amb l'increment total d'activitat FPS, sinó amb l'increment d'activitat atribuïble únicament a la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S, ja que les línies en les que es detecten uns nivells d'activitat FPS atribuïble a FPS1S superiors a l'activitat de la línia FPS1S 9.1, mostren unes rosetes basals més petites, i les línies que tenen nivells d'activitat corresponent a FPS1S comparativament inferiors a la línia 9.1, mostren unes rosetes basals de mida superior (Figura 24).

De manera que, els resultats obtinguts en les dobles transgèniques D2+1S concorden perfectament amb les dades corresponents a les línies transgèniques simples de sobreexpressió de cadascun dels isoenzims citosòlics FPS, doncs s'ha vist que tant si se sobreexpressen junts o per separat, únicament l'isoenzim FPS1S és el responsable de que es desencadeni el fenotip que mimetitza la resposta hipersensible.

Les dades obtingudes fins al moment reafirmen que la sobreexpressió de FPS2 no posa de manifest cap fenotip, per tant, tot sembla indicar que no afecta de la mateixa manera que la sobreexpressió de FPS1S a la distribució de l'IPP/DMAPP cap a diferents branques de la via. La manera com es regula la distribució de substrats entre les diferents branques no és ben coneguda, tot i que es pensa que en part pot estar regulada per la compartimentació (Pan *et al*, 1996). En el cas dels isoenzims FPS1S i FPS2 d'*Arabidopsis* hem demostrat que tenen la mateixa localització subcel·lular, de forma que es podria descartar un accés limitat al *pool* d'IPP degut a una diferent compartimentació entre ells.

Una altra de les explicacions que sembla molt poc provable és que el fenotip observat en la sobreexpressió de FPS1S sigui degut, en part, a que el consum anormalment elevat d'IPP produeixi una davallada també en el substrat disponible per l'isoenzim FPS2. Si fos així, amb la sobreexpressió simultània d'ambdós isoenzims, el fenotip hagués hagut d'atenuar-se o fins i tot desaparèixer, però els fenotips mostrats per les plantes dobles transgèniques que sobreexpressen simultàniament FPS1S i FPS2 no concorden amb aquesta hipòtesi. D'altra banda, considerant les aproximacions cinètiques realitzades, sembla que no existeixen grans diferències en les afinitats de cada isoenzim pels substrats de la reacció.

L'anàlisi de l'estructura dels isoenzims citosòlics de la FPS d'Arabidopsis ens aporta algunes dades interessants sobre les diferències que existeixen entre FPS1S i FPS2. Ambdós isoenzims mostren un 100% d'identitat en els residus que formen part dels VII dominis conservats en les FPS, que inclouen els dominis rics en aspartat (FARM i SARM) (Koyama *et al.*, 1993). Aquest fet recolza la idea que no hi hagin diferències en el comportament cinètic d'aquests dos isoenzims, doncs s'ha descrit que canvis en aminoàcids que formen part dels dominis rics en aspartat (Marrero *et al.*, 1992; Joly i Edwards, 1993; Song i Poulter, 1994), així com canvis en residus conservats que formen part d'altres regions diferents al FARM i SARM (Blanchard i Karst, 1993; Koyama *et al.*, 1996) poden alterar l'eficiència catalítica, l'activitat catalítica o les K_m d'aquests enzims. El modelatge molecular de l'estructura de FPS1S i FPS2 s'ha realitzat en base a l'estructura tridimensional de la FPS de pollastre (Tarshis *et al.*, 1994). Els models tridimensionals per a les FPS d'Arabidopsis prediuen estructures equivalents que presenten el que s'ha definit com a plegament típic de les terpè sintases (Szkopinska i Plochocka, 2005). Aquests isoenzims es trobarien formant homodímers, de fet, les primeres purificacions de les FPS, tant en pollastre com en d'altres organismes, ja indicaven la formació de dímers d'entre 80-84 kDa (Eberhardt i Rilling, 1975; Reed i Rilling, 1975; Yeh i Rilling, 1977; Barnard i Popjak, 1981).

Malgrat l'alt grau d'identitat en la seqüència aminoacídica, existeixen 33 aminoàcids diferents entre FPS1S i FPS2. Quatre d'aquests residus es troben localitzats en la interfície de dimerització entre els dos monòmers. Tots ells podrien estar contactant amb aminoàcids situats a la superfície del monòmer oposat, tot i així, no sembla que aquestes variacions impedeixin una correcta formació dels dímers ni alterin l'activitat catalítica, ja que ambdós isoenzims són actius. Tampoc sembla que pugui

introduir un canvi significatiu en l'activitat enzimàtica la diferència entre el residu E171 en FPS1S que correspondria a D170 en FPS2. Aquests residus, tot i estar situats a l'entrada de la cavitat del centre actiu (Figura 33), no estan produint canvis en la càrrega elèctrica ni introduint grups que puguin suposar un gran impediment estèric.

Probablement, el fet més destacable que deriva d'aquests estudis és que gairebé dues tercers parts dels residus diferents entre els isoenzims FPS1S i FPS2 es troben localitzats a la superfície externa dels homodímers. Aquests aminoàcids no es troben repartits aleatòriament per la superfície del model tridimensional, sinó que queden agrupats en dues zones ben definides. Un grup es localitza en una regió central, però amb l'orientació oposada a la superfície d'interacció entre monòmers, i el segon grup, es troba desplaçat uns 90° respecte la posició del primer (veure Figura 34). La localització d'aquests residus planteja la possibilitat que puguin participar en l'establiment d'hipotètics contactes específics d'isoenzim amb d'altres proteïnes. En aquest supòsit, podríem pensar que quan l'isoenzim FPS2 és sobreexpressat en òrgans o teixits on habitualment el gen *FPS2* s'expressa amb poca intensitat, com per exemple en fulles, no troba els elements necessaris per interaccionar, o bé esdevenen limitants per dur a terme la seva funció. Aquest podria ser el motiu pel qual en fulles, que és on manifesta el fenotip quan sobreexpressem l'isoenzim FPS1S, no es detecti cap alteració al sobreexpressar FPS2. Tot i així, fins ara no hi ha evidències experimentals d'interaccions entre FPS i altres proteïnes.

Com a aproximació preliminar per avaluar si les diferències fenotípiques observades podien relacionar-se amb alguna regió específica d'aquests isoenzims, es van elaborar proteïnes FPS quimèriques en les que es van intercanviar tres regions entre FPS1S i FPS2 utilitzant l'estratègia del *domain swapping*. L'estudi de proteïnes quimèriques generades utilitzant l'estratègia denominada *domain swapping* constitueix una poderosa eina per tal d'identificar funcions específiques associades a diferents dominis o regions d'una proteïna. Aquesta estratègia ha estat àmpliament utilitzada en proteïnes de diversos organismes, com per exemple en cianobactèries (Iglesias *et al.*, 2006), nematodes (Sasata *et al.*, 2004), peixos (Chan *et al.*, 2007) i mamífers (Ransone *et al.*, 1990; Soulet *et al.*, 2006). En plantes, i concretament en la síntesi d'isoprenoides, s'ha utilitzat el *domain swapping* per estudiar diferents terpè sintases (Back i Chappell, 1996; El Tamer *et al.*, 2003; Katoh *et al.*, 2004). Back i Chappell (1996) van identificar dominis funcionals entre dues terpè sintases, la vetispiradiè sintasa d'*Hyoscyamus*

muticus i la 5-epiaristolòquè sintasa de *Nicotiana tabacum*. Aquests dos enzims comparteixen un 77% d'identitat en la seqüència aminoacídica, amb una distribució dels aminoàcids diferents al llarg de tota la seqüència, fet que no permetia identificar directament dominis que poguessin estar implicats en reaccions parcials comunes o etapes finals específiques entre les reaccions catalitzades pels 2 enzims. Aquesta estratègia també ha permès identificar els dominis que determinen l'especificitat dels productes formats per 3 monoterpè sintases de *Citrus limon*, la β -pinè sintasa, la γ -terpinè sintasa i la (+)-lilimonè sintasa (El Tamer *et al.*, 2003), i per 2 monoterpè sintases d'*Abies grandis*, la (-)-lilimonè sintasa i la (-)-lilimonè/ α -pinè sintasa (Kato *et al.*, 2004). Tot i que FPS1S i FPS2 catalitzen la mateixa reacció enzimàtica, l'ús de l'estratègia del *domain swapping* podia ser útil per identificar l'existència d'alguna regió en FPS1S que fos determinant per desencadenar el fenotip observat en condicions de sobreexpressió.

Mitjançant la complementació de la soca CC25 de *S. cerevisiae* i la realització d'assaigs d'activitat enzimàtica *in vitro*, s'ha demostrat que les 6 proteïnes quimèriques generades tenen activitat FPS (Figura 27). Aquest resultat confirma que, tot i l'existència de residus diferents en zones de la interfície d'interacció entre els dos monòmers i en zones que, malgrat no formar part directament del centre actiu, podrien estar en contacte amb aminoàcids que hi queden molt propers, tots aquests canvis no semblen afectar la funcionalitat dels enzims quimèrics.

Tot i no disposar de plantes que sobreexpressin la quimera Q1, la sobreexpressió constitutiva dels enzims quimèrics Q2-Q6 posa novament de manifest que l'aparició del fenotip no depèn del valor total d'activitat FPS a la planta, ja que plantes que mostren valors més alts d'activitat FPS que les plantes de la línia FPS1S 9.1, com per exemple les plantes de la línia 4.3.6, que sobreexpressen l'enzim quimèric Q4, no manifesten lesions ni cap alteració en la mida de la roseta basal (Figura 29; Figura 30). Donat que l'estudi dels enzims quimèrics està en una fase preliminar, encara no es pot assignar la diferència de comportament manifestat entre les dues FPS citosòliques a una regió proteica concreta. Ara bé, les dades obtingudes indiquen que qualsevol regió de FPS1S que sigui alterada comporta una pèrdua o atenuació del fenotip que es manifesta en condicions de sobreexpressió, confirmant la base estructural del comportament diferencial entre FPS1S i FPS2 i reforçant la idea de l'existència d'una especialització entre aquests dos isoenzims.

Finalment, una de les possibilitats a considerar és que les dues FPS citosòliques estiguin consumint l'IPP de 2 *pools* citosòlics diferents. Cal tenir present que, tant en la sobreexpressió de FPS1S com en la sobreexpressió de l'isoenzim mitocondrial FPS1L, es detecta una davallada en els nivells de certs tipus de citoquinines i apareix en comú el fenotip de senescència prematura, que es reverteix quan s'incrementa l'aportació de mevalonat; mentre que aquest fenotip de senescència prematura no es manifesta en les plantes que sobreexpressen FPS2. En concordança amb aquesta hipòtesi també estan les dades aportades per la sobreexpressió de FPS1S i FPS2 simultàniament (línies D2+1S), en les que el consum d'IPP/DMAPP per part de les dues FPS sobreexpressades no sembla tenir efectes additius, és a dir, que el consum d'IPP/DMAPP per part de FPS2 no sembla comportar una alteració més marcada del repartiment d'aquests substrats, doncs tal i com ja s'ha comentat, en les plantes D2+1S no es detecten manifestacions fenotípiques ni diferents ni més severes que les observades en les plantes que sobreexpressen FPS1S. De manera que, es podria especular que l'IPP disponible per a l'isoenzim FPS1S fos del mateix *pool* que l'IPP incorporat a mitocondries o derivat cap a la síntesi de citoquinines, però diferent de l'utilitzat per l'isoenzim FPS2. Aquesta hipòtesi donaria suport a l'organització de la via en canals metabòlics o metabolons proposada per Chappell (1995a). L'existència dels canals metabòlics, ha estat proposada també en d'altres vies metabòliques, com per exemple en la síntesi d'alcaloides, fenilpropanoides, isoflavonoides i glucòsids cianogènics (Jørgensen *et al.*, 2005). Concretament, en la síntesi de poliamines hi ha fortes evidències que les primeres etapes de la via estan organitzades en metabolons (Panicot *et al.*, 2002). D'altra banda, molts dels enzims implicats en el metabolisme de fenilpropanoides també semblen estar organitzats en diversos metabolons, que es diferenciarien entre ells en funció de les isoformes presents i de la natura dels enzims implicats en les últimes reaccions de la via (Winkel, 2004). Tal i com s'ha comentat anteriorment, encara no s'ha demostrat experimentalment que la via del mevalonat s'organitzi formant canals metabòlics. En aquest sentit però, les dades de Leivar *et al.* (2005) que demostren la localització de l'HMGR en RE i en estructures vesiculars que es troben al citoplasma i a les vacuoles, ofereixen un marc possible per a l'organització dels canals metabòlics. No obstant, no hi ha evidències de l'agrupació entre diferents enzims de la via, de manera que caldrien més estudis per tal d'investigar la co-localització d'altres enzims de la via en les mateixes vesícules que contenen l'HMGR.

2. Estudi de mutants d'*Arabidopsis* amb pèrdua de funció dels gens *FPS*

Paral·lelament als estudis realitzats amb mutants amb guany de funció dels isoenzims FPS, s'ha dut a terme la caracterització de mutants d'*Arabidopsis* amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*. S'ha comprovat que totes les línies mutants analitzades en aquest estudi són autèntics mutants *knock-out*, en les quals el T-DNA o l'element Ds inserit impedeix l'expressió de mRNAs FPS que puguin codificar cadascun dels isoenzims en estudi. Això es tradueix en una disminució dels nivells d'activitat FPS en cadascun dels mutants (Figura 37). Concretament en inflorescències, on ambdós gens s'expressen intensament (Cunillera *et al.*, 2000b), es detecta una reducció d'activitat d'aproximadament el 60-70% en els mutants *fps1* i del 30-45% en els mutants *fps2*. L'activitat FPS remanent en aquests mutants és, obviament, deguda a l'isoenzim codificat pel gen FPS que es manté funcional.

Tot i la pèrdua de funció d'un isoenzim de la part troncal de la via del mevalonat, com és la FPS, en les inflorescències dels mutants *fps* no s'observa una disminució en el contingut d'esterols acumulats. En canvi, quan les mesures es fan en fulles de roseta basal o bé en plàntules, sí que es detecta sistemàticament una reducció del 10-15% del contingut d'esterols en les mostres corresponents al mutant *fps1-1* (Figura 41). Aquestes diferències poden ser explicades pels patrons d'expressió dels gens *FPS1S* i *FPS2*. Mentre que l'expressió del gen *FPS1* és intensa i generalitzada tant en la fase vegetativa com en la fase reproductiva de la planta, l'expressió del gen *FPS2* és molt més específica i presenta diferències entre els teixits corresponents a les mostres analitzades. En inflorescències, el gen *FPS2* té una expressió especialment intensa, particularment en els grans de pol·len; mentre que en plàntules, la seva expressió és molt dèbil i resulta pràcticament indetectable en fulles de roseta basal. Així doncs, en aquells òrgans de la planta en els quals l'expressió dels dos gens és intensa, la presència d'un dels dos isoenzims FPS resulta suficient per assumir la producció del FPP necessari per a la síntesi d'esterols. De manera que, es pot afirmar que *FPS1S* i *FPS2* tenen funcions redundants en la síntesi d'esterols en *Arabidopsis*, doncs el FPP produït per cadascun d'ells pot ser canalitzat cap a la formació d'esterols. Tot i així, els resultats obtinguts a partir del mutant *fps1-1* ens mostren que en teixits en els quals l'expressió del gen *FPS2* és més dèbil, com les fulles o les plàntules, l'isoenzim FPS2 només pot

assumir parcialment la funció de FPS1, almenys en termes de síntesi d'esterols. Prèviament, en el mutant *hmg1-1* d'*A. thaliana* s'havia observat una correlació similar entre la disminució dels nivells d'esterols acumulats en diferents teixits del mutant i el patró d'expressió dels gens *HMG*. En plàntules del mutant *hmg1-1* s'acumulen el 53% d'esterols respecte el wt i en inflorescències el 75% (Suzuki *et al.*, 2004), fet que concorda amb que el gen *HMG2* s'expressi bàsicament en teixits meristemàtics i florals (Enjuto *et al.*, 1994).

En els mutants *fps1-1* i *fps2-1* no s'observen canvis en el perfil d'esterols, fet que no és estrany tenint en compte que els enzims FPS estan situats a la part troncal de la via, en un pas previ a la síntesi d'esqualè, primer compost específic de la síntesi d'esterols. En aquest sentit, caldria diferenciar els mutants d'enzims que catalitzen etapes pre-esqualè i els d'enzims que catalitzen etapes post-esqualè. Del primer grup s'han caracteritzat els mutants *hmg*, dels quals, en el mutant *hmg1-1* s'observa una reducció en la quantitat total d'esterols, amb una disminució proporcional de la majoria de compostos (Suzuki *et al.*, 2004); mentre que en el segon grup, on trobem un nombre més gran de mutants caracteritzats (veure apartat 2.5 de la introducció), sí que es produeixen alteracions importants del perfil d'esterols, amb el dèficit d'alguns compostos específics i l'acumulació d'altres en funció de la branca de la síntesi on hi hagi el bloqueig (revisat a Clouse, 2002; Lindsey *et al.*, 2003; Schaller, 2004). És el cas, per exemple, del mutant *smt1*, en el qual hi ha un increment de colesterol en detriment dels nivells de sitosterol (Diener *et al.*, 2000), o del mutant *cvp1*, en el qual s'acumula campesterol, 24-metilenlofenol i colesterol, i es redueixen els nivells de sitosterol i estigmasterol (Carland *et al.*, 2002).

L'aportació de mevalonat al medi de cultiu dels mutants *fps* es tradueix en un increment d'esterols de dues vegades respecte els valors d'esterols acumulats en les mateixes plantes crescudes sense mevalonat. Com ja s'ha comentat anteriorment, el fet que l'addició de mevalonat al medi de cultiu provoqui un increment en la quantitat d'esterols acumulats s'ha observat en altres ocasions, tant en cèl·lules en cultiu (Wilkinson *et al.*, 1994) com en plantes (Masferrer *et al.*, 2002). Ara bé, l'increment del flux de la via en els mutants *fps* no ha produït l'aparició de noves diferències, ni s'han potenciat les diferències ja existents en la quantitat d'esterols, ja que en el cas del mutant *fps2* s'han obtingut els mateixos nivells d'esterols que en el wt, i en el mutant *fps1*, s'ha mantingut la reducció del 10-15% respecte el wt. Globalment, els resultats que deriven de les anàlisis d'esterols dels mutants *fps* confirmen el ja s'havia observat a

partir de la caracterització de les plantes que sobreexpressen els isoenzims FPS, i permeten concloure que la síntesi de FPP no resulta una etapa limitant en la síntesi d'esterols en *A. thaliana*.

El fet que els mutants *fps* siguin viables i que només manifestin petites alteracions fenotípiques evidencia que els isoenzims FPS desenvolupen funcions majoritàriament redundants, més enllà del que és la síntesi d'esterols. Això permet el desenvolupament normal de la planta davant l'absència d'un dels isoenzims FPS. Tot i que en algun dels mutants *fps*, l'activitat FPS sigui fins a un 70% inferior al valor d'activitat de les plantes control, aquesta activitat ja resulta suficient per sintetitzar el FPP necessari per la síntesi dels diferents productes finals de la via del mevalonat. En aquest punt cal destacar que, en valor absolut, l'activitat FPS en *Arabidopsis* és aproximadament d'un ordre de magnitud superior als valors d'activitat HMGR, de manera que, en condicions normals, la planta sembla disposar de molta més activitat FPS que no pas HMGR. Per tant, tot i la falta d'un dels enzims FPS, molt probablement el flux de la via no es veu limitat per la davallada d'activitat FPS total. En aquest sentit, els resultats obtinguts a partir de les anàlisis dels patrons globals d'expressió gènica són totalment coherents amb la importància relativa dels enzims HMGR i FPS en termes de regulació de la via metabòlica. El nombre de gens que alteren la seva expressió en els mutants *hmg* és molt superior al nombre de gens que l'alteren en els mutants *fps*, indicant que un bloqueig de la via a nivell d'un dels isoenzims FPS té molt menys impacte en la resta de processos cel·lulars que si es produeix a nivell d'un isoenzim HMGR. El fet que hi hagi un nombre molt reduït de gens, l'expressió dels quals es veu alterada únicament en un dels 2 mutants *fps*, recolza la idea que en moltes ocasions FPS1 i FPS2 poden complementar-se entre sí, és a dir, que són isoenzims amb funcions majoritàriament redundants. En el cas dels mutants *hmg*, és interessant destacar el gran nombre de gens que veuen alterada la seva expressió únicament en el mutant *hmg1-1*, que concorda amb el fet que en aquest mutant apareguin importants alteracions fenotípiques i destaca la importància del gen *HMGI* en el control de la via del mevalonat.

Pel que fa referència a les alteracions fenotípiques detectades, en totes les línies mutants *fps* s'observa una reducció en la longitud dels tubs pol·línics, essent més marcada en els mutants *fps2* i, especialment, en l'al·lel *fps2-2* (Figura 39). El fet que el

pol·len constitueixi una font important de BRs i que, per exemple, en estudis *in vitro* realitzats en *Prunus avium* es proposés que l'elongació dels tubs pol·línics podia en part dependre dels BRs (Hewitt *et al.*, 1985), suggeria un possible dèficit de BRs en els mutants *fps*. En *Arabidopsis* s'han descrit diversos mutants deficients en brassinosteroides: *deetiolated2 (det2)* (Fujioka *et al.*, 1997), *dwarf4 (dwf4)* (Choe *et al.*, 1998), i *constitutive photomorphogenesis and dwarfism (cpd)* (Szekeres *et al.*, 1996). Entre les característiques que mostren aquests mutants, destaquen la fotomorfogènesi en fosc, l'enanisme, fertilitat reduïda, desenvolupament vascular alterat i un cicle de vida més llarg (Clouse i Sasse, 1998; Altmann, 1999; Clouse i Feldman, 1999; Clouse, 2002). En els mutants *fps* es posen de manifest reduccions significatives en la longitud dels hipocòtils en un fotoperíode de dia curt. Ara bé, en fosc només s'observa una lleugera reducció de la longitud dels hipocòtils respecte els controls en els al·lels *fps1-2* i *fps2-2*, i en cap cas és equiparable als valors que s'obtinguerien en condicions de fotomorfogènesi. Tal i com mostren les dades obtingudes (Figura 39), els hipocòtils de plàntules crescudes en llum (SD) mesuren al voltant de 1,9-3 mm, mentre que en condicions de fosc, tot i les reduccions detectades, s'assoleixen longituds d'entre 11-16 mm. Aquests valors, juntament amb el fet que els cotilèdons no apareixen oberts, fa que els mutants *fps* no es puguin considerar plantes deetioldes quan creixen en fosc. De manera que no presenten cap de les característiques fenotípiques dels mutants deficients en BRs. D'altra banda, l'aplicació d'epi-brassinòlid al medi de cultiu no permet rescatar el fenotip d'hipersensibilitat a mevastatina del mutant *fps2* (Figura 50). Totes aquestes dades permeten afirmar que els mutants *fps* no són deficients en BRs, i concorden amb el fet que els fenotips de mutants que es troben tant en etapes prèvies a la reacció catalitzada per la FPS, com és el mutant *hmg1-1* (Suzuki *et al.*, 2004), com en etapes posteriors, com serien els mutants *smt1* (Diener *et al.*, 2000) i *fackel* (Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000), no siguin deguts a un dèficit de BRs.

El fet que el mutant *eral*, que té una mutació en la subunitat β de la farnesiltransferasa I, no mostri hipersensibilitat a la mevastatina com els mutants *fps2* (Figura 51), és una evidència indirecta que aquest efecte no és degut a un dèficit de farnesilació proteica.

No sembla doncs, que un dèficit d'esterols, de BR o de farnesilació proteica siguin responsables dels efectes fenotípics observats. Ara bé, no es podria descartar l'existència d'una alteració en el contingut d'esterols o d'algun altre derivat isoprenoide de forma puntual en òrgans concrets. Podria ser, per exemple, que estés alterada la

distribució d'esterols a les antereres, doncs es coneix que les cèl·lules tapetals tenen un alt contingut en esterols (Hernández-Pinzón *et al.*, 1999), i que això pogués alterar l'elongació dels tubs pol·línics en els mutants *fps*, tal i com s'ha postulat per explicar l'esterilitat del mutant *hmg1-1* (Suzuki *et al.*, 2004).

La impossibilitat d'obtenir dobles mutants *fps1:fps2* viables indica que les FPS resulten essencials per a les plantes des dels primers estadis de desenvolupament de l'embrió i corrobora que en *Arabidopsis* no hi ha cap altre FPS ni cap altre preniltransferasa que sigui capaç d'assumir la síntesi citosòlica de FPP. Tot i que s'ha demostrat l'existència d'intercanvi d'intermediaris entre la via del MVA i la via del MEP en determinades ocasions (Hemmerlin *et al.*, 2003a; Laule *et al.*, 2003; Rodríguez-Concepción *et al.* 2004), la inviabilitat del doble mutant *fps1:fps2* indica que la via del MEP no pot rescatar un bloqueig a nivell de la reacció catalitzada per la FPS durant el desenvolupament embrionari. Aquests resultats permeten concloure que la presència d'almenys un dels dos gens *FPS* és necessària i suficient per a la viabilitat de les plantes d'*Arabidopsis*.

La letalitat embrionària del doble mutant es produeix abans d'assolir la fase en forma de cor (Figura 43). Alguns mutants d'enzims situats en etapes inicials de la síntesi d'esterols, com són els mutants *smt1* (Diener *et al.*, 2000) i *fackel* (Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000) també mostren alteracions en l'embriogènesi (Figura 7). En aquests mutants, les cèl·lules centrals de l'embrió no es divideixen de forma asimètrica, de manera que, mentre que els embrions *wild type* progressen cap a l'estadi en forma de cor, els embrions mutants es mantenen en un estadi globular i desorganitzats (Clouse, 2000; Clouse, 2002; Diener *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000). Tant en els mutants *smt1* i *fk* com en el doble mutant *fps1:fps2*, els efectes es manifesten quan ja hi ha un nombre de cèl·lules que s'han dividit en l'embrió, per exemple, unes 60 cèl·lules en el cas del mutant *fk* (Schrick *et al.*, 2000), de manera que no sembla que els processos bàsics de divisió cel·lular estiguin afectats. El fet que pugui iniciar-se el desenvolupament de l'embrió pot indicar que en el doble mutant *fps1:fps2* s'estan utilitzant els compostos de reserva existents per dur a terme les primeres divisions i elongacions cel·lulars, però a partir d'un cert moment, el desenvolupament de l'embrió fracassa, ja sigui per l'absència d'esterols per a la síntesi de membranes o per la manca d'altres compostos, la síntesi dels quals derivi del FPP. En el cas dels mutants de síntesi d'esterols, s'ha contemplat la possibilitat que les alteracions en l'embriogènesi puguin derivar de la

implicació dels esterols en la senyalització (Clouse, 2000; Clouse, 2002; Lindsey *et al.*, 2003; Benveniste, 2004; Schaller, 2004). En aquest sentit hi ha diversos precedents en animals, per exemple, s'ha descrit que les proteïnes Hedgehog, una família de molècules senyalitzadores essencials en el desenvolupament embrionari tant de vertebrats com d'invertebrats, requereixen una modificació covalent amb colesterol per unir-se a un receptor i activar la senyalització (Farese i Herz, 1998; Edwards i Ericsson, 1999). En plantes, la identificació de seqüències similars als dominis d'unió a esterols/lípids de mamífers, denominats START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer), en proteïnes implicades en la morfogenesi de diversos òrgans, suggereix la implicació dels esterols en la regulació d'aquestes proteïnes (Ponting i Aravind, 1999).

Si tenim present la posició que ocupa la FPS en la via del mevalonat, cal tenir en compte que un bloqueig absolut en aquest punt no només està afectant la síntesi d'esterols, sinó que també altera tota la resta de branques biosintètiques que deriven del FPP. Per tant, podem pensar que la inviabilitat del doble mutant pot ser conseqüència tant d'un dèficit d'esterols, com del dèficit d'altres derivats de la via del mevalonat. En aquest moment, les dades de les quals es disposa no permeten conèixer amb exactitud les causes de la letalitat del doble mutant *fps1:fps2*.

2.1 Efectes de la pèrdua de funció dels gens FPS sobre l'activitat HMGR

L'addició d'un inhibidor de l'HMGR en el medi de germinació posa de manifest una resposta diferencial entre els mutants *fps1* i *fps2*. En presència de mevastatina les llavors de les plantes *wild type* i de plantes del mutant *fps1* tenen el mateix comportament i manifesten els efectes característics causats per aquest inhibidor. En canvi, en els mutants *fps2*, es manifesta una major sensibilitat a aquest inhibidor ja que, a més a més dels efectes descrits per al *wt*, es produeix un bloqueig en l'elongació de l'hipocòtil i en el desenvolupament dels cotilèdons (Figura 44). La possibilitat que les llavors del mutant *fps2* patissin alguna alteració en la coberta de la llavor que afectés la seva permeabilitat i permetés la penetració de l'inhibidor més fàcilment, ja sigui més ràpidament o en una major quantitat, es va descartar mitjançant l'estudi de la permeabilitat realitzant tincions amb sals de tetrazoli (Figura 46). Descartat això, i donat que l'HMGR és l'enzim inhibit per la mevastatina, es va analitzar si els efectes

d'hipersensibilitat observats correlacionaven amb una reducció en els nivells d'activitat HMGR en els mutants *fps2*. Contràriament, en les llavors dels mutants *fps2-1* i *fps2-2* (tant si són seques com si ja han iniciat el procés de germinació) s'observa un notable increment de l'activitat HMGR (Figura 47), mentre que en plàntules de 5 dies d'aquests mateixos mutants, l'activitat HMGR mostra valors similars als de les plàntules *wild type*. L'increment en els nivells d'activitat HMGR correlaciona tant amb els estadis en els quals apareix hipersensibilitat a la mevastatina, com amb el fet que el mutant *fps2-2*, més sensible a l'inhibidor que el mutant *fps2-1*, també és el que mostra un increment més alt d'activitat HMGR. Aquest resultat contrasta amb dades obtingudes en altres estudis en els quals plantes que sobreexpressaven l'isoenzim HMGR1S, amb un increment de 1,7-2,5 vegades l'activitat HMGR respecte les plantes control, presentaven resistència a la mevinolina (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). En el cas dels mutants *fps* seria raonable pensar que el fenotip d'hipersensibilitat a la mevastatina fos causat per una davallada en l'activitat HMGR i no pas per un augment. Ara bé, l'increment d'activitat HMGR en el mutant *fps2* es pot interpretar com una adaptació metabòlica orientada a incrementar el flux de la via del mevalonat en resposta a la limitació deguda a la pèrdua de funció del gen *FPS2*. El fet que en absència d'inhibidor les llavors dels mutants *fps2* es desenvolupin amb total normalitat indica que l'increment d'activitat HMGR permet compensar la limitació del flux deguda a la pèrdua d'activitat *FPS2*, probablement perquè l'isoenzim *FPS1S* pot canalitzar aquest augment de flux derivat de l'activació de l'HMGR i compensar així l'absència de l'isoenzim *FPS2*. Això indicaria que la viabilitat de la llavor i el desenvolupament inicial del *seedling* en el mutant *fps2* depenen de que hi hagi més activitat HMGR i, per tant, més aportació de precursors. Conseqüentment, quan la mevastatina produeix un bloqueig en el flux metabòlic, són les plantes més dependents d'activitat HMGR (mutants *fps2*), les que es veuen més afectades. El fet que tot i la presència d'inhibidor, quan es suplementa el medi de germinació amb mevalonat no es manifestin els efectes d'hipersensibilitat a la mevastatina en els mutants *fps2*, reforça l'hipòtesi proposada, doncs el mevalonat aportat supera en escreix les possibles necessitats augmentades d'intermediaris i, per tant, evita el bloqueig en el desenvolupament del *seedling*.

Paral·lelament, aquests resultats posen de manifest una correlació entre l'activació de l'HMGR en els mutants *fps2* i el patró d'expressió del gen *FPS2*, doncs l'increment d'activitat HMGR deixa de detectar-se en plàntules de 5 dies, i això correlaciona amb que el gen *FPS2* s'expressa intensament en llavors i en plàntules de

fins a tres dies (Cunillera *et al.*, 2000b). Anteriorment, ja s'havia proposat que l'expressió dels gens *FPS* i *HMG* en teixits de la llavor podia estar relacionada amb la síntesi d'isoprenoides necessaris durant la germinació (Moore i Oishi, 1993; Enjuto *et al.*, 1995; Li i Larkins, 1996). Concretament, pel que fa referència al gen *FPS2*, s'havia proposat, en base al patró d'expressió especialitzat, la seva possible implicació en la síntesi d'isoprenoides específics, necessaris tant en els grans de pol·len, com en la formació de la llavor i la germinació (Cunillera *et al.*, 2000b).

La situació que es dona en les llavors del mutant *fps2* no és el primer cas en el qual s'observa una relació inversa entre un increment d'activitat HMGR i una reducció de la resistència a les estatines, doncs un comportament similar s'ha descrit en cèl·lules de mamífers. En els fibroblastes de pacients afectats amb acidúria mevalònica, una malaltia causada per nivells baixos d'activitat mevalonat quinasa (MVK), es detecta un increment d'activitat HMGR, a la vegada que es manifesta un increment en la sensibilitat a la simvastatina. Els autors proposen que les cèl·lules deficientes en activitat MVK són capaces de mantenir el flux a través de la via de síntesi d'isoprenoides augmentant els nivells intracel·lulars de mevalonat (Houten *et al.*, 2003). Aquesta situació és molt similar a la descrita en els mutants *fps2*, ja que en ambdós casos es compensa una limitació en el flux de la via incrementant l'activitat HMGR. Davant d'aquesta resposta metabòlica compensatòria, tant els fibroblastes com les llavors d'*Arabidopsis* es mostren dependents de l'activitat HMGR i, per tant, molt més sensibles a la inhibició d'aquest enzim.

En el cas que l'activació de l'HMGR en les llavors del mutant *fps2* es produís a nivell transcripcional, s'esperaria detectar un increment en els nivells dels transcrits dels gens *HMG* en les llavors d'aquest mutant. Els resultats però, indiquen que els nivells dels transcrits HMG es veuen reduïts en un 70% en el mutant *fps2* en relació amb els nivells detectats en les llavors de plantes control (Figura 49). Una disminució similar s'observa també en el mutant *fps1*, en el qual els nivells de transcrits HMG disminueixen un 60% respecte els nivells de les plantes control. Un tipus de regulació similar a la que s'observa en el mutant *fps2* d'*Arabidopsis* s'ha observat en la sobreexpressió de l'enzim esqualè sintasa (SQS) en fetge de ratolí. En aquest cas, es detecta un increment d'activitat HMGR d'unes 3,6 vegades respecte el control i alhora una disminució dels nivells de mRNA de l'HMGR en un 39% (Okazaki *et al.*, 2006). Els autors proposen que la regulació transcripcional podria ser desencadenada per un mecanisme de retroalimentació negativa produït per l'acumulació de colesterol, mentre

que l'increment d'activitat HMGR podria ser provocat per la disminució d'altres derivats no esteroidals de la via del mevalonat. En el cas dels fibroblastes de pacients amb acidúria mevalònica comentat anteriorment, l'increment en el valor d'activitat HMGR tampoc va acompanyat d'una activació de la transcripció de l'HMGR. En la situació descrita en aquestes cèl·lules no es veuen implicats mecanismes de regulació transcripcional, doncs no es detecten variacions en els nivells de mRNA HMGR (Houten *et al.*, 2003). En el cas dels mutants *fps* d'*Arabidopsis*, el fet que es detecti una activació de l'HMGR únicament en els mutants *fps2* i en canvi, s'observi una regulació transcripcional negativa tant en *fps1* com en *fps2*, ens planteja l'existència de 2 mecanismes de regulació diferents, un a nivell transcripcional i un altre a nivell post-transcripcional (Figura 57).

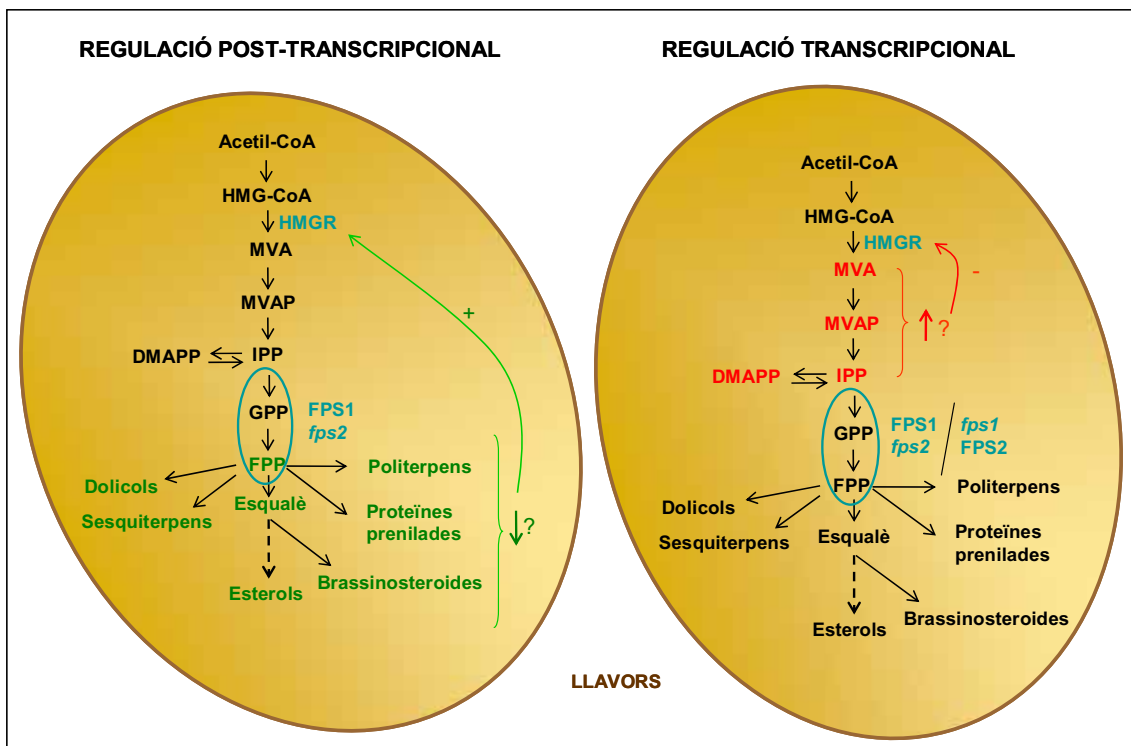


Figura 57: Model proposat per explicar els mecanismes de regulació de l'HMGR en llavors dels mutants *fps* d'*A. thaliana*. A l'esquerra s'esquemmatitza una possible regulació post-transcripcional en les llavors del mutant *fps2* en la qual la davallada d'algun producte derivat específicament de *fps2* desencadenaria l'activació de l'HMGR. A la dreta s'esquemmatitza la regulació transcripcional que podria tenir lloc en les llavors d'ambdós mutants *fps*. En aquest cas, la hipotètica acumulació d'un intermediari entre els enzims HMGR i FPS podria regular negativament l'HMGR a nivell transcripcional.

Per una banda, els resultats d'activitat enzimàtica HMGR suggereixen que el dèficit d'algun compost que deriva específicament del FPP sintetitzat per l'isoenzim FPS2, podria ser el responsable d'una regulació post-transcripcional positiva de l'HMGR, desencadenant-ne la seva activació. D'altra banda, l'acumulació d'algun intermediari de la via situat entre els enzims HMGR i FPS podria ser el responsable d'exercir una regulació negativa de l'HMGR a nivell transcripcional.

En conjunt, tots aquests resultats posen de manifest l'existència de sistemes de control tan complexos en la regulació de l'HMGR en *Arabidopsis*, com els que es poden trobar en altres organismes (Stermer *et al.*, 1994).

Globalment, la viabilitat i el normal desenvolupament dels mutants *fps1* i *fps2*, així com el fet que no es detectin grans alteracions en el contingut d'esterols indica que els isoenzims citosòlics FPS1S i FPS2 d'*Arabidopsis* són majoritàriament redundants, tot i que presenten especialització funcional en determinats òrgans i estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts en els experiments de retransformació del mutant *fps-2-1* amb la construcció pTGEN2-1S, on l'expressió de l'isoenzim FPS1S sota el control del promotor del gen *FPS2* és capaç de revertir la hipersensibilitat a mevastatina de les llavors, suggereixen que l'especialització funcional pot venir conferida pel patrons d'expressió de cadascun dels gens *FPS*.

Tot i així, no es pot descartar que, segons suggereixen els models tridimensionals i els estudis amb els mutants amb guany de funció, hi hagi implicades en l'especialització, la interacció amb d'altres proteïnes.

CONCLUSIONS

1. La sobreexpressió constitutiva de l'isoenzim FPS2 en *A. thaliana* no causa cap alteració fenotípica, i per tant, els seus efectes són completament diferents als causats per la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S, tot i que ambdós isoenzims tenen localització citosòlica, catalitzen *in vitro* la síntesi del mateix producte de reacció (FPP) i mostren uns valors aparents de K_m per als substrats IPP, DMAPP i GPP molt similars.
2. Tal i com passa amb la sobreexpressió de l'isoenzim FPS1S, la sobreexpressió constitutiva de l'isoenzim FPS2 en *A. thaliana* no altera els valors d'activitat HMGR ni el contingut total d'esterols de les plantes transgèniques. Això indica que la reacció catalitzada per les FPS no resulta limitant en la síntesi d'esterols en *A. thaliana*.
3. El fenotip associat a la sobreexpressió de FPS1S (caracteritzat per l'aparició de lesions necròtiques a les fulles, disminució de la mida de la roseta basal i senescència prematura), no és degut a l'increment d'activitat FPS total sinó que depèn específicament de l'increment d'activitat derivat de l'expressió de l'isoenzim FPS1S.
4. Els isoenzims FPS1S i FPS2 d'*A. thaliana* són estructuralment equivalents i presenten el plegament típic de les terpè sintases. Els models estructurals mostren que 19 dels 33 aminoàcids diferents entre FPS1S i FPS2 es localitzen formant dos grups ben definits a la superfície externa de l'homodímer format per cadascun d'ells, suggerint que els efectes diferencials causats per la sobreexpressió d'aquests dos isoenzims poden reflectir una diferent capacitat d'interaccionar amb d'altres proteïnes.
5. La caracterització de dos al·lels mutants amb pèrdua total de funció del gen *FPS1* i de dos al·lels mutants amb pèrdua total de funció del gen *FPS2* d'*A. thaliana* ha posat de manifest que, malgrat la disminució d'activitat FPS que això comporta en cada cas, els quatre mutants poden desenvolupar-se amb normalitat i completar el seu cicle vital, indicant que la presència d'un únic isoenzim FPS és suficient per garantir la viabilitat de les plantes.

6. La letalitat embrionària que presenta el doble mutant homozigot *fps1:fps2* indica que cap altre prenilttransferasa és capaç d'assumir la síntesi de FPP al citòsol, i per tant, no es cobreixen les necessitats de FPP en aquest estadi del desenvolupament. Això confirma que la via del mevalonat és essencial pel correcte desenvolupament de les llavors.

7. La pèrdua de funció de l'isoenzim FPS2 desencadena en les llavors una resposta metabòlica compensatòria caracteritzada per un increment d'activitat HMGR i una disminució de l'expressió dels gens *HMG*.

8. La caracterització dels mutants *fps1* i *fps2* posa de manifest una gran complexitat en la regulació de l'HMGR en les llavors d'*Arabidopsis*, amb intervenció de mecanismes que actuen a nivell transcripcional i post-transcripcional. La repressió transcripcional es produeix molt probablement en resposta a l'increment d'algun dels intermediaris que es troben entre els enzims HMGR i FPS, mentre que l'activació post-transcripcional podria produir-se en resposta al dèficit d'algun compost que deriva específicament del FPP sintetitzat per FPS2.

9. La hipersensibilitat a mevastatina associada a l'increment d'activitat HMGR en les llavors dels mutants *fps2* no es pot atribuir a un dèficit de brassinosteroides ni de farnesilació de proteïnes.

10. Els isoenzims citosòlics FPS1S i FPS2 desenvolupen funcions majoritàriament redundants, tot i que presenten una certa especialització funcional que sembla derivar del patró d'expressió especialitzat de cadascun dels gens *FPS*.

MATERIALS I MÈTODES

1. Material vegetal

El material vegetal utilitzat en aquesta tesi pertany a l'espècie *Arabidopsis thaliana* (Heyn). Les línies transgèniques amb guany de funció per sobreexpressió constitutiva dels isoenzims FPS i de les FPS quimèriques s'han generat al laboratori en la varietat Columbia 3 (Col. 3).

Els mutants amb pèrdua de funció per inserció de T-DNA o per inserció d'un element Ds utilitzats provenen de tres col.leccions diferents. Les línies SALK pertanyen al *Salk Institute Genomic Analysis Laboratori* i han estat generades en la varietat Col. 3. Les línies SAIL (antigament anomenades GARLIC) pertanyen al *Torrey Mesa Research Institute* de *Syngenta* i han estat generades en la varietat Col. 0 *qrt1/qrt1*. Aquest fons genètic amb la mutació en el gen *QRT1* té una característica que fa que els grans de pol.len siguin alliberats formant tètades, fet que no afecta la seva viabilitat i fertilitat (Preuss *et al.*, 1994). Finalment, les línies GT provenen del *Cold Spring Harbor Laboratory* i són de la varietat *Landsberg erecta* (Ler). Totes les línies són mutants insercionals dels gens *FPS1* (At5g47770) i *FPS2* (At4g17190). Els al.lels mutants caracteritzats són els següents:

NOM DEL MUTANT	GEN	LÍNIA D'INSERCIÓ	ECOTIP	TIPUS D'INSERCIÓ	POSICIÓ DE LA INSERCIÓ	RESISTÈNCIA
<i>fps1-1</i>	At5g47770	SAIL 310 D07	Col. 0	T-DNA	+1032 pb	BASTA
<i>fps1-2</i>	At5g47770	SALK 073576	Col. 3	T-DNA	+535 pb	Kanamicina
<i>fps2-1</i>	At4g17190	SAIL 328 G06	Col. 0	T-DNA	+615 pb	BASTA
<i>fps2-2</i>	At4g17190	GT 7041	Ler	Ds	-12 pb de l'ATG	Kanamicina

Taula 7: Mutants d'*A. thaliana* amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* (At5g47770) i *FPS2* (At4g17190). S'indiquen les posicions respecte l'ATG. En el cas del gen *FPS1*, s'ha considerat +1 la posició corresponent a l'ATG que dona lloc a FPS1L.

En funció de l'experiment a realitzar, s'han utilitzat llavors o bé plantes en diferents estadis de creixement i desenvolupament, des de plàntules cultivades en condicions estèrils fins a plantes adultes germinades en condicions estèrils i trasplantades posteriorment a terra.

1.1. Genotipat de les línies amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*

El genotipat de les línies amb pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2* s'ha dut a terme mitjançant reaccions de PCR a partir de DNA genòmic extret de fulles de cadascuna de les línies en estudi. A partir de cada mostra s'han realitzat dues reaccions de PCR. En la primera reacció s'han utilitzat primers específics de cadascun dels gens, que hibriden a 5' i a 3' del lloc d'inserció. En la segona reacció de PCR s'ha utilitzat un primer específic de cadascun dels gens i un primer que hibrida a un extrem del T-DNA o de l'element Ds. El fet de trobar producte d'amplificació en les dues reaccions realitzades seria indicatiu que la inserció es troba en heterozigosi. En el cas que la inserció es trobi en homozigosi, no hi ha d'haver amplificació a partir de la parella de primers que hibriden en el gen a 5' i a 3' del lloc d'inserció. Els primers utilitzats en cada cas i la seva orientació es mostren a la Figura 35. Les seves seqüències s'indiquen a la Taula 8.

PRIMER	SEQÜÈNCIA
LB3	5'-TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'
LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
Ds3-1	5'-ACCCGACCGGATCGTATCGGT-3'
G11	5'-GGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCG-3'
G12	5'-CCGTATCTAAAATTTAGACAATGCCAC-3'
G21	5'-GCTTCACTCAGACATTACCTTCAAAC-3'
G22	5'-CATTGTAATCCTACTTCACTACATCATCC-3'
G23	5'-CTTCTGAGATAAGCAGGCCTTAGAC-3'
G24	5'-GTTTGAAGGTAATGTCTGAGTGAAGC-3'

Taula 8: Seqüències dels primers utilitzats pel genotipat de les línies mutants per pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*.

2. Condicions de cultiu de plantes d'*Arabidopsis thaliana*

2.1. Cultius estèrils

2.1.1. Esterilització de llavors

Les llavors d'*Arabidopsis thaliana* han estat esterilitzades mitjançant el tractament amb una solució etanòlica de clor actiu. El procés d'esterilització es porta a terme en condicions estèrils en una cambra de flux laminar de la manera següent:

Es reparteixen les llavors en tubs de 1,5 ml (la quantitat equivalent a 50-100 µl de llavors/ tub), s'afegeix 1 ml de solució d'esterilització i es manté en agitació durant 8 minuts. A continuació, es realitzen dos rentats amb etanol al 96% per tal d'eliminar les restes de clor. Finalment, s'assequen les llavors deixant-les 16 hores a la cambra de flux laminar per tal d'evaporar completament l'etanol dels rentats.

Per preparar la solució d'esterilització, es dissol una pastilla de Deterclor (dicloroisocianurat de sodi al 45%, *DETERCO*) en 40 ml d'aigua destil.lada. A continuació, es prepara una dilució al 10% en etanol al 96%.

2.1.2 Sembra de les llavors

Les llavors ja esterilitzades es reparteixen en plaques de Petri que contenen medi Murashige i Skoog (MS). Un cop sembrades les llavors, les plaques es sellen amb un esparadrap transpirable (*Leukopor*) i es deixen de 2 a 4 dies a 4°C en fosc per tal de sincronitzar-ne la germinació, un procés denominat estratificació.

Medi Murashige i Skoog (MS)

Sals de Murashige i Skoog (*)	4,4 g/l
MES	0,5 g/l
Sacarosa	10 g/l
Agar	8 g/l
pH 5,7 amb KOH 0,5 M	

(*) medi Murashige i Skoog sense vitamines ni hormones.

El medi s'autoclava 20 min a 120°C. En els casos en els quals s'ha requerit l'addició d'antibiòtics, herbicides, suplementos o inhibidors al medi de cultiu, aquests s'han afegit en condicions estèrils després d'autoclavar el medi per tal d'evitar la seva degradació per les altes temperatures.

Kanamicina (*Sigma*): l'estoc d'aquest antibiòtic es pot preparar a una concentració de 50-100 mg/ml dissolt en aigua. S'utilitza a una concentració final de 50 µg/ml.

Higromicina (*Sigma*): l'estoc es prepara a una concentració de 50 mg/ml dissolt en aigua. S'utilitza a una concentració final de 15 µg/ml.

Glufosinat amònic (BASTA) (*Sigma*): aquest herbicida es prepara dissolt en aigua a una concentració de 50 mg/ml. S'utilitza a una concentració final de 10 µg/ml.

Mevalonat (DL-Mevalonic acid lactone) (*Sigma*): l'estoc es prepara a una concentració de 5 M dissolt en aigua. S'utilitza a una concentració final de 5 mM.

Mevastatina (*Calbiochem*): l'estoc d'aquest inhibidor de l'enzim HMG-CoA reductasa es prepara en EtOH absolut a una concentració de 10 mM i es guarda a -20°C. En aquestes condicions l'inhibidor és estable durant 3 mesos. S'han utilitzat diferents concentracions finals, entre 0.01-1µM.

Epi-brassinòlid (*Sigma*): l'estoc d'aquest brassinosteroide es prepara en EtOH absolut a una concentració de 5 mM i es guarda a -20°C. Les concentracions utilitzades han estat 0.2-1µM.

2.2. Condicions de creixement

Passat el temps requerit per l'estratificació, les llavors es posen a germinar en cambres d'ambient controlat, a una temperatura de 22-24°C i una intensitat lumínica de 100 µEinstein m⁻¹ s⁻¹. Les condicions d'il.luminació s'han ajustat bàsicament a dos fotoperíodes diferents: dia curt (SD) amb 8 h de llum i 16 h de foscor, per potenciar la fase vegetativa de la planta, o dia llarg (LD) amb 16 h de llum i 8 h de foscor, per accelerar la floració de la planta. En alguna ocasió s'ha utilitzat llum contínua (24h llum).

2.3. Cultius en testos

En els casos en els quals ha estat necessària l'obtenció de plantes adultes per als diferents estudis, s'han trasplantat plàntules de 15 dies, germinades en plaques amb medi MS en condicions estèrils, a testos amb terra. El suport sòlid consisteix en una mescla de turba:perlita:vermiculita en proporció 1:1:1, que cal hidratar amb aigua abans d'utilitzar. Les plantes s'han extret del medi de germinació amb cura de no provocar cap lesió i s'han dipositat a la terra cobrint lleugerament l'arrel. Durant la primera setmana, els testos es mantenen tapats amb un plàstic transparent (*Saram Wrap*) per tal de mantenir unes condicions d'humitat

elevades, doncs cal tenir en compte que les plàntules crescudes en placa són molt sensibles a la deshidratació. La irrigació es duu a terme amb solució nutritiva amb una freqüència variable en funció de les necessitats de les plantes.

Composició de la solució nutritiva: 5 mM de KNO₃, 2,5 mM de KH₂PO₄ (pH 5,5), 2 mM de MgSO₄, 2 mM de Ca(NO₃)₂, 50 µM de EDTA-Fe, 70 µM de H₃BO₃, 14 µM de MnCl₂, 0,5 µM de CuSO₄, 1 µM de ZnSO₄, 0,2 µM de NaMoO₄, 10 µM de NaCl, i 10 nM de CoCl₂.

3. Material bacteriològic

3.1. Soques bacterianes

Les soques bacterianes utilitzades en aquest treball són les següents:

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

Escherichia coli **XL1Blue**: *end A1 hsd R17 (r⁻ m⁺) supE44 thi-1 rec A1 gyr A46 rel A1 lac⁻ (F[']pro AB⁺lac IqZ ΔM15 Tn10 Tet^r)*.

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

Agrobacterium tumefaciens **C₅₈C₁**: porta incorporat el plasmidi pGV2260.

3.2. Vectors plasmídics

3.2.1. Vectors per a la preparació de construccions

S'han utilitzat diversos vectors per a la preparació de construccions. Els vectors pBluescript KS⁺ (*Stratagene*) i pGEM-T easy (*Promega*) han estat utilitzats fonamentalment en el clonatge. El vector pQE-60 (*Qiagen*), tot i estar dissenyat per a l'expressió de proteïnes en procarïotes, va ser utilitzat per a la incorporació de la diana Sal I a una construcció prèviament clonada en pBluescript. Per a la replicació de tots aquests plasmidis s'han utilitzat les soques XL1Blue, DH5α i JM109 d'*E. coli*.

3.2.2. Vectors per a l'expressió estable de proteïnes en planta

Per dur a terme els estudis d'expressió estable de proteïnes en planta s'han utilitzat els vectors pBI121 (*Clontech*), pBIB (Becker, 1990) i pCAMBIA 1300 (*Cambia*). Els tres plasmidis, que presenten resistència a kanamicina en bacteries, han estat replicats en la soca DH5 α d'*E. coli* i introduïts posteriorment en la soca C₅₈C₁ d'*A. tumefaciens* per a l'obtenció de plantes transgèniques. El plasmidi pBI121 conté, sota el control d'un promotor eucariòtic, el gen *NPTII* que confereix resistència a kanamicina, mentre que els plasmidis pBIB i pCAMBIA 1300 presenten sota el control d'un promotor eucariòtic, el gen *HPT* que confereix resistència a higromicina. L'ús de vectors amb resistència a antibiòtics diferents ha estat utilitzada per a la incorporació i selecció d'un segon transgèn en plantes ja transgèniques que, per tant, ja presentaven una de les resistències.

3.4. Medis de cultiu

S'ha utilitzat el medi LB pel cultiu de les diferents soques d'*E. coli* i el medi YEP pel cultiu d'*A. tumefaciens*.

Medi Luria-Bertani (LB)

NaCl	5g/l
Extracte de llevat	5g/l
Triptona	10g/l
pH a 7.4 amb NaOH	

Medi YEP:

Extracte de llevat	1 g/l
Extracte de bou	5 g/l
Peptona	5 g/l
Sacarosa	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
pH 7,0 amb NaOH	

En el cas de la preparació de medis sòlids, cal afegir 14 g/l d'agar abans d'autoclavar 20 min a 120°C i 1 atm. Els antibiòtics de selecció necessaris en cada cas, s'afegeixen després d'autoclavar.

3.5. Preparació d'ADN plasmídic

L'extracció d'ADN plasmídic de cultius bacterians s'ha portat a terme utilitzant els kits comercials *Wizard Miniprep* i *Wizard Midiprep* (*Promega*).

4. Generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*

La generació de plantes transgèniques d'*A. thaliana* s'ha aconseguit a través de la integració de forma estable de gens quimèrics en el seu genoma. Això s'ha dut a terme incorporant a la soca C₅₈C₁ (PGV2260) d'*A. tumefaciens* les construccions quimèriques generades i a través de la posterior infecció de les plantes amb aquesta soca mitjançant la tècnica *floral dip* (Clough i Bent, 1998).

4.1. Construccions utilitzades per generar plantes transgèniques amb guany de funció

4.1.1. Construcció del plasmidi p35SFPS2 per a la generació de plantes transgèniques que sobreexpressin l'isoenzim FPS2

Amb l'objectiu de generar plantes transgèniques que sobreexpressin el gen *FPS2* de forma constitutiva, es va clonar el cDNA del gen *FPS2* amb 525 pb de la regió flanquejant situada a 3' del gen, sota el control del promotor *35SCaMV*, en el vector d'expressió en plantes pBI121. Per generar aquesta construcció es va partir dels plasmidis pcNC2, que conté el cDNA de *FPS2* clonat en el vector pGEM-T, i pgNCM, que conté un fragment de 1018 pb de DNA genòmic de *FPS2* situat entre les dianes PstI i KpnI (situades entre les posicions 3007-4025 de la seqüència dipositada al GeneBank; L46350) en el vector pBluescript KS⁺. En primer lloc es va digerir el plasmidi pcNC2 amb els enzims SacII/SaII per tal d'extreure el cDNA del gen *FPS2* d'aquest vector i clonar-lo en pBluescript KS⁺, donant lloc a un plasmidi anomenat pBFPS2. D'altra banda, es va extreure per digestió parcial BglII/KpnI, a partir de pgNCM, un fragment de 548 pb pertanyents a l'extrem 3' del DNA genòmic del gen *FPS2*. Aquest fragment es va clonar en el pBFPS2, que havia estat prèviament tallat amb BglII/KpnI, donant lloc a pBFPS22. A continuació, a partir de pBFPS22 es va amplificar per PCR el cDNA del gen *FPS2* amb la regió genòmica a 3', utilitzant uns primers que permetien incorporar les dianes BamHI a l'extrem 5' i SacI a l'extrem 3' de l'amplicó, i facilitar-ne el clonatge en pBI121. La seqüència dels primers utilitzats és la següent:

primer sentit: conté la diana BamHI per facilitar el clonatge en pBI121

FPSBam: 5'- CGGGATCCCACATTTGGCTTTGCACAC-3'

primer antisentit: conté la diana SacI

3FPS2: 5'- AGCGAGCTCATTTCCTACTAATCTTCTCG-3'

Finalment, el fragment amplificat es va clonar en pBI121 prèviament digerit amb les dianes BamHI/SacI donant lloc al plasmidi p35SFPS2.

4.1.2. Construcció del plasmidi pBIBFPS1S per a la generació de plantes dobles transgèniques D2+1S

L'obtenció de plantes doblement transgèniques que sobreexpressen de forma simultània les isoformes FPS1S i FPS2 sota el promotor constitutiu *35SCaMV* es va dur a terme mitjançant transformació mediada per *A. tumefaciens* del transgèn *35S::FPS1S* en plantes que ja sobreexpressaven la isoforma FPS2. Donat que les plantes utilitzades per a la transformació ja eren transgèniques i presentaven resistència a kanamicina, es va escollir un plasmidi que conferís resistència a un antibiòtic diferent per tal de poder seleccionar les llavors doblement transgèniques. El vector seleccionat va ser el pBIB, portador del gen que codifica per a la Higromicina B fosfotransferasa (*HPT*), que confereix resistència a higromicina.

Per generar la construcció, es va amplificar per PCR un fragment de 1465 pb del cDNA de FPS1S a partir del plasmidi pDD7 reverse (Masferrer *et al.*, 2002). Aquest fragment contenia el cDNA complet que codifica per la isoforma FPS1S més un fragment de DNA genòmic afegit a l'extrem 3' aprofitant les dianes BglII i HindIII. Els primers utilitzats van ser els següents:

primer sentit: conté la diana XbaI per facilitar el clonatge en pBIB

FPS1S-Xba I: 5'-TCTAGAAGTAATTTAGCTGAGAAGTC-3'

primer antisentit: conté la diana SacI

FPS1S-Sac I: 5'-GAGCTCAAGCTTTATTTTCTTGCCTT-3'

El fragment amplificat es va poliadenilar i clonar en el vector pGEM-T easy (Promega), donant lloc a la construcció pGMFPS1S. Aquesta construcció es va digerir amb els enzims XbaI/ SacI i el fragment obtingut es va clonar en el vector pBIB (al que ja se li havia incorporat el promotor *35S CaMV*) prèviament tallat amb XbaI/ SacI i defosforilat. La construcció final obtinguda, denominada pBIBFPS1S es va utilitzar per la incorporació en la soca C₅₈C₁ d' *A. tumefaciens*.

4.1.3. Construcció dels plasmidis *pTQ1*, *pTQ2*, *pTQ3*, *pTQ4*, *pTQ5* i *pTQ6* per a la sobreexpressió de proteïnes FPS quimèriques

L'estratègia anomenada *domain swapping* (Back i Chappell, 1996), basada en l'intecanvi de dominis entre proteïnes, va ser utilitzada per a la generació de proteïnes FPS quimèriques.

Els isoenzims FPS1S (343 aa) i FPS2 (342 aa) es van dividir arbitràriament en tres regions anomenades A, B i C (Figura 25):

A) comprèn un 25% de la proteïna i correspon als 85 primers aminoàcids de l'extrem N-terminal, en els quals trobem 13 aa diferents entre FPS1S i FPS2.

B) comprèn un 50% de la proteïna. Correspon als 179 aa centrals amb només 12 aa diferents entre les dues isoformes. És el bloc que conté més dominis conservats.

C) comprèn el 25% final de la proteïna. És una regió que comprèn 76 aa de l'extrem C-terminal amb 9 aa diferents entre els dos isoenzims.

Per generar les construccions quimèriques, es va partir de les construccions utilitzades per sobreexpressar FPS1S (pBIFPS1S; Masferrer *et al.*, 2002) i FPS2 (pBFPS22). Aquestes construccions estan formades pel cDNA de cada isoenzim i la corresponent regió genòmica situada a 3' del codó de parada.

En el cas de FPS1S, es va amplificar per PCR el fragment corresponent al cDNA i 339 pb de la regió genòmica situada a 3' del TAG a partir del plasmidi pBIFPS1S per tal d'introduir les dianes BamHI i SacI als extrems 3' i 5' respectivament. El fragment obtingut es va clonar en pBluescript KS⁺ donant lloc al plasmidi pBFPS1S. Els primers utilitzats van ser els següents:

primer sentit: conté la diana BamHI i l'inici del cDNA clonat en pBIFPS1S.

BamFPS1S: 5'-CGCGGATCCTGAGAAGTCTTGGTGG-3'

primer antisentit: conté la diana SacI, està situat 11 pb abans de la diana HindIII a 3' del gen.

SacFPS1: 5'-TTGGAGCTCTTTGGAATGGAATGTAGG-3'

En el cas de FPS2 es va partir del plasmidi pBFPS22, que contenia el cDNA de FPS2 i 525 pb de la seva regió genòmica situada a 3' del TAG, clonats entre les dianes BamHI i SacI del pBluescript KS⁺.

Les diferents regions (A, B i C) es van intercanviar aprofitant les dues dianes afegides als extrems (BamHI i SacI) i dues dianes de restricció internes: HindIII (posició +260 en FPS1S/+257 en FPS2) i PstI (posició +800 en FPS1S/+798 en FPS2), donant lloc a les 6 construccions quimèriques en el vector pBluescript anomenades pBQ1, pBQ2, pBQ3, pBQ4, pBQ5 i pBQ6. Posteriorment, es van extreure els fragments BamHI/SacI i es van clonar en el

vector d'expressió en plantes pBI121, donant lloc als plasmidis pTQ1, pTQ2, pTQ3, pTQ4, pTQ5 i pTQ6 (Figura 26).

4.2. Construccions utilitzades per complementar la pèrdua de funció dels gens *FPS1* i *FPS2*

Per tal d'investigar si els efectes fenotípics observats en els mutants *fps* són revertits a l'incorporar novament una còpia *wild type* del gen disruptat, i d'altra banda, per investigar si els isoenzims FPS1S i FPS2 poden complementar-se mútuament, s'han generat les construccions pCGEN1, pCGEN1-2, pTGEN2-1S i pTGEN2, esquematitzades a la Figura 52.

4.2.1. Modificació del vector pCAMBIA 1300

Algunes de les construccions per complementar les plantes mutants amb pèrdua de funció es van fer utilitzant el vector pCAMBIA 1300 al qual s'havia afegit el terminador de la nopalina sintasa (NOS-T). Per això, es va extreure el terminador NOS digerint amb SacI/EcoRI a partir del vector pBI221 i es va clonar en el vector pCAMBIA 1300. El plasmidi resultant es va anomenar pCA-NOS.

4.2.2. Construcció del plasmidi pCGEN1 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen *FPS1*

La construcció pCGEN1 s'ha generat per reintroduir una còpia *wild type* del gen *FPS1* en el mutant *fps1*. Aquesta construcció està formada pel promotor del gen *FPS1* i el gen *FPS1* amb 339 pb de la regió genòmica situada a 3' del codó de parada.

El promotor del gen *FPS1* es va amplificar per PCR a partir del plasmidi pgNC3. El plasmidi pgNC3 conté un fragment del gen *FPS1* que va des de la posició 1 a la posició 2062 (on hi ha la diana HindIII) de la seqüència depositada al GeneBank, L46367; clonat en pBluescript KS⁺. Els primers utilitzats per amplificar 1406 pb d'aquest promotor i part del gen (2056 pb) van ser els següents:

primer sentit: s'hi afegeix la diana Sall per facilitar el clonatge en pCA-NOS. Hibrida entre les posicions 6-25 (L46367).

SalFPS1: 5'-GCGTCGACATATGTAGTTAATGTTGGGG-3'

primer antisentit: s'utilitza el primer T3-Rev del pBluescript

T3-Rev: 5'-CGCCAAGCTCGGAATTAACCC-3'

El fragment amplificat es va digerir amb els enzims de restricció Sall/HindIII i es va clonar en pBluescript, donant lloc a pBP1.

La regió genòmica del gen *FPS1* es va amplificar per PCR a partir del plasmidi pgNC2 (conté un fragment de 2300 pb del gen *FPS1*; a partir de la posició 1608, L46367) utilitzant els encebadors següents:

primer sentit: situat a l'intró 3, hibridant entre les posicions 2020-2040 (L46367)

IFPS1: 5'-ATGTCGCTATCACTCATCAT-3'

primer antisentit: hibrida entre les posicions 3866-3848 (L46367) i conté la diana SacI.

SacFPS1: 5'-TTGGAGCTCTTTGGAATGGAATGTAGG-3'

El fragment de 1855 pb amplificat es va digerir amb els enzims HindIII/SacI i es va clonar en pBP1, donant lloc a pBGEN1. Finalment, la regió del promotor i el gen *FPS1* es va extreure de pBGEN1 per digestió amb Sall/SacI i es va clonar en el vector d'expressió pCA-NOS, donant lloc a la construcció pCGEN1.

4.2.3. Construcció del plasmidi pTGEN2 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen *FPS2*

La construcció pTGEN2 s'ha generat per reintroduir una còpia *wild type* del gen *FPS2* en el mutant *fps2*. Aquesta construcció està formada pel promotor del gen *FPS2* i el gen *FPS2* amb 441 pb de la regió genòmica situada a 3' del codó de parada.

La regió genòmica del gen *FPS2* es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic de fulles d'*A. thaliana* utilitzant els primers següents:

primer sentit: està al voltant de l'ATG del gen *FPS2* (posicions 1366–1387; L46350) i conté la diana NcoI.

NcoFPS2: 5'-GATCCTATCCATGGCGGATCTG-3'

primer antisentit: hibrida entre les posicions 3941–3921 (L46350) i conté la diana SacI.

3FPS2: 5'-AGCGAGCTCATTTCCTACTAATCTTCTCG-3'

El fragment de 2576 pb amplificat es va digerir amb els enzims NcoI/SacI i es va clonar en un pGEM-T prèviament tallat amb els mateixos enzims, donant lloc al plasmidi pGgenFPS2.

El promotor de gen *FPS2* es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic de fulles d'*A. thaliana* utilitzant els següents encebadors:

primer sentit: hibrida entre les posicions 1-19 (L46350) i té afegida la diana SallI.

1329SallI: 5'-GCGTCGACAAGCTTGGAGCATAAGAAG-3'

primer antisentit: està situat a l'intró 1 (40 pb després de la diana EcoRI del primer exó) i hibrida entre les posicions 1511-1492 (L46350).

primer3: 5'-AAATGGAAGTGAATCGAAGG-3'

El fragment amplificat es va tallar amb els enzims SallI/EcoRI. D'altra banda, el plasmidi pGgenFPS2 es va digerir EcoRI/SacI i es va dur a terme una lligació triple en un pBluescript KS⁺ digerit prèviament SallI/SacI, donant lloc al plasmidi pBGEN2.

Finalment, la regió del promotor i el gen *FPS2* es va extreure de pBGEN2 per digestió amb SallI/SacI i es va clonar en el vector d'expressió pBIB, donant lloc a la construcció pTGEN2.

4.2.4. Construcció del plasmidi pCGEN1-2 per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen *FPS1*

La construcció pCGEN1-2 s'ha generat per investigar si l'isoenzim FPS2 pot complementar la pèrdua de funció en el mutant *fps1*.

El promotor de gen *FPS1* es va amplificar per PCR a partir del plasmidi pgNC3 (apartat 4.2.2. de materials i mètodes). Els primers utilitzats per amplificar un fragment de 1529 pb que inclou el promotor van ser els següents:

primer sentit: SalFPS1 (descriu a l'apartat 4.2.2.).

primer antisentit: està al voltant de l'ATG que dona lloc a FPS1S (posicions 1536–1512; L46367) i conté la diana NcoI.

NcoFPS1: 5'-TCTCCATGGAAGAGCTTTGGATACG-3'

El fragment amplificat es va digerir amb els enzims SallI/NcoI. La regió genòmica del gen *FPS2* es va extreure per digestió NcoI/SacI a partir del plasmidi pGgenFPS2 (apartat 4.2.3. de materials i mètodes). La regió genòmica i la regió promotora es van clonar per lligació triple en un pBluescript KS⁺ digerit prèviament SallI/SacI, donant lloc al plasmidi pBGEN1-2. Finalment, les regions clonades es van extreure de pBGEN1-2 per digestió amb SallI/SacI i es van clonar en el vector d'expressió pCA-NOS, donant lloc a la construcció pCGEN1-2.

4.2.5. Construcció del plasmidi pTGEN2-1S per complementar plantes mutants amb pèrdua de funció del gen *FPS2*

La construcció pCGEN2-1S s'ha generat per investigar si l'isoenzim FPS1S pot complementar la pèrdua de funció en el mutant *fps2*.

El promotor de gen *FPS2* es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic de fulles d'*A. thaliana* utilitzant els següents encebadors:

primer sentit: 1329Sall (descriu a l'apartat 4.2.3 de materials i mètodes)

primer antisentit: està al voltant de l'ATG (CAT) del gen *FPS2* (posicions 1383–1362; L46367) i conté la diana NcoI.

NcoANTI2: 5'-TCCGCCCATGGATAGGATCAAGG-3'

El fragment de 1383 pb amplificat es va digerir amb els enzims NcoI/Sall i es va clonar en un pGEM-T prèviament tallat amb els mateixos enzims, donant lloc al plasmidi pGpromFPS2.

La regió genòmica del gen *FPS1* es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic utilitzant els encebadors següents:

primer sentit: conté la diana NcoI, i està al voltant de l'ATG que dona lloc a FPS1S, hibridant entre les posicions 1521-1542 (L46367).

NcoSENSE1 : 5'-AGCTCTTCCATGGGAGACCGATC-3'

primer antisentit: SacFPS1 (apartat 4.2.2. de materials i mètodes)

El fragment de 2345 pb amplificat es va digerir amb els enzims NcoI/SacI i es va clonar en un pGEM-T prèviament tallat amb els mateixos enzims, donant lloc al plasmidi pGgenFPS1. El plasmidi pGpromFPS2 es va digerir Sall/NcoI. D'altra banda, el plasmidi pGgenFPS1 es va digerir NcoI/SacI i es va dur a terme una lligació triple en un pBluescript KS⁺ digerit prèviament Sall/SacI, donant lloc al plasmidi pBGEN2-1S. Finalment, les regions clonades es van extreure de pBGEN2-1S per digestió amb Sall/SacI i es va clonar en el vector d'expressió pBIB, donant lloc a la construcció pTGEN2-1S.

Tots els plasmidis descrits s'han replicat en la soca DH5 α d'*E. coli* i un cop obtingudes les construccions finals, aquestes s'han introduït en *A. tumefaciens*.

4.3. Transformació d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformació de la soca C₅₈C₁ d'*A. tumefaciens* s'ha dut a terme utilitzant una variant del mètode de transformació de cèl.lules d'*E. coli* per xoc tèrmic descrit per An (1987).

El procediment seguit és el que ve detallat a continuació:

4.3.1. Preparació de cèl.lules competents d'*A. tumefaciens*

1. A partir d'una colònia de la soca C₅₈C₁ (pGV2260) d'*A. tumefaciens*, s'inocula un precultiu de 10 ml de YEP-Rifampicina (100 µg/ml), i s'incuba en agitació constant (180 rpm) a 28°C durant aproximadament 24 h. La rifampicina és l'antibiòtic utilitzat per seleccionar aquesta soca.
2. S'inoculen 50 µl del precultiu en 100 ml de medi YEP-Rifampicina (100 µg/ml) i s'incuba aproximadament 18-20 h en agitació a una temperatura de 28°C fins a assolir una DO₆₀₀=0,5.
3. Es recullen les cèl.lules centrifugant el cultiu 5 min a 3000 rpm a 4°C. A partir d'aquest moment, és important mantenir les cèl.lules en fred durant les manipulacions, i resuspendre-les suaument per evitar lisar-les mecànicament.
4. Es resuspenen les cèl.lules en 10 ml d'una solució de NaCl 0,15 M freda i es centrifuga 5 min a 3000 rpm a 4°C.
5. Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl.lules en 1 ml d'una solució de CaCl₂ 200 mM freda.
6. Finalment, es reparteixen les cèl.lules d'*Agrobacterium* competents en alíquotes de 200 µl (en el cas de no ser utilitzades de forma immediata, les cèl.lules poden guardar-se a -80°C).

4.3.2. Transformació de cèl.lules competents d'*A. tumefaciens*

1. S'afegeix una alíquota de 200 µl d'*A. tumefaciens* competents a 1 µg del DNA plasmídic desitjat (contingut en un volum màxim de 10 µl) i s'incuba en gel durant 30 min.
2. A continuació, s'incuba durant 1 min en nitrogen líquid i després s'atemperen les cèl.lules en un bany a 37°C durant 5 min.
3. S'afegeixen 2 ml de medi YEP, i s'incuba 6 h a 28°C en agitació (180 rpm).
4. Es recullen les cèl.lules centrifugant 5 min a 2000 rpm i es resuspèn suaument el sediment de cèl.lules en 200 µl de medi YEP.

5. Es sembra la suspensió cel·lular en dues plaques de Petri que continguin medi YEP sòlid amb rifampicina (100 µg/ml) i kanamicina (50 µg/ml). La kanamicina seleccionarà les cèl·lules que siguin transformades amb el plasmidi recombinant degut a que conté el gen *NPT II*.
6. Finalment, s'incuba a 28°C. Les colònies comencen a ser visibles a partir d'aproximadament 36 h d'incubació.

Després d'aquest procés és necessari comprovar que les cèl·lules transformades contenen el plasmidi amb el T-DNA recombinant correcte. Per això, s'obté DNA plasmídic de les colònies d'*Agrobacterium* mitjançant una miniprep i s'analitza per digestió amb enzims de restricció. Es fa créixer una colònia en 3 ml de medi YEP-kanamicina (50 µg/ml) a 28°C, es centrifuga per recollir les cèl·lules, s'afegeix 20 µl d'una solució de liozím (20 mg/ml) a les cèl·lules resuspeses i s'incuba 15 min a 37°C. El liozím facilita el trencament de la paret bacteriana de manera que augmenta el rendiment en l'obtenció del DNA plasmídic. Tot i així, en els casos en que el DNA plasmídic obtingut continuï essent baix o bé de baixa qualitat, pot ser necessari retransformar cèl·lules DH5α d'*E. coli* per obtenir el DNA plasmídic necessari per realitzar les comprovacions.

Un cop comprovada la presència del plasmidi d'interès, s'inocula la colònia d'*Agrobacterium* en medi YEP-Rifampicina (100 µg/ml)-Kanamicina (50µg/ml), s'incuba a 28°C, i es conserva una alíquota del cultiu a -80°C en 50% de glicerol (v/v).

4.4. Infiltració de plantes d'*Arabidopsis thaliana*

El procediment seguit per la generació de plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques és l'anomenat *floral dip*, mètode descrit per Clough i Bent (1998). Aquest mètode es basa en aconseguir que l'*A. tumefaciens* transformat infecti les cèl·lules germinals de la planta, a fi que aquestes originin posteriorment llavors portadores del transgèn. Per aconseguir-ho, plantes d'*Arabidopsis* són submergides en una suspensió d'*Agrobacterium* transformat amb la construcció desitjada. És imprescindible que les plantes estiguin sanes en el moment de la infiltració per tal que puguin resistir l'estrès provocat per la infecció i siguin capaces de produir un nombre elevat de llavors. Cal escollir també el moment en el qual les plantes tinguin un gran nombre de botons florals tancats i poques siliques madures, ja que això augmentarà el rendiment de la transformació.

4.4.1. Condicions de creixement de les plantes a infiltrar

1. S'esterilitzen i es sembren les llavors d'Arabidopsis que es desitja transformar tal com s'ha descrit a l'apartat 2.1. de materials i mètodes.
2. Als 15 dies d'haver germinat, es passen les plàntules a testos amb terra i es mantenen en condicions de llum de dia curt (8 h de llum i 16 h de foscor) aproximadament 15 dies.
3. Passat aquest temps, es passen les plantes a condicions de llum de dia llarg (16 h de llum i 8 h de foscor). En aquestes condicions comença a formar-se la tija principal amb el seu brot floral (aproximadament entre 20 i 30 dies). En aquest moment, es talla la tija per la base per anular la dominància apical i, per tant, afavorir la formació de tiges laterals i augmentar el nombre de flors.
4. Aproximadament 10 dies després d'haver tallat la tija principal, la planta haurà desenvolupat diverses tiges laterals i estarà preparada per ésser infiltrada. En el moment d'infiltrar cal que la majoria de botons florals encara estiguin tancats.

4.4.2. Condicions de creixement d'*A. tumefaciens*

1. A partir d'una extensió en medi YEP-Rifampicina (100 µg/ml) - Kanamicina (50µg/ml) de la soca d'*A.tumefaciens* portadora de la construcció d'interès, s'inocula un precultiu de 10 ml de medi YEP-Rifampicina (100 µg/ml) - Kanamicina (50µg/ml)- Carbenicil.lina (100 µg/ml) i s'incuba a 28°C, en agitació (160 rpm) durant 24 h. La kanamicina selecciona el plasmidi portador del T-DNA d'interès, la rifampicina selecciona la soca C₅₈C₁ (pGV2260) d'*A. tumefaciens* i finalment, la carbenicil.lina selecciona el plasmidi anomenat *helper* que conté els gens de virulència de l'*Agrobacterium* que promouen la infecció.
2. S'inoculen 2 ml del precultiu en 500 ml (en un erlenmeyer de 2 litres) de medi YEP-Rifampicina (100 µg/ml) - Kanamicina (50µg/ml).
3. S'incuba el cultiu aproximadament unes 12-16h, a 28°C i en agitació (160 rpm), fins que la seva DO₆₀₀=0.8.
4. Es recullen les cèl.lules del cultiu centrifugant 15 min a 3000 rpm i a 15°C.
5. El sediment cel.lular es resuspèn en 300 ml de solució de sacarosa al 5 % agitant suaument per evitar trencar les cèl.lules mecànicament.

Solució de sacarosa al 5%: 15 g de sacarosa en 300 ml d'aigua mQ. Es prepara extemporàniament i no cal autoclavar-la.

4.4.3. Condicions del procés d'infiltració

1. Es col·loquen els 300 ml de la suspensió d'Agrobacterium en un vas de precipitats, s'afegeixen 90 µl del tensioactiu Silwett L-77 i s'agita suaument.
2. Es col·loquen els testos invertits de tal manera que les tiges es submergeixin en la suspensió d'Agrobacterium i es mantenen submergits 1 minut.
3. Es deixa les plantes infiltrades 2-3 h inclinades sobre paper de filtre en una safata sense llum directa.
4. A continuació, es cultiven les plantes en condicions de dia llarg durant aproximadament 1 mes, temps durant el qual les cèl·lules germinals infectades podran donar lloc a llavors transgèniques madures.

4.4.4. Selecció de plantes transgèniques

Un cop les llavors de les plantes transformades han madurat, aquestes es recullen i es realitza el procés de selecció de plantes transgèniques. Donat que no totes les llavors de les plantes infiltrades hauran incorporat el transgèn, cal seleccionar les llavors que contenen el transgèn d'entre totes les llavors obtingudes. Els vectors pBIB i pCAMBIA contenen en el T-DNA la seqüència del gen que confereix resistència a higromicina (*HPT*) i el vector pBI121 conté en la seva seqüència el gen *NPTII*, que confereix resistència a l'antibiòtic kanamicina. Aquesta característica permet una identificació senzilla de les llavors transgèniques, ja que seran les úniques amb capacitat per créixer en medis selectius en presència d'aquests antibiòtics. El procediment de selecció es el següent:

1. S'esterilitzen les llavors (apartat 2.1.1.) provinents de plantes infiltrades (generació T₀).
2. Es sembren les llavors en medi MS que contingui 50 µg/ml de kanamicina o bé 15 µg/ml d'higromicina, en funció del transgèn que es vulgui seleccionar.
3. S'estratifiquen durant 3 dies per sincronitzar la germinació.
4. Es posen a germinar les llavors sembrades en condicions de dia curt.
5. Als 10-12 dies, s'observa clarament que les plàntules no portadores del transgèn, malgrat que puguin germinar, no desenvolupen més enllà dels dos cotilèdons, mentre que les plàntules transgèniques es desenvolupen amb normalitat.
6. Les plàntules resistents poden passar a ser cultivades en terra. Aquestes plàntules resistents constitueixen la generació T₁.

4.4.5. Selecció de línies homozigòtiques pel transgèn

En el procés de transformació, la planta incorpora el transgèn en una de les dues dotacions cromosòmiques, per tant la generació T_1 és heterozigòtica pel transgèn. En la següent generació (T_2), obtinguda per autofecundació de la generació T_1 , s'obté una descendència heterogènia, ja que tindrem plantes homozigòtiques i heterozigòtiques pel transgèn i plantes *wild type* que no presenten cap còpia del transgèn. En el cas que només hi hagi hagut una integració del T-DNA, aquests tres genotips es trobaran en una proporció $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$, respectivament. Per als nostres estudis ens interessa disposar de línies homozigòtiques, de manera que cal seleccionar-les estudiant la segregació de la resistència a l'antibiòtic, com a manifestació de la segregació del transgèn en la descendència de la generació T_2 . Les plantes que siguin homozigòtiques pel transgèn donaran lloc a una descendència 100% resistent a l'antibiòtic. D'altra banda, les plantes de la generació T_2 que siguin heterozigòtiques donaran una descendència $\frac{3}{4}$ resistent a l'antibiòtic i $\frac{1}{4}$ sensible, i les plantes *wild type*, generaran una descendència 100% sensible a l'antibiòtic.

L'estudi de la segregació del caràcter de resistència a l'antibiòtic també permet tenir una idea del nombre d'integracions del T-DNA en el genoma de la planta, doncs les proporcions abans mencionades serien certes en el cas d'una única integració. En el cas de dues integracions per exemple, la proporció de plantes sensibles a l'antibiòtic en la generació T_2 passaria a ser $\frac{1}{16}$.

5. Generació de plantes dobles mutants per pol.linització creuada

La pol.linització creuada de plantes d'*A. thaliana* permet la incorporació de canvis en el genoma a través de l'obtenció de noves línies que heretaran la meitat de la dotació cromosòmica de les plantes progenitores.

La selecció dels nous caràcters que volem introduir en homozigosi es veurà facilitada si els T-DNA que volem estudiar aporten resistència a antibiòtics diferents. El procediment a seguir és el següent:

1. S'agafen flors a punt d'obrir de la planta que actuarà com a receptora del pol.len i es retiren els estams amb unes pinces per evitar l'autofecundació (es poden treure els pètals, però cal anar en compte de no lesionar el pistil i l'ovari). Aquest procés s'anomena emasculació.
2. Es passen suaument flors obertes amb grans de pol.len madurs de la planta donadora sobre el pistil de la planta receptora (aquest procés es repeteix al dia següent). Cal

indicar amb algun tipus de senyal (fil) la flor creuada i fer-ne un seguiment fins a recollir les llavors obtingudes. Es recomana eliminar la resta de flors del mateix botó floral que no han estat creuades per evitar confusions.

6. Anàlisi fenotípic

6.1. Anàlisi de l'elongació del tub pol.línic

Per dur a terme l'anàlisi de l'elongació dels tubs pol.línics cal disposar de plantes en floració de les diferents línies que es volen estudiar, així com de les corresponents plantes control. El procediment consisteix en dipositar grans de pol.len sobre un medi nutritiu i incubar-los 16 h en unes condicions d'humitat òptimes. El fet de disposar de plantes sanes és imprescindible per l'obtenció de bons resultats.

Medi nutritiu:

Sacarosa	25% (p/v)
Agar	3% (p/v)
CaCl ₂	0.7 mM
MgSO ₄	1 mM
Ca(NO ₃) ₂	2 mM
K ₂ HPO ₄	0.25 mM
K ₂ SO ₄	1 mM
H ₃ BO ₃	8 mM
pH 7.4 amb KOH	

Procediment:

1. Es prepara el medi nutritiu fonent la mescla de tots els components al microones.
2. Ràpidament es reparteix una capa uniforme d'aproximadament 3 mm de medi sobre portaobjectes de vidre (tres portaobjectes per cada línia a analitzar) i es deixa solidificar.
3. D'altra banda, es col.loca al fons de plaques de Petri quadrades de 16x16 cm una capa de paper de filtre mullat amb aigua que servirà per mantenir la humitat i evitar que el medi s'assequi.
4. Amb l'ajut d'una lupa es dipositen aproximadament 100 grans de pol.len provinents de diferents flors d'una mateixa línia sobre cada portaobjectes. Això s'aconsegueix agafant amb unes pinces flors amb anteres dehiscentes i fregant-les suament sobre el medi procurant que els grans de pol.len quedin ben repartits per tota la superfície.
5. Tot seguit es col.loquen aquests portaobjectes dins de plaques de Petri separats del fons amb bastonets de fusta i s'incuba 16 h en fosc i a T^a ambient.

- Finalment, es prenen imatges digitals dels diferents portaobjectes i es calcula la longitud dels tubs pol.línics amb l'ajuda del programa *ImageJ*, que permet fer les mesures traçant la longitud dels tubs sobre les mateixes imatges.

S'han comparat els valors d'elongació dels tubs pol.línics de cada mutant amb els valors de les respectives mostres *wt*. Per a l'anàlisi estadístic s'ha aplicat el test t-Student assumint variàncies iguals entre cada parella de mostres. S'han considerat diferències estadísticament significatives quan el valor de $P \leq 0,05$. Els valors de P associats als resultats d'elongació dels tubs pol.línics mostrats a la Figura 39 són els següents: *fps1-1*, $P=0,00001$; *fps2-1*, $P=0,00000$; *fps1-2*, $P=0,0002$ i *fps2-2*, $P=0,00000$. Els valors de P associats als resultats de la Figura 55 són els següents: *fps1-1*, $P=0,00000$; *fps1Gen1*, $P=0,00008$ i *fps1Gen1-2*, $P=0,00000$.

6.2. Anàlisi de la longitud de l'hipocòtil

Les mesures de la longitud de l'hipocòtil es van realitzar en plàntules de 9 dies cultivades en medi MS a 23°C sota diferents condicions d'il.luminació (dia llarg, dia curt i fosc). Passats els 9 dies, les plàntules es van col·locar entre dues làmines de plàstic per ser escanejades. Es va utilitzar l'escaner *ScanMaker 9800XL (Microtek)*. Les mesures es van realitzar sobre les imatges obtingudes amb l'ajuda del programa *ImageJ*. Els resultats provenen de tres experiments independents amb mesures de 70 plàntules de cada línia en cada experiment i sota cada condició d'il.luminació. S'ha comparat la longitud dels hipocòtils de cada mutant amb la longitud dels hipocòtils de les respectives mostres *wt*. Per a l'anàlisi estadístic s'ha aplicat el test t-Student assumint variàncies iguals entre cada parella de mostres. S'han considerat diferències estadísticament significatives quan el valor de $P \leq 0,05$. Els valors de P associats als resultats de les longituds dels hipocòtils mostrats a la Figura 39 són els següents: *fps1-1* (fosc), $P=0,94$; *fps2-1* (fosc), $P=0,55$; *fps1-2* (fosc), $P=0,00000$ i *fps2-2* (fosc), $P=0,00000$; *fps1-1* (LD), $P=0,68$; *fps2-1* (LD), $P=0,002$; *fps1-2* (LD), $P=0,04$ i *fps2-2* (LD), $P=0,001$; *fps1-1* (SD), $P=0,005$; *fps2-1* (SD), $P=0,00000$; *fps1-2* (SD), $P=0,00000$ i *fps2-2* (SD), $P=0,00000$.

6.3. Anàlisi de la longitud de les arrels

Per mesurar la longitud de les arrels es van fer germinar llavors de les diferents línies en estudi en plaques amb medi MS. Passats 4 dies es van transferir els *seedlings* a plaques

quadrades de 16x16 cm per facilitar un creixement en vertical durant 11 dies. Passat aquest temps, es van col·locar les plàntules entre dues làmines de plàstic per ser escanejades. Es va utilitzar l'escaner *ScanMaker 9800XL (Microtek)*. Les mesures de la longitud de les arrels es van realitzar sobre les imatges obtingudes amb l'ajuda del programa *ImageJ*. Es van realitzar tres experiments independents amb 60 plàntules de cada línia repartides en diferents plaques per a cada condició d'il·luminació assajada (LD i SD).

6.4. Estudi de letalitat en les llavors i de letalitat embrionària

La letalitat de les llavors es va analitzar fent un comptatge de llavors viables (verdes degut al fet que l'embrió ha completat el seu desenvolupament dins la llavor i ha arribat a l'estadi en el qual es distingeixen els cotilèdons verds) i llavors avortades (més petites i amb aspecte marronós donat que l'embrió no ha acabat de desenvolupar-se) a l'interior de silíquies verdes, aproximadament 8 dies després de la floració.

L'estudi de l'estadi de desenvolupament en el qual es produeix la letalitat embrionària es va dur a terme mitjançant l'observació de l'embrió de llavors d'*A. thaliana* en un microscopi DIC (*Differential Interference Contrast*) després de sotmetre les llavors a un procés de clarificació. El procediment següent és el següent:

1. S'introdueixen silíquies verdes en solució de clarificació fent un petit tall a la silíqua per tal de permetre el contacte de la solució de clarificació amb les llavors.
2. S'incuba 16 h a 4°C.
3. S'observen els embrions de les llavors en un microscopi DIC descartant les llavors situades en ambdós extrems de la silíqua per tal d'evitar diferències en l'estat de maduració.

Solució de clarificació:

Hidrat de cloral	100 g
H ₂ O mQ	10 ml
Glicerol	10 ml

6.5. Estudi de la senescència per *detachment*

Els experiments de *detachment* s'utilitzen per accelerar el procés de senescència natural de les fulles. El procés d'incubació de fulles separades de la planta permet detectar i estudiar de forma senzilla l'aparició de senescència prematura. És important que totes les fulles utilitzades

en l'experiment tinguin aproximadament la mateixa edat, ja que la senescència és un procés programat i per tant les fulles més velles entraran abans en senescència. El procediment seguit és el següent:

1. Es tallen de 7 a 10 fulles que estiguin al mateix nivell en la roseta basal provinents de diferents plantes de la mateixa línia.
2. S'incuben en plaques de Petri amb 25ml d'aigua destil·lada. Per uniformitzar les condicions, s'intenta que totes les fulles quedin surant amb el revers de la fulla tocant la superfície de l'aigua. La incubació es porta a terme sota condicions d'il·luminació de dia curt, ja que prèviament s'ha vist que altres règims d'il·luminació provoquen estrès en les fulles i, per tant, la síntesi d'antocianines que pel seu color dificulten l'estudi de la senescència.
3. Es prenen imatges de les plaques a temps zero i cada dos dies per poder observar el progrés de l'aparició de la senescència. S'ha utilitzat una càmera *Nikon Coolpix5000*.

6.6. Estudi de la permeabilitat de les llavors

Les sals de tetrazolium poden ser utilitzades per tal d'estudiar la permeabilitat de les llavors. Quan aquestes sals penetren a l'interior de la llavor són metabolitzades per reductases NADH-dependents del reticle endoplasmàtic donant lloc a formazans colorejats, de manera que, diferències en la coloració de les llavors tenyides poden ser indicatives de diferències en la permeabilitat d'aquestes llavors (Debeaujon *et al.*, 2000).

Aquesta tinció es realitza incubant les llavors 2 hores en una solució aquosa a l'1% (p/v) de clorur de 2,3,5-trifeniltetrazoli, en foscor i a 30°C de temperatura.

7. Tècniques amb àcids nucleics: DNA

7.1. Extracció de DNA genòmic en teixits d'*A. thaliana*

7.1.1. Micropreparació de DNA genòmic en medi bàsic

L'extracció de DNA genòmic de plantes amb NaOH és un mètode ràpid i senzill que pot ser utilitzat quan es necessiten petites quantitats de DNA genòmic per comprovar per exemple, la inserció d'un T-DNA en una línia mutant mitjançant PCR. El procediment és el següent:

1. S'agafen fulles de les plantes de les quals es vol fer l'extracció, es pesen i es col·loquen en tubs d'1,5 ml.
2. S'afegeixen 10 µl de NaOH 0,5 M per cada mg de teixit i es tritura el teixit amb l'ajuda d'un pistil de plàstic.
3. Es centrifuga 5 segons per tal de recollir les restes cel·lulars al fons del tub.
4. S'agafen 20 µl del sobrenedant i es neutralitzen amb 980 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8. L'extracte neutralitzat ja es pot utilitzar com a motlle per a la PCR.

7.1.2. Extracció de DNA pel mètode del CTAB

El mètode utilitzat per a l'extracció de DNA per als experiments de Southern Blot va ser descrit per Murray i Thompson (1980). El protocol seguit es detalla a continuació:

1. Es tritura la mostra en un morter en presència de N₂ líquid fins a obtenir una pólvora molt fina.
2. S'afegeixen 5ml de tampó d'extracció per gram de teixit i es continua molent fins a homogeneïtzar la mostra.

Tampó d'extracció

Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	100 mM
NaCl	250 mM
Proteinasa K	100 µg/ml

3. Es passa la mostra triturada a un tub de vidre Corex 30. Es mesura el volum de la mostra i s'afegeix Sarkosyl 10% (N-Lauroylsarcosine, *Sigma*) fins a una concentració final de l'1%.
4. S'incuba 2h a 55°C.
5. Es centrifuga a 6000 rpm, a 4°C durant 15 minuts. Es recupera el sobrenedant i es repeteix la centrifugació per eliminar les restes vegetals.
6. Es recupera el sobrenedant i s'afegeixen 0,6 V d'isopropanol. S'incuba un mínim de 30 min a -20°C per precipitar l'ADN.
7. Es centrifuga a 4°C i 8000 rpm durant 20 minuts.
8. Es renta el precipitat amb etanol al 70% fred. S'asseca el pellet i es resuspèn en TE pH 7,4 (0,5 ml/ g de teixit inicial). Cal resuspendre l'ADN amb cura i no fer servir vòrtex.

L'ADN obtingut pot estar associat a nombrosos polisacàrids. Per tal d'eliminar-los s'utilitza el detergent no iònic bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB, *Sigma*) que evita que

precipitin de forma conjunta, sempre i quan es treballi a una concentració de sals superior a 0,5 M. Per la qual cosa:

9. S'afegeixen 160 µl de NaCl 5M/ ml de mostra.
10. S'afegeix 1/10 del volum final obtingut al pas anterior amb la solució de CTAB prèviament atemperada a 65°C. A continuació, s'incuba 20 min a 65°C.
11. S'afegeix 1 V de cloroform:isoamílic (24:1, v/v) i s'agita suaument per inversió.
12. Es centrifuga 10 min a 6000 rpm i a T^a ambient.
13. Es recupera el sobrenedant i es torna a repetir 2 vegades el procés des del pas n°10.
14. Es recupera el sobrenedant i es precipita afegint 0,6 V d'isopropanol. Es deixa 30 min-1h a 4°C.
15. Es recupera el precipitat centrifugant 15 min a 8000 rpm a 4°C. Es renta amb etanol al 70% per eliminar les restes de CTAB i sals i s'asseca a l'estufa a 37°C.
16. Finalment, es resuspèn l'ADN en TE pH 7.5 (aprox. 60 µl/g de teixit inicial).
17. Per tal de comprovar l'estat de l'ADN es pot córrer 1 µl en un gel d'agarosa a l'1%. Si apareix contaminació per RNA, es recomana fer un tractament amb RNAses. Normalment, s'obté un rendiment de 10 µg/g de teixit.

7.2. Southern blot genòmic

La tècnica del Southern blot genòmic consisteix en la transferència de fragments de DNA genòmic des d'un gel d'electroforesi a una membrana on són immobilitzats, seguit d'un procés d'hibridació en el qual una sonda marcada podrà reconèixer i hibridar en seqüències similars del DNA analitzat.

7.2.1. Preparació de les sondes *NPTII* i *35S*

Les sondes utilitzades per detectar el nombre d'insercions en les línies transgèniques per sobreexpressió de les proteïnes FPS1S i FPS2 es van dirigir a la regió promotora *35S:CaMV* i al gen de resistència a kanamicina *NPTII*, dues zones que s'haurien inserit amb el T-DNA i per tant només són detectables en el cas de tenir el transgèn.

Les dues sondes es van amplificar per PCR utilitzant com a motlle el plasmidi pBI121 (n° accés: AF485783) per amplificar un fragment de 771 pb del promotor *35S*, i un fragment de 780 pb del gen *NPTII*. En els dos casos es va afegir la diana EcoRI en els encebadors utilitzats

per possibilitar el clonatge de les sondes en el plasmidi pBluescript KS⁺, donant lloc als plamidis pB35S i pBNPT. Els primers utilitzats són els següents:

primer sentit 35SA: 5'-CGGAATTCTGCTAACCCACAGATGG-3'

primer antisentit 35SB: 5'-CGGAATTCGAGGAAGGGTCTTGCG-3'

primer sentit NPTA: 5'-CGGAATTCAAGATGGATTGCACGC-3'

primer antisentit NPTB: 5'-CGGAATTCGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'

El marcatge amb digoxigenina de les sondes es va realitzar amplificant per PCR a partir de pB35S i pBNPT utilitzant una barreja de dNTPs que contenia DIG-11-dUTP (*Roche*).

7.2.2. Preparació de les mostres de DNA genòmic

El DNA genòmic es sotmet a un tractament amb RNasa A per eliminar el RNA que hagi quedat després de l'extracció. Per això, cal incubar el DNA genòmic 1 h a 37°C amb RNasa A.

Després d'aquest tractament i un cop purificat i quantificat, es digereix amb els enzims de restricció adequats que permetin la identificació d'un fragment del T-DNA unit a un fragment de la regió on s'ha inserit el transgèn. En els experiments realitzats, s'ha digerit el DNA genòmic amb HindIII o amb EcoRI.

7.2.3. Electroforesi i tractament del gel

1. Es sembren 20 µg de DNA genòmic digerit amb els enzims de restricció adequats en un gel d'agarosa al 0,8% en TPE i sense bromur d'etidi. S'utilitza un portagels de 15x15 cm.
2. Es separen els fragments de DNA per electroforesi aplicant un voltatge de 20 V durant 18 h.
3. Es tenyeix el gel amb bromur d'etidi i es fa una fotografia del gel en el transiluminador amb un regle al costat per tal de conèixer la posició dels diferents fragments de DNA del marcador.
4. Es realitza un procés de desnaturalització del DNA a l'interior del gel rentant 2 vegades el gel durant 20 min amb una solució de 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.
5. A continuació es neutralitza el gel amb 2 rentats de 20 min amb una solució de 0,5 M Tris-HCl pH 7.55, 3M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0. Es recomana que el gel quedi a un pH<9.

7.2.4. Transferència del DNA

Tot seguit es transfereix el DNA a una membrana de Nylon carregada positivament (*Roche*). La transferència es prepara de la forma indicada en la Figura 58 tenint en compte que cal mullar la membrana en tampó SSC 2X (*Sigma*) i equilibrar-la en SSC 20X abans de fer el muntatge. Es deixa transferint unes 16 h. Al desfer el muntatge es renta la membrana amb SSC 2X.

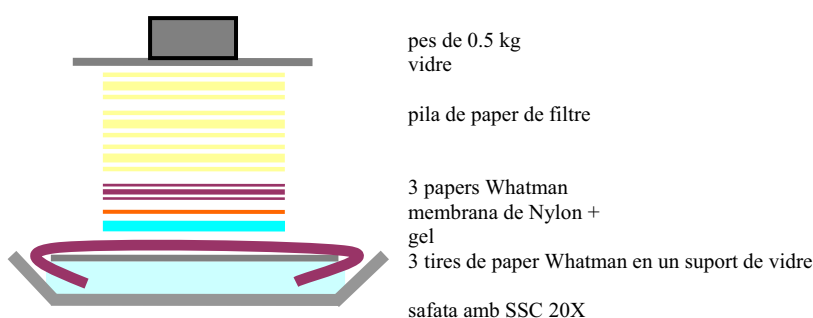


Figura 58: Esquema del muntatge de la transferència del DNA genòmic a la membrana de Nylon carregada positivament (*Roche*).

7.2.5. Fixació del DNA a la membrana

L'alta concentració salina del tampó de transferència fa que el DNA quedi unit a la membrana però no immobilitzat de forma permanent. La fixació permanent del DNA a la membrana es realitza després de la transferència, assecant la membrana 30 min en una estufa a 80°C i a continuació, mitjançant la irradiació amb llum UV en el *UV Crosslinker* (*Spectrolinker, Spectronics Corporation*).

7.2.6. Pre-hibridació, hibridació i rentats

Els passos de pre-hibridació, hibridació amb la sonda i rentats es duen a terme amb la membrana dins d'un tub a l'interior d'un forn d'hibridació.

1. S'equilibra la membrana en SSC 2X durant 3 min.
2. Es pre-hibrida la membrana a 37°C durant 3 h amb solució *DIG Easy Hyb* (*Roche*).
3. S'hibrida 16 h a 37°C amb 15 ml de solució d'hibridació:

<i>DIG Easy Hyb</i>	15 ml
sonda marcada amb digoxigenina*	12 ng/ml

*Cal desnaturalitzar la sonda a 100°C durant 10 min abans d'afegir-la a la solució d'hibridació. La solució *DIG Easy Hyb* conté formamida i no pot ésser escalfada a temperatures superiors a 68°C.

4. Es fan 2 rentats de 8 min a T^a ambient amb SSC 2X, SDS 0,1%.
5. Es fa un rentat de 20 min a T^a ambient amb SSC 0,5X, SDS 0,1%.
6. Es fa un rentat de 25 min a 68°C amb SSC 0,5X, SDS 0,1%.

7.2.7. Immunodetecció quimioluminescent

Aquest procés consta bàsicament de tres parts, en primer lloc es bloqueja la membrana per evitar interaccions inespecífiques de l'anticòs amb la membrana. A continuació, s'incuba amb un anticòs Anti-Digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina. Finalment, es fa reaccionar amb un substrat que donarà un producte quimioluminiscent i s'exposa a una pel·lícula d'autoradiografia que enregistra el senyal luminescent. El protocol seguit és el detallat a continuació:

1. S'equilibra la membrana 1 min en tampó de rentat.
2. Es bloqueja la membrana incubant 1 h en solució de bloqueig.
3. S'incuba 30 min en una solució d'anticòs 1:20.000 Anti-Digoxigenina-AP (*Roche*) preparada en solució de bloqueig. Per tal d'evitar agregats d'anticòsos que poden donar soroll de fons, és recomanable centrifugar 1 min l'anticòs abans de preparar la dilució.
4. Es fan 2 rentats de 15 min en solució de rentat.
5. S'equilibra la membrana 2 min en tampó de detecció.
6. Es prepara un volum de 500 µl d'una dilució 1:300 de substrat CDP-Star™ (*Roche*) en tampó de detecció.
7. Es col·loca la membrana entre dues làmines de plàstic transparent, s'afegeix el reactiu sobre la membrana i s'incuba 5 min, eliminant l'excés de reactiu amb l'ajut d'un paper secant, de manera que ens quedi una pel·lícula de reactiu entre la membrana i el plàstic.
8. Es contacta la membrana amb una pel·lícula d'autoradiografia. El temps d'exposició de la pel·lícula pot ser variable, tot i que en els experiments realitzats va ser de 3 hores.
9. La incubació amb el substrat CDP-Star™ i el revelat es duen a terme en una cambra fosca.

Les solucions necessàries són les següents:

<u>Tampó de rentat</u>		<u>Tampó de detecció</u>	
Àcid maleic	100 mM	Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM	NaCl	100 mM
Tween 20	0,3% (v/v)	ajustar a pH 9.5	
ajustar a pH 7.5			

Solució de bloqueig

Es prepara una solució de *Blocking reagent* (Roche) a l'1% (p/v) en una solució d'àcid maleic 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM.

8. Tècniques amb àcids nucleics: RNA

8.1. Extracció de RNA en teixits d'*A. thaliana*

En funció de l'experiment i el tipus de mostra, s'han utilitzat tres mètodes diferents per l'obtenció del RNA:

- Mètode comercial *RNeasy[®] Plant Mini Kit* de Qiagen
- Mètode del TRIzol
- Mètode del LiCl per a l'extracció de RNA en llavors

En tots els casos les mostres utilitzades s'han congelat en N₂ líquid immediatament després de la seva recol·lecció. Un cop congelades, s'han guardat a -80 °C fins al moment de l'extracció.

Sempre que es treballa amb RNA s'ha d'evitar la presència de RNAses, enzims molt estables i relativament abundants que podrien degradar les mostres. Per aquest motiu s'han pres mesures com: utilitzar guants en totes les manipulacions, autoclavar dues vegades el material de plàstic fungible, deixar tot el material de vidre, metall o porcellana a 200 °C durant una nit, i tractar les solucions amb dietilpirocarbonat (DEPC), un reactiu que modifica els residus d'His i Tyr de les proteïnes inactivant-les inespecíficament.

8.1.1. Extracció de RNA pel mètode comercial *RNeasy[®] Plant Mini Kit* de Qiagen

Aquest mètode, basat en l'adherència del RNA a columnes de sílica gel, permet l'obtenció de petites quantitats de RNA d'una forma senzilla i ràpida. S'ha seguit el protocol detallat en les instruccions del fabricant.

8.1.2. Extracció de RNA pel mètode del TRIzol

Aquest mètode utilitza el reactiu TRIzol (*Invitrogen*) per a l'extracció de l'ARN total. El procediment següent és el següent:

1. El teixit recollit (aproximadament 100-120 mg) s'homogeneïtza en N₂ líquid utilitzant un pistil de plàstic (dins del mateix tub).
2. S'afegeix 1 ml de TRIzol i s'incuben les mostres a T^a ambient durant 5 min per tal de permetre la completa dissociació dels complexos de nucleoproteïnes.
3. S'afegeixen 0.2 ml de cloroform i s'agita enèrgicament durant 15 segons. A continuació s'incuba 3 min a T^a ambient.
4. Es centrifuga 15 min a 12.000 x g, a 4°C per permetre la separació de fases. En aquest punt s'observa una fase superior aquosa incolora que conté el RNA, una interfase de color blanc, i una fase inferior orgànica de color rosat on queden el DNA i les proteïnes.
5. Es transfereix el sobrenedant (fase aquosa) a un nou tub de 1.5 ml i s'afegeixen 0.5 ml d'isopropanol per precipitar el RNA. Es barreja i s'incuba 10 min a T^a ambient.
6. Es centrifuga 10 min a 12.000 x g, a 4°C. El RNA precipitat forma un precipitat d'aspecte gelatinós.
7. S'elimina el sobrenedant i es renta el precipitat amb 1 ml d'etanol 75% (v/v) (preparat amb aigua tractada amb DEPC)
8. Es centrifuga 5 min a 7.500 x g, a 4°C
9. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecar el precipitat a T^a ambient durant 5-10 min. S'observa que el precipitat inicialment de color blanc es torna transparent. No s'ha de deixar assecar excessivament perquè això pot dificultar la resuspensió.
10. Es resuspèn el precipitat en 100 µl d'aigua DEPC amb l'ajut d'una pipeta.
11. S'incuba 10 min a 60°C per dissoldre completament el RNA.
12. Es purifica utilitzant les columnes RNeasy (*Qiagen*).

8.1.3. Extracció de RNA de llavors d'*Arabidopsis* pel mètode del LiCl

L'extracció de RNA a partir de llavors presenta una sèrie de dificultats degut al fet que el material de partida té un alt contingut en lípids i proteïnes de reserva, i en metabolits secundaris com per exemple mucíl·lags i compostos fenòlics. A més a més, la mida tan petita de les llavors d'*Arabidopsis* resulta un factor limitant pel que fa a la quantitat de material de partida (Vicent i Delseny, 1999). Tots aquests factors dificulten la purificació del RNA i fa que tant els mètodes comercials disponibles com el mètode del TRIzol per l'extracció de RNA no resultin eficaços.

El mètode utilitzat en aquesta tesi per l'extracció de RNA de llavors és el descrit per Viciant i Delseny (1999) i es basa en l'ús de LiCl per a l'extracció del RNA, seguit de diferents extraccions fenòliques. El procediment seguit és el que ve detallat a continuació:

1. S'homogeneïtzen les llavors amb l'ajuda d'un morter en presència de N₂ líquid. En el cas de tractar-se de llavors germinades, es sembren 50-100 mg de llavors sobre discs de paper de filtre (que ens serviran per facilitar-ne la recol·lecció) en plaques de medi MS. S'estratifiquen 3 dies a 4°C i en foscor i finalment es deixen 24h en una cambra a 23°C per tal d'induir la germinació.
2. Es reparteix la pols triturada en 2 tubs de 2 ml i s'hi afegeix 1 ml de tampó d'extracció (8 M LiCl, 2% β-mercaptoetanol) prèviament refredat a -20°C.
3. S'agita fins que quedi la mostra totalment resuspensa i s'incuba tota la nit a 4°C en agitació suau.
4. Es centrifuga 4 segons a velocitat màx. i es transfereix el sobrenedant a un nou tub de 2 ml. Aquest pas ens permet eliminar les restes cel·lulars.
5. Es torna a centrifugar el sobrenedant a 13.000 rpm durant 30 min a 4°C.
6. S'elimina el sobrenedant, es renta el precipitat amb etanol al 70% fred i es deixa assecar breument.
7. Es dissol el precipitat en 0,5 ml de tampó de solubilització (0,5 % SDS, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% β-mercaptoetanol).
8. Es realitzen dues extraccions amb 1 volum de fenol equilibrat a pH 7.6, una extracció amb una mescla de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1), i una extracció amb un volum de cloroform: alcohol isoamílic (24:1). En totes les extraccions es barreja la fase aquosa i la fase orgànica agitant manualment i es centrifuga a 4°C i a 13.000 rpm durant 15 minuts.
9. S'afegeix a la fase aquosa extreta 0,1 V d'acetat sòdic 3 M i 1,5 V d'etanol absolut fred i es deixen les mostres a -20°C tota la nit.
10. Es centrifuguen els tubs a 4°C i 13.000 rpm durant 30 minuts.
11. S'elimina el sobrenedant i s'afegeixen al pellet 0,25 ml d'acetat sòdic 3 M. El precipitat s'agita fortament amb un vòrtex durant 1 minut i a continuació es centrifuga 10 minuts a 4°C i a 13.000 rpm.
12. El precipitat es renta amb etanol al 70%, i es dissol en 50-100 µl d'aigua DEPC.

8.1.4. Quantificació i comprovació de la qualitat del RNA obtingut

La quantificació es realitza mitjançant un anàlisi espectrofotomètric, utilitzant la convenció que 1 unitat d'absorbància a 260 nm equival a 40 µg/ml de RNA.

Cal mesurar l'absorbància a 260 nm i a 280 nm per determinar tant la quantitat com la puresa de les mostres. La relació A260/A280 ha de ser propera a 2 (s'accepten valors entre 1.8 i 2.1), ja que valors per sota de 1.8 indiquen una possible contaminació proteica i valors superiors a 2.1 podrien indicar la presència de RNA degradat, cRNA truncat i/o nucleòtids lliures.

La qualitat de l'ARN es comprova separant 0,5-1 µl de RNA en un gel d'agarosa a l'1 % en presència de bromur d'etidi. S'han de veure dues bandes majoritàries corresponents als 18S i 28S RNAs.

8.2. RT-PCR

Aquesta tècnica combina la capacitat de l'enzim Transcriptasa Reversa (RT) de sintetitzar una cadena de DNA a partir d'un motlle de RNA, amb la capacitat de l'enzim DNA Taq polimerasa d'amplificar seqüències nucleotídiques específiques de DNA mitjançant la reacció de PCR.

El RNA utilitzat per aquests experiments s'ha obtingut mitjançant el kit *RNeasy® Plant Mini* (Qiagen). Abans de la seva utilització, s'han tractat els RNAs amb la RQ1 DNAsa (Promega) per eliminar possibles contaminacions amb DNA genòmic. Un cop quantificat i comprovada la qualitat de les mostres de RNA, s'ha realitzat la síntesi de cDNA per retrotranscripció (RT) seguint el protocol detallat a continuació:

1. Es col·loca en un tub de 0,2 µl:

RNA tractat amb DNAsa	1 µg
oligodT (100 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
H ₂ O DEPC q.s.p.	13 µl

2. S'escalfa 5 min a 65°C.

3. Mantenint les mostres en gel s'afegeixen:

<i>SuperScript buffer 5X</i>	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNAsin (<i>Promega</i>)	1 µl

4. S'escalfa 2 min a 42°C i s'afegeix 1 µl de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*).

5. S'incuba 50 min a 42°C.
6. Finalment s'incuba 15 min a 70°C.

Per a la reacció de PCR s'ha utilitzat el kit *Pure Taq Ready-to-go PCR Beads* (Amersham), uns tubs que contenen una mescla liofilitzada dels components necessaris per a la reacció. A cada tub únicament cal afegir:

H ₂ O mQ	21 µl
primer sentit (10 µM)*	1 µl
primer antisentit (10 µM)*	1 µl
cDNA motlle	2 µl

Les seqüències dels primers utilitzats per detectar l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* són les següents:

FPS1fwd: 5'-GGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCGTATCCAA-3'

FPS1rev: 5'-GGAAATTTTTGAGGGCTGAGACTTATGTTTGTC-3'

FPS2fwd: 5'-GGCTTTGCACACCTTCCTTG-3'

FPS2rev: 5'-CGGAGAGAGGCCCGAGTATG-3'

A partir de la parella de primers FPS1fwd/FPS1rev s'obté un amplicó de 1110 pb corresponent a FPS1 i a partir de la parella FPS2fwd/FPS2rev, l'amplicó resultant és de 1083 pb corresponent a FPS2.

Les reaccions de PCR s'han dut a terme en l'aparell termociclador *Minicycler* (MJ Research) i les condicions d'amplificació utilitzades han estat les següents:

1. Desnaturalització 5 min/94°C
2. Desnaturalització 30 seg/94°C
3. Anellament 40 seg/60°C
4. Extensió 2min/72°C
5. 34 cicles a partir del pas 2
6. Extensió final 10 min/72°C

8.3. Real-time PCR

La tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa a temps real (Real-time PCR) presenta una sèrie d'avantatges respecte la PCR tradicional, ja que permet una monitorització de tot el procés. En la PCR a temps real, les reaccions es caracteritzen pel cicle en el qual

l'amplificació comença a ser detectada en lloc de per la quantitat d'amplicó acumulat després d'un nombre determinat de cicles. De manera que, quan més gran sigui el nombre inicial de còpies de la seqüència que es vol detectar, més aviat s'observarà un increment significatiu en la fluorescència de l'agent reporter. Es disposa de diferents sistemes de detecció, però en els experiments realitzats en aquesta tesi, s'ha utilitzat el SYBR[®] Green I (*Applied Biosystems*). El SYBR[®] Green es caracteritza pel fet que s'uneix al solc menor de l'ADN de doble cadena i emet fluorescència. Permet la detecció de qualsevol ADN de doble cadena i no necessita cap sonda específica, fet que redueix les despeses en comparació amb altres sistemes de detecció.

En el disseny dels primers s'ha de tenir en compte una sèrie de requeriments específics a més a més dels habituals, com per exemple que la T_m estigui entre 58-60°C, que hi hagi un màxim de 2 G+C en les 5 últimes posicions a l'extrem 3' i que la longitud del fragment amplificat oscil·li entre 80-120 pb (a ser possible amb un intró al mig).

Per detectar l'abundància dels missatgers les isoformes de la HMGR (HMGR1S, HMGR1L i HMGR2) es van dissenyar uns primers degenerats dirigits per hibridar en una zona que codifica pel domini catalític dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*A. thaliana*. La longitud de l'amplicó generat era de 109 pb.

primer sentit CDF: 5'-TGT AGT ACT GGT GAT GCT AT-3'

primer antisentit CDR: 5'-CAG AGA TKC CAA TMA CAT CCA-3'

L'abundància dels transcrits de la HMGR es va normalitzar en relació als nivells d'expressió de la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH, At3g26650). En aquest cas, la longitud de l'amplicó generat era de 101 pb.

primer sentit GAPDH forw: 5'-CTC CCT TGG AAG GAG CTA GG-3'

primer antisentit GAPDH rev: 5'-TTC TTG GCA CCA GCT TCA AT-3'

L'obtenció del RNA utilitzat per aquests experiments s'ha realitzat mitjançant el kit *RNeasy[®] Plant Mini* (*Qiagen*) en el cas de plàntules i amb el mètode del LiCl en el cas de fer l'extracció a partir de llavors d'*A. thaliana*. Un cop quantificat i comprovada la qualitat de les mostres, s'han tractat els RNAs amb la RQ1 DNAsa (*Promega*).

La síntesi de cDNA per retrotranscripció (RT) de les mostres de RNA s'ha realitzat seguint el mateix protocol detallat a l'apartat 8.2., però partint únicament de 500 ng de RNA tractat amb DNAsa.

La reacció de PCR a temps real es prepara de forma similar a una PCR convencional però fent servir uns tubs especials que permeten la lectura de la fluorescència emesa (*Optical*

tubs, Optical caps; Applied Biosystems), i la SYBR[®] Green Mix (Applied Biosystems) que conté: tampó, MgCl₂, dNTPs, DNA polimerasa *AmpliTaq*, SYBR Green i ROX (el ROX és una referència interna que serveix per corregir fluctuacions en la fluorescència degudes a canvis en la concentració o el volum de les mostres).

Cada tub de reacció conté:

cDNA*	2 µl
primer sentit (10 µM)	1 µl
primer antisentit (10 µM)	1 µl
H ₂ O	8,5 µl
SYBR [®] Green Mix	12,5 µl

*Prèviament s'ha d'ajustar la dilució adequada de cDNA. Quan les mostres provenien de RNA de plàntules, s'han utilitzat dilucions 1:10 i en el cas de RNA de llavors la dilució ha estat 1:5.

Les reaccions s'han dut a terme en l'aparell de PCR *ABI PRISM 7700[®] Sequence Detection System* (Applied Biosystems) i les condicions d'amplificació utilitzades han estat les següents:

- 2 min 50°C
- 10 min 95°C, activació de la polimerasa *AmpliTaq*
- 40 cicles: 15 segons 95°C, desnaturalització
1 min 60°C, anellament i extensió

La quantificació relativa s'ha dut a terme pel **mètode del $\Delta\Delta Ct$** . Aquest mètode utilitza la fórmula aritmètica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per determinar la quantitat de transcrit d'un gen determinat normalitzat per l'expressió d'un control intern i referit a una mostra control o no tractada. **Ct** es defineix com el cicle en el qual la fluorescència generada supera un valor llindar.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{control intern}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mostra problema}} - \Delta Ct_{\text{mostra control}}$$

$$\text{Quantificació relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

8.4. Anàlisi de perfils d'expressió gènica mitjançant micromatrius d'ADN

L'anàlisi dels patrons globals d'expressió gènica de les diferents línies mutants d'*Arabidopsis* amb pèrdua o guany de funció disponibles es va realitzar durant dues estades al grup del Professor Wilhelm Gruissem a l'Institute of Plant Sciences del Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich (Suïssa).

L'anàlisi es va dur a terme mitjançant les micromatrius d'ADN *GeneChip*[®] *Arabidopsis ATH1 Genome Array* (Affymetrix). En aquests *GeneChips* els oligonucleòtids es sintetitzen de forma específica sobre la micromatriu i cadascun es localitza en una àrea específica dins de la micromatriu denominada *probe cell* (que pot contenir milions de còpies d'un determinat oligonucleòtid). Per a la detecció de cada transcrit es disposa d'un *probe set* que consta d'11 oligonucleòtids específics diferents (d'una longitud de 25 bases) complementaris a la seqüència de referència (*Perfect Match*). Les matrius incorporen també oligonucleòtids amb les mateixes seqüències però amb un canvi en la base que es troba en la posició central (*Perfect Mismatch*) per tal de controlar les hibridacions inespecífiques.

L'anàlisi de l'expressió consisteix en la hibridació de les matrius amb fragments de cRNA biotinitats, obtinguts a partir de l'ARN de les mostres. Un cop hibridades, les micromatrius es tenyeixen amb un conjugat d'estreptavidina-ficoeritrina, i finalment, s'escanegen tenint en compte que la quantitat de llum emesa a 570 nm és proporcional a la quantitat de cRNA hibridat a cada cel.la de la micromatriu.

8.4.1. Condicions de creixement de les plantes i recolecció de les mostres

Les condicions de creixement i recol.lecció de les plantes a analitzar són unes condicions que havien estat prèviament estandaritzades pel grup del Professor Wilhelm Gruissem a l'ETH.

Les llavors es van sembrar en plaques de Petri que contenien medi MS (sense sacarosa ni vitamines). Les plaques es van estratificar a 4°C en foscor durant 2,5 dies. Les plàntules van ser crescudes durant 7 dies en una cambra de creixement a 23°C, il.luminades amb llum blanca (150 µE/m²) sota un fotoperíode de 12h llum/12h foscor.

Les mostres van ser recollides just després d'haver començat la fase lluminosa. Es van recollir les plàntules senceres, es van congelar en nitrogen líquid i guardar a -80°C. Es van processar mostres de dos experiments independents, en cada experiment es va obtenir RNA de

plàntules crescudes en 3 plaques (50 plàntules per placa). L'obtenció del RNA es va dur a terme amb el mètode del TRIzol (descriu a l'apartat 8.1.2. de materials i mètodes).

8.4.2. Síntesi de cDNA a partir de RNA total

Un cop quantificat el RNA i comprovada la seva qualitat, es va continuar amb la síntesi del cDNA. En aquest procés s'han utilitzat els kits *One-Cycle cDNA Synthesis Kit* i *IVT Labeling Kit* subministrats per *Affymetrix*. Totes les incubacions s'han dut a terme en un aparell termociclador.

La síntesi de cDNA es realitza a través de dues reaccions. En primer lloc, l'ARN total es retrotranscriu fent servir el *T7-oligo(dT) Promoter Primer* per sintetitzar la primera cadena de cDNA i a continuació es sintetitza la segona cadena de cDNA.

Seqüència de l'oligonucleòtid *T7-oligo(dT) Promoter Primer*:

5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(dT)₂₄-3'

Síntesi de la primera cadena de cDNA

1. Es parteix de 15 µg de RNA total en un tub de PCR de 0.2 ml.
2. S'afegeixen 2 µl de *T7-oligo(dT) Promoter Primer* (50 µM).
3. Es completa fins a un volum final d'11 µl amb H₂O lliure de RNases (tractada amb DEPC).
4. Es mescla i centrifuga breument (5 seg) per recollir tot el volum al fons del tub i s'incuba 10 min a 70°C.
5. A continuació, es refreda la mostra 2 min a 4°C.
6. En un altre tub es prepara la *First-Strand Master mix* que es compon de:

5X First Strand reaction mix	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl
dNTP 10 mM	1 µl

7. S'afegeixen 7 µl de *First-Strand Master mix* a cada tub i s'incuba 2 min a 42°C.
8. S'afegeixen 2 µl de *SuperScript II* i s'incuba 1h a 42°C.
9. Tot seguit es refreda a 4°C. El fet de refredar les mostres resulta imprescindible, doncs el fet d'afegir la *Second-Strand Master mix* a solucions que estan a 42°C podria comprometre l'activitat enzimàtica.

Síntesi de la segona cadena de cDNA

1. En un altre tub, es prepara la *Second-Strand Master mix*:

H ₂ O DEPC	91 µl
5X 2nd Strand Reaction mix	30 µl
dNTP 10 mM	3 µl
<i>E. coli</i> DNA lligasa	1 µl
<i>E. coli</i> DNA polimerasa I	4 µl
RNasa H	1 µl

2. S'afegeixen 130 µl de Second-Strand Master mix a cada mostra i s'incuba 2 h a 16°C.
3. S'afegeixen 2 µl de T4 DNA Polimerasa i s'incuba 5 min a 16°C.
4. Finalment s'afegeixen 10 µl d'EDTA 0.5 M per aturar la reacció.

8.4.3. Purificació del cDNA

Per a la purificació del cDNA s'utilitzen els tubs *Phase Lock Gel* (Eppendorf). Aquests tubs contenen un gel que permet la perfecta separació entre la fase aquosa i el fenol-cloroform ja que se situa entre ambdues fases.

1. Es transfereixen les mostres de cDNA a nous tubs eppendorf de 1.5 ml i s'afegeix el mateix volum (162 µl) d'una mescla de fenol:cloroform:isoamílic (25:24:1) saturat amb Tris-HCl 10mM, pH 8.0.
2. S'agita enèrgicament les mostres amb el vòrtex.
3. Es centrifuga els tubs de *Phase Lock Gel* a velocitat màx per recollir el contingut al fons del tub.
4. Es transfereix la barreja amb la mostra als tubs que contenen el *Phase Lock Gel*.
5. Es centrifuga 2 min a 14.000 rpm.
6. Es transfereix la fase aquosa (162 µl) a un nou tub de 1.5 ml.
7. Es precipita amb 2.5 volums (405 µl) d'EtOH absolut (-20°C), 0.5 V (81 µl) d'acetat amònic 7.5 M i 1 µl de *Glycogen blue* (Ambion). S'agita amb el vòrtex.
8. Es centrifuga 10 min a T^a ambient i es renta el pellet amb 0.5 ml d'EtOH 80% fred.
9. Es centrifuga 5 min a T^a ambient i es repeteix el rentat amb etanol.
10. Es deixa assecar el pellet i un cop sec, es guarda a -20°C.

8.4.4. Síntesi del cRNA marcat amb biotina

La doble cadena de cDNA purificada s'utilitza com a motlle en la reacció de Transcripció *In Vitro* (IVT). Aquesta reacció es duu a terme en presència de la T7 RNA polimerasa i d'una barreja d'anàlegs de nucleòtids i ribonucleòtids biotinilats per l'amplificació del RNA complementari (cRNA) i el seu marcatge amb biotina. Les mostres de cRNA biotinilades són purificades, fragmentades i hibridades sobre les micromatrius *GeneChip*[®] *Arabidopsis ATH1 Genome Array*. El procés per la transcripció *in vitro* detallat a continuació no pot ser preparat en fred ja que l'espermidina continguda en el *Labeling Buffer* podria fer precipitar el cDNA.

1. Es resuspèn el cDNA en 12 µl d'aigua DEPC.
2. Es transfereixen 6 µl del cDNA (volum recomanat quan el material de partida són 15 µg de RNA total) a un nou tub de 0.2 ml.
3. Es prepara una barreja que contingui per a cada tub:

H ₂ O DEPC	14 µl
10X IVT Labeling Buffer	4 µl
IVT Labeling NTP Mix	12 µl
4. S'afegeixen 30 µl d'aquesta barreja al cDNA motlle.
5. A continuació, s'afegeixen 4 µl de IVT *Labeling Enzyme Mix* i s'incuba a 37°C durant 16h. Després d'aquest punt, es recomana continuar immediatament amb la purificació o guardar el cRNA marcat a -20°C o -70°C.

8.4.5. Purificació del cRNA biotinilat

Per a la purificació del cRNA biotinilat s'utilitzen les columnes RNeasy (*Qiagen*) amb alguna variació en relació al protocol donat pel fabricant:

1. S'afegeixen 60 µl d'aigua DEPC per tal d'ajustar el volum de la mostra a 100 µl.
2. S'afegeixen 350 µl del tampó RLT (*Qiagen*) i es mescla.
3. S'afegeixen 250 µl d'EtOH absolut (T^a ambient) i es mescla amb l'ajut de la pipeta.
4. Es transfereix la mostra (700 µl) a una columna RNeasy col·locada en un tub recol·lector i es centrifuga 15 seg a velocitat màx.
5. Es recull el volum del tub col·lector i es torna a passar per la columna centrifugant 15 segons (fent passar la mostra dues vegades per la columna augmenta el rendiment de la purificació).

6. Es transfereix la columna a un nou tub col·lector de 2 ml, s'afegeixen 500 µl de tampó RPE (*Qiagen*) i es centrifuga 15 seg a velocitat màx.
7. Es descarta el líquid eluït, s'afegeixen 500 µl més de tampó RPE a la columna i es centrifuga 2 min a velocitat màx.
8. Es transfereix la columna a un nou tub de 1.5 ml. S'afegeixen 30 µl d'aigua lliure de RNases sobre la membrana de la columna i s'espera 1 min abans d'eluir el producte de Transcripció *In Vitro* centrifugant a velocitat màx durant 1 min.
9. Es repeteix el pas 8 amb 20 µl d'aigua i es recull l'eluït en el mateix tub ($V_f = 50 \mu\text{l}$).

8.4.6. *Quantificació i comprovació de la qualitat del cRNA biotinitat*

La quantificació de cRNA biotinitat es realitza mitjançant anàlisi espectrofotomètric (DO a 260/280) utilitzant una dilució 1/100 de l'eluït. Es comprova la qualitat de l'1% dels transcrits biotinitats (0.5 µl) en un gel d'agarosa a l'1%.

8.4.7. *Càlcul de la quantitat ajustada de cRNA*

Quan s'utilitza RNA total com a material de partida, cal calcular la quantitat ajustada de cRNA per corregir el RNA sense marcar que tenim a la mostra. La quantitat de cRNA ajustada és la que s'ha d'utilitzar per calcular la quantitat necessària per els següents passos de fragmentació i hibridació. La fórmula utilitzada és la següent:

$$\text{Quantitat de cRNA ajustat} = \text{RNA}_{\text{m}} - (\text{RNA}_{\text{i}} \cdot y)$$

RNA_m: quantitat de cRNA mesurat després de la reacció de transcripció *in vitro* IVT (µg)

RNA_i: quantitat inicial de RNA total (µg)

y: fracció de cDNA utilitzat per la reacció de la IVT (a l'haver-ne utilitzat un 50%, $y = 0.5$)

8.4.8. *Fragmentació del cRNA marcat amb biotina*

La fragmentació del cRNA biotinitat prèvia a la hibridació és necessària per obtenir una millor sensibilitat en l'assaig. En aquest pas, hi ha una hidròlisi del cRNA que dona lloc a fragments de 35-100 pb. Seguint les recomanacions d'*Affymetrix*, cal utilitzar 15 µg de cRNA biotinitat fragmentat quan s'hibriden micromatrius de format estàndard. El cRNA s'incuba 35

min a 95°C i es manté en gel després de la incubació fins al moment de ser utilitzat en la hibridació.

cRNA biotinitat	16 µg	<u>Tampó de fragmentació 5X</u>	
5X tampó de fragmentació	8 µl	Tris-acetat pH 8.1	200mM
H ₂ O DEPC q.s.p.	40 µl	Acetat potàssic	500 mM
		Acetat magnèsic	150 mM
		Filtrar amb un filtre de 0.2 µm	

8.4.9. Hibridació

El cRNA biotinitat fragmentat es barreja amb albúmina sèrica bovina (BSA), DNA d'esperma de salmó, tampó d'hibridació i una barreja de controls de la hibridació. A continuació, aquesta barreja s'aplica sobre les micromatrius pretractades on els transcrits marcats hibridaran a 45°C durant 16 hores.

Les micromatrius utilitzades són els anomenats *GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array* d'Affymetrix que contenen més de 22.000 sets d'oligonucleòtids cobrint la majoria de cDNAs identificats en *Arabidopsis thaliana*. Aquests xips es fabriquen sintetitzant els oligos *in situ* sobre un matriu sòlida mitjançant fotolitografia.

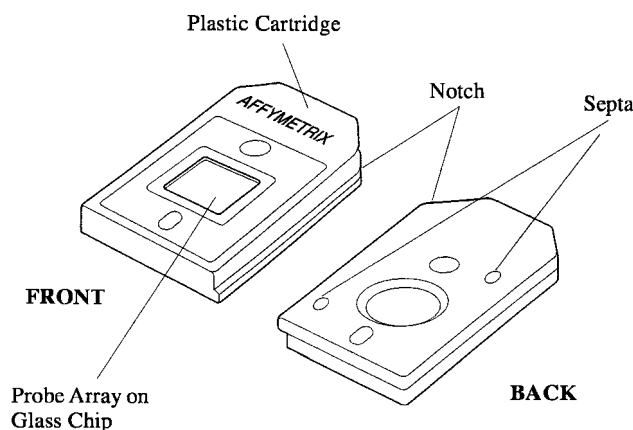


Figura 59: Esquema d'una micromatriu *GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array* (Affymetrix)

Abans d'iniciar el procés d'hibridació, és necessari fer el següent tractament de les micromatrius:

1. S'equilibra la micromatriu a T^a ambient (les micromatrius han d'estar emmagatzemades a 4°C).
2. Es pre-hibrida la micromatriu amb tampó d'hibridació. S'insereix una punta de pipeta en el *septum* inferior per permetre la sortida de l'aire que hi ha a la cambra continguda a

l'interior de la micromatriu. S'afegeixen 200 µl de tampó d'hibridació a través del *septum* superior i s'incuba un mínim de 10 min a 45°C amb una rotació de 60 rpm en un forn d'hibridació.

Tampó d'hibridació

MES	100 mM	Cal filtrar el tampó d'hibridació amb un filtre de 0.2 µm i guardar-lo a 4°C protegit de la llum.
[Na ⁺]	1 M	
EDTA	20 mM	
Tween-20	0.01%	

Just abans del procés d'hibridació es preparen les mostres de la següent manera:

1. Es barregen els següents components en un tub de 1,5 ml:

16 µg de cRNA biotinitat fragmentat	40 µl
20X Eukaryotic Hybridization control mix*	15 µl
Oligonucleòtid control B2 3 nM**	5 µl
DNA d'esperma de salmó (10 mg/ml)	3 µl
BSA acetilada (20 mg/ml)	7 µl
Tampó d'hibridació 2X	150 µl
DMSO	30 µl
H ₂ O DEPC	50 µl

2. S'escalfa la barreja d'hibridació a 99°C durant 5 minuts.
3. S'incuba a 45°C durant 5 minuts.
4. Es centrifuga 5 min a 14.000 rpm per eliminar qualsevol material insoluble de la barreja.

*L'Eukaryotic Hybridization control mix conté un set d'oligonucleòtids específics per transcrits no eucariòtics que serveix com a control de la hibridació i de la pròpia micromatriu.

**El control B2 és un oligonucleòtid sintètic, la hibridació de qual permet al software *Microarray suite* alinear la posició de cada punt sobre la imatge obtinguda amb l'escàner.

El procés d'hibridació consisteix en el següent:

1. Es treu la solució de pre-hibridació de les micromatrius.
2. S'afegeixen 220 µl de la barreja d'hibridació amb el mateix procediment descrit anteriorment, deixant una petita bombolla d'aire a l'interior per afavorir la barreja durant la incubació.
3. Es sella el *septum* amb una petita enganxina per evitar la pèrdua de líquid.
4. S'incuba 16 h a 45°C amb una rotació de 60 rpm.
5. Passades les 16 h, es treu la barreja d'hibridació i s'afegeixen 250 µl de tampó no estringent.

<u>Tampó no estringent</u>		<u>Tampó estringent</u>	
SSPE	6X	MES	100 mM
Tween-20	0.01%	[Na ⁺]	0.1 M
		Tween-20	0.01%
<u>SSPE 20X pH 7.4</u>			
NaCl	3 M		
NaH ₂ PO ₄	0.2 M		
EDTA	0.02 M		

Filtrar totes les solucions utilitzant un filtre de 0.2 µm

Les solucions que contenen MES s'han de guardar a 4°C protegides de la llum

8.4.10. Rentats i tinció de les micromatrius

Després de la hibridació, la micromatriu és sotmesa de forma automatitzada a una sèrie de rentats, a una amplificació del senyal mitjançant l'ús d'un anticòs, i a dues tincions amb un conjugat de streptavidin R-phycoerythrin (SAPE).

Affymetrix disposa d'una sèrie de protocols optimitzats en funció del tipus de mostra, del tipus de micromatriu i del kit utilitzat pel marcatge de la mostra. Els següents passos es van realitzar de forma automatitzada en la *Fluidics Station 450 (Affymetrix)* controlada a través de l'*Affymetrix Genehip® Operating Software (GCOS)*. En el nostre cas es va utilitzar el protocol anomenat **EukGE-WS2v4_450** que consta dels següents passos:

- 10 cicles de dos rentats/cicle amb el tampó de rentat no estringent a 25°C.
- 4 cicles de 15 rentats/cicle amb el tampó de rentat estringent a 50°C.
- 10 min en solució SAPE a 25°C.
- 10 cicles de 4 rentats/cicle amb el tampó de rentat no estringent a 25°C.
- 10 min en solució de l'anticòs a 25°C.
- 10 min en solució SAPE a 25°C.
- 15 cicles de 4 rentats/cicle amb tampó de rentat no estringent a 30°C.

<u>Solució de l'anticòs</u>		<u>Solució SAPE</u>	
2X tampó de tinció	300 µl	2X tampó de tinció	600 µl
H ₂ O DEPC	266.4 µl	H ₂ O DEPC	540 µl
BSA acetilada (50mg/ml)	24 µl	BSA acetilada (50mg/ml)	48 µl
IgG de cabra (10mg/ml)	6 µl	SAPE (1mg/ml)	12 µl
Anticòs biotinilat (0.5 mg/ml)	3.6 µl		

La solució SAPE i la solució de l'anticòs s'han de preparar immediatament abans del seu ús. El reactiu SAPE és fotolàbil, de manera que cal protegir-lo de la llum, i cal conservar-lo a 4°C.

Tampó de tinció

MES estoc	100 mM
[Na ⁺]	1 M
Tween-20	0.05%

Filtrar amb un filtre de 0.2 µm. Es guarda a 4°C protegit de la llum

8.4.11. Escanejat de les micromatrius

L'aparell utilitzat per escanejar les micromatrius híbrides és el *GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)*. Aquest escàner detecta la quantitat de llum emesa pels grups fluorescents incorporats a la mostra a una longitud d'ona de 570 nm, que és proporcional a la quantitat de RNA híbridat a la micromatriu.

8.4.12. Anàlisi de dades

L'*Affymetrix Genechip® Operating Software (GCOS)* a més de controlar els processos automatitzats de rentats i tincions de les micromatrius permet processar les dades obtingudes en la imatge de l'escanejat de les micromatrius i emmagatzemar els valors d'intensitat de cada cel.la de la micromatriu (document amb extensió .cel). Aquestes dades d'intensitat són transformades a un document anomenat "Chip file" que conté els valors obtinguts de cada set d'oligonucleòtids per a un determinat transcrit.

Per assegurar la qualitat de les dades obtingudes es va comprovar en primer lloc una sèrie de paràmetres proporcionats pel GCOS (document amb extensió .rpt), com per exemple: % de gens detectats, soroll de fons, valors obtinguts per als controls no eucariòtics afegits, etc. En segon lloc es va utilitzar una eina bioinformàtica desenvolupada per la Universitat de Lausanne que s'anomena RACE (*Remote Analysis Computation for gene Expression data*) disponible a <http://race.unil.ch>. Aquesta eina processa les dades (.cel files) i en realitza diferents controls de qualitat.

9. Tècniques amb proteïnes

9.1. Preparació d'extractes proteics

El procediment utilitzat per a la preparació d'extractes proteics de plàntules i fulles d'*Arabidopsis thaliana* per a la realització de western blots o bé d'assajos d'activitat enzimàtica és el detallat a continuació:

1. Es recullen entre 150-300 mg de teixit fresc. Es pesen, es col·loquen en un morter (que cal mantenir en gel) i s'afegeix el tampó d'homogeneïtzació fred en una proporció 1:2 (p/v).
2. S'homogeneïtza el teixit i es passa l'extracte obtingut a un tub d'1,5 ml.
3. Es centrifuga a 200 x g durant 10 min a 4°C per eliminar les restes cel·lulars.
4. Es recupera el sobrenedant (sn 200) que serà el denominat extracte cru.

En l'estudi de les isoformes citosòliques de la FPS s'ha utilitzat en alguns casos el sobrenedant de 16000 x g ja que correspon a un extracte més net on trobarem només la fracció citosòlica, doncs s'haurà separat en el sediment de 16000 x g la fracció corresponent a mitocondries, cloroplastes i peroxisomes. En aquests casos, s'ha continuat centrifugant l'extracte cru (sn 200) a 16000 x g durant 20 minuts a 4°C. El sobrenedant obtingut és el denominat sn 16000.

<u>Tampó d'homogeneïtzació</u>		<u>Inhibidors de proteases</u>	
KCl	10 mM	Aprotinina (3 mg/ml en aigua)	15 µg/ml
MgCl ₂	1 mM	E64 (1 mM en sol. tampó)	1 µg/ml
EDTA	1 mM	Pepstatina A (3 mg/ml en metanol)	1,5 µg/ml
Sacarosa	250 mM	PMSF (100 mM en isopropanol)	0,5 mM
Tricina pH 7,5	0,1 M	DTT (1M en aigua)	10 mM

El tampó d'homogeneïtzació conté sacarosa per mantenir l'osmolaritat i evitar el trencament de membranes durant la preparació de l'extracte. Els inhibidors de proteases s'afegeixen al tampó just abans de la seva utilització.

9.1.1. Quantificació d'extractes proteics d'*A. thaliana*

Per determinar la concentració proteica dels extractes obtinguts s'ha utilitzat el mètode colorimètric descrit per Bradford (1976). Aquest mètode es basa en la unió del colorant

Comassie a les proteïnes. Per a la reacció colorimètrica s'ha utilitzat el reactiu comercial *BioRad Protein Assay (BioRad)*. Els valors obtinguts s'han referit a una recta patró d'albumina de sèrum boví (BSA) elaborada dins d'un rang de concentracions de 0 a 10 µg/ml. De cada mostra s'han mesurat entre 1-1,5 µl, dels quals s'ha fet una dilució prèvia per evitar errors de pipeteig.

9.2. Western blot

9.2.1. Separació de proteïnes mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) permet, en condicions desnaturalitzants, la separació de les proteïnes d'una mostra segons la seva massa molecular. L'SDS és un detergent que confereix a les proteïnes una densitat de càrrega negativa proporcional a la seva massa, de manera que, aplicant un voltatge al gel, s'aconsegueix una migració de les proteïnes del pol negatiu cap al pol positiu.

La tècnica utilitzada es basa en el mètode descrit per Laemmli (1970). Segons aquest mètode, el gel es prepara en dues parts que presenten diferent concentració d'acrilamida i diferent pH: el gel apilador i el gel separador. En primer lloc, les proteïnes desnaturalitzades per l'SDS migren cap al pol positiu a través del gel apilador (de menor concentració d'acrilamida), i s'acumulen a la interfase dels dos gels. A continuació, es separen degut a la seva massa molecular en el gel separador que conté una major concentració d'acrilamida.

Preparació del gel de poliacrilamida

1. Abans de començar a preparar el gel és recomanable muntar el sistema per fer el gel *Mini protean (BioRad)* i omplir-lo d'aigua per comprovar-ne la seva estanqueïtat. Un cop feta aquesta comprovació, s'elimina l'aigua i s'asseca l'interior.
2. En primer lloc es barregen tots els components del gel separador, afegint en l'últim moment els iniciadors de la polimerització: persulfat amònic (PSA) i TEMED. Aquesta solució s'aboca al compartiment entre els dos vidres on ha de polimeritzar el gel fins a una alçada d'aproximadament 5 cm.
3. S'afegeix una capa d'isopropanol sobre el gel separador per aconseguir que la polimerització sigui uniforme en la interfase entre els dos gels. Aquest isopropanol s'elimina un cop el gel hagi polimeritzat (aprox. 30 min).

4. Es prepara i s'afegeix el gel apilador fins a l'extrem superior dels dos vidres. S'hi encaixa la pinta que formarà els pous on es carreguen les mostres i deixa polimeritzar.

<u>Gel apilador 4%</u>		<u>Gel separador 12,5%</u>	
Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	1,25 ml	Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	3,75 ml
Solució monomèrica*	0,67 ml	Solució monomèrica*	6,3 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	150 µl
PSA 10% (p/v)	37,5 µl	PSA 10% (p/v)	75 µl
TEMED	3,8 µl	TEMED	7,5 µl
H ₂ O mQ q.s.p.	5 ml	H ₂ O mQ q.s.p.	15 ml

*La solució *BioRad* monomèrica utilitzada és l'Acilamida/N,N'-Metilbisacrilamida 30% (30% T, 2,7% C).

Preparació de les mostres i electroforesi

1. Es col·loca el gel en la cubeta corresponent i s'afegeix tampó d'electroforesi fins a cobrir els pouets.
2. S'afegeix un volum del tampó de càrrega (2X) a totes les mostres, es desnaturalitzen bullint-les a 100°C durant 5 minuts i es mantenen en gel fins al moment carregar-les al gel de poliacrilamida. Per carregar les mostres s'utilitzen unes puntes multiflex de punta fina. Es carreguen 5 µl del marcador *Prestained SDS-PAGE Standards-Low Range (BioRad)*.
3. S'aplica un amperatge constant de 25 mA per gel mentre les mostres migren a través del gel apilador, i de 30 mA en el gel separador, fins que el front de migració hagi recorregut tot el gel. Aquest front es pot veure degut al colorant Blau de bromfenol que conté el tampó afegit a la mostra.

<u>Tampó de càrrega per a proteïnes 2X</u>		<u>Tampó d'electroforesi</u>	
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml	Tris-HCl pH 8.3	3 g
SDS 10%	4 ml	Glicina	14,4 g
Glicerol	2 ml	SDS 10%	10 ml
2-mercaptoetanol	1 ml	H ₂ O mQ q.s.p.	1 l.
Blau de bromfenol	0.04%		
H ₂ O mQ q.s.p	10 ml		

9.2.2. Transferència de les proteïnes a una membrana de PVDF

Després d'haver separat les proteïnes en funció de la seva massa molecular mitjançant l'electroforesi, cal transferir-les a una membrana de PVDF, suport sobre el qual es duran a

terme les hibridacions amb els anticossos específics i la detecció quimioluminescent. Aquesta transferència es realitza immediatament després de l'electroforesi seguint el següent protocol:

1. Es prepara una membrana de PVDF (*Hybond-P Amersham-Pharmacia Biotech RPM 30 3F*) de la mateixa mida del gel (10 x 5 cm), es mulla amb metanol i es submergeix en tampó de transferència fins al moment de fer el muntatge.
2. Es treu el gel d'entre els dos vidres on s'ha fet l'electroforesi i, amb l'ajuda d'un bisturí, s'elimina la part corresponent al gel apilador.
3. Per fer la transferència s'ha utilitzat el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)*. El muntatge de la transferència s'inicia sobre el costat negre del cassette corresponent al pol negatiu. En primer lloc es mulla l'esponja en el tampó de transferència i es col.loquen a sobre 3 papers *Whatmann 3 MM* també mullats. A continuació, es posa el gel i la membrana, evitant la presència de bombolles que impedirien una transferència correcta. Finalment, es col.loquen tres papers *Whatmann 3 MM* i una altra esponja adequadament mullats i es tanca el *cassette*. Seguint aquest ordre ens quedarà el gel orientat cap al pol negatiu i la membrana cap al pol positiu.

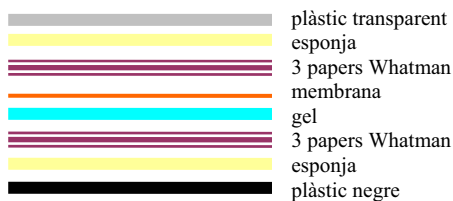


Figura 60: Esquema del muntatge per la transferència de les proteïnes del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF.

4. S'inserta el *cassette* en la cubeta de transferència (*BioRad Mini Trans-Blot*) i s'omple amb 1 litre de tampó de transferència.
5. S'aplica una corrent elèctrica amb una intensitat constant de 400 mA durant 2h. Es recomana fer la transferència a 4°C, afegint a més a més un recipient amb aigua congelada que eviti l'augment de temperatura del tampó de transferència de dins la cubeta.
6. Un cop finalitzat el procés, cal desfer el muntatge i recuperar la membrana. És recomanable fer un petit tall en una cantonada de la membrana que permeti identificar-ne posteriorment la cara on es troben les proteïnes i l'orientació i el sentit de l'electroforesi.

Tampó de transferència

Tris-HCl pH 8,3	3 g
Glicina	14,4 g
H ₂ O milliQ q.s.p	1 l

9.2.3. Immunodetecció quimioluminescent

La detecció de la proteïna d'estudi es porta a terme sobre la membrana de PVDF mitjançant la incubació amb un anticòs específic que reconeixi la proteïna en qüestió. Aquest anticòs primari és reconegut per un anticòs secundari anti-IgG conjugat a la peroxidasa de rave (RHP). La peroxidasa té la capacitat de transformar el substrat *Lumigen PS-3* del kit comercial *ECL+Plus (Amersham)* provocant l'emissió de llum i permetent la detecció quimioluminescent de la proteïna en una pel·lícula d'autoradiografia. Els anticossos primaris utilitzats (anti-FPS 9768) es van obtenir al laboratori mitjançant l'immunització de conills New Zealand amb la proteïna FPS1S d'*Arabidopsis thaliana* sobreexpressada en *E.coli* i purificada. El procediment seguit per a la immunodetecció és el següent:

1. Es renta la membrana amb PBS 1X durant 3 min a T^a ambient.
2. S'incuba la membrana amb una solució de PBS-Tween20-llet durant una hora a T^a ambient. Aquest pas s'anomena bloqueig de la membrana i té com a objectiu bloquejar els llocs d'unió inespecífica de l'anticòs primari.
3. A continuació, s'incuba amb una dilució 1:4000 de l'anticòs anti-FPS 9768 en la solució de PBS-Tween 20-llet durant tota la nit a 4°C.
4. Es fan 3 rentats de la membrana amb una solució de PBS-Tween 20 durant 4 min a T^a ambient.
5. S'incuba la membrana durant 30 min a T^a ambient amb una dilució 1:10.000 de l'anticòs secundari (anti-Ig G de conill lligat a peroxidasa, *Amersham*) en solució de PBS-Tween 20-llet a T^a ambient.
6. Es fan 4 rentats de 3 minuts amb PBS-Tween 20.
7. Es renta la membrana amb PBS durant 4 minuts.

PBS

NaCl	8 g
KCl	200 mg
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	240 mg
H ₂ O mQ q.s.p.	1 l
pH 7.4 amb HCl	

PBS-Tween 20

Tween 20	50 µl
PBS q.s.p.	100 ml

PBS-Tween 20-llet

llet desnatada	1,5 g
PBS-Tween 20 q.s.p.	30 ml

Per la detecció s'ha utilitzat el sistema *ECL+Plus* (Amersham). Es preparen 0.5 ml de reactiu (per una membrana de 10 x 5 cm) seguint les proporcions dels reactius A i B recomanades pel fabricant.

Es col·loca la membrana entre dues làmines de plàstic transparent, s'afegeix el reactiu sobre la membrana i s'incuba 5 min, eliminant l'excés de reactiu amb l'ajut d'un paper secant de manera que ens quedi una pel·lícula de reactiu entre la membrana i el plàstic.

Es contacta la membrana amb una pel·lícula d'autoradiografia. El temps d'exposició òptim (en el nostre cas, entre 10 segons-1 min) pot variar en funció de l'experiment i de l'anticòs utilitzat. Els passos de detecció i revelat de la pel·lícula es duen a terme en una cambra fosca.

9.2.4. Tinció de les proteïnes presents a la membrana de PVDF

Amb l'objectiu de normalitzar la quantitat de proteïna present en cada carril i comprovar-ne la integritat, es realitza una tinció de la membrana de PVDF del western blot amb Blau de Coomassie.

1. Es submergeix la membrana en solució de tinció durant 5-10 min, a T^a ambient i en agitació suau.
2. Un cop tenyida, la membrana es submergeix en la solució de destinció. Es manté en agitació suau, a T^a ambient i es va renovant la solució de destinció fins aconseguir eliminar la tinció de fons de la membrana. El Blau de Coomassie proporciona una tinció irreversible de les proteïnes.

Solució de tinció amb Blau de Coomassie:

Blau brillant de Coomassie R-250	250 mg
Metanol	400 ml
Àcid acètic glacial	70 ml
H ₂ O mQ q.s.p.	1 l

Solució de destinció:

Metanol	400 ml
Àcid acètic glacial	70 ml
H ₂ O mQ q.s.p.	1 l

10. Assaigs d'activitat enzimàtica

En aquesta tesi s'han realitzat assaigs d'activitat enzimàtica per mesurar *in vitro* l'activitat dels enzims HMGR i FPS. El mètode seguit es basa en la incubació d'un extracte proteic amb una barreja que conté una proporció del substrat de l'enzim marcat radioactivament

amb ^{14}C , seguit de la purificació del producte de la reacció per tal de separar-lo de la resta del substrat marcat. L'activitat enzimàtica es quantifica mesurant la radioactivitat present en el producte de la reacció mitjançant un contador de centelleig.

10.1. Assaig d'activitat HMGR

L'assaig d'activitat enzimàtica HMGR està basat en un mètode descrit per Bach *et al.*, (1986).

Els extractes proteics utilitzats, corresponents a la fracció del sobrenedant de 200 x g, s'han obtingut triturant inicialment el teixit en presència de N_2 líquid i procedint de la manera descrita anteriorment (apartat 9.1. de materials i mètodes) però utilitzant el següent tampó d'extracció:

<u>Tampó d'extracció per a HMGR</u>	
Sacarosa	100 mM
H_2KPO_4 pH 7,2	40 mM
EDTA pH 8,0	30 mM
KCl	50 mM
Tritó X-100	0,2%

Aquest tampó es pot conservar a -20°C . En el moment de la seva utilització s'afegeixen el DTT i els inhibidors de proteases. Les solucions estoc dels inhibidors de proteases es conserven a -20°C excepte el PMSF que es manté a 4°C .

DTT (1M en aigua)	10 mM
PMSF (100 mM en isopropanol)	0.5 mM
Aprotinina (3 mg/ml en aigua)	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
E64 (1 mM en solució tampó)	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Pepstatina A (3mg/ml en metanol)	1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

En el cas de realitzar l'assaig HMGR en extractes proteics de llavors d'Arabidopsis, la quantitat de material de partida s'ha reduït a 30-80 mg. Quan s'han utilitzat llavors germinades, les llavors han estat sotmeses a un procés de rehidratació i estratificació i s'han deixat 24 hores en una cambra de cultiu per permetre'n la germinació. En tots els casos, la proporció inicial de tampó d'homogeneïtzació ha estat 1:4 (p/v). Després d'obtenir un primer sn 200, s'ha afegit novament tampó d'homogeneïtzació en una proporció 1:2 (v/v) i s'ha repetit la centrifugació a 200 x g, a 4°C durant 10 min.

10.1.1. Substrats i solucions necessàries

Substrat marcat (^{14}C -HMG-CoA): 3-hydroxy-3-methyl[3- ^{14}C]glutaryl coenzyme A (*Amersham-Pharmacia Biotech*), 20 μCi / ml.

Solució estoc de substrat HMG-CoA fred: DL-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, (*Sigma*) es prepara en tampó KH_2PO_4 50 mM pH 4,5 a una concentració de 0,8 mM. Es fan alíquotes i es guarden a -80°C .

Gliceraldehid-6-fosfat-Deshidrogenasa 0,25 U/ μl : es dissolen 1000 U de l'enzim liofilitzat (*Boehringer*) en 4 ml de citrat sòdic 5 mM pH 7,4. Es conserva a -20°C .

Solució d'HCl 25%: es barregen 10,13 ml d'àcid clorhídric comercial (al 37 %) amb 4,87 ml d'aigua.

<u>Solució cocktail</u>	<u>Conc. estoc</u>	<u>Conc. en la reacció</u>
Tris-HCl pH 7,2	500 mM	208,3 mM
EDTA	120 mM	50 mM
Glucosa-6-Fosfat	120 mM	50 mM
NADP ⁺	6 mM	2,5 mM
Albúmina sèrica bovina	1,2 mg/ml	0,5 mg/ml

<u>Barreja de reacció</u>	<u>Conc. en la reacció</u>	
33.5 μl de barreja contenen:		
HMG-CoA fred (0.8 mM)	2.5 μl	33.3 μM
HMG-CoA (^{14}C) (0,319 mM)	2.5 μl	13.29 μM
DTT (170 mM)	1.5 μl	4.25 mM
G-6-P DH (0,5 unitats)	2.0 μl	0.017 U/ μl
solució cocktail	25 μl	

10.1.2. Reacció de transformació d'HMG-CoA a mevalonat

1. Es posen 26,5 μl d'extracte de cada mostra en tubs de 1,5 ml i s'afegeixen 33,5 μl de la barreja de reacció (V_f 60 μl). Es prepara un blanc de la reacció utilitzant 26,5 μl del tampó d'extracció que es processaran de la mateixa forma i en paral.lel.
2. S'incuba a 37°C durant 2h. Aquest temps és el que s'ha utilitzat quan l'extracte era de fulles de la roseta basal o llavors Columbia, però es pot reduir en funció del teixit assajat.
3. S'afegeixen 10 μl de HCl al 25 % per tal de canviar el pH del medi i aturar la reacció enzimàtica.

4. S'incuba durant 15 min a 50°C per lactonitzar el mevalonat sintetitzat. El procés de formació de lactones és necessari per separar el [¹⁴C]mevalonat mitjançant cromatografia en capa fina del [¹⁴C]HMG-CoA que no ha reaccionat.
5. Es refreden les mostres durant 4 min a -20°C.
6. Es centrifuguen els tubs 2 min a 10000 rpm.

10.1.3. Cromatografia en capa fina

La purificació del mevalonat produït en la reacció enzimàtica es realitza mitjançant cromatografia en capa fina (TLC) en un suport de Silicagel 60 (*Merck*). La placa, de 20 x 20 cm, es talla en dos fragments de 20 x 10 cm. En cada fragment, es marquen 7 carrils de 2,5 cm cadascun en sentit vertical, i s'elimina la sílica en la separació de cada carril amb una punta de pipeta, de manera que no puguin barrejar-se els productes de dos carrils diferents. L'origen de la cromatografia es situa a 1,5 cm de la part inferior de la placa i es marca amb llapis. Es marca també una línia a 3,5 cm de l'origen per sobre de la qual es trobarà el producte un cop feta la separació cromatogràfica.

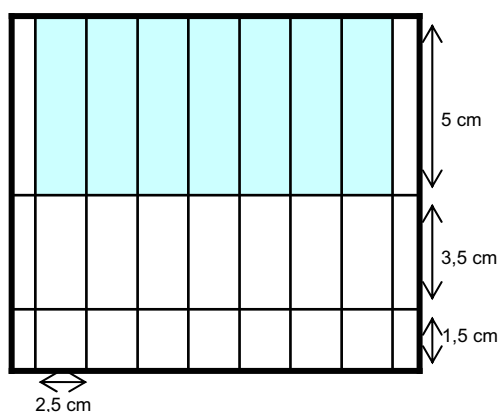


Figura 61: Representació esquemàtica de les divisions fetes en les plaques de Silicagel 60 (*Merck*) utilitzades en la cromatografia en capa fina per a la separació dels productes de reacció de l'assaig d'activitat HMGR. En color blau s'indica la fracció de sílica que es rascarà per recuperar la mevalonolactona.

Es sembren 35 µl (dels 70 µl) dipositant-los lentament en l'origen de cada carril i es deixen assecar (s'accelera el procés amb l'ajuda d'un assecador de cabell convencional).

Es col·loca la placa de TLC en una cubeta de cromatografia que conté com a fase mòbil una barreja d'acetona:bencè (1:1), preparada amb anterioritat per tal de saturar la cubeta amb els vapors de la fase mòbil. Es deixa progressar la fase mòbil fins al límit superior de la placa (fase

estacionària) i quan arriba a aquest punt, es treu la placa de la cubeta i es deixa assecar completament. Tot aquest procés en el qual es manipulen dissolvents orgànics, es realitza sota una campana d'extracció de gasos.

10.1.4. Contatge de la mevalonolactona marcada amb [^{14}C]

Un cop s'ha evaporat el dissolvent de la placa de TLC, es recupera la mevalonolactona rasant amb l'ajuda d'un bisturí els 5 cm superiors de la placa. Per evitar la formació de pols de sílica radioactiva, s'humiteja previament la placa amb aigua destil·lada utilitzant un pulveritzador. La sílica rascada es passa a l'interior d'un vial de centelleig i s'afegeixen 10 ml de líquid de centelleig *CytoscinTM ES (ICN)*. En un altre vial es barregen 33.5 μl de la mescla de reacció amb 10 ml de líquid de centelleig, que serviran per quantificar l'activitat específica de la mescla de reacció. Finalment, es quantifica la radioactivitat en un contador de centelleig (*Hewlett Packard*).

10.1.5. Càlcul de l'activitat específica de l'enzim HMGR

L'activitat específica s'expressa en U/mg proteïna. Cada unitat d'activitat de l'enzim HMGR es defineix com els pmols de substrat transformat en producte per minut a 37°C. El càlcul de l'activitat específica, es detalla a continuació:

$$\begin{aligned} \text{Activitat específica (pmol HMG-CoA/min.mg)} &= \text{cpm} \times \frac{\text{pmol HMG-CoA en la mescla}}{\text{cpm mescla de reacció}} \times \\ &\frac{1}{\text{temps de reacció (min)}} \times \frac{1}{\text{volum d'extracte (26.5 } \mu\text{l)}} \times \frac{\text{volum total assaig (70 } \mu\text{l)}}{\text{volum aplicat a TLC (35 } \mu\text{l)}} \times \\ &\frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times \frac{\text{volum d'extracte (ml)}}{\text{quantitat de proteïna (mg)}} \end{aligned}$$

10.2. Assaig d'activitat FPS

La tècnica utilitzada per mesurar l'activitat de l'enzim farnesildifosfat sintasa és la descrita per Chambon *et al.* (1990), amb algunes modificacions.

Els extractes proteics utilitzats s'han obtingut tal i com es descriu en l'apartat 9.1 de materials i mètodes. Les mesures realitzades han tingut com a objectiu determinar l'activitat

preniltransferasa dels enzims citosòlics FPS1S i FPS2, de manera que s'ha utilitzat tant la fracció corresponent al sobrenedant de 200 x g, com la corresponent al sobrenedant de 16000 x g (obtinguda centrifugant 10 min a 16000 x g i 4°C, el sn 200), doncs aquesta última permet separar alguns orgànuls i obtenir uns extractes més nets.

10.2.1. Substrats i solucions necessàries

Substrat marcat (^{14}C -IPP): 3-Methyl-[1- ^{14}C]but-3-enyl pyrophosphate (*Amersham-Pharmacia Biotech*), 50 μCi / ml.

Solucions estoc d'IPP, GPP i DMAPP: aquests substrats (*Sigma*) estan en forma de sal amònica dissolts en metanol: NH_4OH (7:3). Per preparar-los, s'evapora el dissolvent dels vials d'IPP, DMAPP i GPP sota corrent de nitrogen i a continuació, es resuspenen els substrats en hidròxid amònic 10 mM tamponat amb fosfat potàssic pH 7.5. Les solucions estoc d'IPP i DMAPP es preparen a una concentració final de 2 mM i el GPP es prepara a una concentració final de 4 mM.

10.2.2. Reacció de síntesi de FPP

1. Es col.loquen 5 μl de l'extracte a assajar i 45 μl de tampó d'extracció en un tub de 2 ml.
2. S'afegeixen 50 μl de la barreja de reacció i s'incuba 15 min a 37°C.

<u>Barreja de reacció (2X)</u>		<u>Concentració a l'assaig</u>
Tampó fosfats pH 7.5 (250 mM)	20 μl	50 mM
GPP (4 mM)	5 μl	200 μM
[1- ^{14}C]IPP (55 mCi/mmol)	1,5 μl	13,6 μM
IPP (2 mM)	2,31 μl	46,2 μM
MgCl_2 (25 mM)	4 μl	1 mM
H_2O mQ q.s.p.	17,19 μl	

3. Es para la reacció amb una mescla que conté 500 μl d' H_2O i 86 μl d' HCl 2 M, refredada a 0°C, i es deixa 1 min en gel.
4. S'incuba 10 min a 37°C per tal d'hidrolitzar els grups fosfat. L' HCl aporta el pH necessari per dur a terme una defosforilació en medi àcid.
5. A continuació s'afegeix NaCl a saturació (aprox. una punta d'espàtula) i s'agita amb el vòrtex durant 1 minut.
6. Es fa una extracció amb 900 μl d'hexà. El FPP format, un cop defosforilat serà extret per l'hexà, però no s'extreurà el [^{14}C]IPP tot i que també s'hagi defosforilat.

7. Es centrifuga 10 min a 8000 rpm i a 4°C.
8. Es col.loquen 200 µl de la fase hexànica en un vial que contingui 10 ml de líquid de centelleig ECOSCYNT 0 (*National Diagnostics*). Finalment, es quantifica la radioactivitat en un contador de centelleig (*Hewlett Packard*).

10.2.3. Càlcul de l'activitat específica de l'enzim FPS

L'activitat específica s'expressa en U/mg proteïna. Cada unitat d'activitat de l'enzim FPS es defineix com els nmols d'IPP incorporats en productes àcid-làbils per minut a 37°C. El càlcul de l'activitat específica, es detalla a continuació:

$$\begin{aligned}
 \text{Activitat específica (nmol FPP/min.mg)} &= \text{cpm} \times \frac{\text{nmol IPP en la mescla}}{\text{cpm mescla de reacció}} \times \\
 &\frac{1}{\text{temps de reacció (min)}} \times \frac{1}{\text{volum d'extracte (5 } \mu\text{l)}} \times \frac{\text{volum hexà (900 } \mu\text{l)}}{\text{volum hexà contat (200 } \mu\text{l)}} \times \\
 &\frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times \frac{\text{volum d'extracte (ml)}}{\text{quantitat de proteïna (mg)}}
 \end{aligned}$$

10.3. Aproximació al càlcul de K_m per a IPP, GPP i DMAPP

Per tal de comparar el comportament cinètic de les dues isoformes citosòliques de la FPS en *A. thaliana*, s'han realitzat aproximacions al càlcul de la K_m per als diferents substrats dels enzims FPS, utilitzant extractes (sn 16000) de fulles de roseta basal de plantes que sobreexpressaven de forma constitutiva la isoforma FPS1S i la isoforma FPS2. S'ha assumit que en aquests extractes, pràcticament la totalitat de l'activitat detectada en l'assaig és atribuïble a la isoforma sobreexpressada. Els protocols seguits per l'obtenció dels extractes i per fer l'assaig d'activitat FPS han estat els descrits anteriorment però amb les següents modificacions:

- El volum d'extracte assajat és de 4 µl.
- S'han preparat diferents barreges de reacció amb concentracions creixents del substrat del qual es calcula la K_m .

La composició de les diferents barreges de reacció ve detallada a continuació:

<u>Barreja de reacció K_m GPP</u>	<u>Conc. a l'assaig</u>
Tampó fosfats pH 7.5 (250 mM)	50 mM
[1- ¹⁴ C]IPP (55 mCi/mmol)	13,6 μM
IPP (2 mM)	46,2 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM
GPP (4 mM)	6,25 μM, 12,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM i 200 μM

<u>Barreja de reacció K_m DMAPP</u>	<u>Conc. a l'assaig</u>
Tampó fosfats pH 7.5 (250 mM)	50 mM
[1- ¹⁴ C]IPP (55 mCi/mmol)	27,2 μM
IPP (2 mM)	92,8 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM

DMAPP (2 mM) 7,5 μM, 15 μM, 30 μM, 60 μM, 120 μM i 200 μM

En el cas de l'IPP, donat que es tracta del substrat marcat amb ¹⁴C, s'ha hagut de considerar que la quantitat total d'IPP incorporada a l'assaig consisteix en una barreja de substrat calent (marcat amb ¹⁴C) i substrat fred (sense marcar) en el moment de calcular les concentracions.

<u>Barreja de reacció K_m IPP</u>	<u>Concentració a l'assaig</u>
Tampó fosfats pH 7.5 (250 mM)	50 mM
GPP (4 mM)	200 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM

<u>Conc. total d'IPP a l'assaig</u>	<u>[1-¹⁴C]IPP (55 mCi/mmol)</u>	<u>IPP (2 mM)</u>
1 μM	1 μM	0 μM
2,5 μM	2,5 μM	0 μM
5 μM	5 μM	0 μM
10 μM	10 μM	0 μM
30 μM	13,6 μM	16,4 μM
60 μM	13,6 μM	46,4 μM

En tots els casos, el valor aparent de K_m s'ha obtingut per extrapolació a partir de l'efecte de la concentració de substrat sobre la velocitat de la reacció segons la representació de Lineweaver-Burk (1/V en front 1/S). Cal tenir en compte que els valors obtinguts no es poden considerar K_m com a tals, ja que l'estudi no s'ha realitzat amb proteïna purificada.

10.4. Anàlisi dels productes de la reacció catalitzada per l'enzim FPS mitjançant cromatografia en capa fina

Els productes de reacció generats en l'assaig d'activitat FPS, un cop defosforilats poden ser identificats mitjançant cromatografia en capa fina (TLC).

En el cas d'analitzar els productes generats en assaigs FPS *in vitro* a partir d'extractes de llevat, no s'ha afegit cap pas específic en el protocol. Ara bé, quan s'ha volgut analitzar productes generats en assaigs *in vitro* a partir d'extractes de planta, ha estat necessari canviar la hidròlisi en medi àcid per una hidròlisi enzimàtica per acció de la fosfatasa àcida de patata. En aquestes mostres l'assaig FPS (apartat 10.2) s'ha aturat posant els tubs en gel i s'ha procedit de la següent manera:

1. S'afegeixen a cada tub 150 µl d'H₂O saturada amb n-butanol.
2. S'afegeixen 500 µl de n-butanol (saturat amb H₂O) i s'agita amb el vòrtex 30 segons.
3. Es centrifuga 2 min a 13000 rpm i es recull la fase orgànica (superior).
4. Es reextreu la fase aquosa amb 500 µl de n-butanol (saturat amb H₂O) i s'agita amb el vòrtex 30 segons.
5. Es centrifuga 2 min a 13000 rpm i es recull la fase orgànica (superior).
6. Es renta les fases orgàniques amb 500 µl d'H₂O saturada amb n-butanol i es torna a recuperar la fase orgànica.
7. Es conta una alíquota de 50 µl en un contador de centelleig i el volum restant (950 µl) s'evapora a l'Speed-Vac fins a un volum de 250 µl.
8. Es prepara per a cada tub una solució de fosfatasa àcida. En primer lloc es dissol:

Fosfatasa àcida de patata grau II (<i>Roche</i>)	2,2 mg
Acetat sòdic 0,1 M pH 5.6	125 µl

S'acaba de preparar la solució mesclant:

Metanol	500 µl
Tritó X-100 1%	125 µl
Solució de fosfatasa àcida preparada	125 µl

9. S'afegeix la mescla anterior a cada tub i s'incuba 16 h a 37°C en agitació forta.
10. S'atura la reacció de defosforilació amb 20 µl de NaOH i es fa una extracció amb 750 µl d'hexà.
11. Es renta la fase hexànica amb 350 µl d' H₂O.

10.4.1. Separació de prenialcohols per cromatografia en capa fina

S'han dut a terme dos tipus de cromatografia en capa fina, una en fase directa i una altra en fase reversa. Un cop obtingut l'extracte hexànic, el tractament de les mostres ha estat el mateix en ambdós casos, la única diferència es troba en el tipus de fase mòbil i fase estacionària utilitzat en cada cas. El procediment vé detallat a continuació:

1. S'afegeixen a la fase hexànica de cada mostra: 10 µl de geraniol (10 µg/µl, *Sigma*) i 10 µl de farnesol (10 µg/µl, *Sigma*). Aquests alcohols serveixen com a estàndard intern i eviten l'evaporació dels alcohols marcats radiactivament, ja que a aquesta concentració precipiten.
2. Es concentra totalment les mostres amb l'ajut de l'Speed-Vac.
3. Es resuspèn el sediment en 20 µl d'hexà.
4. Es realitza la cromatografia:
 - a. utilitzant com a fase estacionària plaques SilicaGel 60 (*Merck*) i com a fase mòbil una mescla de benzè/acetat d'etil (7:1) en el cas de mostres d'*A. thaliana*.
 - b. utilitzant com a fase estacionària plaques HPTLC RP-18F_{254S} (*Merck*) i com a fase mòbil una mescla de metanol/aigua (95:5) en el cas de mostres de *S. cerevisiae*.
5. A continuació, es visualitza la posició dels prenialcohols utilitzant vapors de iode.
6. Finalment, es revela la presència de productes radioactius mitjançant el *phosphorimager STORM 840 (Molecular Dynamics)* o contactant la cromatografia amb una pel·lícula d'autoradiografia. Les imatges obtingudes al *phosphorimager* es poden quantificar amb el programa *ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics)*.

11. Extracció i anàlisi d'esterols

El procés d'extracció i anàlisi d'esterols s'ha realitzat seguint un procediment posat a punt pel grup de la Dra. Magda Rafecas del Departament de Bromatologia i Nutrició de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Les mostres a analitzar han estat recollides, pulveritzades en presència de nitrogen líquid i conservades a -80°C fins al moment de ser liofilitzades. La liofilització és necessària per extreure l'aigua del teixit vegetal. Un cop el teixit ja està liofilitzat es pot conservar a temperatura ambient. El procés d'extracció s'ha realitzat en una cambra amb llum vermella

atenuada per tal d'evitar reaccions d'oxidació que puguin afectar a alguns dels compostos a analitzar. El procediment d'extracció i anàlisi següent es el següent:

1. Es taren tubs de centrifuga de vidre pyrex i es pesa exactament la quantitat de mostra a analitzar.
2. S'afegeixen 25 µl de 5α-colestà (250 µg/ml) com a patró intern (el patró es dissol en ciclohexà).
3. S'afegeixen 8 ml de pyrogallol 3% (p/v) i 2 ml de KOH 28% (p/v) i s'agita amb el vòrtex. El pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene, *Sigma*) té funció antioxidant. L'etanol absolut que s'utilitza com a dissolvent del pyrogallol contribueix a la precipitació de les proteïnes de la mostra.
4. A continuació, s'incuba 1h a 80°C. En aquest pas, anomenat saponificació, els triglicèrids passen a formar sabons que quedaran a la fase aquosa al fer l'extracció.
5. Es deixen els tubs 5 minuts en gel per aturar la saponificació. S'afegeixen 12 ml d'H₂O destil.lada per diluir el KOH.
6. S'extreu la fracció insaponificable amb ciclohexà. S'afegeixen 20 ml de ciclohexà, s'agita enèrgicament amb el vòrtex i es centrifuga 10 minuts a 3000 rpm a temperatura ambient.
7. Es recupera la fase orgànica incolora (el pyrogallol dóna color negra a la fase etanòlica i permet diferenciar clarament la interfase amb l'etanol).
8. Es fan dues reextraccions de la fase aquosa amb 8 ml de ciclohexà.
9. Les fases ciclohexàniques s'ajunten en un baló de vidre topaci i es rotaevaporen a 30°C.
10. Per una altra banda es preparen les columnes d'extracció. En primer lloc, es netegen les agulles de la cubeta de vidre on es farà el buit fent passar 40 ml d'hexà. A continuació, s'acoblen les columnes Bond Elute LRC[®] aminopropyl solid-phase extraction (SPE) cartridges (*Varian Associates*) a les agulles de la cubeta i s'activen fent passar 4 ml de n-hexà a través de la resina (a partir d'aquest moment és molt important no deixar assecar mai la columna). Finalment, els vials on es recollirà l'elució de les columnes es col.loquen a sota les agulles de la cubeta.
11. Un cop evaporades les mostres, s'afegeixen 2 ml CHCl₃:isopropanol (2:1) a cada baló on hi ha el residu sec i es fa baixar amb l'ajut d'una pipeta Pasteur per les parets per tal de redissoldre la mostra. Es recupera la dissolució que conté la mostra i es fa passar a través de les columnes SPE (el dissolvent queda d'un color groc ataronjat).
12. Es repeteix aquest pas (afegint cada vegada 1 ml) fins que el dissolvent recuperat del baló és pràcticament incolor (aproximadament 7 ml).

13. Quan ja s'ha afegit tot el volum de mostra a les columnes SPE, es connecta el buit a la cubeta per facilitar el pas de tot el volum a través de la columna.
14. S'evapora el dissolvent posant els vials en un bloc a 30°C sota corrent de nitrogen. A mida que es va evaporant és necessari afegir una mica de CHCl_3 :isopropanol per fer que la mostra baixi de les parets i quedi concentrada al fons del vial.
15. Es deixen les mostres 16 h en un dessecador amb parafina i pentòxid de fòsfor i es fa el buit al dessecador. Aquest pas assegura la total eliminació de l'aigua que encara pogués quedar a la mostra. En aquest moment les mostres es poden guardar a -20°C fins al moment de la silanització.

La silanització és un pas en el qual es derivatitzen els compostos extrets, afegint un grup trimetilsilil a totes les molècules amb grups -OH. Per silanitzar es dissol el residu sec en 50 µl de piridina, s'afegeixen 50 µl de Sylon i s'incuba a temperatura ambient durant 30 minuts.

Finalment, s'analitza 1 µl de l'extracte silanitzat mitjançant cromatografia de gasos en un cromatògraf Perkin Elmer GC Autosystem™ amb una columna capil·lar ZB1 (100% metilpolisiloxà; 30 m x 0,25 µm de diàmetre intern; 0,25 µm de tamany de partícula) equipat amb una detector d'ionització de flama (FID) utilitzant heli com a gas portador. El sistema d'injecció és manual amb split de 12,5:1. Les condicions de la cromatografia han estat: temperatura de l'injector, 290°C; temperatura del detector, 300°C; la temperatura del forn s'ha mantingut 0.5 min a 245°C i després s'ha programat fins a 265°C a raó de 2°C/min i finalment, fins a 290°C a raó de 3,5°C/min.

La identificació dels pics obtinguts s'ha realitzat per temps de retenció relatiu i per cromatografia d'estandards. La quantificació s'ha dut a terme per normalització interna respecte al control de 5α-colestà a partir de les àrees dels pics obtinguts en el cromatograma:

$$\frac{\text{Àrea esterol}}{\text{àrea } 5\alpha\text{-colestà}} = \frac{\text{concentració esterol}}{\text{concentració } 5\alpha\text{-colestà}}$$

12. Preparació de mostres per a immunocitoquímica i observació al microscopi electrònic de transmissió

Inicialment es van intentar processar les mostres (fulles d'Arabidopsis) mitjançant crioultramicrotomia però, davant les dificultats que es van presentar per obtenir talls de mostres

de teixit vegetal mitjançant aquest procés, finalment es va optar per la criosubstitució, tècnica mitjançant la qual es van obtenir els resultats mostrats.

12.1. Criosubstitució

12.1.1. Fixació química del teixit

En aquest procés s'elimina l'aire del teixit vegetal i es fa penetrar el líquid fixador per tal de conservar al màxim l'ultraestructura. Cal treballar a T^a ambient i sota campana d'extracció de gasos degut a la toxicitat del líquid fixador.

Solució de fixació

Paraformaldehyd	4%
Glutaraldehyd	0.1%
Sacarosa	8%
en tampó PIPES 30mM pH 6.9-7.0	

(PIPES: Piperazine-N,N-bis(2-ethansulfonic acid))

1. Amb l'ajuda d'un bisturí es tallen trossos de fulla d'un tamany inferior a 1 mm³. Aquests talls es fan sobre una superfície de parafina i amb el teixit envoltat d'una gota de líquid fixador per evitar-ne la dessecació.
2. Els trossets de fulla es col.loquen en vials de vidre amb la solució de fixació. Al principi, la majoria queden flotant en la superfície del líquid fixador perquè al contenir molt aire, la seva densitat és menor. Quan es substitueix tot l'aire pel líquid fixador, augmenta la densitat del teixit i els trossets queden al fons del vial.
3. Es mantenen a 4°C fent el buit fins a l'eliminació de tot l'aire.
4. Es seleccionen els fragments que han incorporat el fixador (estan al fons del vial) i es passen a un tub de 1,5 ml.
5. Es renta amb tampó PIPES 30mM pH 7.0.
6. Es fan 4 rentats de 10 min a 4°C amb tampó PIPES 30mM pH7.0 que conté glicina 50mM (la glicina evita que els aldehids del líquid fixador puguin donar senyal de fons).

12.1.2. Crioprotecció

El procés de crioprotecció consisteix en la incubació dels fragments de teixit en solucions amb una concentració creixent de sacarosa (preparades en tampó fosfats). Es duu a terme a 4°C en agitació constant, seguint el següent protocol:

- 2h en sacarosa 0.6 M
- 2 h en sacarosa 1.05 M
- o/n en sacarosa 2.1 M
- 4 h en sacarosa 2.3 M

12.1.3. Criofixació

La criofixació es realitza per immersió del teixit en propà líquid utilitzant l'aparell *Leica EM CPC (Cryopreparation system)*.

12.1.4. Criosubstitució

Per dur a terme el procés de criosubstitució s'utilitza l'aparell *Leica EM AFS (Automatic Freeze Substitution)* seguint els passos següents:

1. Es mantenen les mostres durant 72h a -90°C en metanol amb 0.5% d'acetat d'uranil.
2. A continuació es realitza una pujada progressiva de la temperatura fins a -50°C a raó de 5°C/h .
3. Es realitzen 3 rentats d'1 h en metanol a -50°C .
4. Es duu a terme la inclusió del teixit en la resina Lowicryl HM20:
 - o/n en Lowicryl:etanol 1:3 (v/v) a -50°C
 - o/n en Lowicryl:etanol 2:2 (v/v) a -50°C
 - 8 h en Lowicryl:etanol 3:1 (v/v) a -50°C
 - 48 h en Lowicryl pur a -50°C
5. La polimerització de la resina es fa irradiant 48 h amb llum UV a -50°C .

12.1.5. Ultramicrotomia

Per a la realització dels talls s'utilitza l'ultramicrotòtom *Leica Ultracut UCT*. Els talls de 50-70 nm de gruix s'agafen amb un pèl de dàlmata subjectat a un palet de fusta i es col.loquen sobre reixetes de coure i pal.ladi (de 3 mm de diàmetre, recobertes amb membrana de Formvar[®] i carbonades). A partir d'aquest moment es poden mantenir a temperatura ambient.

12.1.6. Immunocitoquímica

Es dipositen sobre un parafilm gotes de 20 µl de les diferents solucions que s'utilitzaran per a la immunocitoquímica. A partir d'aquest moment tots els rentats i incubacions es realitzen transferint les reixetes amb la cara del pal·ladi (que conté els talls ultrafins) en contacte amb les diferents solucions. Es segueix el següent protocol:

1. Es renta les reixetes durant 15 minuts en una solució de glicina 0.2% (p/v) en PBS 0,1M.
2. S'incuben 15 minuts en una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) 5% en PBS 0,1M.
3. Es fan 2 rentats de 5 minuts amb PBS 0,1M.
4. S'incuben 2 h en una dilució 1:400 de l'anticòs 1ari anti-FPS (7968) en PBS.
5. Es fan 3 rentats de 10 minuts en PBS-0.25% Tween 20.
6. S'incuben 1 h en una dilució 1:30 de l'anticòs 2ari Proteïna A conjugat amb partícules or (*Univ. d'Utrecht*) en PBS.
7. Es fan 2 rentats de 5 minuts en PBS-0.25% Tween 20.
8. Es fan 8 rentats de 2 minuts en H₂O destil·lada.

12.1.7. Contrastat de les mostres

Es mantenen les reixetes en contacte amb una solució d'acetat d'uranil al 2% en aigua durant 30 minuts a temperatura ambient i a continuació es deixen assecar.

12.1.8. Observació de les mostres al microscopi electrònic de transmissió

Un cop contrastades, les mostres s'observen a 80 kV en un microscopi electrònic de transmissió *Jeol 1010 (Jeol, Japan)* de la Unitat de Tècniques de Microscopia Elèctronica i Reconeixement Molecular *in situ* dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Els negatius fotogràfics de les imatges obtingudes s'escanegen amb l'escàner d'alta resolució *Artixscan 2500F (Microtek)*.

13. Complementació funcional de mutants de llevat

La soca CC25 de *Saccharomyces cerevisiae* és una soca defectiva en activitat farnesildifosfat sintasa degut a una mutació en el gen *ERG20*, que codifica per l'enzim FPS en llevat. La mutació *erg20-2* produeix un canvi en un únic nucleòtid, que es tradueix en el canvi de Lys a Glu en l'aminoàcid de la posició 197 i confereix al llevat la propietat de secretar geraniol al medi (Blanchard i Karst 1993), doncs queda bloquejat el segon pas de la síntesi de FPP. Aquest mutant és termosensible i requereix la presència d'ergosterol en el medi de cultiu per poder créixer a 36 °C .

El genotip de la soca mutant CC25 és: *mat a, erg12-2, erg20-2, ura3-1, trp1-1*.

13.1. Cultiu de la soca CC25

13.1.1. Medis de cultiu

La preparació dels medis de cultiu s'ha dut a terme seguint les recomanacions del manual de laboratori *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997).

<u>Medi complet (YPG):</u>		<u>Medi mínim (YNB):</u>	
Peptona	10 g/l	Yeast Nitrogen Base sense aminoàcids ni (NH ₄) ₂ SO ₄	1,7 g/l
Extracte de llevat	10 g/l	Sulfat d'amoni	5 g/l
Glucosa	20 g/l	Glucosa	10 g/l
pH 7 amb NaOH		pH 7 amb NaOH	

Quan el medi conté glucosa, aquesta s'afegeix en condicions estèrils a partir d'una solució estoc de glucosa al 20%. Els medis i la solució estoc de glucosa s'esterilitzen autoclavant 20 min a 120°C, 1 atm. Els medis sòlids es preparen afegint agar 15 g/l als medis líquids.

13.1.2. Nutrients complementaris

Els aminoàcids i les bases púriques i pirimidíniques necessàries per complementar les auxotrofies de les soques de llevat s'afegeixen en pols al medi mínim (YNB) abans d'autoclavar. En els casos indicats en la memòria s'ha addicionat triptòfan (50 µg/ml) i uracil (50 µg/ml).

Quan ha estat necessària l'addició d'ergosterol, aquest compost s'ha afegit als medis un cop autoclavats, a unes concentracions finals de 80 µg/ml en medis sòlids i de 4 µg/ml en medis líquids. L'estoc d'ergosterol es prepara a una concentració 4 mg/ml en una solució de Tergitol NP40-etanol absolut (1:1 v/v):

1. Es fon el tergitol en un bany a 80°C (el tergitol és un surfactant no iònic sòlid a T^a ambient) i es mescla amb etanol absolut (1:1) mantenint la barreja a 80°C.
2. Es dissol l'ergosterol (4 mg/ml) en la solució anterior.

Aquesta solució es pot conservar a T^a ambient protegida de la llum (l'ergosterol és fotolàbil). S'haurà de fondre la solució que conté tergitol abans d'afegir-la als medis de cultiu.

13.2. Construccions per la complementació funcional de mutants de llevat

Per a l'expressió de proteïnes en llevat s'ha utilitzat el vector pJR1133 (Cunillera *et al.*, 2000a), que conté com a marcador de selecció en llevat URA3 sota el control del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GPD). Aquest plasmidi conté el gen *Amp* sota el control d'un promotor procariòtic, que confereix resistència a ampicil.lina en bacteries.

Per tal de generar les construccions per expressar tant l'isoenzim FPS2 com les proteïnes FPS químèriques en llevat, es va partir dels plasmidis p35SFPS2 (apartat 4.1.1. de materials i mètodes) i pBQ1, pBQ2, pBQ3, pBQ4, pBQ5 i pBQ6 (apartat 4.1.3 de materials i mètodes). Aquests plasmidis es van digerir amb els enzims de restricció BamHI/SacI, i els inserts extrems es van clonar provisionalment en el vector pQE-32 donat que permetia afegir la diana SalI a 3' dels inserts. Els plasmidis resultants es van anomenar pQE-Q1, pQE-Q2, pQE-Q3, pQE-Q4, pQE-Q5, pQE-Q6 i pQE-FPS2. A continuació, aquests es van digerir amb la parella d'enzims BamHI/SalI i els inserts es van clonar en el vector pJR1133, donant lloc a les construccions pJQ1, pJQ2, pJQ3, pJQ4, pJQ5, pJQ6 i pJFPS2. Tots aquests plasmidis es van replicar en la soca DH5α d'*E. coli* fins el moment de transformar *S.cerevisiae*.

13.3. Transformació de llevats

El procediment per a la transformació de llevats s'ha dut a terme segons el mètode de l'acetat de liti descrit per Gietz *et al.* (1992), amb algunes adaptacions:

1. Es prepara un cultiu en 10 ml del medi adequat per a la soca que es desitgi transformar, i es deixa créixer durant una nit a 28°C fins a una DO_{600} d'entre 0,6-1. La soca CC25 es va créixer en medi YPG amb ergosterol.
2. Es traspassen els 10 ml de pre-cultiu a 50 ml de medi fresc (YPG + ergosterol) i es deixa créixer fins que la DO_{600} sigui 0,8 (aproximadament 10^9 cèl.lules).
3. Es reparteix el medi en 2 tubs falcon 50 i es centrifuga 10 min a 3.000 rpm a T^a ambient per recollir les cèl.lules.
4. Es renta les cèl.lules amb 10 ml de la solució 1 i es torna a centrifugar 10 min a 3.000 rpm a T^a ambient.
5. Es resuspenen els llevats en 500 µl de solució 1 i es transfereixen a un tub eppendorf.
6. S'incuba 1 hora a 28°C.
7. Per cada transformació, s'afegeix en un tub eppendorf seguint l'ordre indicat i assegurant-nos de mesclar bé:
 - 1 µg DNA plasmídic (en 5 µl TE)
 - 5 µl DNA d'esperma de salmó preparat* (10 µg/µl)
 - 50 µl de la suspensió de llevat del pas 6 (aproximadament 10^8 cèl.lules)

Cal tenir present que en cada procés de transformació cal realitzar el control negatiu:

- 5 µl TE
 - 5 µl DNA d'esperma de salmó preparat* (10 µg/µl)
 - 50 µl de la suspensió de llevat del pas 6 (aproximadament 10^8 cèl.lules)
8. S'incuba 10 min a T^a ambient.
 9. S'afegeixen 300 µl de la solució 2 i s'incuba 30 min a T^a ambient.
 10. S'incuba 5 min a 42°C.
 11. Es centrifuga 5 segons a 1.300 rpm per recollir els llevats.
 12. Es resuspenen els llevats en 200 µl de TE pH 8.
 13. Es plaqueja en el medi selectiu adequat** perquè només creixin les cèl.lules transformades (el medi que posi de manifest el marcador de selecció del vector utilitzat).
 14. Finalment s'incuba a 28°C fins que apareguin colònies (2-3 dies).

Solució 1:

Sorbitol 1 M
Acetat de liti 0,1 M
en TE pH 7,5

Solució 2:

PEG 4000 40%
Acetat de liti 0,1 M
en TE pH 7,5

*Per preparar DNA d'esperma de salmó, es dissolen 20 mg/ml en aigua, es sonica la solució fins que perdi la viscositat i es bull. Finalment, es passa la solució a través d'una agulla

de xeringa per desnaturalitzar-la i es guarda a -20°C . Abans d'usar aquesta solució, s'escalfa a 100°C durant 5 min i es torna a passar per una agulla de xeringa.

**La soca CC25 transformada amb els plasmidis pJR1133, pJQ1, pJQ2, pJQ3, pJQ4, pJQ5, pJQ6 i pJFPS2 i el control del procés de transformació van ser plaquejats en medi YNB suplert amb ergosterol i triptòfan. També es va plaquejar la soca CC25 sense transformar en medi YPG, i es va incubar a 36°C per comprovar que no hi havia hagut cap revertent durant el procés de creixement de la soca.

Comprovació de la transformació

Abans de realitzar l'assaig de complementació funcional, s'ha de comprovar que la soca de llevat ha estat transformada amb el plasmidi desitjat. Per això s'ha d'obtenir DNA plasmídic a partir del cultiu de les colònies transformades i utilitzar-lo per retrotransformar *E. coli*, on la comprovació dels plasmidis per digestió amb enzims de restricció és molt més senzilla. El procés d'obtenció de DNA plasmídic de llevat està detallat a continuació:

1. Es prepara un cultiu de 2 ml de la soca transformada. El medi utilitzat és YNB amb triptòfan i ergosterol en el cas de la soca transformada amb pJR1133, i YNB amb triptòfan en la resta de casos. El creixement es fa a 28°C amb una agitació constant de 230 rpm.
2. Es recullen les cèl.lules centrifugant 5 minuts a 14.000 rpm.
3. Es resuspenen les cèl.lules en 200 μl de solució de lisi.
4. S'afegeix sorra de vidre de $0,45\ \mu\text{m}$ de diàmetre fins arribar al menisc format per la suspensió de cèl.lules, i s'agita 2 minuts per trencar les cèl.lules. Es passa el lisat resultant a un nou tub eppendorf.
5. Es fa una extracció amb fenol-cloroform-isoamílic (25:24:1).
6. El sobrenedant aquós es precipita amb acetat sòdic (V/10) i etanol absolut fred (2V) i es deixa 16 h a -20°C .
7. Es centrifuga 20 minuts a 14.000 rpm i a 4°C . Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el pellet.
8. Es resuspèn el precipitat en 20 μl d' H_2O mQ i s'utilitza 1 μl d'aquesta resuspensió per retrotransformar *E. coli*. La transformació d'*E. coli* es realitza per electroporació.

Solució de lisi:

Tritó X-100	2% (v/v)
SDS	1% (v/v)
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

13.4. Assaig de complementació funcional de la soca CC25

Un cop comprovada la presència de cada plasmidi en la soca mutant de llevat, ja es pot procedir a estudiar si l'expressió de la proteïna codificada pel plasmidi complementa funcionalment la mutació del llevat.

A causa de la mutació *erg20-2*, la soca CC25 és un mutant termosensible auxotròfic per l'ergosterol a 36°C. Perquè la soca CC25 pugui créixer a 36°C cal afegir ergosterol al medi. D'altra banda, la soca CC25 pot créixer a 28 °C en medi YPG amb o sense suplement d'ergosterol.

Per comprovar si les proteïnes FPS quimèriques complementaven la soca CC25, es va sembrar les soques transformades en medi complet, tant a 28°C com a 36°C. En el cas d'haver complementació funcional, la soca transformada hauria de créixer a 36°C sense suplement d'ergosterol. Paral·lelament i com a control, es va plaquejar també la soca CC25 sense transformar, per comprovar que creixia a 28°C, i que no creixia a 36°C sense suplement d'ergosterol.

13.5. Assaig d'activitat FPS en *S. cerevisiae*

L'assaig d'activitat farnesildifosfat sintasa en *S. cerevisiae* es realitza seguint el mateix protocol descrit per a l'assaig d'activitat FPS (apartat 10.2) en extractes de planta. Les úniques diferències es troben en la preparació de l'extracte cel·lular, que s'obté de la següent manera:

1. A partir d'un pre-cultiu de 3 ml, s'inoculen 100 ml de medi mínim líquid (amb els nutrients complementaris necessaris) i es deixa créixer el llevat a 28°C en agitació aproximadament unes 20 hores, que és el temps necessari perquè el cultiu assoleixi l'estat estacionari. La soca CC25 [pJR1133] es fa créixer en medi mínim amb triptòfan i ergosterol. La soca CC25[pJFPS2] i les soques transformades amb les diferents construccions quimèriques es fan créixer en medi mínim amb triptòfan.

2. Es recullen les cèl.lules centrifugant 5 min a 5.000 rpm a 4°C.
3. Es resuspenen les cèl.lules en 10 ml de tampó fosfats 50 mM pH 7 i es passen a tubs Corex 15. Es centrifuga 5 min a 5.000 rpm a 4°C i es repeteix el rentat amb tampó fosfats.
4. Es resuspenen les cèl.lules en 1,5 ml de tampó d'extracció.
5. S'afegeix sorra de vidre freda (a -20°C) de 0,45 µm de diàmetre fins arribar al menisc format per la suspensió de cèl.lules.
6. Mantenint la mostra sempre freda (en gel), s'agita amb el vòrtex durant 1 min. Per evitar escalfar la mostra, posar-la en gel durant 2 min, i repetir una segona agitació d'1 min.
7. Es recupera la fase líquida amb una pipeta Pasteur, i es traspasa a un tub eppendorf.
8. Es centrifuga 5 min a 12.000 rpm a 4°C per eliminar les restes cel.lulars.
9. Es recupera el sobrenedant i es centrifuga durant 35 min a 13.000 rpm i a 4°C.
10. Es recupera el sobrenedant, es quantifica la proteïna de l'extracte i es manté en gel fins el moment de dur a terme l'assaig d'activitat FPS. La mostra no es pot conservar a -20°C, ja que perd activitat FPS, per tant, cal obtenir extracte nou cada vegada que es desitgi determinar l'activitat FPS. L'assaig es duu a terme amb 100 µg de proteïna.

14. Elaboració de models estructurals tridimensionals per als isoenzims

FPS1S i FPS2 d'*A. thaliana*

L'elaboració dels models estructurals ha estat realitzada en col·laboració amb l'Eduardo López Viñas i el Dr. Paulino Gómez Puertas del Centre de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Madrid.

Els models estructurals tridimensionals dels homodímers FPS1S i FPS2 complexats amb GPP i Mg²⁺ s'han elaborat mitjançant un modelatge per homologia basat en les dades cristal·logràfiques de la FPS de *Gallus gallus* [accés Protein Data Bank (PDB) 1UBW; Tarshis *et al.*, 1996] i l'alineament múltiple de les seqüències de diferents membres de la família de les FPS. L'alineament de les seqüències de FPS1S i FPS2 amb les seqüències de les FPS d'altres organismes es va realitzar utilitzant els algorismes ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) i T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000). Els models estructurals es van realitzar utilitzant els programes del servidor SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003), i la seva qualitat estructural es va comprovar amb el programa WHAT IF (Vriend, 1990). Finalment, per tal d'optimitzar la geometria, alliberar constriccions locals i corregir possibles mals contactes, es va minimitzar

l'energia de les estructures amb la implementació del camp de forces GROMOS 43B1 en el programa DeepView (Guex i Peitsch, 1997).

BIBLIOGRAFIA

A

- Adiwilaga, K. i Kush, A.** (1996) *Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (Hevea brasiliensis)*. *Plant Mol. Biol.* 30(5), 935-46.
- Ahumada-Díaz, I.** (2001) *Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular de la acetoacetil-coenzima A tiolasa de Arabidopsis thaliana*. Tesi Doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III. Universitat de Barcelona.
- Altmann, T.** (1999) *Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants*. *Planta* 208, 1-11.
- An, G.** (1987) *Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis*. *Methods Enzymol.* 153, 292-305.
- Anderson, M.S., Yarger, J.G., Burck, C.L. i Poulter, C.D.** (1989) *Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264, 19176-84.
- Antolín, M.** (2005) *Paper de les proteïnes AtKLC-1 i AtB'' en la regulació de l'HMG-CoA reductasa d'Arabidopsis thaliana*. Tesi Doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Biologia. Universitat de Barcelona.
- Aoyagi, K., Beyou, A., Moon, K., Fang, L. i Ulrich, T.** (1993) *Isolation and characterization of cDNAs encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. *Plant Physiol.* 102, 623-8.
- Apfel, C.M., Takacs, B., Fountoulakis, M., Stieger, M. i Keck, W.** (1999) *Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential uppS gene*. *J. Bacteriol.* 181(2), 483-92.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Attucci, S., Aitken, S.M., Gulick, P.J. i Ibrahim, R.K.** (1995a) *Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein*. *Arch. Biochem. Biophys.* 321(2), 493-500.
- Attucci, S., Aitken, S.M., Ibrahim, R.K. i Gulick, P.J.** (1995b) *A cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase in white lupin*. *Plant Physiol.* 108(2), 835-6.
- Ausubel, R.F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. i Struhl, K.** (2002) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

B

- Bach, T.J., Rogers, D.H. i Rudney, H.** (1986) *Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings*. *Eur. J. Biochem.* 154(1), 103-11.
- Back, K. i Chappell, J.** (1996) *Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(13), 6841-5.
- Barnard, G.F. i Popjak, G.** (1981) *Human liver prenyltransferase and its characterization*. *Biochim. Biophys. Acta* 661, 87-99.
- Becker, D.** (1990). *Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes*. *Nucleic Acids Res.* 18(1), 203.
- Benveniste, P.** (1986) *Sterol biosynthesis*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 275-308.

- Benveniste, P.** (2002) *Sterol metabolism*. The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists.
- Benveniste, P.** (2004) *Biosynthesis and accumulation of sterols*. Annu. Rev. Plant Biol. 55,429-57.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D. i Wang, R.** (1996) *The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts*. Biochemica 4, 15-20.
- Bhattacharyya, M.K., Paiva, N.L., Dixon, R.A., Korth, K.L. i Stermer, B.A.** (1995) *Features of the hmg 1 subfamily of genes encoding HMG-CoA reductase in potato*. Plant Mol. Biol. 28(1), 1-15.
- Bick, J. A. i Lange, M.** (2003) *Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane*. Arch. Biochem. Biophys. 415, 146-54.
- Blanchard, L. i Karst, F.** (1993) *Characterization of a lysine-to-glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from Saccharomyces cerevisiae*. Gene 125(2),185-9.
- Bouvier, F., Rahier, A. i Camara B.** (2005) *Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids*. Prog Lipid Res 44, 357-429.
- Bouvier, F., Suire, C., D. Harlingue A., Backhaus, R.A. i Camara, B.** (2000) *Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells*. Plant J. 24(2), 241-52.
- Bowman, J.** (1994) *Arabidopsis: An atlas of morphology and development*. Springer; New York.
- Bradford, M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding*. Anal. Biochem. 72, 248-254
- Brooker, J.D. i Russell, D.W.** (1975) *Properties of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from Pisum sativum seedlings*. Arch. Biochem. Biophys. 167(2) 723-9.

C

- Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., i Nelson, T.** (2002) *The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning*. Plant Cell 14, 2045-58.
- Cervantes-Cervantes, M., Gallagher, C.E., Zhu, C. i Wurtzel, E.T.** (2006) *Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity*. Plant Physiol. 141, 220-31.
- Chambon, C., Ladeveze, V., Oulmouden, A., Servouse, M. i Karst, F.** (1990) *Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase*. Curr. Genet. 18, 41-6.
- Chan, Y.H., Cheng, C.H.K. i Chan, K.M.** (2007) *Study of goldfish (Carassius auratus) growth hormone structure-function relationship by domain swapping*. Comp. Biochem. Physiol. B. doi.10.1016/j.cbpb.2006.11.019
- Chappell, J.** (1995a) *Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 521-47.
- Chappell, J.** (1995b) *The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism*. Plant Physiol. 107, 1-6.

- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, r. i Saunders, C.** (1995) *Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants?*. *Plant Physiol.* 109, 1337-43.
- Chen, A., Kroon, P.A. i Poulter, C.D.** (1994) *Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure.* *Protein Sci.* 3, 600-7.
- Chen, D.H., Ye, H.C. i Li, G.F.** (2000) *Expression of a chimeric of farnesyl diphosphate synthase gene in Artemisia annua L. transgenic plants via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation.* *Plant Sci.* 155, 179-85.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A. i Feldmann K.A.** (1998) *The DWARF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis.* *Plant Cell* 10, 231-43.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E. i Feldmann K.A.** (1999a) *The Arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis.* *Plant Physiol.* 119, 897-907.
- Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E. i Feldmann K.A.** (1999b) *The Arabidopsis dwarf7/ste1 mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis.* *Plant Cell* 11, 207-21.
- Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A.S., Tax, F.E., Yoshida, S. i Feldmann K.A.** (2000) *Lesions in the sterol delta reductase gene of Arabidopsis cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis.* *Plant J.* 21, 431-43.
- Choi, D., Bostock, R.M., Avdiushko, S. i Hildebrand, D.F.** (1994) *Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in Solanum tuberosum L.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(6), 2329-33.
- Chory, J., Nagpal, P. i Peto, C.A.** (1991) *Phenotypic and genetic analysis of det2, a new mutant that affects light-regulated seedling development in Arabidopsis.* *Plant Cell* 3, 445-9.
- Chye, M.L., Tan, C.T. i Chua, N.H.** (1992) *Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in Hevea brasiliensis: hmg1 and hmg3 are differentially expressed.* *Plant Mol. Biol.* 19(3), 473-84.
- Clarke, C.F., Tanaka, R.D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A.M. i Edwards, P.A.** (1987) *Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to prenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway.*
- Clough, S.J. i Bent, A.F.** (1998) *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.* *Plant J.* 16(6), 735-43.
- Clouse, S.D.** (2000) *Plant development: A role for sterols in embryogenesis.* *Current Biol.* 10, 601-4.
- Clouse, S.D.** (2002) *Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development.* *Plant Cell* 14, 1995-99.
- Clouse, S.D. i Feldmann, K.** (1999) *Molecular genetics of brassinosteroid action.* In: *Brassinosteroids: steroidal plant hormones.* Tokio, Springer 163-190.
- Clouse, S.D. i Sasse J.M.** (1998) *Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development.* *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 49, 427-51.

- Cowan, A.K., Moore-Gordon, C.S., Bertling, I. i Wolstenholme, B.N.** (1997) *Metabolic control of avocado fruit growth (Isoprenoid growth regulators and the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)*. Plant Physiol. 114(2), 511-518.
- Croteau, R., Kutchan, T. i Lewis, N.** (2000) *Natural products (secondary metabolites)*. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD.
- Crowell, D.N.** (2000) *Functional implications of protein isoprenylation in plants*. Prog. Lipid Res. 39(5), 393-408.
- Cunillera, N., Arró, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A. i Ferrer, A.** (1996) *Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes*. J. Biol. Chem. 271(13) 7774-80.
- Cunillera, N., Arró, M., Forés, O., Manzano, D. i Ferrer, A.** (2000a) *Characterization of dehydrodolichyl diphosphate synthase of Arabidopsis thaliana, a key enzyme in dolichol biosynthesis*. FEBS Lett. 477(3),170-4.
- Cunillera, N., Boronat, A. i Ferrer, A.** (1997) *The Arabidopsis thaliana FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform*. J. Biol. Chem. 272(24), 15381-88.
- Cunillera, N., Boronat, A. i Ferrer, A.** (2000b) *Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2*. Plant Mol. Biol. 44, 747-58.
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S. i McCourt, P.** (1996) *A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis*. Science 273, 1239-41.

D

- Daudonnet, S., Karst, F. i Tourte, Y.** (1997) *Expression of the farnesyl diphosphate gene of Saccharomyces cerevisiae in tobacco*. Mol. Breed. 3, 137-45.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M. i Koornneef, M.** (2000) *Influence of the testa on seed dormancy, germination and longevity in Arabidopsis*. Plant Physiol. 122, 403-413.
- DellaPenna, D.** (1999) *Carotenoid synthesis and function in plants: Insights from mutant studies in Arabidopsis*. Pure Appl. Chem. 71, 2205-12.
- Delourme, D., Lacroute, F. i Karst, F.** (1994) *Cloning of an Arabidopsis thaliana cDNA coding for a farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast*. Plant Mol. Biol. 26, 1867-73.
- Devarenne, T.P., Ghosh, A. i Chappell, J.** (2002) *Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco*. Plant Physiol. 129(3), 1095-106.
- Diener, A.C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D. i Fink, G.R.** (2000) *Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants*. Plant Cell 12, 853-70.
- Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T.J. i Rohmer, M.** (1998) *Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl-chain in tobacco BY-2 cells*. Biochem. J. 331, 615-21.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W. i Gershenzon, J.** (2005) *The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(3), 933-38.

E

- Eberhardt, N.L. i Rilling, H.C.** (1975) *Prenyltransferase from Saccharomyces cerevisiae. Purification to homogeneity and molecular properties.* J. Biol. Chem. 250, 863-6.
- Edwards, P.A. i Ericsson, J.** (1999) *Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway.* Annu. Rev. Biochem. 68, 157-85.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. i Rodich, F.** (2004) *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway.* Cell. Mol. Life Sci. 61, 1401-26.
- El Tamer, M.K., Lucker, J., Bosch, D., Verhoeven, H.A., Verstappen, F.W., Schwab, W., van Tunen, A.J., Voragen, A.G., de Maagd, R.A. i Bouwmeester, H.J.** (2003) *Domain swapping of Citrus limon monoterpene synthases: impact on enzymatic activity and product specificity.* Arch. Biochem. Biophys. 411(2), 196-203.
- Enfissi, E.M.A., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W. i Bramley, P.M.** (2005) *Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato.* Plant Biotechnol. J. 3, 17-27.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M. i Boronat, A.** (1994) *Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(3), 927-31.
- Enjuto, M., Lumberras, V., Marin, C. i Boronat, A.** (1995) *Expression of the Arabidopsis HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues.* Plant Cell 7(5), 517-27.

F

- Farese, R.V. i Herz, J.** (1998) *Cholesterol metabolism and embryogenesis.* Trends Genet. 14, 115-20.
- Feron, G., Clastre, M. i Ambid, C.** (1990) *Prenyltransferase compartmentation in cells of Vitis vinifera cultivated in vitro.* FEBS Lett. 271, 236-8.
- Flesh, G. i Rohmer, M.** (1988) *Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose.* Eur. J. Biochem. 175, 405-11.
- Fujioka, S., Li, J., Choi, Y.H., Seto, H., Takatsuto, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Kuriyama, H., Yokota, T., Chory, T. i Sakurai, A.** (1997) *The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis.* Plant Cell 9, 1951-62.
- Fulton, D.C., Kroon, P.A. i Threlfall, D.R.** (1994) *Enzymological aspects of the redirection of terpenoid biosynthesis in elicitor-treated cultures of Tabernaemontana divaricata.* Phytochemistry 35, 1183-6.

G

- Gaffe, J., Bru, J.P., Causse, M., Vidal, A., Stamitti-Bert, L., Carde, J.P. i Gallusci, P.** (2000) *LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development.* Plant Physiol. 123(4), 1351-62.
- Gan, S. i Amasino, R.M.** (1995) *Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin.* Science 270, 1986-8.

- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. i Schiestl, R.H.** (1992) *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.* Nucleic Acids Res. 20(6), 1425.
- Goldstein, J.L. i Brown, M.S.** (1990) *Regulation of the mevalonate pathway.* Nature 343, 425-430.
- Gondet, L., Weber, T., Maillot-Vernier, P., Benveniste, P. i Bach, T.J.** (1992) *Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in a tobacco mutant that overproduces sterols.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 186(2), 888-93.
- González, V.** (2002) *Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas: estudio molecular del control de la vía a nivel de la enzima HMG-CoA reductasa.* Tesi doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III. Universitat de Barcelona.
- Grandmougin-Ferjani, A., Schuller-Muller, I. i Hartmann, M.A.** (1997) *Sterol modulation of the plasma membrane H^+ -ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids.* Plant Physiol. 113, 163-74.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Wahren, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L. i Cook, J.C.** (1979) *A unique plant growth promoting steroid from Brassica napus pollen.* Nature 281, 216-7.
- Guex, N. i Peitsch, M.C.** (1997) *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.* Electrophoresis 18(15), 2714-23.

H

- Ha, S.H., Lee, S.W., Kim, Y.M i Hwang, Y.S.** (2001) *Molecular characterization of HMG2 gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rice.* Mol. Cells 11, 295-302.
- Han, J.L., Liu, B.Y., Ye, H.C., Wang, H., Li, Z.Q. i Li, G.F.** (2006) *Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in Artemisia annua L.* J. Integrat. Plant Biol. 48(4), 482-7.
- Harker, M., Holmberg, N., Clayton, J.C., Gibbard, C.L., Wallace, A.D., Rawlins, S., Hellyer, S.A., Lanot, A. i Safford, R.** (2003) *Enhancement of seed phytosterol levels by expression of an N-terminal truncated Hevea brasiliensis (rubber tree) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.* Plant Biotechnol. J. 1, 113-21.
- Hartmann, M.A.** (1998) *Plant sterols and the membrane environment.* Trends Plant Sci. 3, 170-5.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. i Bach, T.J.** (2003a) *Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells.* J. Biol. Chem. 278(29), 26666-76.
- Hemmerlin, A., Rivera, S.B., Erickson, H.K. y Poulter, C.D.** (2003b) *Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the Big Sagebrush Artemisia tridentata ssp. spiciformis.* J. Biol. Chem. 278(34), 32132-40.
- Hernández-Pinzón, I., Ross, J.H., Barnes, K.A., Damant, A.P. i Murphy, D.J.** (1999). *Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of Brassica napus.* Planta 208(4), 588-98.
- Hewitt, F.R., Hough, T., O'Neill, P., Sasse, J.M. i Williams E.G.** (1985) *Effect of brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of Prunus avium using a multiple hanging drop assay.* Aust. J. Plant Physiol. 12, 201-11.

- Holmberg N., Harker, M., Gibbard, C.L., Wallace, A.D., Clayton, J.C., Rawlins, S., Hellyer, A. i Safford, R. (2002) *Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed*. *Plant Physiol* 130(1), 303-11.
- Holmberg N., Harker, M., Wallace, A.D., Clayton, J.C., Gibbard, C.L. i Safford, R. (2003) *Co-expression of N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA and C-24-sterol methyltransferase type 1 in transgenic tobacco enhances carbon flux towards end-product sterols*. *Plant J.* 36, 12-20.
- Houten, S.M., Schneiders, M.S., Wanders, R.J.A. i Waterham, H.R. (2003) *Regulation of isoprenoid/cholesterol biosynthesis in cells from mevalonate kinase-deficient patients*. *J. Biol. Chem.* 278(8), 5736-43.
- Hugueney, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlingue, A. i Camara, B. (1996) *Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits*. *Plant Physiol.* 111, 619-26.

I

- Iglesias, A.A., Ballicora, M.A., Sesma, J.I. i Preiss, J. (2006) *Domain swapping between a cyanobacterial and a plant subunit ADP-glucose pyrophosphorylase*. *Plant Cell Physiol.* 47(4), 523-30.

J

- Jang, J.C., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., Aida, M., Yoshida, S. i Sheen, J. (2000) *A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 14, 1485-97.
- Joly, A. i Edwards, P.A. (1993) *Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity*. *J. Biol. Chem.* 268, 26983-9.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S. i Møller, B.L. (2005) *Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products*. *Current Opinion Plant Biol.* 8, 280-91.

K

- Karst, F., Plochocka, D., Meyer, S. i Szkopinska, A. (2004) *Farnesyl diphosphate synthase activity affects ergosterol level and proliferation of yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. International* 28, 193-7.
- Katoh, S., Hyatt, D. i Croteau, R. (2004) *Altering product outcome in Abies grandis (-)-limonene synthase and (-)-limonene/(-)- α -pinene synthase by domain swapping and directed mutagenesis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 65-76.
- Korth, K.L., Jaggard, D.A. i Dixon, R.A. (2000) *Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato*. *Plant J.* 23(4), 507-16.
- Koyama, T. (1999) *Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(10), 1671-76.
- Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokohama, K., Uchida, M., Nishino, T. i Ogura, K. (1993) *Thermostable farnesyl diphosphate synthase of Bacillus*

stearothermophilus: molecular cloning, sequence determination, overproduction and purification. J. Biochem. (Tokio) 113, 355-63.

Koyama, T., Tajima, M., Sano, H., Doi, T., Koike-Takeshita, A., Obata, S., Nishino, T. i Ogura, K. (1996). *Identification of significant residues in the substrate binding site of Bacillus stearothermophilus farnesyl diphosphate synthase*. Biochemistry 35(29), 9533-8.

Kribii, R., Arro, M., Del Arco, A., Gonzalez, V., Balcells, L., Delourme, D., Ferrer, A., Karst, F. i Boronat, A. (1997) *Cloning and characterization of the Arabidopsis thaliana SQS1 gene encoding squalene synthase. Involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway*. Eur. J. Biochem. 249(1), 61-9.

Krisans, S.K., Ericsson, J., Edwards, P.A. i Keller, G.A. (1994) *Farnesyl diphosphate synthase is localized in peroxisomes*. J. Biol. Chem. 269(19), 14165-9.

L

Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227(5259), 680-5.

Lange, B.M. i Ghassemian, M. (2003) *Genome organization in Arabidopsis thaliana: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism*. Plant Mol. Biol. 51(6), 925-48.

Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. i Croteau, R. (2000) *Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(24), 13172-7.

Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W. i Lange, M. (2003) *Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(11), 6866-71.

Learned, R.M. (1996) *Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase gene expression in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 110, 645-55.

Leivar, P., González, V.M., Castel, S., Trelease, R.N., López-Iglesias, C., Arró, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A. i Fernández-Busquets, X. (2005) *Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*. Plant Physiol. 137, 57-69.

Li, C.P. i Larkins, B.A. (1996) *Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase*. Gene 171(2), 193-6.

Liang, P.H., Ko, T.P. i Wang, A.H.J. (2002) *Structure, mechanism and function of prenyltransferases*. Eur. J. Biochem. 269, 3339-54.

Lichtenthaler, H.K. (2000) *Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors*. Biochem. Soc. Trans. 28, 785-9.

Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. i Schwender, J. (1997a) *Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants*. Physiologia plantarum 101, 643-52.

Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A. i Rohmer, M. (1997b) *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway*. FEBS Lett. 400, 271-4.

Lindsey, K., Pullen, M.L. i Topping, J.F. (2003) *Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling*. Trends Plant Sci. 8, 521-5.

- Liu, C.J., Heinsteinst, P. i Chen, X.Y.** (1999) *Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors.* Mol. Plant Microbe Interact. 12(12), 1095-104.
- Loguercio, L.L., Scott, H.C., Trolinder, N.L. i Wilkins, T.A.** (1999) *Hmg-coA reductase gene family in cotton (Gossypium hirsutum L.): unique structural features and differential expression of hmg2 potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos.* Plant Cell Physiol. 40(7), 750-61.
- Lumbreras, V., Campos, N. i Boronat, A.** (1995) *The use of an alternative promoter in the Arabidopsis thaliana HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region.* Plant J. 8(4), 541-9.
- Lütke-Brinkhaus, F., Liedvogel, B. i Kleinig, H.** (1984) *On the biosynthesis of ubiquinones in plant mitochondria.* Eur. J. Biochem. 141, 537-41.

M

- Maillot-Vernier, P., Gondet, L., Schaller, H., Benveniste, P. i Belliard, G.** (1991) *Genetic study and further biochemical characterization of a tobacco mutant that overproduces sterols.* Mol. Gen. Genet. 231(1), 33-40.
- Mandel, M.A., Feldmann, K.A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M. i Leon, P.** (1996) *CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.* Plant J. 9(5), 649-58.
- Manzano, D.** (2003) *Estudio de la función reguladora de las enzimas farnesildifosfato sintasa y HMG-CoA reductasa en la vía del mevalonato en Arabidopsis thaliana.* Tesi Doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- Manzano, D., Busquets, A., Closa, M., Hoyerová, K., Schaller, H., Kamínek, M., Arró, M. i Ferrer, A.** (2006) *Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in Arabidopsis mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis.* Plant Mol. Biol. 61, 195-213.
- Manzano, D., Fernández-Busquets, X., Schaller, H., González, V., Boronat, A., Arró, M. i Ferrer, A.** (2004) *The metabolic imbalance underlying lesion formation in Arabidopsis thaliana overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity.* Planta 219, 982-92.
- Marrero, P.F., Poulter, C.D. i Edwards, P.A.** (1992) *Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity.* J. Biol. Chem. 267, 21873-8.
- Masferrer, A., Arró, M., Manzano, D., Schaller, H., Fernández-Busquets, X., Moncaleán, P., Fernández, B., Cunillera, N., Boronat, A. i Ferrer, A.** (2002) *Overexpression of Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic Arabidopsis induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels.* Plant J. 30(2), 123-132.
- McGarvey, D.J. i Croteau, R.** (1995) *Terpenoid Metabolism.* Plant Cell 7, 1015-26.
- Mekkriengkrai, D., Sando, T., Hirooka, K., Sakdapipanich, J., Tanaka, Y., Fukusaki, E. i Kobayashi, A.** (2004) *Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom Lactarius chrysorrheus.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2360-68.

Moore, K.B. i Oishi, K.K. (1993) *Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity during maize seed development, germination, and seedling emergence.* Plant Physiol. 101(2), 485-491.

Murray, M.G. i Thompson W.F. (1980) *Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA.* Nucl. Acids Res. 8, 4321-5.

N

Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S. i Muranaka, T. (2002) *Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in Arabidopsis lacking the non-mevalonate pathway.* Planta 216, 345-350.

Narita, J.O. i Gruissem, W. (1989) *Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening.* Plant Cell 1(2), 181-90.

Nelson, A.J., Doerner, P.W., Zhu, Q. i Lamb, C.J. (1994) *Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor-inducible.* Plant Mol. Biol. 25(3), 401-12.

Nigon, F., Serfaty-Lacrosniere, C., Beucler, I., Chauvois, D., Neveu, C., Giral, P., Chapman, M.J. i Bruckert, E. (2001) *Plant sterol-enriched margarine lowers plasma LDL in hyperlipidemic subjects with low cholesterol intake:effect of fibrate treatment.* Clin. Chem. Lab. Med. 39(7), 634-40.

Notredame C., Higgins, D.G. i Heringa, J. (2000) *T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment.* J. Mol. Biol. 302, 205-17.

O

Ogura, K. i Koyama, T. (1998) *Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation.* Chem. Rev. 98(4), 1263-74.

Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. i Kamiya, Y. (2000). *Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis.* Plant Physiol 122(4), 1045-56.

Okazaki, H., Tazoe, F., Okazaki, S., Isoo, N., Tsukamoto, K., Sekiya, M., Yahagi, N., Iizuka, Y., Ohashi, K., Kitamine, T., Tozawa, R., Inaba, T., Yagyu, H., Okazaki, M., Shimano, H., Shibata, N., Arai, H., Nagai, R., Kadowaki, T., Osuga, J. i Ishibashi, S. (2006) *Increased cholesterol biosynthesis and hypercholesterolemia in mice overexpressing squalene synthase in the liver.* J. Lipid Res. 47, 1950-8.

Oh, S.K., Han, K.H., Ryu, S.B. i Kang, H. (2000) *Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from Arabidopsis thaliana. Implications in rubber biosynthesis.* J. Biol. Chem. 275(16), 18482-8.

P

Pan, Z., Herickhoff, L. i Backhaus, R.A. (1996) *Cloning, characterization, and heterologous expresión of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles.* Arch. Biochem. Biophys. 332, 196-204.

Panicot, M., Minguet, E.G., Ferrendo, A., Alcázar, R., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C. i Tiburcio, A.F. (2002) *A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis.* Plant Cell 14, 2539-51.

- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. i Delmer, D.** (2002) *Sitosterol- β -glucoside as a primer for cellulose synthesis in plants*. *Science* 295, 147-50.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. i Lampi, A.** (2000) *Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition*. *J. Sci. Food Agric.* 80, 939-66.
- Ponting, C.P. i Aravind, L.** (1999) *START: A lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins*. *Trends Biochem. Sci.* 295, 147-50.
- Poulter, C.D. i Rilling, H.C.** (1976) *Prenyltransferase: the mechanism of the reaction*. *Biochemistry* 15(5), 1079-83.
- Preuss, D., Rhee, S.Y. i Davis, R.W.** (1994) *Tetrad analysis possible in Arabisopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes*. *Science* 264(5164), 1458-60.

R

- Ransone, L.J., Wamsley, P., Morley, K.L. i Verma, I.M.** (1990) *Domain swapping reveals the modular nature of Fos, Jun and CREB proteins*. *Mol. Cell Biol.* 10 (9), 4565-73.
- Reed, B.C. i Rilling, H.C.** (1975) *Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver*. *Biochemistry* 14, 50-4.
- Rodríguez-Concepción, M.** (2006) *Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells*. *Phytochemistry Rev.* 5, 1-15.
- Rodríguez-Concepción, M. i Boronat, A.** (2002) *Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics*. *Plant Physiol.* 130, 1079-89.
- Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., Zik, M., Fromm, H. i Gruißem, W.** (1999) *The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein*. *EMBO J.* 18(7), 1996-2007.
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J.F., González, V., Phillips, M.A., Ferrer, A. i Boronat, A.** (2004) *Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development*. *Plant Cell* 16, 144-56.
- Runquist, M., Ericsson, J., Thelin, A., Chojnacki, T. i Dallner, G.** (1994) *Isoprenoid biosynthesis in rat liver mitochondria. Studies on farnesyl pyrophosphate synthase and trans-prenyltransferase*. *J. Biol. Chem.* 269(8), 5804-9.
- Russell, D.W. i Davidson, H.** (1982) *Regulation of cytosolic HMG-CoA reductase activity in pea seedlings: contrasting responses to different hormones, and hormone-product interaction, suggest hormonal modulation of activity*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104(4), 1537-43.

S

- Sanmiya, K., Iwasaki, T., Matsuoka, M., Miyao, M. i Yamamoto, N.** (1997) *Cloning of a cDNA that encodes farnesyl diphosphate synthase and the blue-light-induced expression of the corresponding gene in the leaves of rice plants*. *Biochim. Biophys. Acta* 1350(3), 240-6.
- Sasata, R.J., Reed, D.W., Loewen, M.C i Covello, P.S.** (2004) *Domain swapping localizes the structural determinants of regioselectivity in membrane-bound fatty acid desaturases of *Caenorhabditis elegans**. *J. Biol. Chem.* 279(38), 39296-302.

- Sato, M., Sato, K., Nishikawa, S., Hirata, A., Kato, J. i Nakano, A.** (1999) *The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis.* Mol. Cell. Biol. 19(1), 471-83.
- Schaeffer, A., Bouvier-Nave, P., Benveniste, P. i Schaller, H.** (2000) *Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2.* Lipids 35(3), 263-9.
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. i Schaller, H.** (2001). *The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2-1.* Plant J. 25(6), 605-15.
- Schaller, H.** (2003) *The role of sterol in plant growth and development.* Prog. Lipid Res. 422, 163-75.
- Schaller, H.** (2004) *New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants.* Plant Physiol. Biochem. 46, 465-76.
- Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M.L., Tan, C.T., Song, Y.H. i Chua, N.H.** (1995) *Expression of the Hevea brasiliensis (H.B.K.) Müll. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction.* Plant Physiol. 109, 761-70.
- Schmidt, J., Altmann, T. i Adam, G.** (1997) *Brassinosteroids from seeds of Arabidopsis thaliana.* Phytochemistry 45, 1325-7.
- Schrack, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J. i Juergens, G.** (2000) *FACKEL is a sterol C14 reductase required for organized cell division and expansion in Arabidopsis embryogenesis.* Genes Dev. 14, 1471-84.
- Schulbach, M.C., Brennan, P.J. i Crick, D.C.** (2000) *Identification of a short (C15) chain Z-isoprenyl diphosphate synthase and a homologous long (C50) chain isoprenyl diphosphate synthase in Mycobacterium tuberculosis.* J. Biol. Chem. 275(30), 22876-81.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. i Peitsch, M.C.** (2003) *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server.* Nucleic Acids Res. 31(13), 3381-5.
- Shimizu, N., Koyama, T. i Ogura, K.** (1998) *Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases.* J. Biol. Chem. 273(31), 19476-81.
- Shipton, C.A., Parmryd, I., Swiezewska, E., Andersson, B. i Dallner, G.** (1995) *Isoprenylation of plant proteins in vivo. Isoprenylated proteins are abundant in the mitochondria and nuclei of spinach.* J. Biol. Chem. 270, 566-72.
- Song, L. i Poulter, C.D.** (1994) *Yeast farnesyl diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3044-8.
- Soulet, F., Schmid, S.L. i Damke, H.** (2006) *Domain requirements for an endocytosis-independent, isoform-specific function of dynamin-2.* Exp. Cell Res. 312, 3539-45.
- Souret, F.F., Kim, Y., Wyslouzil, B.E., Wobbe, K.K. i Weather, P.J.** (2003) *Scale-up of Artemisia annua L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression.* Biotechnol. Bioeng. 83, 653-67.
- Stanley Fernandez, S.M., Kellogg, B.A. i Poulter, C.D.** (2000) *Farnesyl diphosphate synthase. Altering the catalytic site to select for geranyl diphosphate activity.* Biochemistry 39(50), 15316-21.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M. i Korth, K.L.** (1994) *Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants.* J. Lipid Res. 35, 1133-40.

- Suzuki, M., Kamide, Y., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H., Masuda, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yoshida, S. i Muranaka, T.** (2004) *Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels.* Plant J. 37, 750-61.
- Svoboda, J. i Weirich, G.F.** (1995) *Sterol metabolism in the tobacco hornworm, Manduca sexta.* Lipids 30, 263-7.
- Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann T., Redei, J.P., Nagy, F., Schell, J. i Koncz, C.** (1996) *Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis.* Cell 85, 171-82.
- Szkopinska, A. i Plochocka, D.** (2005) *Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity.* Acta Biochim. Pol. 52(1), 45-55.
- Szkopinska, A., Swiezewska, E. i Karst, F.** (2000) *The regulation of activity of main mevalonic acid pathway enzymes: farnesyl diphosphate synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and squalene synthase in yeast Saccharomyces cerevisiae.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 473-7.

T

- Tarshis, L.C., Proteau, P.J., Kellogg, B.A., Sacchettini, J.C. i Poulter, C.D.** (1996) *Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(26), 15018-23.
- Tarshis, L.C., Yan, M., Poulter, C.D. i Sachettini, J.C.** (1994) *Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6Å resolution.* Biochemistry 33, 10871-7.
- Tholl, D., Croteau, R. i Gershenzon, J.** (2001) *Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, gernayl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from Abies grandis (grand fir).* Arch. Biochem. Biophys. 386(2). 233-42.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. i Gibson, T.J.** (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Res. 22, 4673-80.
- Topping, J.F., May, V.J., Muskett, P.R. i Lindsey, K.** (1997) *Mutations in the HYDRA1 gene of Arabidopsis perturb cell shape and disrupt embryonic and seedling morphogenesis.* Development 124, 4415-24.

V

- Van Staden, J.** (1996) *Changes in foliar cytokinins of Salix babylonica and Ginkgo biloba prior and during leaf senescence.* South Afr. J. Bot. 62, 1-10.
- Vicient, C.M., Delseny, M.** (1999). *Isolation of Total RNA Arabidopsis thaliana Seeds.* Analytical Biochemistry 268, 412-413.
- Vriend, G.** (1990) *WHAT IF: a molecular modelling and drug design program.* J. Mol. Graph. 8, 52-6.

W

- Wang, P., Liao, Z., Guo, L., Li, W., Chen, M., Pi, Y., Gong, Y., Sun, X. i Tang, K.** (2004) *Cloning and functional analysis of a cDNA encoding Ginkgo biloba farnesyl diphosphate synthase.* Mol. Cells 28(2), 150-6.

- Weissenborn, D.L., Denbow, C.J., Laine, M., Lang, S.S., Yang, Z., Yu, X. i Cramer, C.L.** (1995) *HMG-CoA reductase and terpenid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway*. *Physiologia plantarum* 93, 393-400.
- Wentzinger, L.F., Bach, T.J. i Hartmann, M.A.** (2002) *Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. *Plant Physiol.* 130(1), 334-46.
- Weststrate, J.A. i Meijer, G.W.** (1998) *Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects*. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52(5), 334-43.
- Wilkin, D.J., Kutsunai, S.Y. i Edwards, P.A.** (1990) *Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester*. *J. Biol. Chem.* 265(8), 4607-14.
- Wilkinson, S.C., Powls, R. i Goad, J.C.** (1994) *The effects of excess exogenous mevalonic acid on sterol and steryl ester biosynthesis in celery (*Apium graveolens*) cell suspension cultures*. *Phytochemistry* 37, 1031-5.
- Winkel, B.S.J.** (2004) *Metabolic channeling in plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 85-107.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M. i Mariani, C.** (1998) *Lipids are required for directional pollen-tube growth*. *Nature* 392, 818-21.
- Y**
- Yeh, L.S. i Rilling, H.C.** (1977) *Purification and properties of pig liver prenyltransferase: interconvertible forms of the enzyme*. *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 718-25.
- Z**
- Zook, M.N. i Kuc, J.A.** (1991) *Induction of sesquiterpene cyclase and supression of squalene synthetase activity in elicitor treated infected potato tuber tissue*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 377-90.