

Universitat de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió IV

**BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES:
CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA FARNESILDIFOSFAT
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana*.**

Núria Cunillera i Segarra
Barcelona, 1999

Universitat de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió IV

**BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES:
CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA FARNESILDIFOSFAT
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana*.**

Memòria presentada per Núria Cunillera i Segarra
per optar al grau de Doctora en Farmàcia.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del
Dr. Albert Ferrer i Prats al Departament de
Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió IV de la
Facultat de Farmàcia.

Barcelona, juny de 1999.

Vistiplau de

Director de la Tesi i Tutor

Autora

Dr. Albert Ferrer i Prats

Núria Cunillera i Segarra

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada amb l'ajut d'una beca predoctoral per a la formació d'investigadors de la Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya. El treball s'ha dut a terme amb el suport econòmic dels projectes:

PB93-0753: Análisis molecular de la biosíntesis de isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*. DGITYT. MEC.

PB96-0176: Organización y regulación de la biosíntesis de isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*. DGES. MEC.

Acciones Integradas Hispano-Francesas HF-19B y HF290 (1995-1996): Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Análisis molecular de las enzimas mevalonato quinasa y farnesilpirofosfato sintasa. MEC.

Projectes per potenciar grups de qualitat GRQ94-1034, 1995SGR-00457 i 1997SGR-00088. Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya.

**Si plores per perdre el sol,
les llàgrimes no et deixaran veure les estrelles**

Rabindranath Tagore

Agraïments

Voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que durant la realització d'aquest treball, d'una manera o altra, han contribuït a la meva formació, tan professional com personal.

Al Dr. Albert Ferrer, per haver-me ofert l'oportunitat de realitzar la Tesi Doctoral sota la seva direcció, i de qui en tot moment he rebut coneixements i suport incondicional. I més especialment, per poder compartir la seva amistat.

Al Dr. Albert Boronat, per la seva col.laboració en l'orientació d'aquesta Tesi, per la seva confiança posada en mi i pel seu interès en el meu treball.

Al Dr. Francis Karst, gràcies a la col.laboració del qual va ser possible iniciar aquest treball. Voldria agrair-li també haver-me permès treballar en el seu laboratori. I voldria donar les gràcies especialment, a en Didier, amb qui vaig començar a caminar en el món dels llevats, i a la Rachida i a tota la gent del laboratori, que van fer de la meva estada a Poitiers una experiència inoblidable.

Al Dr. Wolfgang Schuster, que desinteressadament em va acollir en el seu laboratori a Berlín per ensenyar-me com purificar mitocondries de patata i com realitzar experiments d'importació *in vitro*. Sense els seus consells, potser encara estaria pelant patates...

A tots els companys del laboratori que treballem amb *Arabidopsis*, és a dir, els que formem el grup "Ara-lab". A la Montse, com la persona més veterana del grup que és, i que sempre troba el moment per ajudar-te quan li ho demanes. A les "ara-noies" que ja han marxat, l'Encarna i la Gemma, i a les "ara-noies" que encara hi són, la Toni i l'Àngela. Durant aquests anys que hem compartit, hem après a avançar no només en el món de la Biologia Molecular, sinó pels camins de la vida. I també al David, al Konrad, i al Xavier, que passaran a la història com els primers "ara-nois".

Als companys del nostre grup que treballen al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Química, amb els qui sovint hem intercanviat bocins de ciència.

A tot el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Divisió IV perquè, en un o altre moment, tothom m'ha ofert ajut i amistat.

També voldria agrair d'una manera molt especial el suport rebut de la meua família: dels meus pares, als quals dec tot el que sóc; del meu germà, que m'ha intentat inculcar les poques nocions d'informàtica que tinc; i de la família Pineda, que des de ja fa temps són també la meua família. El seu suport, silenciós i constant, ajuda a superar totes les dificultats.

I finalment, però a la vegada en primer lloc, al Jordi, a qui amb paraules mai podré agrair-li que comparteixi la vida amb mi.

Abreviatures

ABA	Àcid abscísic
ANA	Àcid 2-naftalenacètic
BSA	Albúmina sèrica bovina
CoxIV	Subunitat IV de la citocrom C oxidasa
cpm	comptes per minut
CTAB	Bromur d'hexadeciltrimetilamoni
Da, kDa	Dalton, kilodalton
DEPC	Dietilpirocarbonat
DMAEPP	dimetilaminoetildifosfat
DMAPP	Dimetilal.lildifosfat
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNTPs	Deoxirribonucleòtids
DTT	Ditiotreitol
DXP	1-deoxi-D-xil.lulosa-5-fosfat
DXR	1-deoxi-D-xil.lulosa-5-fosfat reductoisomerasa
DXS	1-deoxi-D-xil.lulosa-5-fosfat sintasa
erg	ergosterol
FARM	Primer domini ric en aspartats (First Aspartat Rich Motif)
FPP	Farnesildifosfat
FPS	Farnesildifosfat sintasa
FTasa	Farnesil proteïna transferasa
GAP	Gliceraldèhidfosfat
GFPP	Geranilfarnesildifosfat
GFPS	Geranilfarnesildifosfat sintasa
GGPP	Geranilgeranildifosfat
GGPS	Geranilgeranildifosfat sintasa
GPP	Geranildifosfat
GPS	Geranildifosfat sintasa
GUS	β -glucuronidasa
HepPP	Heptaprenildifosfat
HepPS	Heptaprenildifosfat sintasa
HexPP	Hexaprenildifosfat
HexPS	Hexaprenildifosfat sintasa
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzim A reductasa
IPP	Isopentenildifosfat
ME	2-metileritritol
MEP	2-metileritritol-4-fosfat
MES	Àcid 2-morfolietansulfònic
min	minut
MOPS	Àcid 4-morfolipropanosulfònic
MU	4-metilumbel.liferona
MUG	4-metilumbel.liferil β -D-glucurònid

MVK	Mevalonat quinasa
NADH	Nicotinamidoadenín dinucleòtid
NADP ⁺	Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat
nt	Nucleòtids
pb, kb	Parells de bases, kilobases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
RACE	Amplificació ràpida d'extrems de cDNA
RE	Reticle endoplasmàtic
rpm	revolucions per minut
RT	Retrotranscripció
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SQS	Esqualè sintasa
tRNA	RNA de transferència
Trp	Triptòfan
UPP	Undecaprenildifosfat
UPS	Undecaprenildifosfat sintasa
Ura	Uracil
xg	gravetats
X-GLU	5-brom-4-clor-3-indolil β -D-glucurònid

ÍNDIX

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	1
INTRODUCCIÓ	
1. Biosíntesi de compostos isoprenoides en plantes.	3
2. Compartimentació subcel.lular i organització en canals metabòlics de la via de síntesi d'isoprenoides en plantes.	7
2.1. Models de compartimentació dels enzims de la via de síntesi d'isoprenoides.	7
2.2. La via de síntesi d'IPP independent de mevalonat.	13
2.3. La via del metileritritolfosfat en plantes.	16
2.4. Hi ha cooperació entre les dues vies de síntesi d'IPP?	19
2.5. Model d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics.	21
3. Regulació de la biosíntesi d'isoprenoides.	26
4. Preniltransferases.	31
4.1. Classificació de les preniltransferases.	32
4.1.1. Preniltransferases de tipus I: <i>E</i> -prenildifosfat sintases de cadena curta.	32
4.1.2. Preniltransferases de tipus II: <i>E</i> -prenildifosfat sintases de cadena mitjana.	34

4.1.3. Preniltransferases de tipus III: <i>E</i> -prenildifosfat sintases de cadena llarga.	35
4.1.4. Preniltransferases de tipus IV: <i>Z</i> -prenildifosfat sintases.	36
4.2. Comparació de les estructures primàries de les preniltransferases.	37
4.3. Estructura tridimensional de la FPS.	38
4.4. Determinació del mecanisme catalític de les <i>E</i> -preniltransferases.	39
4.4.1. Funció dels aminoàcids conservats.	39
4.4.2. Mecanisme de determinació de la longitud del producte de reacció.	42

MATERIALS I MÈTODES

1. Condicions de cultiu de plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	45
1.1. Cultius estèrils.	46
1.2. Cultius en testos.	47
2. Southern blot genòmic.	47
2.1. Obtenció de DNA genòmic d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	47
2.2. Electroforesi i transferència de DNA genòmic.	49
2.3. Hibridació i rentats.	49
2.4. Sondes utilitzades.	50
3. Aïllament de clons genòmics.	50
4. Southern de fragments.	51
5. Northern blot.	51
5.1. Obtenció d'RNA total de diferents teixits d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	51
5.2. Electroforesi i transferència d'RNA.	53
5.3. Hibridació i rentats.	53
5.4. Sondes utilitzades.	54
6. RACE.	55
6.1. Detecció de missatgers.	55
6.2. Clonatge dels cDNAs FPS1L i FPS2.	57
6.3. Determinació de l'inici de transcripció del gen <i>FPS2</i> .	59

7.	Protecció enfront la digestió amb RNAsa.	63
	7.1. Preparació de la ribosonda.	63
	7.2. Protecció enfront la digestió amb RNAsa.	65
8.	Mutagènesi dirigida.	66
	8.1. Obtenció de DNA de cadena senzilla.	66
	8.2. Síntesi de la cadena mutagenitzada.	67
	8.3. Construccions i encebadors utilitzats en la mutagènesi dirigida.	68
9.	Complementació funcional de mutants de llevat.	69
	9.1. Soques i vectors.	69
	9.2. Condicions de cultiu.	71
	9.3. Construccions utilitzades per la complementació funcional de mutants de llevat.	72
	9.4. Transformació de llevats.	73
	9.5. Assaig de complementació funcional.	75
	9.6. Anàlisi genètica de llevats.	76
10.	Assaig d'activitat FPS.	77
	10.1. Preparació de l'extracte cel.lular.	77
	10.2. Quantificació de les proteïnes.	78
	10.3. Assaig d'activitat FPS.	78
	10.4. Anàlisi dels productes de reacció.	79
11.	Experiments de transcripció-traducció <i>in vitro</i> .	80
	11.1. Descripció de les construccions utilitzades.	80
	11.2. Sistemes de transcripció-traducció <i>in vitro</i> .	81
12.	Experiments d'importació de proteïnes a mitocondries.	81
	12.1. Purificació de mitocondries de patata.	81
	12.2. Assaig d'importació de proteïnes a mitocondries purificades de patata.	83
13.	Expressió transitòria en protoplastes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	85
	13.1. Descripció de les construccions utilitzades en els experiments d'expressió transitòria en protoplastes.	85
	13.2. Purificació del DNA dels plasmidis utilitzats per la transfecció de protoplastes.	89

13.3.	Manteniment de la línia cel.lular T87 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	91
13.4.	Obtenció de protoplastes a partir de la suspensió cel.lular de la línia T87.	91
13.5.	Transfecció de protoplastes.	93
13.6.	Assaig d'activitat GUS.	94
14.	Generació i anàlisi de plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	96
14.1.	Descripció de les construccions utilitzades per generar plantes transgèniques.	96
14.2.	Transformació d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	96
14.3.	Mètode d'infiltració al buit.	98
14.4.	Selecció de plantes transgèniques.	100
14.5.	Comprovació per PCR de la integració del transgèn en el genoma de la planta.	101
14.6.	Anàlisi de les plantes transgèniques.	102

RESULTATS

1.	Clonatge dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	105
1.1.	Determinació de la complexitat genòmica de la FPS d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	105
1.2.	Clonatge dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	106
1.3.	Anàlisi estructural dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	112
2.	Estudi de l'expressió dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> per Northern blot.	115
3.	Aïllament i caracterització d'un cDNA d' <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica l'isoenzim FPS2.	117
3.1.	Clonatge d'un cDNA que codifica l'isoenzim FPS2.	117
3.2.	Determinació de l'inici de transcripció del gen <i>FPS2</i> .	120
3.3.	Anàlisi comparativa dels isoenzims FPS1 i FPS2.	121
3.4.	Confirmació de l'activitat farnesildifosfat sintasa de l'isoenzim FPS2.	122

4. Identificació i caracterització d'un isoenzim mitocondrial de la FPS d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	126
4.1. Detecció i clonatge d'un nou mRNA derivat del gen <i>FPS1</i> .	126
4.2. Determinació dels inicis de transcripció del gen <i>FPS1</i> .	128
4.3. Anàlisi per Northern blot de l'expressió dels mRNAs derivats del gen <i>FPS1</i> .	130
4.4. Anàlisi funcional <i>in vitro</i> del codó AUG distal de l'mRNA <i>FPS1L</i> .	132
4.5. Anàlisi teòrica de l'extensió aminoterminal de la isoforma <i>FPS1L</i> .	132
4.6. Anàlisi funcional <i>in vivo</i> de l'extensió aminoterminal de la isoforma <i>FPS1L</i> .	135
4.7. Importació <i>in vitro</i> de la isoforma <i>FPS1L</i> a mitocondries de planta.	138
5. Anàlisi del patró d'expressió dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> en plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	142
5.1. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73) <i>FPS1S-GUS</i> en plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	142
5.1.1. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73) <i>FPS1S-GUS</i> durant la fase vegetativa del desenvolupament de la planta.	144
5.1.2. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73) <i>FPS1S-GUS</i> durant la fase reproductiva del desenvolupament de la planta.	145
5.2. Patró d'expressió del gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> en plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	151
5.2.1. Patró d'expressió del gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> durant la fase vegetativa del desenvolupament de la planta.	152
5.2.2. Patró d'expressió del gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> durant la fase reproductiva del desenvolupament de la planta.	155
6. Anàlisi de les regions 5'-flanquejants dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	163
6.1. Estudis d'expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS1</i> .	163
6.2. Estudis d'expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> .	167
6.3. Estudis d'expressió estable en <i>Arabidopsis</i> de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> .	170

DISCUSSIÓ

1. <i>Arabidopsis thaliana</i> conté una petita família multigènica que codifica FPS.	175
2. El gen <i>FPS1</i> és un gen bifuncional que codifica una isoforma citosòlica i una isoforma mitocondrial de FPS.	178
2.1. El gen <i>FPS1</i> genera dos mRNAs que es troben sota el control de promotors alternatius.	178
2.2. La isoforma <i>FPS1L</i> és precursora d'una FPS mitocondrial.	179
3. Els gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> presenten patrons d'expressió diferencials.	185
3.1. Anàlisi de l'expressió dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> per Northern blot.	185
3.2. La isoforma <i>FPS1S</i> presenta un patró d'expressió de tipus "housekeeping".	187
3.3. El gen <i>FPS2</i> presenta un patró d'expressió especialitzat.	188
4. Anàlisi de les regions 5'-flanquejants dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> .	196
4.1. Anàlisi de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS1</i> .	197
4.2. Anàlisi de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> .	198

CONCLUSIONS	203
--------------------	-----

ANNEXOS

ANNEX I: Aliniament múltiple de les seqüències d'aminoàcids de 14 FPS de plantes.	205
ANNEX II: Aliniament múltiple de seqüències d'aminoàcids de FPS de plantes, mamífers, fongs i bacteris.	209
ANNEX III: Publicacions generades a partir d'aquest treball.	215

BIBLIOGRAFIA	217
---------------------	-----

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Esquema simplificat de la via de biosíntesi d'isoprenoides en plantes.	5
Figura 2. Models de compartimentació dels enzims de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes.	8
Figura 3. Esquema de la via del metileritritolfosfat síntesi d'IPP.	14
Figura 4. Model de distribució subcel.lular de les dues vies de síntesi d'IPP en plantes.	18
Figura 5. Models d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en plantes.	23
Figura 6. Reaccions catalitzades per les preniltransferases.	32
Figura 7. Classificació de preniltransferases.	33
Figura 8. Representació esquemàtica dels set dominis conservats entre <i>E</i> -preniltransferases.	37
Figura 9. Esquema de l'estratègia utilitzada pel clonatge del cDNA FPS2 d' <i>Arabidopsis</i> .	58
Figura 10. Esquema de la determinació de l'extrem 5' de l'mRNA FPS2 d' <i>Arabidopsis</i> mitjançant l'estratègia de RACE.	60
Figura 11. Mapa de restricció del cDNA de la FPS d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	106
Figura 12. Anàlisi mitjançant experiments de Southern blot de la complexitat genòmica de la FPS d' <i>Arabidopsis</i> .	107
Figura 13. Anàlisi dels clons genòmics mitjançant Southern blot.	109
Figura 14. Representació esquemàtica i mapa de restricció de les regions genòmiques que contenen els gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	110
Figura 15. Estructura dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	113
Figura 16. Anàlisi del patró d'expressió dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> mitjançant Northern blot.	116
Figura 17. Seqüència nucleotídica del cDNA FPS2 d' <i>Arabidopsis</i> , i aliniament de les seqüències aminoacídiques dels isoenzims FPS1 i FPS2.	118
Figura 18. Transcripció i traducció <i>in vitro</i> del cDNA FPS2.	120
Figura 19. Complementació funcional de la soca mutant de llevat CC25 amb el plasmidi pNCFPS2.	123

Figura 20. Identificació dels productes de reacció dels assajos <i>in vitro</i> d'activitat FPS en extractes proteics de les soques CC25, CC25[pNCFPS2] i NC1.	124
Figura 21. Seqüència de nucleòtids de la regió 5' del gen <i>FPS1</i> , i seqüència deduïda d'aminoàcids de l'extrem NH ₂ -terminal de la proteïna FPS1L.	127
Figura 22. Determinació dels inicis de transcripció del gen <i>FPS1</i> d' <i>Arabidopsis</i> mitjançant protecció enfront la digestió amb RNAsa.	129
Figura 23. Anàlisi per Northern blot del patró d'expressió dels mRNAs derivats del gen <i>FPS1</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	131
Figura 24. Anàlisi funcional <i>in vitro</i> del codó AUG distal de l'mRNA FPS1L.	133
Figura 25. Anàlisi de l'extensió NH ₂ -terminal de la isoforma FPS1L d' <i>Arabidopsis</i> .	134
Figura 26. Complementació funcional de la soca mutant de llevat WSR amb el plasmidi pFPS1Ltp-YΔCOX.	137
Figura 27. Anàlisi de la influència del sistema de transcripció-traducció <i>in vitro</i> de la proteïna precursora RPS10 en el procés d'importació a mitocòndries purificades de patata.	139
Figura 28. Importació de la proteïna FPS1L d' <i>Arabidopsis</i> a mitocòndries purificades de patata.	141
Figura 29. Representació esquemàtica del gen quimèric (-1476/+73) <i>FPSIS-GUS</i> utilitzat per generar plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	143
Figura 30. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase vegetativa del desenvolupament en plantes d' <i>Arabidopsis</i> transformades amb el gen quimèric (-1476/+73) <i>FPSIS-GUS</i> .	147
Figura 31. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase reproductiva del desenvolupament en plantes d' <i>Arabidopsis</i> transformades amb el gen quimèric (-1476/+73) <i>FPSIS-GUS</i> .	149
Figura 32. Representació esquemàtica del gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> utilitzat per generar plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	151
Figura 33. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase vegetativa del desenvolupament en plantes d' <i>Arabidopsis</i> transformades amb el gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> .	153
Figura 34. Localització histoquímica de l'activitat GUS en diferents estadis florals de plantes d' <i>Arabidopsis</i> transformades amb el gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> .	157

Figura 35. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase reproductiva del desenvolupament en plantes d' <i>Arabidopsis</i> transformades amb el gen quimèric (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> . Diferents estadis de la fructificació.	161
Figura 36. Seqüència nucleotídica de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS1</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	164
Figura 37. Anàlisi mitjançant expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments delecionats per l'extrem 5' de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS1</i> d' <i>Arabidopsis</i> fusionats al gen marcador <i>uidA</i> .	165
Figura 38. Seqüència nucleotídica de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	168
Figura 39. Anàlisi mitjançant expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments delecionats per l'extrem 5' de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> fusionats al gen marcador <i>uidA</i> .	169
Figura 40. Comprovació per PCR de la integració dels diferents transgens en les plantes transformades amb construccions que contenen fragments de la regió 5' del gen <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	171
Figura 41. Anàlisi de la seqüència compresa entre les posicions -111 i +65 de la regió 5'-flanquejant del gen <i>FPS2</i> .	200

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Genotip de les soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	70
Taula 2. Vectors d'expressió en llevat.	70
Taula 3. Seqüències nucleotídiques i posicions dels encebadors sentit utilitzats per generar les construccions delecionades per l'extrem 5' del gen <i>FPS1</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	87
Taula 4. Seqüències nucleotídiques i posicions dels encebadors sentit utilitzats per generar les construccions delecionades per l'extrem 5' del gen <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	88
Taula 5. Seqüències dels encebadors sentit utilitzats en la PCR per comprovar la integració dels transgens al genoma de les plantès, i mida dels fragments generats en l'amplificació.	102
Taula 6. Comparació de les mides i percentatge d'identitat a nivell de nucleòtids i d'aminoàcids entre els exons i els introns equivalents dels gens <i>FPS1</i> i <i>FPS2</i> d' <i>Arabidopsis</i> .	114

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

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

L'enzim farnesildifosfat sintasa (FPS) catalitza la condensació seqüencial de dues molècules d'isopentenildifosfat, una amb dimetilal·lildifosfat i l'altra amb l'intermediari de 10 carbonis geranildifosfat, per produir el compost de 15 carbonis farnesildifosfat. En plantes, el farnesildifosfat és el punt de partida d'un gran nombre de ramificacions de la via que condueixen a la síntesi de tota una sèrie de derivats isoprenoides com són, per exemple, els fitoesterols, els brassinoesteroides, els dolícols, les ubiquinones, el grup hem a i les fitoalexines sesquiterpèniques. A més, el farnesildifosfat és utilitzat per la prenilació de proteïnes. En conseqüència, canvis en l'activitat FPS poden alterar el flux d'isoprenoides a través de les diverses ramificacions de la via i, per tant, desenvolupar un paper clau en la regulació de tota una sèrie de funcions essencials per les plantes.

En el moment d'iniciar el treball que constitueix aquesta Tesi Doctoral, es disposava de molt poca informació relativa a la FPS de plantes, i únicament havia estat clonat un cDNA codificant per la FPS d'*Arabidopsis thaliana*. A més, tot i que estava acceptat que hi havia síntesi d'isoprenoides específics a partir d'IPP en tres compartiments subcel·lulars, citosol-reticle endoplasmàtic, cloroplastes i mitocòndries, només s'havia detectat activitat FPS en el citosol-reticle endoplasmàtic. Amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement de la regulació, l'organització i la compartimentació de la via de síntesi d'isoprenoides en plantes, es va iniciar el treball que es presenta a continuació, centrat en la caracterització molecular de l'enzim farnesildifosfat sintasa d'*Arabidopsis thaliana*. En concret, els objectius proposats van ser els següents:

1. Determinar el número de gens que codifiquen FPS a *Arabidopsis thaliana* i clonar-los per procedir a la seva caracterització.
2. Determinar els patrons d'expressió dels gens FPS mitjançant experiments de Northern blot i mitjançant la generació i anàlisi d'*Arabidopsis* transgèniques portadores de construccions que continguin les regions 5'-flanquejants dels gens FPS fusionades al gen marcador *uidA* d'*Escherichia coli*.
3. Identificar les regions del promotor implicades en el control de l'expressió dels gens FPS mitjançant l'expressió transitòria en protoplastes i l'expressió estable en *Arabidopsis* transgèniques de construccions que continguin fragments progressivament delecionats per l'extrem 5' de les regions 5'-flanquejants dels gens FPS fusionats al gen marcador *uidA* d'*Escherichia coli*.

A més, durant el desenvolupament dels objectius proposats inicialment, es va plantejar un objectiu addicional:

4. Estudiar l'existència d'un segon mRNA producte de l'expressió del gen *FPS1*, i si la isoforma FPS codificada per aquest mRNA correspon a una FPS de localització mitocondrial.

INTRODUCCIÓ

1. BIOSÍNTESI DE COMPOSTOS ISOPRENOIDES EN PLANTES.

Les plantes produeixen una gran varietat de compostos isoprenoides, que constitueixen un conjunt molt heterogeni de productes amb estructures i funcions molt diferents. Fins l'actualitat, s'han descrit més de 29.000 compostos de naturalesa isoprenoide (Chapman i Hall, 1996), la qual cosa fa que els isoprenoides formin la major família de productes naturals descrita. Malgrat aquesta gran diversitat estructural i funcional, tots els compostos isoprenoides deriven d'un precursor estructural comú de cinc àtoms de carboni, que és l'isopentenildifosfat (IPP).

Clàssicament, els isoprenoides, també anomenats terpenoides, s'han classificat en funció del número d'àtoms de carboni en hemiterpens (C_5), monoterpens (C_{10}), sesquiterpens (C_{15}), diterpens (C_{20}), triterpens (C_{30}), tetraterpens (C_{40}) i politerpens ($>C_{40}$). En plantes, una classificació basada en un criteri funcional divideix els isoprenoides en dos grans grups, segons si es consideren metabòlits primaris o secundaris (Chappell, 1995a i b; Newman i Chappell, 1997). Com a metabòlits primaris, s'inclouen compostos essencials pel creixement i desenvolupament de les plantes, mentre que com a metabòlits secundaris s'inclouen compostos que no són essencials per la viabilitat de la planta, però que són importants en la resposta d'adaptació d'aquesta al medi. Entre els isoprenoides considerats metabòlits primaris, hi ha esterols, implicats en el manteniment de l'estructura de les membranes, carotenoides, que tenen funcions

fotoprotectors, i diferents hormones com les giberel·lines, l'àcid abscísic, les citoquinines i els brassinoesteroides. També s'inclouen en aquest grup de metabòlits primaris derivats isoprenoides com les quinones (ubiquinona i plastoquinona) i els dolícols, que estan involucrats en el transport d'electrons i en la glicosilació de proteïnes, respectivament. A més, prenillfosfats com el FPP i el GGPP s'utilitzen com a donadors de grups prenil en el procés de prenilació de proteïnes, mecanisme que promou la interacció amb les membranes i l'activació de proteïnes involucrades en processos com la transducció de senyals, la biogènesi de membranes i el control del cicle cel·lular.

Entre els isoprenoides classificats com metabòlits secundaris, es troben monoterpens, sesquiterpens i diterpens. La funció d'aquests compostos és actuar com mediadors de les interaccions de la planta amb altres plantes, amb insectes o amb agents patògens. Alguns exemples de metabòlits secundaris són substàncies atractants d'insectes, per facilitar la pol·linització, o bé substàncies de defensa enfront infeccions fúngiques o bacterianes, com les fitoalexines. Entre els metabòlits secundaris figuren també compostos importants pel seu interès econòmic, com el cautxú natural, els olis essencials, les sapogenines o el taxol.

Malgrat la importància de les funcions que els isoprenoides desenvolupen i el valor econòmic que alguns d'ells tenen, molts aspectes del metabolisme d'isoprenoides en plantes i, en particular, de la seva regulació, encara són relativament poc coneguts. Un dels motius principals és que la biosíntesi d'isoprenoides en plantes té lloc a través d'una via metabòlica molt complexa. En la figura 1 es mostra un esquema simplificat d'aquesta via metabòlica, en la que es poden considerar tres parts ben diferenciades. La primera part comprèn les etapes que condueixen a la síntesi d'IPP que, tal com s'ha indicat, és la unitat estructural bàsica de la qual deriven tots els isoprenoides. La síntesi d'IPP, com es veurà més endavant, pot tenir lloc a través de dues vies metabòliques diferents: l'anomenada via del mevalonat (a vegades referida com via clàssica) i la recentment identificada via del metileritritolfosfat (també referida com via de Rohmer o via alternativa) que utilitza com a precursors piruvat i gliceraldèhid-3-fosfat, i de la qual encara no es coneixen totes les etapes. En la via del mevalonat (indicada en la figura 1),

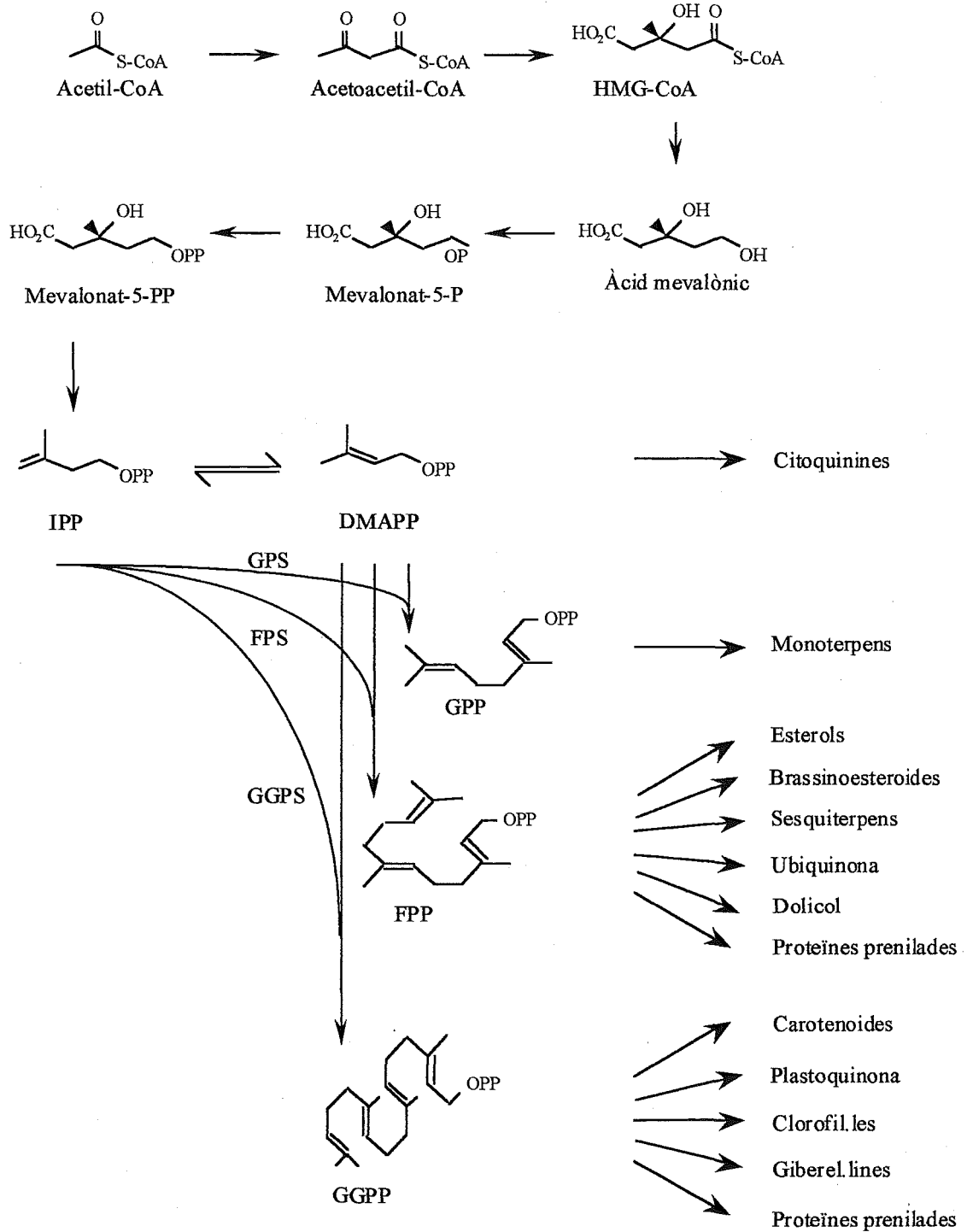


Figura 1. Esquema simplificat de la via de biosíntesi d'isoprenoides en plantes (adaptat de McGarvey i Croteau, 1995).

tres molècules d'acetil-CoA són condensades per generar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que és posteriorment convertit en mevalonat per acció de l'HMG-CoA reductasa (HMGR). A continuació, el mevalonat és fosforilat i descarboxilat per generar IPP.

La segona part de la via metabòlica inclou les etapes que porten a la síntesi d'una sèrie de prenifosfats de diferent longitud, geranildifosfat (GPP, C₁₀), farnesildifosfat (FPP, C₁₅) i geranilgeranildifosfat (GGPP, C₂₀). En l'etapa inicial, l'IPP, que no és prou reactiu per ionitzar-se i iniciar les condensacions que han de donar lloc a isoprenoides més grans, és convertit en el seu isòmer dimetilal·lildifosfat (DMAPP) per acció de l'enzim IPP isomerasa. Posteriorment, l'acció de les preniltransferases GPP sintasa (GPS), FPP sintasa (FPS) i GGPP sintasa (GGPS) sobre els precursors IPP i DMAPP genera els prenifosfats GPP, FPP i GGPP, respectivament. El conjunt de reaccions requerides per la síntesi d'aquests prenifosfats a partir d'acetil-CoA constitueix el que tradicionalment s'anomena la part troncal de la via de síntesi d'isoprenoides. Els prenifosfats esmentats anteriorment són els punts de partida de diferents ramificacions que condueixen a la síntesi de la gran diversitat de compostos isoprenoides. Aquestes ramificacions, que s'originen principalment a partir de FPP i de GGPP, constitueixen la tercera part de la via metabòlica. A partir del FPP té lloc la síntesi de compostos tan diversos com els esterols, els brassinoesteroides, les fitoalexines sesquiterpèniques, la ubiquinona o el dolicol. A partir de GGPP s'inicia la síntesi de carotenoides, plastoquinona, clorofil·les o giberel·lines. FPP i GGPP també són substrats de les proteïna preniltransferases, implicades en la prenilació de proteïnes.

A més de la gran complexitat d'aquesta via metabòlica, una altra de les raons que ha dificultat l'estudi de la biosíntesi d'isoprenoides és la tendència que tenen els isoprenoides, en general, a acumular-se durant períodes de temps molt llargs, com és el cas dels esterols, o bé a sintetitzar-se en baixa quantitat en tipus cel·lulars específics o en teixits molt determinats i/o en estadis molt concrets del desenvolupament, com és el cas, per exemple, de les hormones sintetitzades en cèl·lules meristemàtiques, o bé els monoterpens, sesquiterpens i diterpens sintetitzats en glàndules, conductes i tricomes. Això fa que molts dels enzims implicats en la síntesi de compostos isoprenoides es

trobin presents en molt baixa quantitat, de manera que els seus nivells d'activitat a la planta estiguin per sota dels límits de detecció dels assajos enzimàtics disponibles i la seva purificació sigui particularment difícil. Per aquestes raons, la utilització de les tècniques de Biologia Molecular ha estat de gran utilitat en l'estudi de la biosíntesi d'isoprenoides, que s'ha centrat principalment en tres grans aspectes: l'organització i la compartimentació subcel.lular de la via metabòlica i la seva regulació.

2. COMPARTIMENTACIÓ SUBCEL.LULAR I ORGANITZACIÓ EN CANALS METABÒLICS DE LA VIA DE SÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES.

Un dels aspectes més controvertits de la biosíntesi d'isoprenoides és el que fa referència a l'organització i la compartimentació subcel.lular de la via metabòlica, ja que si bé és conegut que a partir d'IPP hi ha síntesi de compostos isoprenoides específics en tres compartiments ben diferenciats, citosol-reticle endoplasmàtic (RE) (esterols i dolícols), plastidis (clorofil·les, carotenoides, plastoquinona) i mitocòndries (ubiquinona, hem a) (Gray, 1987; Kleinig 1989), la localització subcel.lular dels enzims involucrats en la síntesi d'IPP no està definitivament establerta.

2.1. Models de compartimentació dels enzims de la via de síntesi d'isoprenoides.

Dues han estat les hipòtesis que han intentat explicar la compartimentació de la síntesi d'IPP en plantes (fig. 2). La primera de les hipòtesis postulava que la síntesi d'isoprenoides a partir d'acetil-CoA tenia lloc de forma independent en els tres compartiments (citosol-RE, plastidis i mitocòndries). Aquesta hipòtesi es fonamentava en estudis d'incorporació de $^{14}\text{CO}_2$ i (2 ^{14}C)-mevalonat (Goodwin i Mercer, 1963;

Goodwin, 1965), en els que s'havia va observar un marcatge preferencial a partir de $^{14}\text{CO}_2$ dels compostos isoprenoides sintetitzats en els cloroplastes, mentre que el marcatge dels isoprenoides no cloroplastídics era més gran quan s'utilitzava (2^{14}C)-mevalonat. Aquests resultats van ser posteriorment confirmats per altres autors (Griffith *et al.*, 1968; Lichtenthaler *et al.*, 1982; Sergeant i Britton, 1984). A partir d'aquests resultats es va proposar el model anomenat de segregació o compartimentació (fig. 2.A),

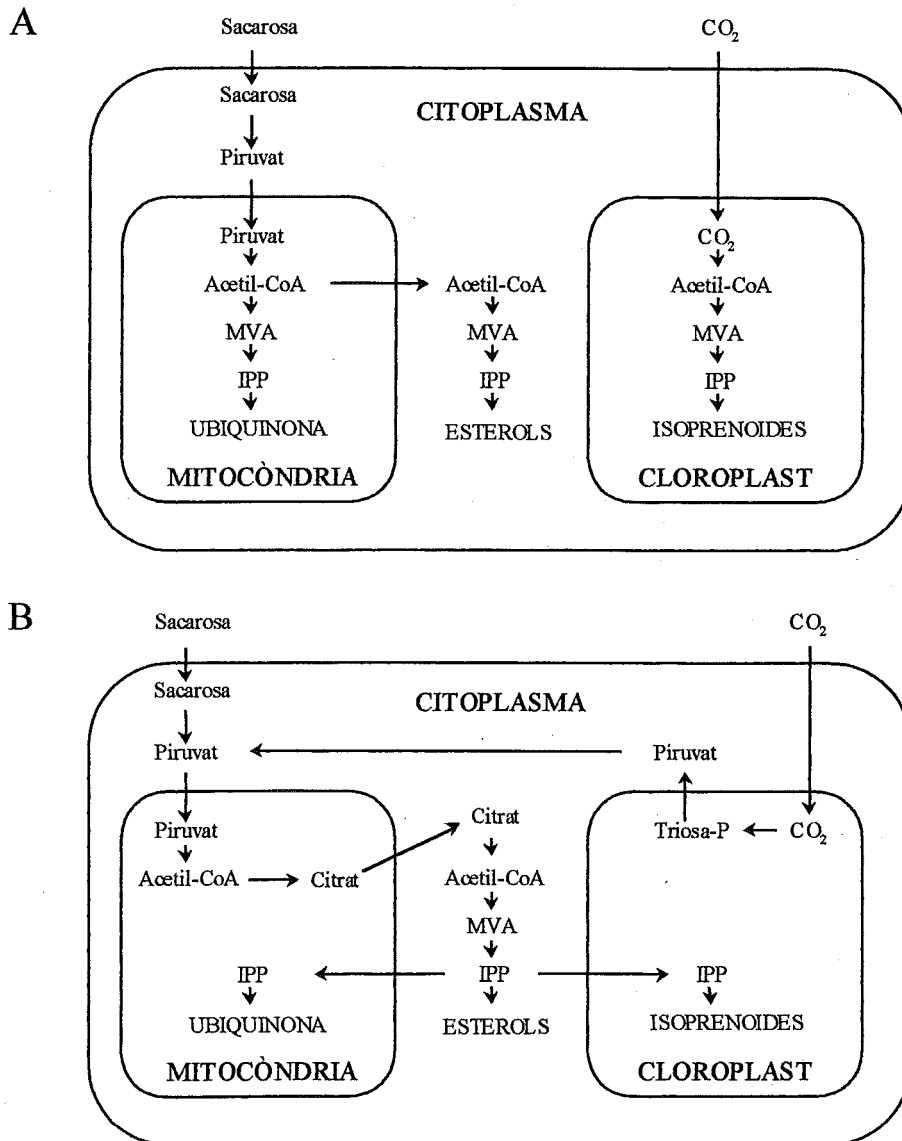


Figura 2. Models de compartimentació dels enzims de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes (segons Gray, 1987). A) Model proposat per Goodwin i Mercer (1963), amb tres vies independents de síntesi d'isoprenoides. B) Model proposat per Kreuz i Kleinig (1984), on l'IPP es sintetitza únicament en el citosol i posteriorment és translocat a l'interior dels orgànuls.

que postulava l'existència de vies separades per la síntesi d'IPP, passant per mevalonat, en cloroplastes, mitocòndries i citosol-RE. Segons aquest model, els compartiments estaven separats per membranes impermeables al mevalonat, i cada un d'ells contenia els enzims necessaris per la síntesi d'IPP a partir d'acetil-CoA.

Aquesta hipòtesi va ser posada en dubte, ja que no estava d'acord amb resultats obtinguts en estudis d'incorporació *in vitro* de substractes marcats radioactivament, ni amb determinacions directes d'activitats enzimàtiques en orgànuls aïllats. Kreuz i Kleinig (1984) i Lutke-Brinkhaus *et al.* (1984) van posar de manifest que les activitats enzimàtiques que transformaven el mevalonat en IPP es localitzaven en el citosol-RE, però no en els cloroplastes ni en les mitocòndries. Van comprovar també que cloroplastes (Kreuz i Kleinig, 1984) i mitocòndries (Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984) podien sintetitzar els seus respectius derivats isoprenoides a partir d'IPP, però no a partir de mevalonat ni de mevalonat 5-difosfat (precursor immediat de l'IPP). Basant-se en aquests resultats, Kreuz i Kleinig van proposar una hipòtesi alternativa, segons la qual els enzims implicats en la síntesi d'IPP estarien localitzats únicament en el citosol-RE, i no es trobarien en plastidis ni mitocòndries (fig. 2.B). Per tant, plastidis i mitocòndries, per sintetitzar els seus isoprenoides específics, haurien de translocar l'IPP produït en el citosol-RE cap al seu interior. Segons els mateixos autors, les membranes de les mitocòndries (Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984) i dels cloroplastes (Kreuz i Kleinig, 1984) eren permeables a l'IPP, tot i no haver-se pogut identificar cap transportador d'IPP en aquests orgànuls.

Encara que aquesta segona hipòtesi semblava ser la més acceptada, tampoc permetia interpretar satisfactòriament els resultats d'experiments en els que s'analitzava l'efecte del tractament amb mevinolina, un potent inhibidor competitiu de l'HMGR, sobre la biosíntesi d'isoprenoides. Bach i Lichtenthaler (1983) havien demostrat que l'aplicació de mevinolina inhibia fortament la biosíntesi d'esterols a *Raphanus sativus* i, en canvi, pràcticament no afectava l'acumulació de clorofil·les i carotenoides en els plastidis. El mateix resultat va ser obtingut en plàntules de *Raphanus sativus* (Schindler *et al.*, 1985) i en cultius cel·lulars de *Sylibum marianum* (Döll *et al.*, 1984). Aquests resultats semblaven indicar que els plastidis podien sintetitzar IPP de forma autònoma,

ja que si la formació d'esterols i d'isoprenoides plastídics depengués de l'IPP sintetitzat al citosol-RE, la síntesi d'isoprenoides en els dos compartiments s'hauria de veure inhibida de la mateixa manera pel tractament amb mevinolina. A més, els autors van explicar que la síntesi d'isoprenoides plastídics no es veia afectada pel tractament amb mevinolina assumint que l'inhibidor no podia penetrar a l'interior dels plastidis. En canvi, pel que fa referència a la síntesi d'isoprenoides en mitocondries, en cultius cel·lulars de *Sylibum marianum* (Doll *et al.*, 1984) i en plàntules de *Raphanus sativus* (Schindler *et al.*, 1985) tractats amb mevinolina, el contingut d'ubiquinona va disminuir, però mai per sota del 50%. Per tant, la biosíntesi d'ubiquinona a les mitocondries semblava ser dependent de la formació d'IPP citoplasmàtic, resultat que estava d'acord amb la hipòtesi de Kreuz i Kleinig. L'efecte diferencial del tractament amb mevinolina sobre la síntesi d'esterols i d'ubiquinona va ser explicat en funció de les diferents afinitats de les preniltransferases pels prenilfosfats intermediaris, de tal manera que el poc IPP format en presència de mevinolina es desviaria principalment cap a la síntesi d'ubiquinona.

Posteriorment, Schulze-Siebert i Schultz (1987) van descriure que els cloroplastes aïllats a partir de fulles joves d'espínacs no incorporaven l'acetat i el mevalonat en la biosíntesi de carotens, mentre que el CO₂, l'àcid fosfoglicèric i el piruvat s'incorporaven eficientment. Aquests resultats no tenien una explicació satisfactòria amb cap de les dues teories anteriors. Els autors van proposar l'existència en plastidis de dos "pools" d'acetil-CoA; un d'ells provindria de l'acetil-CoA sintetasa plastídica, i seria únicament utilitzat per la síntesi *de novo* d'àcids grassos; el segon "pool" d'acetil-CoA provindria del complex plastídic de la piruvat deshidrogenasa i nutriria la biosíntesi d'IPP plastídic. Així doncs, aquests resultats reforçaven la idea que els cloroplastes podien sintetitzar isoprenoides de forma autònoma.

Schultz i col·laboradors van seguir estudiant la incorporació de precursors radioactius a esterols i a isoprenoides cloroplastídics (carotens, α -tocoferol i clorofil·les a i b) utilitzant seccions transversals, a diferents nivells, de fulles de civada, des de la base fins a la punta de la fulla (Heintze *et al.*, 1990). Van observar que la regió basal de les fulles, que conté cloroplastes en desenvolupament, presentava la màxima

incorporació de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ a isoprenoides plastídics, mentre que la incorporació d'aquests precursor a esterols era molt baixa. D'altra banda, la incorporació de $[2-^{14}\text{C}]$ -mevalonat a isoprenoides plastídics augmentava progressivament des de la base fins a l'àpex de la fulla, on hi ha cloroplastes madurs. Es va comprovar que el piruvat actuava com a substrat per a la síntesi d'IPP. Els mateixos autors van proposar que la síntesi d'IPP cloroplastídic començaria per acció del complex de la piruvat deshidrogenasa, que a partir del piruvat generaria un producte de dues unitats de carboni (no acetil-CoA), que reaccionaria amb l'acetil-CoA per formar l'intermediari de la via del mevalonat, acetoacetil-CoA. Aquesta hipòtesi concordava amb l'observació que l'activitat del complex de la piruvat deshidrogenasa disminuïa a mesura que el cloroplast es desenvolupava.

Aquest conjunt de resultats va dur els autors (Schultz i col.laboradors) a proposar un tercer model de compartimentació, segons el qual la biosíntesi d'isoprenoides en cloroplastes variaria durant el desenvolupament de l'orgànul. Segons aquest model, durant les etapes inicials del desenvolupament, el cloroplast seria autònom per la síntesi d'isoprenoides, però a mesura que es produiria la maduració del cloroplast, hi hauria una disminució progressiva de la síntesi endògena d'IPP, acompanyada d'un augment de la quantitat d'IPP translocat. El cloroplast madur importaria tot l'IPP del citosol. Aquesta tercera hipòtesi explicaria l'observació que en fulles de blat, dosis elevades de mevinolina exercien un efecte inhibitori major sobre la síntesi de pigments plastídics en plàntules de 9 dies que en plàntules més joves (Bach i Lichtenthaler, 1983). L'efecte diferencial de la mevinolina sobre l'acumulació de pigments en funció de l'estadi de desenvolupament podria ser deguda no només a una diferent permeabilitat de la coberta plastídica, sinó també a una creixent auxotrofia en relació a la síntesi d'IPP a mesura que el cloroplast madura. Per tant, s'havia arribat a una hipòtesi híbrida entre les dues hipòtesis de compartimentació proposades inicialment, en la que es proposava un model dinàmic de compartimentació de la síntesi d'isoprenoides, variable en funció de l'estadi de desenvolupament.

Donat que l'enzim HMGR és clau en la biosíntesi d'IPP, definir la localització subcel.lular d'aquest enzim podria contribuir de forma rellevant a establir la

compartimentació de la via de síntesi d'IPP. En totes les plantes estudiades, l'enzim HMGR està codificat per famílies multigèniques, compostes per un número de gens variable, que oscil·la entre els dos gens d'*Arabidopsis thaliana* (Caelles *et al.*, 1989; Enjuto *et al.*, 1994) fins als més d'onze descrits en *Solanum tuberosum* (Stermer *et al.*, 1994; Bhattacharyya *et al.*, 1995). Aquest fet semblava recolzar inicialment el model de segregació, ja que l'existència de múltiples isoenzims HMGR estaria d'acord amb la seva localització en diferents compartiments subcel·lulars. No obstant, fins l'actualitat no ha estat possible demostrar de forma definitiva la presència de l'HMGR ni en els plastidis ni en les mitocondries.

Una de les plantes en les que s'ha avançat més en els estudis de localització subcel·lular de l'enzim HMGR és *Arabidopsis thaliana*. Això s'ha vist facilitat pel fet que aquesta planta conté una petita família multigènica que consta només de dos gens, *HMG1* i *HMG2*, que codifiquen tres HMGR diferents: HMGR1S, HMGR1L i HMGR2. Les isoformes HMGR1S i HMGR1L deriven del gen *HMG1* (Lumbreras *et al.*, 1995), i es diferencien únicament pel fet que la isoforma HMGR1L té una extensió aminoterminal addicional de 50 aminoàcids respecte la isoforma HMGR1S. Està demostrat que les tres HMGR d'*Arabidopsis* s'insereixen a les membranes del reticle endoplasmàtic (Enjuto *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995). Posteriorment, Campos i Boronat (1995) han demostrat que els dos dominis hidrofòbics de l'enzim HMGR1S participen en el procés d'inserció de l'enzim a les membranes del RE. La regió aminoterminal i el domini catalític queden orientats cap al citosol, mentre que la regió hidrofílica localitzada entre els dos dominis hidrofòbics queda exposada al lumen del RE. Donat que totes les HMGR de plantes caracteritzades fins el moment presenten una estructura primària molt similar i tenen molt conservats el dos dominis hidrofòbics i la seqüència hidrofílica que els separa, els autors proposen que totes les HMGR descrites es troben inserides en les membranes del reticle endoplasmàtic adoptant la mateixa topologia. Aquests resultats, que han estat confirmats en altres sistemes vegetals (Denbow *et al.*, 1996), suggereixen que l'enzim HMGR està localitzat, probablement de forma exclusiva, en el citosol-RE. Ara bé, la possibilitat que l'HMGR de plantes pugui ser dirigida a plastidis o mitocondries, directament o després de la inserció a RE, no pot ser descartada, tot i que sembla ser altament improbable, ja que no s'ha descrit cap

HMGR que tingui una seqüència amb característiques de pèptid de trànsit a mitocòndries o cloroplastes.

Així doncs, les evidències indicaven que la via de síntesi d'IPP a través de mevalonat operava en el citosol-RE, i no en les mitocòndries ni en els cloroplastes. Ara bé, també es disposava d'evidències que demostraven que en cloroplastes hi havia síntesi autònoma d'IPP. Per tant, la síntesi d'IPP en cloroplastes només podria tenir explicació si aquesta tenia lloc a través d'una via de síntesi diferent a la via del mevalonat.

2.2. La via de síntesi d'IPP independent de mevalonat.

Les primeres evidències de l'existència d'una via de síntesi d'IPP diferent a la del mevalonat van ser obtingudes per Flesch i Rohmer (1988), en estudiar la biosíntesi dels hopanoides, esterols pentacíclics triterpènics produïts per algunes espècies bacterianes. Estudis d'incorporació de precursors com l'acetat, la glucosa, el piruvat i l'eritrosa marcats amb ^{13}C van posar de manifest que les unitats d'isoprè dels hopanoides i de les cadenes laterals de les ubiquinones no es sintetitzaven a través de la via del mevalonat. L'esquema clàssic de síntesi d'IPP va haver de ser abandonat i, en base als patrons de marcatge obtinguts, es va proposar una nova ruta biosintètica per l'IPP que era comú a un conjunt d'espècies bacterianes (Flesch i Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993). La proposta de la nova via de síntesi d'IPP independent del mevalonat incloïa l'addició d'una unitat de C_2 (derivada del piruvat, per descarboxilació) a una unitat C_3 (una triosa fosfat) per acció d'una transcetolasa, seguida d'una reorganització similar a les observades en la síntesi d'aminoàcids ramificats com la valina (Rohmer *et al.*, 1989 i Rohmer *et al.*, 1993). Aquesta nova via metabòlica va ser anomenada via alternativa de síntesi d'IPP o via no dependent de mevalonat. Actualment, aquesta via metabòlica està parcialment elucidada (fig. 3). La primera reacció consisteix en la condensació d'hidroxietiltiamina, provinent de la descarboxilació del piruvat, amb el grup carbonil del gliceraldèhid-3-fosfat (GAP), per

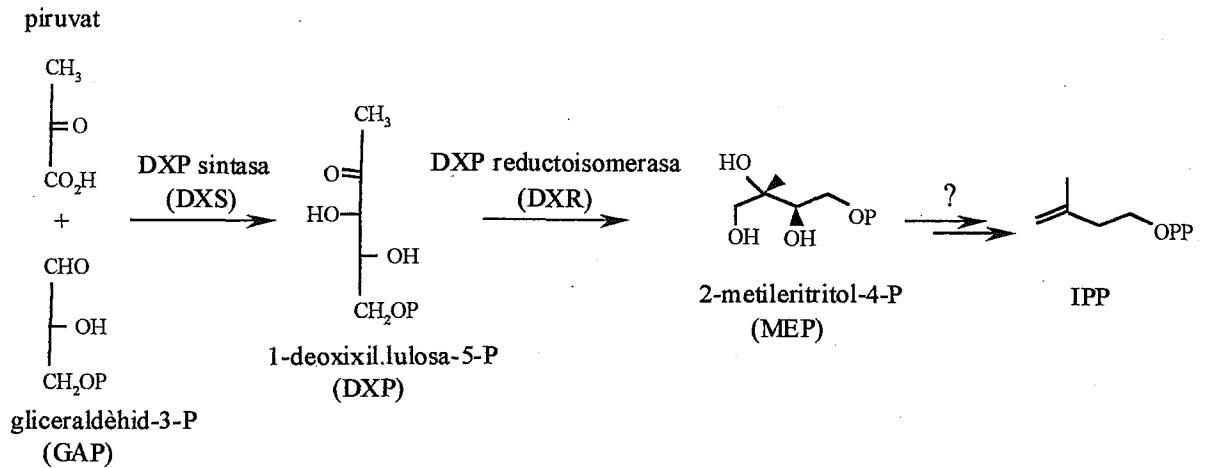


Figura 3. Esquema de la via del metileritritolfosfat de síntesi d'IPP. Les etapes que condueixen a la síntesi d'IPP a partir de MEP encara no han estat determinades.

generar 1-deoxi-D-xil.lulosa-5-fosfat (DXP) (Rohmer *et al.*, 1996). La DXP és també precursora en la biosíntesi de tiamina i piridoxal (Himmeldirk *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1996). El primer intermediari específic de la biosíntesi d'IPP és el 2C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP), format mitjançant reducció i reorganització intramolecular de la DXP (Duvold *et al.*, 1997). Les etapes posteriors que condueixen a la síntesi d'IPP a partir de MEP encara no han estat determinades. Donat que el MEP és el primer intermediari específic en aquesta via de síntesi d'IPP, recentment s'ha proposat que aquesta via sigui anomenada via del metileritritolfosfat o, alternativament, via de Rohmer (4th European Symposium on Plant Isoprenoids, Barcelona, abril 1999).

El clonatge de gens que codifiquen els enzims que catalitzen les dues primeres reaccions de la via del metileritritolfosfat ha permès confirmar definitivament les dues primeres etapes d'aquesta nova via metabòlica. Així, recentment s'han clonat els gens d'*Escherichia coli* que codifiquen la D-1-deoxixil.lulosa-5-fosfat sintasa (DXS), la transcetolasa que catalitza la condensació d'hidroxietiltiamina amb el C1 del D-gliceraldehid-3-fosfat, per donar lloc a la DXP (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998) i la deoxixil.lulosa-5-fosfat reductoisomerasa (DXR) (Takahashi *et al.*, 1998), l'enzim catalitza la formació de MEP, mitjançant reestructuració intramolecular i reducció de la DXP, en un únic pas.

La via del metileritritolfosfat està àmpliament distribuïda en procariotes, mentre que, en canvi, la via del mevalonat només ha estat identificada en algunes espècies (revisat a Horbach *et al.*, 1993). També s'ha observat que en procariotes poden coexistir les dues vies metabòliques de síntesi d'IPP, com és el cas d'*Streptomyces aerioovifer* (Seto *et al.*, 1996).

Un altre grup d'organismes en el que s'ha demostrat l'existència de la via del metileritritolfosfat és el de les algues verdes. Se sabia que en aquests organismes el ¹⁴C-mevalonat no era incorporat a β -carotens (Anderson *et al.*, 1960), esterols (Goodwin, 1981) ni a la fracció lipídica total (Fischer *et al.*, 1962). L'explicació donada per justificar aquesta observació era que les cèl.lules no podien captar el mevalonat extern. També s'havia observat que la presència de mevinolina no inhibia la síntesi d'isoprenoides. El descobriment de la via del metileritritolfosfat ha permès explicar aquests resultats aparentment contradictoris. Estudis d'incorporació de ¹³C-glucosa en *Scenedesmus obliquus* han mostrat que el patró de marcatge dels isoprenoides plastídics i dels esterols està d'acord amb la síntesi d'IPP a través de la via del metileritritolfosfat, i no a través de la via del mevalonat (Schwender *et al.*, 1996). Posteriorment, per estudiar la distribució de la via del metileritritolfosfat entre les algues, s'ha analitzat el patró de marcatge resultant de la incorporació de ¹³C-glucosa en els isoprenoides sintetitzats en diverses algues (cloròfites, rodòfites, crisòfites i euglenòfites) i també en el cianobacteri *Synechocystis* (Schwender *et al.*, 1997; Disch *et al.*, 1998b). Els resultats obtinguts demostren que cloròfites i el cianobacteri sintetitzen tots els isoprenoides a través de la via del metileritritolfosfat. En canvi, rodòfites i crisòfites sintetitzen esterols a través de la via del mevalonat, mentre que sintetitzen els isoprenoides plastídics a través de la via del metileritritolfosfat. Les euglenòfites són els únics organismes eucariotes fototròfics on la via del metileritritolfosfat no s'ha detectat, i que sintetitzen tots els isoprenoides a través de la via del mevalonat.

2.3. La via del metileritritolfosfat en plantes.

Les primeres evidències de l'existència de la via del metileritritolfosfat en plantes es van obtenir a partir d'estudis d'incorporació de precursors marcats amb ^{13}C a isoprenoides, en cultius de *Ginkgo biloba* (Schwartz, 1994). Es va observar que el ^{13}C -mevalonat s'incorporava en baixa proporció als ginkgòlids, mentre que la incorporació a esterols era elevada. En canvi, en presència de glucosa marcada en diferents posicions amb ^{13}C , els ginkgòlids presentaven un patró de marcatge que no corresponia a l'esperat segons la via del mevalonat, i que estava d'acord amb la via de síntesi del metileritritolfosfat (Rohmer *et al.*, 1993). També es va observar que l'esquelet diterpènic dels taxans en *Taxus chinensis* (Eisenreich *et al.*, 1996) i la marrubiïna en *Marrubium vulgare* (Knöss, 1996) es formava a través de la via del metileritritolfosfat.

Experiments duts a terme posteriorment en altres espècies de plantes (*Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* i *Daucus carota*) van permetre comprovar que el patró de marcatge de fitols, β -carotens i la cadena nonaprenil de la plastoquinona estava d'acord amb l'esperat segons la via del metileritritolfosfat. En canvi, els esterols citosòlics presentaven un patró de marcatge que estava d'acord amb la via del mevalonat (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Per tant, aquests resultats van posar de manifest que en les plantes existeixen les dues vies de síntesi d'IPP. A més, el fet que els isoprenoides plastídics es sintetitzessin a través de la via del metileritritolfosfat i els esterols es sintetitzessin a través de la via clàssica va indicar que la nova via de síntesi d'IPP a partir de GAP i piruvat havia d'estar localitzada en plastidis. En altres estudis, s'ha demostrat que la D-1-deoxixilulosa és utilitzada per la síntesi d'isoprè en *Populus nigra*, *Chelidonium maius* i *Salix viminalis* (Zeidler *et al.*, 1997), de fitols en *Lemna gibba* (Schwender *et al.*, 1997) i de carotens, luteïna i fitol en *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1997). També s'ha demostrat que l'IPP, i no el DMAPP, és el producte final de la via del metileritritolfosfat en cèl·lules secretores de *Mentha × piperita* (McCaskill i Croteau, 1999) i en *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1999).

Una evidència directa de la presència de la via del metileritritolfosfat en plantes ha estat obtinguda mitjançant el clonatge de cDNAs que codifiquen la deoxixilulosa-5-fosfat sintasa de *Mentha × Piperita* (Lange *et al.*, 1998) i de *Capsicum annuum* (Bouvier *et al.*, 1998). Amb anterioritat, havia estat descrit un mutant albi d'*Arabidopsis thaliana* (mutant *clal-1*), en el que els cloroplastes aturaven el seu desenvolupament en estadis inicials i, en conseqüència, no acumulaven carotenoides ni clorofil·les (Mandel *et al.*, 1996). Es va clonar el gen *CLAI*, i es va poder observar que codificava una transcetolasa. Encara que inicialment el gen *CLAI* no va ser relacionat amb la via del metileritritolfosfat, posteriorment la seva similitud amb les DXS clonades ha posat de manifest que el gen *CLAI* codifica la DXS d'*Arabidopsis*. A més, tant la DXS d'*Arabidopsis* com la de *Mentha × Piperita* com la de *Capsicum annuum* presenten en la seva seqüència una extensió aminoterminal respecte l'enzim bacterià que té característiques de pèptid de trànsit a cloroplastes, fet que està d'acord amb la localització subcel·lular cloroplastídica de la via del metileritritolfosfat en plantes. Seqüències homòlogues a DXS han estat detectades també en *Oryza sativa*, *Ricinus communis* i *Pinus taeda* (Lois *et al.*, 1998). Recentment, en el nostre laboratori s'ha clonat un cDNA d'*Arabidopsis thaliana* que codifica la DXR d'*Arabidopsis* i que presenta també una extensió NH₂-terminal amb característiques de pèptid de trànsit a cloroplastes (Campos *et al.*, 1999).

La detecció de la via del metileritritolfosfat en plantes monocotiledònies i dicotiledònies suggereix que aquesta via està àmpliament distribuïda, probablement en els plastidis de totes les plantes superiors. El descobriment que la via del metileritritolfosfat opera en els plastidis de les plantes ha permès explicar tota una sèrie d'observacions experimentals que no concordaven amb l'existència, segons el model de Kreuz i Kleinig, d'una única via de síntesi d'IPP en el citosol-RE. Aquest es el cas, per exemple, de la manca d'inhibició de la síntesi d'isoprenoides cloroplastídics pel tractament amb mevinolina, o de la incorporació a isoprenoides cloroplastídics de substrats com el CO₂, el piruvat o la glucosa, i no de l'acetat o el mevalonat.

Pel que fa referència a l'origen de l'IPP utilitzat en les mitocondries per a la síntesi d'isoprenoides en plantes, s'havia observat que en presència de mevinolina la

quantitat d'ubiquinona sintetitzada disminuïa fins valors que mai eren inferiors al 50% de la quantitat d'ubiquinona sintetitzada en absència de l'inhibidor (Döll *et al.*, 1984; Schindler *et al.*, 1985). Aquesta aparent dependència, si més no parcial, de la síntesi d'ubiquinona de l'IPP sintetitzat a través de la via del mevalonat suggeria la possibilitat que la via del metileritritolfosfat contribuís subministrant part de l'IPP requerit per la síntesi d'ubiquinona. Analitzant els patrons de marcatge dels isoprenoides sintetitzats a partir de glucosa i de piruvat marcats amb ¹³C en cultius cel·lulars de tabac, s'ha demostrat que l'IPP utilitzat per la síntesi d'ubiquinona prové de la via del mevalonat (Disch *et al.*, 1998a).

En conclusió, en plantes com a mínim hi ha síntesi independent d'IPP en dos compartiments subcel·lulars diferents (fig. 4). En un dels compartiments, el citosol-RE, es produeix IPP a través de la via del mevalonat, el qual és posteriorment distribuït entre el RE i les mitocòndries per a la síntesi de triterpenoides (inclosos els esterols), sesquiterpenoides, dolícols i la cadena lateral de la ubiquinona. En l'altre compartiment, el cloroplast, es produeix IPP a través de la via del metileritritolfosfat per a la síntesi dels isoprenoides plastídics (fitol, plastoquinona, carotenoides, etc.).

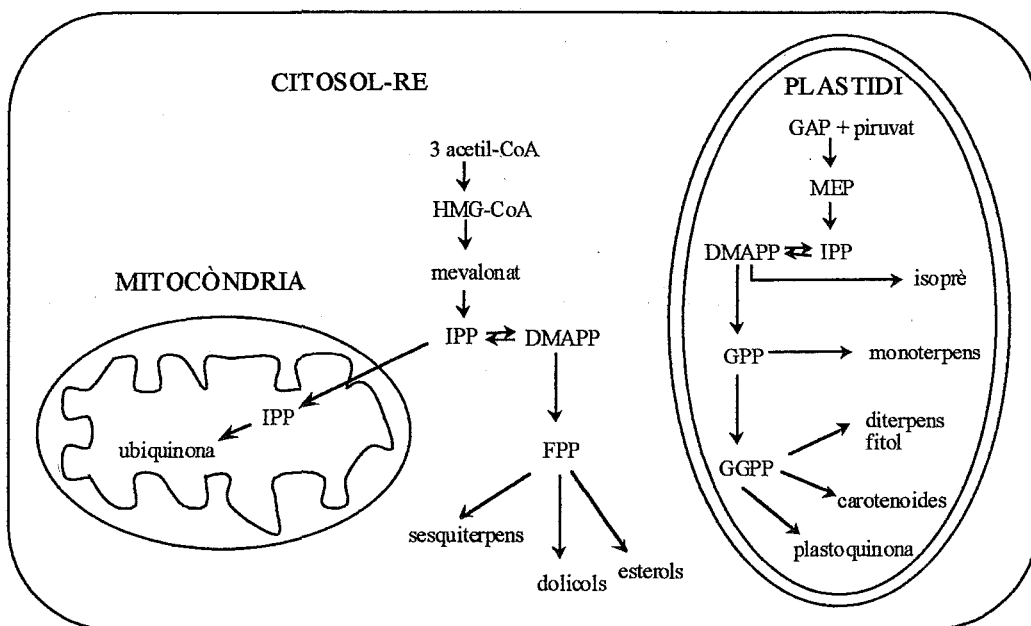


Figura 4. Model de distribució subcel·lular de les dues vies de síntesi d'IPP en plantes. (Adaptat de Lichtenthaler *et al.*, 1997)

2.4. Hi ha cooperació entre les dues vies de síntesi d'IPP?

L'existència de dues vies de síntesi d'IPP localitzades en compartiments subcel·lulars diferents suggereix una compartimentació estricta de l'IPP sintetitzat. De fet, amb anterioritat al descobriment de la via del metileritritolfosfat, s'havia observat que la inhibició de l'enzim HMGR per tractament amb mevinolina aturava la síntesi d'esterols i no afectava la síntesi d'isoprenoides cloroplastídics (Bach i Lichtenthaler, 1982; Bach i Lichtenthaler, 1983). Aquest resultat semblava posar de manifest que els cloroplastes no podien proporcionar IPP al citosol-RE per la formació d'esterols. No obstant, actualment es disposa d'una sèrie d'evidències que indiquen que pot existir un intercanvi d'IPP o d'altres prenifosfats entre el citosol-RE i els plastidis (revisat a Lichtenthaler *et al.*, 1997 i McCaskill i Croteau, 1998).

Les primeres evidències sobre la possible cooperació entre les dues vies metabòliques es van obtenir estudiant la biosíntesi de derivats diterpènics en cultius de *Ginkgo biloba* (Schwartz, 1994). Tres unitats isoprèniques del ginkgòlid presentaven el marcatge de ^{13}C característic dels isoprenoides sintetitzats a través de la via del mevalonat, mentre que la quarta unitat isoprènica es marcava d'acord amb la via del metileritritolfosfat. Els autors van proposar que una unitat d'IPP d'origen plastídic s'unia a un FPP d'origen citosòlic per donar lloc al diterpè final. No se sabia, però, si el ginkgòlid es sintetitzava i localitzava en el citosol o en el plastidi. Es va observar un fet similar en el cas del fitol i de diterpens d'*Heteroscyphus planus* (Nabeta *et al.*, 1995), en què la unitat C_{20} bàsica provenia de la combinació d'una unitat d'IPP cloroplastídic amb una unitat de FPP citosòlic. Recentment, també s'ha posat de manifest un patró de marcatge heterogeni en la biosíntesi de sesquiterpens en *Chamomilla recutita* (Adam i Zapp, 1998). Les dues primeres unitats del FPP deriven exclusivament de la via del metileritritolfosfat, mentre que la tercera unitat incorporada pot derivar de qualsevol de les dues vies metabòliques. D'altra banda, s'ha observat que en proporcionar deoxixilulosa (o algun dels seus derivats) marcada radioactivament com a precursor per a la síntesi d'isoprenoides, es produeix marcatge radioactiu en esterols, encara que baix, en cultius de *Salvia miltiorrhiza* (Broers, 1994) i en cultius de *Catharantuhus roseus* (Arigoni *et al.*, 1997).

Una conseqüència derivada del fet que els intermediaris biosintètics no es trobin estrictament compartimentats, és que no és possible establir *a priori* l'origen biosintètic de les diferents famílies d'isoprenoides únicament en funció del compartiment cel·lular on té lloc la seva síntesi. Així, per exemple, estava demostrat que en cèl·lules secretores de *Mentha × piperita*, que tenen la biosíntesi d'isoprenoides citosòlica bloquejada a nivell de l'enzim HMGR, la biosíntesi tant de monoterpens com de sesquiterpens té lloc a partir d'IPP d'origen plastídic (McCaskill i Croteau, 1995). Posteriorment s'ha confirmat que els sesquiterpens de l'oli essencial d'aquesta planta deriven de la via del metileritritolfosfat i no de la via del mevalonat, que és el que caldria esperar tenint en compte la localització citosòlica de la biosíntesi de sesquiterpens (Eisenreich *et al.*, 1997). També està demostrat que els pètals de rosa incorporen l'àcid mevalònic a la síntesi de monoterpens de forma ràpida i eficient (Francis i O'Connell 1969).

Finalment, hi ha evidències que mostren que els cloroplastes poden canviar els substrats utilitzats per la síntesi d'IPP segons l'estadi de desenvolupament (Heintze *et al.*, 1990). Abans del descobriment de l'existència de la via del metileritritolfosfat en plantes, Schultz i col·laboradors havien proposat un model dinàmic de compartimentació de la síntesi d'IPP, segons el qual els cloroplastes joves sintetitzaven IPP de forma autònoma, mentre que en madurar passaven a ser dependents de l'IPP d'origen citosòlic. Una vegada descoberta l'existència de la via del metileritritolfosfat en plantes, els mateixos autors van revisar els resultats, i van comprovar que en cloroplastes immadurs d'espínacs joves la síntesi d'IPP té lloc majoritàriament a través de la via del mevalonat (Heintze *et al.*, 1994). Així doncs, els autors postulen que en cloroplastes el funcionament de la via clàssica i la via del metileritritolfosfat està en funció de l'estadi de desenvolupament de l'òrganul.

En definitiva, aquests estudis indiquen que pot existir un intercanvi significatiu d'IPP o d'altres prenildifosfats entre els dos compartiments subcel·lulars, intercanvi que probablement varia en funció del teixit i/o de l'estadi de desenvolupament. A més, sembla que podria existir una versió plastídica de la via del mevalonat, que només seria activa en alguns estadis de desenvolupament. Aquesta aparent flexibilitat de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes probablement és una conseqüència dels

requeriments necessaris per coordinar i regular de forma precisa la síntesi de la gran varietat d'isoprenoides que deriven d'un únic precursor comú, l'IPP (McCaskill i Croteau, 1998).

2.5. Model d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics.

D'acord amb la visió tradicional del metabolisme, la biosíntesi d'isoprenoides en el citosol-RE tindria lloc en un entorn homogeni, on els intermediaris podrien difondre lliurement i, en conseqüència, serien accessibles als diferents enzims de la via que competeixen per ells. No obstant, una sèrie d'observacions han posat de manifest que aquesta imatge de l'organització de la via metabòlica pot no ser correcta. D'una banda, està descrit que diversos enzims de la via metabòlica es troben codificats per famílies multigèniques i, per tant, presenten diverses formes isoenzimàtiques. Aquest és el cas, per exemple, dels enzims HMGR (Stermer *et al.*, 1994), IPP isomerasa (Campbell *et al.*, 1997), farnesildifosfat sintasa (aquest treball; Attucci *et al.*, 1995a i b; Li i Larkins, 1996; Pan *et al.*, 1996), geranilgeranildifosfat sintasa (Bartley i Scolnik, 1995; Zhu *et al.*, 1997) o esqualè sintasa (Kribii *et al.*, 1997; Devarenne *et al.*, 1998). A més, els gens que codifiquen els diferents isoenzims presenten patrons d'expressió diferencials i responen de manera diferent a determinats estímuls externs. Així per exemple, estava demostrat que en resposta a ferida o a infecció s'indueix l'expressió de diferents gens HMGR en *Solanum tuberosum* (Yang *et al.*, 1991). Posteriorment, també en patata, es va observar que l'acumulació d'esterols s'indueix per ferida del teixit tuberós, mentre que s'aturava si el teixit ferit era tractat amb àcid araquidònic. A més, quan el teixit es tractava amb àcid araquidònic, s'acumulaven fitoalexines sesquiterpèniques (Choi *et al.*, 1992). Es va posar de manifest que l'acumulació d'esterols provocada per ferida es correlacionava amb la inducció de l'expressió del gen *HMG1*. En canvi, l'acumulació de fitoalexines sesquiterpèniques provocada pel tractament amb àcid araquidònic es correlacionava amb l'expressió dels gens *HMG2* i *HMG3*. També es va demostrar que el gen *HMG1* de tomàquet s'expressa més intensament en teixits de creixement ràpid, i

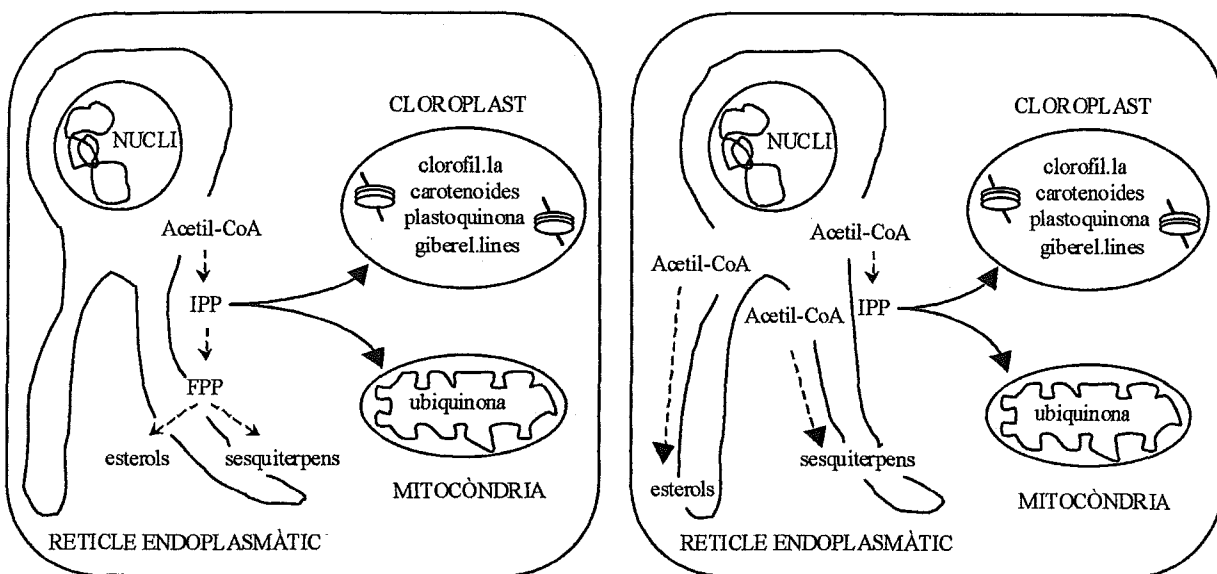
que l'expressió del gen *HMG2* s'activa en resposta a ferida o a agents patògens (Weissenborn *et al.*, 1995). En conjunt, el fet que els diferents gens HMGR de cada família multigènica presentessin diferents patrons d'expressió i responguessin de manera diferencial a diferents estímuls indicava que cada membre de la família multigènica estava regulat de forma diferent per tal de fer front a la demanda de mevalonat en condicions fisiològiques canviants i, en definitiva, que els diferents isoenzims HMGR estaven implicats en la síntesi de famílies específiques de compostos isoprenoides.

Basant-se en aquestes observacions, es va proposar un nou model per explicar l'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en plantes, el model dels canals metabòlics o metabolons (Chappell, 1995a i b) (fig. 5). Segons aquest model, en el reticle endoplasmàtic hi hauria agrupacions d'isoenzims dedicades a produir grups específics d'isoprenoides, cada una de les quals estaria regulada de forma independent. Per tant, el control de la síntesi dels productes finals dependria de la regulació de cada canal metabòlic mitjançant l'acumulació dels diferents isoenzims, la seva inserció en el canal metabòlic adequat i la modulació de la seva activitat a través de modificacions post-traduccionals. L'existència de metabolons permetria la canalització dels intermediaris cap a la formació de famílies específiques d'isoprenoides, evitant la competició de diferents enzims pel mateix substrat. Així doncs, segons aquest model, proposat inicialment en el cas concret de les Solanàcies, existiria un metaboló dedicat específicament a la síntesi d'esterols, un segon metaboló dedicat a la síntesi de sesquiterpens (fitoalexines) i un tercer metaboló dedicat a produir l'IPP que posteriorment seria translocat a mitocondries i cloroplastes. Òbviament, el descobriment de la via del metileritritolfosfat, que opera en els plastidis, obliga a retocar el model d'organització en canals metabòlics en el sentit que l'IPP destinat als orgànuls només ha de translocar-se a les mitocondries, ja que els cloroplastes sintetitzen el seu propi IPP. No obstant, cal considerar el possible intercanvi d'IPP o d'altres prenifosfats entre el citosol-RE i els cloroplastes (fig. 5.C).

Donant suport a la teoria dels metabolons, en plantes està descrit que el RE no és homogeni, sinó que és un orgànul dinàmic compost per un gran número de subdominis

A

B



C

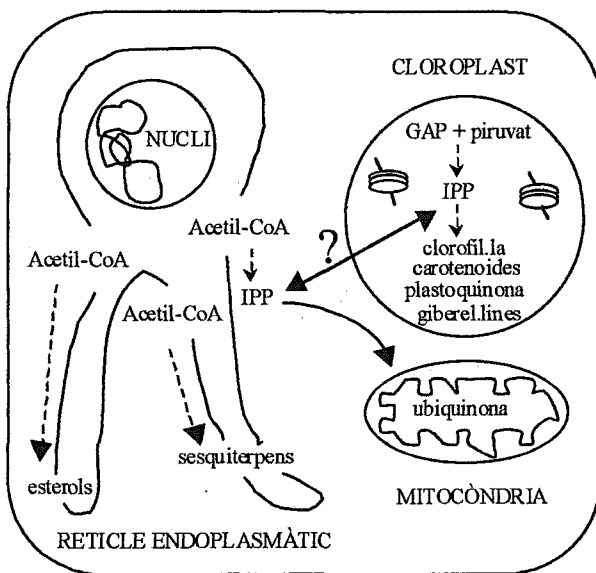


Figura 5. Models de l'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en plantes (Adaptat de Newman i Chappell, 1997). **A)** Model d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides segons la visió tradicional. **B)** Proposta d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics (Chappell, 1995a i b). **C)** Adaptació del model d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics, integrant la via del metileritritolfosfat.

amb funcions especialitzades (revisat a Staehelin, 1997). En aquest sentit, és raonable pensar que els metabolons s'organitzin físicament al voltant dels dos enzims que estan units a la membrana del RE, l'HMGR i l'esqualè sintasa (SQS). De fet, la majoria d'HMGR descrites presenten el motiu conservat MDXR_RRR (X pot ser V, I, L o S) a l'extrem aminoterminal. S'ha descrit que el motiu constituït per dos residus d'arginina localitzats en les posicions 2 i 3, 3 i 4, 4 i 5, 2 i 4 o 3 i 5 de l'extrem NH₂-terminal és suficient per retenir les proteïnes de membrana de tipus II en el RE (Schutze *et al.*, 1994). Així doncs, la majoria d'HMGR de plantes presenten el motiu de retenció a RE i, tal com s'ha mencionat anteriorment, probablement s'insereixen en les membranes del RE (Campos i Boronat, 1995). No obstant, en el cas concret d'*Arabidopsis*, l'isoenzim HMGR1L té un extrem NH₂-terminal (MKKKQA) diferent al de les altres HMGR, tot i que també té capacitat per inserir-se en les membranes del RE (Lumbreras *et al.*, 1995). És possible que la seqüència MKKKQA també sigui un senyal de retenció a RE, ja que està descrit que en alguns casos els residus de lisina poden substituir els residus d'arginina en senyals NH₂-terminals de retenció a RE (Schutze *et al.*, 1994). Els autors (Campos i Boronat, 1995) proposen que els isoenzims HMGR amb diferent extrem NH₂-terminal podrien integrar-se en diferents subdominis del RE, de tal manera que la possible segregació física dels diferents isoenzims d'HMGR en la membrana del RE seria l'origen de la subcompartimentació citosòlica de la producció de mevalonat.

Tal i com s'ha indicat anteriorment, l'esqualè sintasa també pot estar implicada en l'organització dels metabolons. Recentment, s'han obtingut evidències de la possible participació de l'SQS en l'organització dels canals metabòlics en la biosíntesi d'isoprenoides en llevat. De fet, la segregació física de les diferents isoformes HMGR de llevat en la membrana del RE i la subcompartimentació citosòlica de la producció de mevalonat també està proposada en llevat (Wright *et al.*, 1988; Casey *et al.*, 1992). Pel que fa referència a l'SQS, es va posar de manifest que l'expressió del cDNA que codifica l'SQS d'*Arabidopsis thaliana* no complementava un mutant de llevat deficient en activitat esqualè sintasa, malgrat que l'SQS s'inseria en el RE, s'expressava en forma activa, i era capaç de produir esqualè (Kribii *et al.*, 1997). Els resultats suggerien que l'esqualè sintetitzat no podia ser utilitzat pel següent enzim de la via, l'esqualè epoxidasa, que també està associat a les membranes del RE (Sakakibara *et al.*, 1995).

Per resoldre aquesta qüestió, es van expressar en el mateix mutant de llevat diferents SQS híbrides entre l'enzim d'*Arabidopsis thaliana* i el d'*Schizosacharomyces pombe*. Es va observar que només hi havia complementació quan s'expressava una SQS quimèrica en la que l'extrem carboxiterminal de l'enzim d'*Arabidopsis* havia estat substituït per la regió equivalent de l'SQS de *S. pombe*. Està acceptat que l'extrem carboxiterminal de l'enzim SQS és la regió que conté el domini hidrofòbic responsable de la integració en la membrana del RE (Robinson *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993). El conjunt de resultats indicava que l'extrem carboxiterminal de l'enzim SQS de llevat està implicat en la canalització de l'esqualè cap a la síntesi d'esterols en llevat (Kribii *et al.*, 1997). Una possible explicació és que la regió carboxiterminal de l'SQS de llevat contingui seqüències que permetin la interacció específica entre l'SQS i l'esqualè epoxidasa. Una altra possibilitat és que aquesta regió contingui seqüències que dirigeixin l'enzim a subdominis específics del RE de manera que colocalitzi amb altres enzims de la via com l'esqualè epoxidasa. En definitiva, aquestes observacions reforcen la hipòtesi d'organització en metabolons de la via de síntesi d'isoprenoides de llevat.

A partir de la comparació de seqüències d'HMGR associades amb la biosíntesi de sesquiterpens (de patata, tabac i tomàquet) i de sesquiterpè ciclases de tabac i *Hyoscyamus muticus*, s'ha identificat una seqüència comuna de 7 aminoàcids (EK(P/V)LKPH) que ha estat proposada com a possible seqüència senyal implicada en l'organització del metaboló de síntesi de sesquiterpens. Aquesta seqüència es troba entre els 30 aminoàcids de l'extrem aminoterminal de les HMGR i entre els 20 aminoàcids de l'extrem carboxiterminal de les sesquiterpè ciclases. Aquest motiu no és present en altres HMGR no associades a la síntesi de sesquiterpens, ni tampoc en altres sesquiterpè ciclases seqüenciades (Newman i Chappell, 1997). De forma similar, s'ha identificat un lloc de glicosilació en el petit domini que queda exposat al lumen del RE de les HMGR associades amb la producció de compostos de defensa o metabòlits secundaris com el cautxú (Denbow *et al.*, 1996). Aquest lloc de glicosilació no és present en les HMGR associades a la síntesi constitutiva d'esterols o a la síntesi d'isoprenoides de teixits meristemàtics. Els autors proposen que aquestes seqüències podrien estar relacionades amb la localització de l'HMGR en subdominis específics del RE, o bé amb les interaccions proteïna-proteïna requerides per la formació dels metabolons.

3. REGULACIÓ DE LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES.

La regulació de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes és encara poc coneguda. La gran complexitat de la via metabòlica, així com la gran varietat de funcions en les que participen els isoprenoides que en deriven, fa pensar que aquesta via metabòlica ha d'estar sotmesa a una regulació molt estricta, que permeti la producció dels diferents isoprenoides requerits en les diferents parts de la planta i/o en els diferents estadis del desenvolupament. En aquest sentit, l'existència de dues vies diferents de síntesi d'IPP (la via del mevalonat i la via del metileritritolfosfat) i la proposada organització de la via en canals metabòlics suggereix que és possible regular de forma independent i coordinada la síntesi de grups específics d'isoprenoides.

La major part dels estudis relacionats amb la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes s'han centrat en l'estudi del possible paper regulador de l'enzim HMGR. Els estudis realitzats fins l'actualitat han posat de manifest que l'activitat de la HMGR està estrictament regulada per diversos mecanismes de control que actuen tant a nivell transcripcional com post-transcripcional (revisat a Stermer *et al.*, 1994). L'activitat enzimàtica respon a diversos estímuls externs, com la llum (Brooker i Russell, 1975, 1979; Learned, 1996; Learned i Connolly, 1997) i les agressions, tant per ferida com per infeccions causades per fitopatògens (Oba *et al.*, 1985; Stermer i Brostock, 1987; Yang *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994; Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999). L'activitat HMGR també respon a reguladors del creixement (Bach i Lichthenthaler, 1984; Brooker i Russell, 1979; Nishi i Tsuritani, 1983; Russell *et al.*, 1985) i al nivell d'esterols (Russell i Davidson, 1982). A més, en diferents teixits i diferents estadis de desenvolupament hi ha marcades diferències d'activitat HMGR (Garg i Douglas, 1983; Bach, 1987; Bach *et al.*, 1991; Narita i Gruissem, 1989; Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999).

Tot i que l'enzim HMGR desenvolupa un paper important en la regulació de la via metabòlica, estudis de sobreexpressió de l'enzim en plantes transgèniques han aportat evidències indicatives de l'existència d'altres enzims involucrats en el control de

la via. Així per exemple, la sobreexpressió de l'HMGR de hámster en plantes transgèniques de tabac només es va traduir en un augment significatiu del nivell d'esterols totals (Chappell *et al.*, 1994). En concret, l'esterol acumulat majoritàriament era el cicloartenol, un intermediari de la biosíntesi dels esterols més abundants de les plantes (campesterol, sitosterol i estigmasterol). És a dir, tot i que l'activitat reductasa és limitant per la síntesi d'esterols, l'acumulació de cicloartenol indica l'existència d'algun enzim involucrat en la regulació del flux que estaria situat després d'aquest intermediari. Aquest enzim podria ser l'esterol metil transferasa (SMT1), enzim que metila el cicloartenol en la posició 24, primer pas en la síntesi de 24 metil i etil esterols. En aquest sentit, recentment s'ha descrit que en les plantes de tabac que sobreexpressen el gen HMGR de hámster el nivell d'mRNA corresponent al gen SMT1 està disminuït dues vegades respecte les plantes control (Devarenne i Chappell, 1999).

D'altra banda, en sobreexpressar l'enzim HMGR d'*Arabidopsis thaliana* en plantes transgèniques d'*Arabidopsis*, es va observar que, malgrat que els nivells de l'mRNA corresponent a l'HMGR eren molt alts, les plantes només presentaven un increment d'activitat reductasa de fins a tres vegades l'activitat de les plantes no transformades, que no es traduïa, però, en un augment de la síntesi i acumulació d'isoprenoides finals (Re *et al.*, 1995). Tot i que aquests resultats no estaven d'acord amb els resultats anteriors de Chappell *et al.* (1994), van posar de manifest que l'activitat HMGR està regulada a múltiples nivells. Posteriorment, es va sobreexpressar el cDNA corresponent a l'isoenzim HMGR1 d'*Hevea brasiliensis* en tabac (Schaller *et al.*, 1995). Les plantes de tabac transgèniques acumulaven fins a sis vegades més esterols que les plantes no transformades, en forma d'esters d'esterols en cossos lipídics citoplasmàtics. Entre els esterols acumulats, a part dels productes finals de la via (campesterol, sitosterol i estigmasterol), s'hi trobaven intermediaris com el cicloartenol. El fenotip d'aquestes plantes era idèntic al fenotip del mutant de tabac LAB1-4 descrit per Maillot-Vernier *et al.* (1991), que havia estat generat a partir de protoplastes haploides de tabac mutagenitzats per UV i que havien estat seleccionats per la seva capacitat per créixer en presència d'inhibidors de les etapes finals de la biosíntesi d'esterols. Tot i que no s'havia determinat quin enzim estava afectat per la mutació LAB1-4, se sabia que l'activitat HMGR estava gairebé triplicada (Gondet *et al.*, 1992).

Aquests resultats estaven d'acord amb els resultats de Chappell *et al.* (1994), en el sentit que l'HMGR és un enzim regulador clau per la síntesi d'esterols en plantes, tot i l'existència de punts addicionals de control en etapes posteriors de la via metabòlica.

Hi ha evidències que indiquen que la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides implica la modulació simultània de l'activitat de múltiples enzims a fi de produir canvis coordinats en el flux a través de les diferents ramificacions de la via metabòlica. En laboratoris independents (Vögeli i Chappell, 1988; Threlfall i Whitehead, 1988), s'havia observat que durant el creixement de cultius cel·lulars de tabac s'acumulaven esterols i no es sintetitzaven sesquiterpens. Després de 6 hores de l'addició d'elicitors fúngics al cultiu, l'acumulació d'esterols es reduïa aproximadament al 10%, mentre que s'induïa l'acumulació de sesquiterpens. L'addició de l'elicitor suprimia la incorporació d'acetat i de mevalonat a esterols, a la vegada que n'induïa la incorporació a sesquiterpens. Aquests resultats suggerien que la regulació de la biosíntesi d'esterols i sesquiterpens era posterior a l'HMGR. Es va correlacionar la caiguda de síntesi d'esterols amb una devallada de l'activitat esqualè sintasa, i la inducció de la biosíntesi de sesquiterpens amb la inducció de l'activitat sesquiterpè ciclase. Com que els dos enzims estan situats immediatament a continuació d'un punt de ramificació de la via, la inducció d'un i la simultània supressió de l'altre va ser interpretada com un indicador de l'existència d'un mecanisme de control coordinat que regula el flux de metabòlits a través de branques de la via que porten a la formació de diferents productes finals.

Resultats semblants han estat obtinguts en estudis realitzats en discs de patata en resposta a la ferida o al tractament amb elicitors fúngics (Zook i Kuc, 1991). Així, l'increment de la síntesi d'esterols provocat per ferida es va correlacionar amb un increment de l'activitat esqualè sintasa. En canvi, la inducció de la síntesi de fitoalexines sesquiterpèniques provocada per tractament amb àcid araquidònic es va correlacionar amb una inducció de la síntesi de sesquiterpè ciclases i, alhora, amb una supressió de l'activitat esqualè sintasa. Posteriorment, es va comprovar que el tractament amb nivells baixos de metil jasmonats provocava una forta inducció de la transcripció del gen *HMG1*, acompanyada d'un augment en l'acumulació de glicoalcaloides esteroidics. En canvi, el tractament amb àcid araquidònic va provocar

una forta supressió de l'expressió del gen *HMG1* en paral·lel amb una forta inducció de l'expressió del gen *HMG2*. Aquest efecte estava acompanyat de la supressió de l'acumulació de glicoalcaloides esteroídics i de la inducció de la síntesi de fitoalexines sesquiterpèniques (Choi *et al.*, 1994).

En conjunt, aquests estudis posen de manifest el paper d'isoenzims específics de l'HMGR en la canalització de la síntesi d'IPP cap a la producció de diferents grups d'isoprenoides. A més, suggereixen que l'SQS és el primer punt de control important per dirigir el flux de metabòlits cap a la síntesi d'esterols. En aquest sentit, recentment s'ha demostrat que el descens de l'activitat SQS observat en cultius cel·lulars de tabac tractats amb el·licitors fúngics no va precedir per un descens en els nivells del corresponent mRNA (Devarenne *et al.*, 1998). Aquest resultat indica que la supressió de l'activitat SQS és deguda a modificacions post-traduccionals de l'enzim, i novament posa de manifest que la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides requereix complexos mecanismes de control que actuen tant a nivell transcripcional com post-transcripcional.

Hi ha més dades indicatives de la regulació coordinada de diverses activitats enzimàtiques per tal d'aconseguir el canvi requerit en la síntesi de determinats isoprenoides. En cultius cel·lulars de *Tabernaemontana divaricata*, es va demostrar que la síntesi de fitoalexines triterpèniques cícliques induïda per tractament amb el·licitors fúngics implica la modulació coordinada de l'activitat de múltiples enzims, com és la inducció de les activitats HMGR, IPP isomerasa, FPS i ciclases específiques involucrades en la síntesi dels triterpens, així com la supressió simultània de l'activitat d'enzims de la biosíntesi d'esterols (Fulton *et al.*, 1994). En discs de pebrot, es va observar que el tractament amb cel·lulasa provoca l'acumulació de capsidiol, una fitoalexina sesquiterpènica, i simultàniament inhibeix la síntesi d'esterols (Hugueney *et al.*, 1996). Aquest canvi va ser relacionat amb una inducció de l'expressió dels gens que codifiquen la FPS i la 5-epi-aristoloquè sintasa (ciclase que sintetitza capsidiol a partir de FPP), que va associada al corresponent augment d'activitat FPS i 5-epi-aristoloquè sintasa.

Pel que fa referència a la regulació de l'activitat FPS en plantes, actualment es disposa de poca informació. Està descrit que el gen de la FPS de pebrot s'expressa en el fruit de forma constitutiva (Hugueney *et al.*, 1996). També està descrit que el gen FPS d'arròs s'expressa principalment en fulles, i que la llum, particularment la llum blava, incrementa aquesta expressió (Sanmiya *et al.*, 1997). En el cas de la FPS d'*Hevea brasiliensis*, la seva expressió, que té lloc en les cèl·lules productores de làtex i en l'epidermis, augmenta quan s'indueix la producció de làtex (Adiwilaga i Kush, 1996). També es coneix que *Zea mays* codifica una FPS que s'expressa exclusivament en l'endosperm de la llavor, i que la seva expressió està augmentada en els mutants de *Zea mays* 02 i *fl2*, mutants deficients en la producció de zeïnes (Li i Larkins, 1996). Finalment, està descrit que la sobreexpressió de la FPS de *Sacharomyces cerevisiae* en plantes transgèniques de tabac provoca un increment en la síntesi d'esterols i de carotenoides que porta a un acúmulo d'aquests isoprenoides quatre vegades superior al normal (Daudonnet *et al.*, 1997). Aquest conjunt d'observacions, juntament amb els exemples citats anteriorment d'inducció de síntesi de fitoalexines, que comporten un augment de l'activitat FPS (Fulton *et al.*, 1994; Hugueney *et al.*, 1996), suggereix que l'activitat FPS pot ser limitant en la síntesi d'isoprenoides.

D'altra banda, referent a la biosíntesi de carotenoides, experiments en plantes transgèniques de tomàquet demostren que l'alteració dels nivells d'expressió del gen fitoè sintasa 1 (*PSY1*), tant per sobreexpressió del corresponent RNA com de l'RNA antisentit, es tradueix en alteracions dels nivells normals de carotenoides (Bird *et al.*, 1991; Bramley *et al.*, 1992; Fray i Grierson, 1993). La sobreexpressió del gen *PSY1* en plantes transgèniques de tomàquet no només porta a una elevada acumulació de carotenoides, sinó que també provoca nanisme (Fray *et al.*, 1995). Aquest fenotip és degut a una disminució en els nivells de l'hormona giberel·lina A₁, probablement causada per l'elevada activitat *PSY1* que consumeix la major part del GGPP disponible, que és també precursor de la síntesi de giberel·lines. En canvi, la inhibició de l'activitat *PSY1* provoca l'acumulació de GGPP i FPP, i nivells elevats de giberel·lines durant el desenvolupament del fruit (Bird *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1995). Aquests resultats indiquen que l'enzim fitoè sintasa, situat en un punt de ramificació, controla el flux d'isoprenoides cap a la biosíntesi de carotenoides.

Així doncs, la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides implica la modulació coordinada de l'activitat de diferents enzims de la via, i també d'isoenzims específics, per tal de produir els canvis de flux a través de les diferents branques que permeten la síntesi dels isoprenoides necessaris en cada cas. Aquest tipus de regulació està d'acord amb la teoria d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics (Chappell, 1995a i b). A part del paper regulador de l'HMGR, les evidències apunten cap a l'existència d'altres enzims reguladors situats en els punts de ramificació de la via. Concretament, aquest es el cas de l'esqualè sintasa, i la fitoè sintasa, que semblen tenir un paper important en la regulació de la síntesi d'esterols i de carotenoides, respectivament. A més, és probable que altres enzims, com la farnesildifosfat sintasa, puguin estar també involucrats en la regulació de la via metabòlica.

4. PRENILTRANSFERASES.

En el sentit més ampli de la paraula, les preniltransferases són tots aquells enzims que transfereixen grups prenil a una gran varietat de molècules substrat que contenen una regió rica en electrons (Poulter i Rilling, 1981). Les preniltransferases es poden dividir en tres grans grups en funció de la molècula acceptora del grup prenil. El primer grup inclou enzims que catalitzen reaccions en les que l'acceptor del grup prenil és l'IPP. Dintre d'aquest grup s'hi troben els enzims FPS o GGPS, que sintetitzen FPP o GGPP, respectivament. Un segon grup de preniltransferases inclou enzims que dimeritzen el substrat al·lílic. En aquest grup trobem els enzims esqualè sintasa i fitoè sintasa, que catalitzen la dimerització de FPP i GGPP, per donar lloc a l'esqualè i al fitoè, respectivament. El tercer grup de preniltransferases, més heterogeni, inclou enzims que transfereixen grups al·lílics a substrats no terpènics. Aquest grup inclou enzims que transfereixen grups al·lílics a RNAs de transferència, a compostos aromàtics com el para-hidroxibenzoat (síntesi de quinones), i també a proteïnes. En aquesta memòria, però, el terme preniltransferasa s'utilitza en un sentit més restringit, ja que es consideren com a preniltransferases els enzims que tenen l'IPP com acceptor dels grups prenil i, per tant, inclou només el primer dels tres grups d'enzims indicats anteriorment.

La reacció que catalitzen les preniltansferases comença amb l'eliminació del grup difosfat de la posició 1 del substrat al·lílic, per formar un catió al·lílic. Aquest carbocatió és atacat per una molècula d'IPP, en la que s'elimina de forma estereoespecífica un protó, de tal manera que es forma un nou enllaç carboni-carboni i un doble enllaç (fig. 6). Aquesta reacció és una condensació 1'-4 (cap-cua) entre el carboni de la posició 1 del substrat al·lílic i el carboni de la posició 4 de l'IPP. Repetint aquest tipus de condensació entre l'IPP i el prenildifosfat, la preniltansferasa allarga el grup prenílic fins a produir un prenildifosfat de longitud definida i amb una estereoquímica determinada. La longitud del prenifosfat sintetitzat varia entre uns marges molt amplis, que van des dels deu carbonis del geranildifosfat (C_{10}) fins els més de cinc mil del cautxú natural ($C_{>5.000}$).

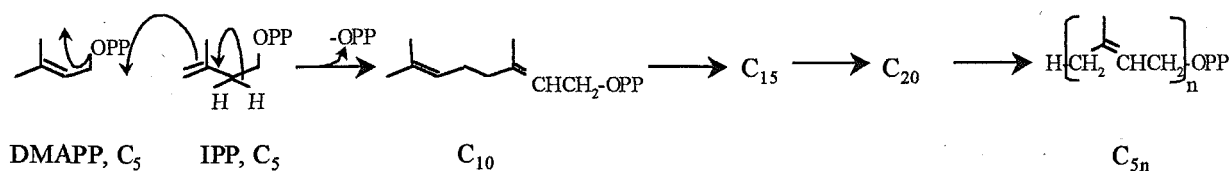


Figura 6. Reaccions catalitzades per les preniltansferases (Ogura i Koyama, 1998).

4.1. Classificació de les preniltansferases.

Les preniltansferases caracteritzades fins l'actualitat, tot i que catalitzen el mateix tipus de reacció, es poden classificar en quatre grups en funció de la composició de subunitats i de la longitud i l'estereoquímica del producte de reacció (fig. 7).

4.1.1. Preniltansferases de tipus I: *E*-prenildifosfat sintases de cadena curta.

Les preniltansferases de tipus I inclouen els enzims que sintetitzen prenildifosfats fins 25 unitats de carboni (C_{25}). S'hi troben, per tant, la geranildifosfat sintasa (GPS), la farnesildifosfat sintasa (FPS), la geranilgeranildifosfat sintasa (GGPS) i la

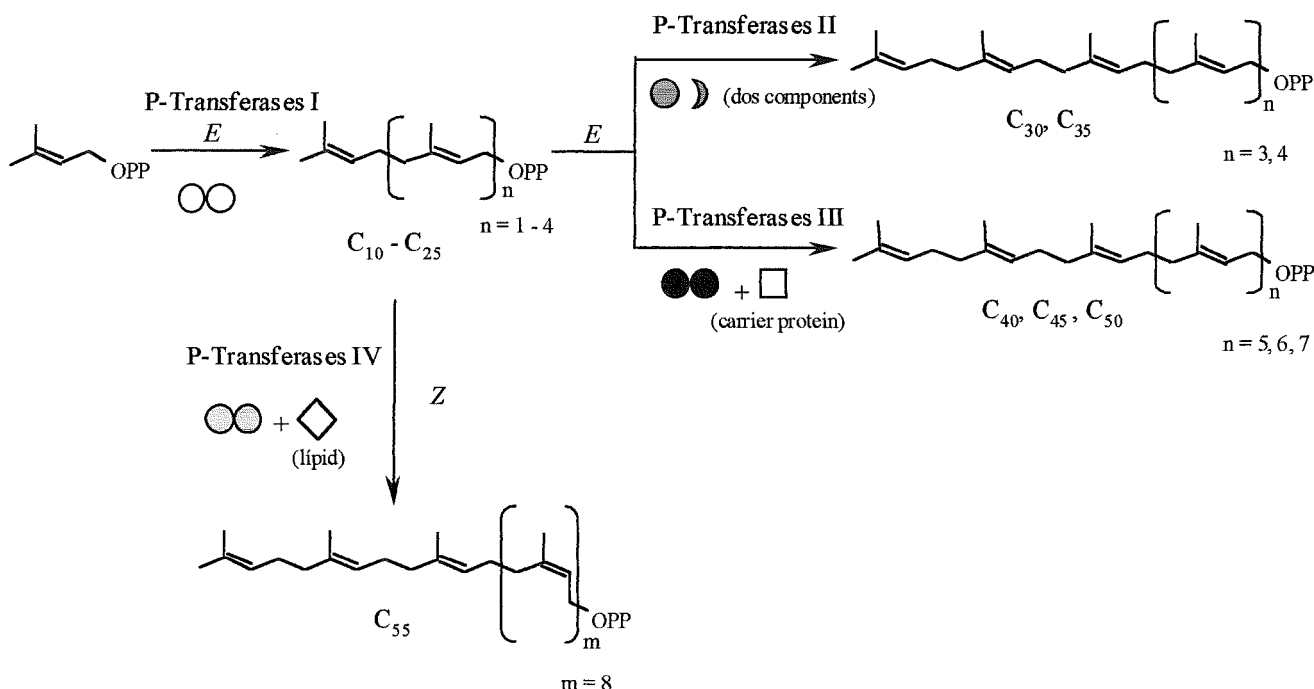


Figura 7. Classificació de les preniltransferases (segons Koyama, 1999).

geranilfarnesildifosfat sintasa (GFPS). Els seus substrats són el DMAPP i l'IPP, tot i que també accepten com a substrats els seus intermediaris al·lílics. Aquests enzims tenen estructures homodimèriques i per ser funcionals requereixen cations metàl·lics divalents com Mg^{2+} o Mn^{2+} , que és una característica comuna de totes les preniltransferases.

Dintre d'aquest grup, les preniltransferases FPS i GGPS són les que han estat caracteritzades més extensament. Tant la FPS com la GGPS són enzims de distribució universal, ja que els seus productes de reacció FPP i GGPP es troben a la part troncal de la via de síntesi d'isoprenoides i són els precursors biosintètics de molts isoprenoides essencials (fig. 1).

Seqüències genòmiques o de cDNA que codifiquen FPS han estat aïllades de diferents espècies. El primer cDNA aïllat va ser un cDNA de la FPS de rata (Clarke *et al.*, 1987). El van seguir cDNAs d'humans (Sheares *et al.*, 1989; Wilkin *et al.*, 1990), i

els gens de *Saccharomyces cerevisiae* (Anderson *et al.*, 1989; Chambon *et al.*, 1990) i *Escherichia coli* (Fujisaki *et al.*, 1990). En el cas de les plantes, el primer cDNA aïllat va ser el corresponent a una FPS d'*Arabidopsis thaliana* (Delourme *et al.*, 1994). Posteriorment, han estat clonats fins 14 cDNAs d'un total d'11 espècies diferents de plantes (en l'Annex I es mostra l'aliniament de 14 FPS de plantes) i diversos cDNAs i gens corresponents a diferents FPS d'animals, insectes, llevats i bacteris. Pel que fa referència a la GGPS, també han estat aïllats clons genòmics o cDNAs de bacteris, llevats i plantes (revisat a Ogura i Koyama, 1998). Recentment s'ha clonat un cDNA que codifica la GGPS humana (Ericsson *et al.*, 1998).

4.1.2. Preniltransferases de tipus II: *E*-prenildifosfat sintases de cadena mitjana.

Les preniltransferases de tipus II inclouen els enzims bacterians hexaprenildifosfat sintasa (HexPS) i heptaprenildifosfat sintasa (HepPS), que catalitzen la síntesi cadenes preníliques C₃₀ i C₃₅, respectivament, que s'utilitzaran posteriorment en la síntesi de quinones. Aquests enzims catalitzen la síntesi de (tot-*E*)-HexPP i de (tot-*E*)-HepPP addicionant 3 i 4 molècules d'IPP al FPP, respectivament, però són incapaçs de sintetitzar GPP o FPP a partir de DMAPP i IPP. Necessiten, per tant, que la FPS proporcioni FPP.

La caracterització de l'HexPS de *Micrococcus luteus* i l'HepPS de *Bacillus subtilis* (revisat a Ogura i Koyama, 1998), ha posat de manifest que ambdós enzims són heterodímers, que únicament són funcionals quan les dues subunitats s'associen. Cap de les dues subunitats presenta activitat catalítica per ella sola. Les dues subunitats només estan associades, i per tant tenen activitat, en presència de Mg²⁺ i FPP, i un cop catalitzada l'addició d'IPP, el complex es dissocia altra vegada.

Recentment, han estat clonats el gens que codifiquen les dues subunitats de l'enzim HepPS de *Bacillus stearothermophilus* (Koike-Takeshita *et al.*, 1995) i de *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 1997), i de l'HexPS de *Micrococcus luteus* (Shimizu *et al.*, 1998a). Tant en l'HexPS com en l'HepPS, una de les dues subunitats (component I)

presenta similitud amb la FPS del mateix bacteri, mentre que l'altra subunitat (component II) no presenta cap homologia significativa amb les seqüències disponibles en les bases de dades de proteïnes. Per tant, els autors postulen que el component I uneix el substrat i realitza la catàlisi, i el component II desenvolupa una funció auxiliar però essencial per la catàlisi.

Amb anterioritat, Ashby i Edwards (1990) havien aïllat el gen *COQ1* de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica una HexPS que intervé en la biosíntesi del coenzim Q. No se sap encara si la proteïna té activitat per ella mateixa o bé necessita associar-se a un altre component per tenir activitat. Aquest és l'únic cas en el que s'ha descrit l'existència d'una preniltransferasa de tipus II en un organisme eucariota.

4.1.3. Preniltransferases de tipus III: *E*-prenildifosfat sintases de cadena llarga.

Les preniltransferases de tipus III inclouen enzims que sintetitzen cadenes preniliques C₄₀, C₄₅ i C₅₀, que s'usaran posteriorment per la síntesi de quinones. El primer d'aquests enzims caracteritzat va ser la nonaprenil (solanesil) difosfat sintasa de *Micrococcus luteus* (Sagami *et al.*, 1977). Es va comprovar que l'enzim era incapaç d'utilitzar DMAPP com a substrat al·lílic i que necessitava utilitzar GPP com a iniciador, si bé FPP i GGPP també podien ser utilitzats. Posteriorment, es va comprovar que aquest enzim és un homodímer que necessita un factor proteic addicional per mantenir un recanvi catalític eficient (Ohnuma *et al.*, 1991). Sembla que aquest factor proteic ajuda a sortir del centre catalític els productes de reacció altament hidrofòbics que, d'altra manera, inhibirien la reacció enzimàtica. Els autors van designar aquesta proteïna auxiliar com proteïna portadora de grups poliprenil (polyprenyl carrier protein, PCP).

Asai *et al.* (1994) van demostrar que el gen *ispB* d'*E. coli* codifica una octaprenildifosfat sintasa. Suzuki *et al.* (1997) van clonar el gen codificant per la decaprenildifosfat sintasa d'*Schizosaccharomyces pombe*. S'ha comprovat que la PCP de *Micrococcus luteus* actua positivament sobre aquestes sintases, i no sobre

preniltransferases del grup IV. Per això es considera que la PCP col·labora específicament amb les *E*-preniltransferases de cadena llarga. De moment, encara no ha estat caracteritzada cap preniltransferasa encarregada de sintetitzar els grups prenílics de les quinones d'organismes eucariotes.

4.1.4. Preniltransferases de tipus IV: *Z*-poliprenildifosfat sintases.

Aquestes preniltransferases catalitzen l'addició en *cis* d'unitats d'IPP sobre els substrat al·lílic FPP. Per tant, donen lloc a prenildifosfats d'estereoquímica mixta *E,Z*. En el cas dels organismes procariotes, la funció de les *Z*-preniltransferases és produir els precursors dels poliprenil-lípids implicats en el transport dels carbohidrats requerits per la síntesi de la paret bacteriana. L'enzim caracteritzat amb més profunditat és la undecaprenildifosfat sintasa (UPS), que catalitza la síntesi de C₅₅-prenildifosfats. Ha estat descrit en diversos bacteris, com *Micrococcus luteus* (Kurokawa *et al.*, 1971), *Bacillus subtilis* (Takahashi i Ogura, 1982), *Escherichia coli* (Fujisaki *et al.*, 1986) i *Lactobacillus plantarum* (Keenan i Allen, 1974). En *Lactobacillus plantarum*, s'ha comprovat que l'enzim és homodimèric i que per mantenir la seva activitat requereix la presència d'un fosfolípid o d'un detergent (com el Tritó X-100), probablement involucrat en la sortida del producte de reacció del centre actiu de l'enzim (Muth i Allen, 1984). Recentment, han estat clonats els gens que codifiquen la undecaprenildifosfat sintasa de *Micrococcus luteus* (Shimizu *et al.*, 1998b) i d'*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* (Apfel *et al.*, 1999).

En els organismes eucariotes, les *Z*-preniltransferases, en concret les dehidrodolicildifosfat sintases, sintetitzen la fracció prenílica del dolicol. Aquests enzims catalitzen la síntesi de cadenes molt més llargues que els enzims bacterians, i necessiten altes concentracions de detergent per tenir la màxima activitat. L'enzim ha estat caracteritzat a partir de membranes de cèl·lules tumorals de ratolí (Adair *et al.*, 1984), de fetge de rata (Matsuoka *et al.*, 1991) i de *Saccharomyces carlsbergensis* (Bukhtiyarov *et al.*, 1993).

En plantes productores de làtex, s'ha identificat una *Z*-preniltransferasa especial, que és la *cis*-preniltransferasa del cautxú, que pot arribar a condensar entre 1.500 i 60.000 molècules d'IPP. L'enzim ha estat caracteritzat en *Hevea brasiliensis* (Archer *et al.*, 1963) i en *Parthenium argentatum* (Cornish i Backhaus, 1990).

4.2. Comparació de les estructures primàries de les preniltransferases.

Fins l'actualitat, s'han aïllat i caracteritzat més de 30 gens o cDNAs que codifiquen *E*-preniltransferases de diversos organismes eucariotes i procariotes. Malgrat les diferències funcionals que presenten els diferents tipus d'*E*-preniltransferases, la comparació de les seqüències d'aminoàcids ha posat de manifest que totes elles tenen set regions altament conservades (numerades I-VII) (Koyama *et al.*, 1996; Quondam *et al.*, 1997) (fig. 8). Les regions II i VI contenen els dominis rics en aspartat DDXX(XX)D (on X codifica qualsevol aminoàcid), que estan involucrats en la catàlisi (revisat a Ogura i Koyama, 1998). Per facilitar la nomenclatura, sovint el primer domini ric en aspartats s'anomena FARM (*First Aspartat Rich Motif*) (Ohnuma *et al.*, 1997). Genèricament, el primer, segon i tercer residu d'aspartat del FARM s'anomenen D1, D2 i D3, respectivament; en el cas dels residus del segon domini ric en aspartat, s'anomenen D4, D5 i D6.

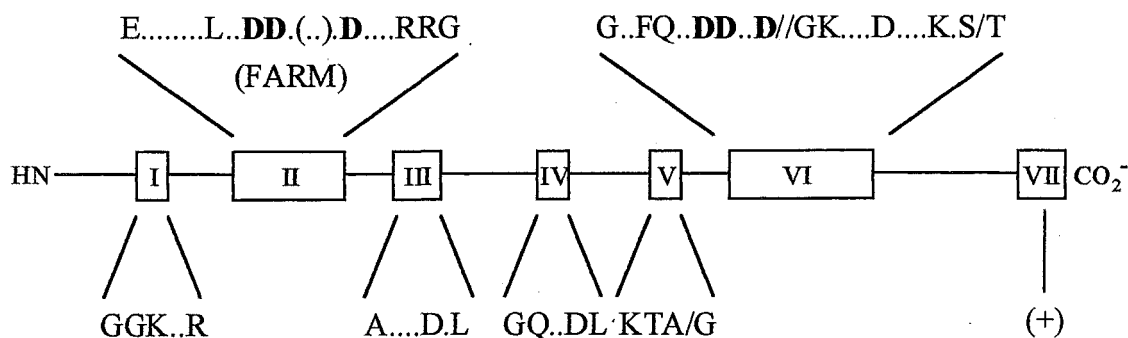


Figura 8. Representació esquemàtica dels set dominis conservats entre *E*-preniltransferases. (Adaptada de Koyama *et al.*, 1993).

El recent clonatge de gens que codifiquen Z-preniltransferases, en concret la UPS (Shimizu *et al.*, 1998b; Apfel *et al.*, 1999), ha permès identificar seqüències homòlogues en 23 espècies bacterianes més, que podrien correspondre, per tant, a hipotètiques UPS. L'aliniament de les seqüències d'aquestes UPS ha posat de manifest que l'estructura primària de les Z-preniltransferases és molt diferent a la de les E-preniltransferases, i que no presenten cap dels set dominis conservats entre les E-preniltransferases, ni tan sols els dos motius d'aspartat. Així doncs, sembla que les Z-preniltransferases constitueixen una classe de prenilttransferases totalment diferent de les E-prenilttransferases.

4.3. Estructura tridimensional de la FPS.

L'estructura tridimensional d'una prenilttransferasa, concretament de la FPS de pollastre, va ser determinada per primera vegada per Tarshis *et al.*, (1994). El monòmer de FPS consta d'un únic domini format per 10 α -hèlix antiparal·leles, unides per llaços curts que no presenten estructura secundària definida. Les regions en α -hèlix envolten una llarga cavitat central on es localitza el centre actiu de l'enzim. Els dominis II i VI, que inclouen els motius rics en aspartat, estan situats en bandes oposades de la cavitat central, amb les cadenes laterals dels residus d'aspartat dirigides cap el seu interior. A la paret de la cavitat que conté el centre actiu, s'hi troben dues depressions hidrofòbiques, que han estat proposades com a butxaques on es poden acomodar els substrats de l'enzim. La més profunda de les depressions té unes dimensions suficients per encabir GPP, i la seva obertura és adjacent al primer motiu d'aspartat. Com s'ha mencionat anteriorment, la FPS és activa en forma homodimèrica. El dímer de FPS presenta una estructura tridimensional amb una interfase altament hidrofòbica. Els dos centres actius estan situat en posicions oposades l'un de l'altre.

Estudis posteriors (Tarshis *et al.*, 1996), han posat de manifest que el substrat homoal·lílic (IPP) s'uneix al segon motiu ric en aspartat, mentre que el substrat al·lílic (DMAPP o GPP) s'uneix al FARM. A més, s'ha comprovat que el substrat al·lílic

s'uneix mitjançant el grup difosfat als residus d'aspartat 1 i 3 a través d'un pont amb un àtom de magnesi. Un segon àtom de magnesi també està unit als D1 i D3, i al residu d'aspartat del domini IV.

4.4. Determinació del mecanisme catalític de les *E*-preniltransferases.

Amb la finalitat d'avaluar la funció de les regions conservades en les *E*-preniltransferases, s'han realitzat nombrosos experiments de mutagènesi dels residus aminoacídics conservats. Aquests estudis s'han dut a terme bàsicament utilitzant la FPS com a model de preniltransferasa i han permès identificar els residus aminoacídics implicats en la catàlisi, a la vegada que han posat de manifest que la mida de la cavitat hidrofòbica del centre actiu de la preniltransferasa on s'uneix el substrat al·lílic determina la longitud del prenilfosfat que es sintetitza.

4.4.1. Funció dels aminoàcids conservats.

Diferents laboratoris han analitzat la funció dels aminoàcids conservats mitjançant la caracterització cinètica de FPS mutades. En substituir el primer (D4) i el tercer (D6) aspartats del domini VI per glutamats en la FPS de rata, es va comprovar que la substitució D4→E provocava una disminució en la V_{\max} de 90 vegades, mentre que la substitució D6→E pràcticament no alterava les propietats cinètiques de l'enzim (Marrero *et al.*, 1992). Quan els aspartats D1, D2, D3 i D5 de la FPS de rata van ser substituïts per glutamats (Joli i Edwards, 1993), la FPS mutada D1→E va presentar una V_{\max} similar a la de la FPS nativa, i la FPS mutada D5→E va presentar una lleugera disminució en la V_{\max} . En canvi, les substitucions D2→E i D3→E van produir disminucions d'aproximadament 1000 vegades en la V_{\max} . Cap de les FPS mutades va veure alterades les K_m pels seus substrats.

Es van realitzar estudis similars amb la FPS recombinant de *Saccharomyces*

cerevisiae (Song i Poulter, 1994). Es van substituir els aspartats dels dominis II i VI per alanines. Els resultats van mostrar que totes les substitucions produïdes en la regió II i les substitucions dels residus D4 i D5 disminuïen dràsticament l'activitat catalítica de l'enzim. La substitució del residu D6 va provocar una lleugera disminució en la V_{\max} , i augments també lleugers de $K_{m(IPP)}$ i $K_{m(GPP)}$. Posteriorment, es van substituir els aspartats del domini VI per alanines en la FPS de *Bacillus stearothermophilus* (Koyama *et al.*, 1996). Els canvis D4→A i D5→A van produir una disminució d'entre 10^4 i 10^5 vegades en la velocitat de la reacció, sense modificar les K_m pels substrats. El canvi D6→A va disminuir 10 vegades la velocitat de reacció i va augmentar 10 vegades la $K_{m(IPP)}$.

El fet que la majoria de mutacions dels aspartats dels dominis II i VI produeixin una disminució important de la velocitat de reacció sense modificar significativament les $K_{m(IPP)}$ ni $K_{m(GPP)}$ indica que aquests residus aminoacídics estan involucrats en l'eficiència catalítica de l'enzim més que en l'afinitat d'unió dels substrats (Ogura i Koyama, 1998). En conjunt, els resultats indiquen que la importància dels sis residus d'aspartat en els dominis II i VI no és la mateixa. Així, mentre que D2, D3 i D4 són tan crítics que cap d'ells pot ser substituït, ni tan sols per glutàmic, D1 pot ser substituït per glutàmic, però no per alanina, i D6 pot ser substituït fins i tot per alanina. Aquest últim resultat no és sorprenent si es té en compte que existeixen preniltransferases que no tenen conservat aquest sisè residu d'aspartat, com és el cas de la GGPS de *Neurospora crassa* (Carattoli *et al.*, 1991) o de *Sulfolobus acidocaldarius* (Ohnuma *et al.*, 1994).

Pel que fa referència a altres residus aminoacídics, la substitució de les dues arginines conservades del domini II de la FPS de rata per lisines (Joli i Edwards, 1993) va produir disminucions d'aproximadament 1000 vegades en el valor de la V_{\max} , sense afectar la $K_{m(IPP)}$ ni la $K_{m(GPP)}$. Com que els canvis van produir els mateixos efectes que les mutacions dels aspartats D2 i D3 del mateix domini, els autors van proposar que aquests residus també estaven implicats en la catalisi.

Blanchard i Karst (1993) havien aïllat el gen de la FPS de la soca CC25 de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquesta soca és portadora de la mutació *erg20-2* en el gen

que codifica la FPS, i presenta la propietat d'excretar geraniol al medi. La comparació de la seqüència d'aminoàcids de la FPS de la soca mutant amb la de la FPS nativa va posar de manifest que la mutació havia produït el canvi $K_{197} \rightarrow E$. La lisina-197 correspon a la lisina conservada de la regió V de les *E*-preniltransferases. Els autors van proposar que el canvi per glutamat disminuïa l'afinitat de l'enzim pel GPP, raó per la qual la soca excretava geraniol al medi. Posteriorment, es va substituir la lisina equivalent de la FPS de *Bacillus stearothermophilus* per una alanina i es va comprovar que es produïa un augment de 20 vegades en el valor de la $K_{m(IPP)}$ i una disminució de 70 vegades en el valor de la K_{cat} (Koyama *et al.*, 1996). Aquesta observació permetia donar una nova explicació a l'excreció de geraniol per part de la soca CC25, basada en què la disminució de l'afinitat de la FPS mutada per l'IPP, més que pel GPP, es traduiria en l'alliberació del centre catalític de l'intermediari GPP (Koyama *et al.*, 1996). D'acord amb aquestes dues possibles explicacions de l'excreció de geraniol per la soca CC25, en analitzar l'estructura tridimensional de la FPS de pollastre, es va observar que la posició en el centre catalític del grup amino de la lisina del domini V era molt propera al substrat al·lílic, i es va proposar que aquest residu actuava en la catàlisi activant el difosfat que ha de sortir, i posteriorment estabilitzant el carbocatió generat i desprotonant el C_2 de l'IPP (Tarshis *et al.*, 1996).

Es va analitzar el motiu FQ (fenilalanina-glutamina) de la regió VI en la FPS de *Bacillus stearothermophilus* (Koyama *et al.*, 1995). Els canvis $F \rightarrow A$ i $Q \rightarrow E$ van provocar una disminució de 10^5 i 10^3 vegades l'activitat catalítica en la FPS mutada, respectivament. El canvi $Q \rightarrow E$ va provocar un augment de 25 vegades la $K_{m(DMAPP)}$. Els autors van proposar que el motiu FQ del domini VI està implicat en la unió del substrat i en la catàlisi, i que concretament la fenilalanina contribueix a l'acceleració de la catàlisi estabilitzant el carbocatió format a l'inici de la reacció. Finalment, es va analitzar el paper de la serina del domini VI de la GGPS de *N. crassa* (Quondam *et al.*, 1997). La substitució de la serina per una asparragina es va traduir en una reducció del 90% de l'activitat de l'enzim.

També ha estat analitzada la funció en la regió carboxiterminal del domini VII, caracteritzat per ser ric en residus aminoacídics bàsics. En el cas de les FPS eucariotes

(veure Annex 2), el domini està encara més conservat (KIYKRQK), i el residu avantpenúltim (R, arginina) es manté també en FPS procariotes. Aquesta arginina ha estat mutada en la FPS de *B. stearothermophilus* (Koyama *et al.*, 1994) i *S. cerevisiae* (Song i Poulter, 1994), i s'ha comprovat que la mutació augmenta lleugerament la $K_{m(IPP)}$. D'altra banda, la fusió de l'epítot EEF (carregat negativament) a l'extrem carboxiterminal de la FPS de *S. cerevisiae* va provocar una disminució de 12 vegades en la V_{max} i un augment de 14 vegades en la $K_{m(IPP)}$ (Song i Poulter, 1994). Els autors van proposar que l'extrem carboxiterminal ajudava a unir IPP i, a la vegada, actuava com una barrera per evitar l'entrada d'aigua al centre actiu de l'enzim.

4.4.2. Mecanisme de determinació de la longitud del producte de reacció.

Mitjançant mutagènesi química, la FPS de *Bacillus stearothermophilus* va ser convertida en una GGPS (Ohnuma *et al.*, 1996a). L'enzim mutat, que havia sofert el canvi tirosina-81 per histidina ($Y_{81} \rightarrow H$), va adquirir la capacitat de sintetitzar GGPP com a producte de reacció majoritari (més del 85%). La tirosina-81 ocupa la posició -5 respecte el FARM. També mitjançant mutagènesi química, es va substituir l'aminoàcid que ocupa la posició -5 respecte el FARM de la GGPS de *Sulfolobus acidocaldarius*, fenilalanina-77 (Ohnuma *et al.*, 1996b). L'enzim resultant va ser capaç de sintetitzar GFPP i HexPP. Per analitzar el paper del residu situat en la cinquena posició abans del FARM, es van generar 19 FPS mutades de *B. stearothermophilus*, cada una de les quals tenia un aminoàcid diferent a la posició -5 (Ohnuma *et al.*, 1996c). Tots els enzims, excepte els portadors de les mutacions $Y_{81} \rightarrow P$ i $Y_{81} \rightarrow W$, podien catalitzar condensacions amb IPP més enllà de FPP, fins HexPP (C_{30}). Aquest conjunt de resultats va indicar que la cadena lateral del residu aromàtic que ocupa la posició -5 respecte el FARM, tirosina en la FPS o fenilalanina en la GGPS, bloqueja la condensació més enllà de FPP o GGPP, probablement mitjançant contacte directe amb la cadena hidrocarbonada del FPP o GGPP, respectivament.

D'altra banda, en determinar l'estructura tridimensional de la FPS de pollastre, s'havia observat que els residus aminoacídics -4 (fenilalanina-112) i -5 (fenilalanina-

113) respecte el FARM delimiten la cavitat hidrofòbica on es situa el substrat al·lilic (Tarshis *et al.*, 1994). Es van preparar els enzims mutats $F_{112} \rightarrow A$ i $F_{113} \rightarrow S$ i el doble mutat $F_{112} \rightarrow A / F_{113} \rightarrow S$, es van caracteritzar i es va determinar la seva estructura tridimensional (Tarshis *et al.*, 1996). Es va comprovar que l'enzim mutat $F_{112} \rightarrow A$ produïa GGPP, el mutat $F_{113} \rightarrow S$ produïa GFPP, i que el doble mutat $F_{112} \rightarrow A / F_{113} \rightarrow S$ podia sintetitzar cadenes encara més llargues, fins C_{70} . És a dir, com més petites eren les cadenes laterals dels residus aminoacídics de les posicions -4 i -5 respecte el FARM més gran era la longitud del prenifosfat sintetitzat. En analitzar l'estructura tridimensional de les FPS mutades, es va comprovar que les mutacions havien produït un augment de la mida de la butxaca on es situa el prenifosfat en el centre actiu. A partir d'aquestes observacions, els autors van proposar que la mida de la butxaca hidrofòbica del centre actiu de l'enzim determina la longitud del prenifosfat sintetitzat. El creixement de la cadena isoprenoídica més enllà de 15 carbonis és fortament inhibit en la FPS nativa per interaccions estèriques amb els anells aromàtics dels dos residus de fenilalanina del domini II.

En el cas de la FPS, estudis posteriors han demostrat que els residus crítics per determinar l'especificitat del producte sintetitzat són diferent entre FPS eucariotes i procariotes (Ohnuma *et al.*, 1997). En les FPS eucariotes, els residus aminoacídics -5 i -4 respecte FARM, que són cadenes aromàtiques F/YF, determinen la longitud del prenifosfat sintetitzat. En canvi, en les FPS procariotes, la longitud del producte sintetitzat ve determinada per dos factors: el residu aminoacídic -5 (que és una tirosina), però no pel residu de la posició -4 (que no és un residu aromàtic), i els dos residus aminoacídics addicionals que les FPS procariotes tenen enmig del FARM (DD.(XX).D). A partir d'aquest resultat, els autors han classificat les FPS en dos tipus, segons les seqüències que envolten FARM i els mecanismes que determinen la longitud de la cadena isoprenoídica: FPS de tipus I, les eucariotes; i FPS de tipus II, les procariotes.

Més recentment, s'ha confirmat que en les *E*-preniltransferases el mecanisme per determinar la longitud del prenifosfat sintetitzat és el contacte directe del grup prenílic amb la cadena lateral d'algun residu aminoacídic de l'enzim. S'han generat dobles i triples mutants en les posicions -5, -8 i -11 respecte el FARM de la FPS de *B.*

stearothermophilus i de la GGPS de *S. acidocaldarius* (Ohnuma *et al.*, 1998). Aquests residus aminoacídics estan situats en el mateix costat de l' α -hèlix que delimita la cavitat on es situa el prenildifosfat sintetitzat, i estan separats per la distància d'una, dues i tres unitats d'isoprè. En aquest cas, els enzims portadors de la triple mutació han arribat a sintetitzar productes més llargs de C₅₀, fins C₁₀₀. A partir d'aquests resultats, els autors han proposat que l'especificitat de producte d'una *E*-preniltransferasa està determinada per l'estructura que delimita el camí per on el prenildifosfat s'allarga en l'interior de l'enzim.

MATERIALS I MÈTODES

Les tècniques de manipulació i anàlisi de DNA, RNA, i proteïnes s'han realitzat segons els manuals *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997). Els mètodes que es descriuen a continuació corresponen a tècniques que s'han posat a punt en el laboratori i/o que són d'especial interès.

1. CONDICIONS DE CULTIU DE PLANTES D'*Arabidopsis thaliana*.

Tots els experiments d'obtenció de DNA i RNA i de transformació d'aquesta memòria s'han dut a terme amb l'espècie *Arabidopsis thaliana* varietat Columbia.

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* van ser cultivades a una temperatura de 22-24°C, i sotmeses a un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor (condicions de dia llarg, per accelerar la floració de la planta) o bé a un fotoperíode de 8 h de llum i 16 h de foscor (condicions de dia curt, per potenciar la fase vegetativa de la planta i retardar la floració).

El material biològic utilitzat va ser cultivat o bé en condicions estèrils o bé en testos, segons les necessitats.

En l'apartat de Materials i Mètodes on es descriu la generació i anàlisi de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* (apartat 14), es descriuen les condicions de cultiu concretes d'aquestes plantes.

1.1. Cultius estèrils.

El cultiu estèril d'*Arabidopsis* és necessari quan es pretén obtenir teixit per purificar-ne àcids nucleics de plàntules crescudes en llum i en foscor i d'arrels. També es sol utilitzar sempre per germinar llavors de la planta que, quan tenen aproximadament 15 dies de vida, es passen a créixer en testos.

Per cultivar les plantes en condicions estèrils, les plantes es creixen en plaques de Petri. El medi de cultiu és medi de germinació.

Les llavors d'*Arabidopsis thaliana* s'esterilitzen per tractament amb hipoclorit sòdic 5% (v/v, lleixiu comercial) i tritó X-100 al 0,01% durant 15 min, seguit d'una sèrie de 7 rentats amb aigua destil·lada estèril, per eliminar el lleixiu i el detergent. Finalitzat el procés, les llavors es distribueixen en el medi estèril amb l'ajut d'una pipeta Pasteur.

Quan es desitja recollir les plàntules senceres per obtenir àcids nucleics, les llavors es dipositen a sobre de paper Whatman 3MM estèril col·locat damunt del medi de germinació. D'aquesta manera, el paper servirà de suport a les plàntules, que podran ser recollides amb una espàtula. Per l'obtenció d'arrels de les plàntules, les llavors es van sembrar en línia recta sobre paper Whatman 3MM, però en un medi de germinació que contenia 20 g/l d'agar. Aquesta concentració d'agar permet col·locar les plaques en posició vertical sense que el medi es desprengui. Es col·loca la placa de forma que la línia de llavors sigui paral·lela a la superfície, i d'aquesta manera la part aèria de la planta creix perfectament separada de l'arrel. Quan es desitja recollir el teixit, amb un bisturí es separen les dues parts, i es recullen amb una espàtula. En el cas concret de plàntules crescudes en foscor, la recol·lecció del teixit es fa amb una llum verda com a única font d'il·luminació. Sempre que es recullen teixits per l'obtenció d'àcids nucleics, les mostres es congelen immediatament en nitrogen líquid i es conserven a -80°C .

Quan s'esterilitzen llavors amb la finalitat de transferir les plantes a testos, les llavors poden ser dipositades directament sobre el medi de germinació, ja que la baixa concentració d'agar permetrà retirar la plàntula sense trencar les arrels que s'han introduït en el medi.

Medi de germinació:

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

Esterilitzar amb autoclau.

(*) En tota la memòria, sempre quan es fa referència al medi Murashige i Skoog, correspon al medi sense sacarosa, sense kinetina, sense àcid 3-indolacètic i sense agar.

1.2. Cultius en testos.

El cultiu en test es realitza en un suport sòlid que consisteix en una mescla de turba i sorra de riu en proporció 4:1. Els testos s'irriguen un o dos cops per setmana, segons les necessitats de les plantes, alternant aigua i una solució de nutrients minerals (Somerville i Ogreen, 1982).

Quan es recol·lecten diferents parts de la planta per obtenir RNA, les mostres es congelen immediatament en nitrogen líquid i es conserven a -80°C .

<u>Medi mineral:</u>		<u>Micronutrients:</u>	
KNO ₃	5 mM	H ₃ BO ₃	70 mM
KH ₂ PO ₄ (pH 5,5)	2,5 mM	MnCl ₂	14 mM
MgSO ₄	2 mM	CuSO ₄	500 μM
Ca(NO ₃) ₂	2 mM	ZnSO ₄	1 mM
EDTA Fèrric	50 μM	NaMoO ₄	200 μM
Micronutrients	0,1 %	NaCl	10 mM
		CoCl ₂	10 μM

2. SOUTHERN BLOT GENÒMIC.

2.1. Obtenció de DNA genòmic d'*Arabidopsis thaliana*.

El mètode d'obtenció de DNA genòmic d'*Arabidopsis thaliana* està basat en els mètodes d'obtenció de DNA descrits en el manual *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997), amb algunes modificacions. El teixit escollit per l'obtenció de DNA genòmic d'*Arabidopsis* és plàntula de 14 dies creixuda en condicions estèrils.

PROCEDIMENT

1. En nitrogen líquid, i evitant sempre que es descongeli la mostra, moldre 10-20 g de teixit en un morter fins a obtenir una pols molt fina. Aquest és un pas crític en el procés, ja que si no es trenca bé el teixit l'extracció de DNA no es veurà afavorida.
2. Afegir 5 ml de tampó d'extracció per g de teixit i moldre altra vegada fins tornar a tenir pols fina.
3. Deixar descongelar la mostra, i mesurar-ne el volum. Afegir quantitat suficient d'una solució de Sarcosil 10% (p/v) perquè quedi a una concentració final de l'1% (p/v). Homogenitzar la mostra i repartir-la en tubs Corex-30.
4. Incubar 2 h a 55°C .
5. Centrifugar 15 min a $5.500\times g$ a 4°C .
6. Recuperar el sobrenedant i precipitar els àcids nucleics afegint 0,6 volums d'isopropanol. El sediment hauria de ser fàcilment visible; cas que no ho fos, deixar que la precipitació tingui lloc durant 1 h a -20°C .

7. Centrifugar 20 min a $7.500\times g$ a 4°C .

A partir d'aquest punt, cal tenir en compte que per evitar degradar el DNA genòmic les mostres hauran de ser agitades i pipetejades amb suavitat, ja que la mida de les molècules de DNA les fa ser especialment fràgils.

8. Recuperar el sediment, rentar-lo amb etanol al 70% i assecat-lo, encara que no excessivament, ja que d'altra manera el DNA és molt difícil de resuspendre.
9. Resuspendre cada sediment de DNA en 1 ml TE pH 7,5.
10. Afegir 160 μl NaCl 5 M per cada ml de mostra.
11. Afegir 1/10 del volum final (mostra DNA + NaCl 5M) de la solució CTAB/NaCl (prèviament atemperada a 65°C) i incubar 20 min a 65°C .
12. Fer una extracció amb igual volum de cloroform:isoamílic 24:1 (v:v).
13. Recuperar la fase aquosa. Repetir dues vegades els passos 11 i 12.
14. Transferir la fase aquosa a un tub Corex-30 nou, i precipitar els àcids nucleics amb 0,6 volums d'isopropanol. El DNA genòmic és fàcilment visible, i precipita gairebé instantàniament.
15. Centrifugar 15 min a 8.000 rpm a 4°C per recollir el DNA.
16. Rentar el DNA amb força volum d'etanol al 70% (aproximadament 10 ml, per eliminar les restes de CTAB) i assecat-lo.
17. Resuspendre el DNA en 1-2 ml de TE pH 7,5.
18. Fer un tractament amb RNAsa A 100 $\mu\text{g/ml}$ per eliminar l'RNA present a la mostra.
19. Fer una extracció amb fenol/cloroform:isoamílic.
20. Recuperar la fase aquosa i fer dues extraccions amb cloroform:isoamílic.
21. Recuperar la fase aquosa i precipitar el DNA genòmic afegint 1/10 del volum d'acetat sòdic 3M pH 5,2 i 2 volums d'etanol absolut.
22. Centrifugar 15 min a 8.000 rpm a 4°C per recollir el DNA.
23. Resuspendre el DNA en 1-2 ml de TE pH 7,5, i quantificar-lo a l'espectrofotòmetre.

La quantitat final de DNA obtinguda es quantifica determinant la seva absorbància a 260, 280 i 340 nm, tenint en compte que $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$, que la relació $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ha de ser propera a 2 i que OD_{340} ha de ser pràcticament nul·la.

SOLUCIONS

Tampó d'extracció:

Tris-HCl pH 8	100 mM
EDTA	100 mM
NaCl	250 mM
Proteinasa K	100 $\mu\text{g/ml}$
Afegir Proteinasa K extempòriament.	

CTAB/NaCl:

CTAB	10%
NaCl	0,7 M

2.2. Electroforesi i transferència de DNA genòmic.

L'electroforesi de DNA genòmic es realitza en gels d'agarosa 0,8% (p/v) preparats en tampó TPE. En cada carril, es carreguen 8 µg de DNA digerit amb l'enzim de restricció escollit (*Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I i *Eco*RV). L'electroforesi té lloc durant aproximadament 14 h a 20 volts, fins que el front ha recorregut 10 cm. El gel s'incuba en tampó TPE 1× amb bromur d'etidi 0,5µg/ml aproximadament durant 30 min, fins que el DNA és visible i es pot fotografiar.

Seguidament, es desnaturalitza el DNA fent dos rentats del gel de 45 min amb una solució NaCl 1,5 M i NaOH 0.5 M, i després es neutralitza fent dos rentats de 45 min amb una solució NaCl 1,5 M, Tris-HCl pH 7,5 0,5 M i EDTA 1mM.

El DNA es transfereix durant tota una nit a una membrana de nitrocel.lulosa Hybond-C (Amersham) per capil.laritat en una solució SSC 10×. Al matí, el filtre es renta amb SSC 6×, i es fixa el DNA escalfant dues hores a 80°C.

SOLUCIONS

Tampó TPE 10×:

Tris-fosfat pH 8,7	360 mM
EDTA	10 mM

Preparació: pesar la quantitat necessària de Tris base i EDTA, i ajustar el pH 8,7 afegint NaH₂PO₄ en pols. Autoclavar.

2.3. Hibridació i rentats.

HIBRIDACIÓ

Les condicions d'alta astringència foren una pre-hibridació de 4 h en un bany a 65°C en agitació; i una hibridació de 18 h en un bany a 65°C en agitació, amb la solució d'hibridació a la que afegim la quantitat de 10⁶ cpm/ml de sonda marcada amb ³²P. Les condicions de baixa astringència foren una pre-hibridació i una hibridació com les del cas anterior, però realitzades a la temperatura de 58°C.

Solució de pre-hibridació:

NaCl	0,7 M
Fosfat sòdic pH 7,6	40 mM
EDTA	4 mM
PVP	0,2% (p/v)
Ficoll	0,2% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
DNA de salmó	200 µg/ml

Solució d'hibridació:

NaCl	0,7 M
Fosfat sòdic pH 7,6	40 mM
EDTA	4 mM
PVP	0,2% (p/v)
Ficoll	0,2% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
DNA de salmó	200 µg/ml
Sulfat de dextrà	9% (p/v)

RENTATS

Els rentats dels filtres hibridats en condicions d'alta astringència foren els següents:

- dos rentats de 5 min a temperatura ambient en SSC 2× i SDS 0,5%
- dos rentats de 20 min a 65°C en SSC 1× i SDS 0,5%
- dos rentats de 20 min a 65°C en SSC 0,2× i SDS 0,5%

Els rentats del filtre hibridat en condicions de baixa astringència foren els següents:

- dos rentats de 20 min a temperatura ambient en SSC 2× i SDS 0,5%
- dos rentats de 20 min a 58°C en SSC 2× i SDS 0,5%

2.4. Sondes utilitzades.

Sonda FPS1: fragment de 340 pb del cDNA del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, generat per digestió *NotI-HindIII* del plasmidi pDD71 (Delourme *et al.*, 1994) (veure figura 11).

Sonda FPS2: fragment que s'extén des de la posició -534 a la posició +280 del gen *FPS2*. Ha estat generada per digestió *XhoI-HindIII* de la regió 5' del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* (veure figura 14).

Les sondes varen ser marcades amb ^{32}P radiactiu amb $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, utilitzant el kit de marcatge *Random Primers DNA labeling kit* (Boehringer Mannheim).

3. AÏLLAMENT DE CLONS GENÒMICS.

L'aïllament de clons genòmics farnesilpirofosfat sintasa es va dur a terme analitzant 2×10^4 fags recombinants d'una llibreria genòmica d'*Arabidopsis thaliana* varietat *Columbia* construïda en el vector λEMBL4 , cedida pel Dr. A. Bachmair (Max-Plank Institut für Züchtungsforschung, Köln, Alemanya). El plaueig del banc es va fer utilitzant la soca BNN 102 (*Escherichia coli* C600*hflA supE44 hsdR thi-1 thr-1 leu36 lacY1 tonA21 hflA150 (chr::Tn 10 (ter'))*). Com a sonda per realitzar el crivellatge, es va utilitzar el fragment de 730 pb *EcoRI-PstI* del cDNA *FPS1* (Delourme *et al.*, 1994), que va ser marcat amb ^{32}P radiactiu amb $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, utilitzant el kit de marcatge *Random Primers DNA labeling kit* (Boehringer Mannheim).

L'anàlisi de la genoteca es va dur a terme segons els protocols descrits en el manual *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997), en condicions de baixa astringència. DNA dels fags recombinants va ser transferit a filtres de nitrocel.lulosa (Millipore). Els filtres van ser pre-hibridats durant 5 h a 65°C en una solució que era SSC 6×, solució de Denhardt 2× i DNA desnaturalitzat d'esperma de salmó 100 $\mu\text{g/ml}$. Els filtres van ser hibridats en una solució idèntica a la de pre-hibridació, a la que s'afegien 750.000 cpm sonda/ml. Es van realitzar dos rentats dels filtres de 15 min a 45°C en una solució SSC 2× i SDS 0,1%, i dos rentats més de 15 min a 45°C en una solució SSC 0,2× i SDS 0,1%. Van fer falta tres passos de purificació per aïllar onze clons genòmics.

4. SOUTHERN DE FRAGMENTS.

Es va obtenir DNA dels clons genòmics aïllats i es va digerir amb els enzims de restricció *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I i *Eco*RV. Per cada enzim de restricció, es van preparar quatre gels d'agarosa 1% on es va carregar 1 µg de DNA dels diferents fags. Els gels van ser tractats i transferits tal com s'ha descrit en l'apartat 2.2 de Materials i Mètodes, per la transferència de DNA genòmic.

Els filtres van ser hibridats en condicions d'alta i de baixa astringència utilitzant alternativament dues sondes diferents del cDNA FPS1 (Delourme *et al.*, 1994), que van ser marcades amb ³²P radiactiu amb [α -³²P]dCTP, utilitzant el kit de marcatge *Random Primers DNA labeling kit* (Boehringer Mannheim). Les sondes utilitzades van ser:

- fragment de 340 pb del cDNA del cDNA FPS1 d'*Arabidopsis*, generat per digestió *Not*I-*Hind*III del plasmidi pDD71, sonda usada també en els experiments de Southern amb DNA genòmic
- fragment de 730 pb *Eco*RI-*Pst*I del cDNA FPS1 d'*Arabidopsis*, sonda usada també per dur a terme el crivellatge del banc genòmic d'*Arabidopsis*

Les condicions d'hibridació i rentats d'alta i baixa astringència són idèntiques a les descrites en els experiments de Southern amb DNA genòmic (apartat 2.3 de Materials i Mètodes), amb l'única excepció de la composició de la solució d'hibridació, que és la següent: SSC 6×, solució de Denhardt 2× i DNA desnaturalitzat d'esperma de salmó 100 µg/ml.

5. NORTHERN BLOT

Els experiments de Northern blot s'han dut a terme amb RNA total de diferents teixits d'*Arabidopsis*, que són plàntules crescudes en condicions de dia llarg o de foscor, arrels, tija, fulla i flor.

5.1. Obtenció d'RNA total de diferents teixits d'*Arabidopsis thaliana*.

El mètode usat per a l'extracció d'RNA de mostres d'*Arabidopsis thaliana* està basat en el mètode descrit per Dean *et al.* (1985), amb algunes modificacions. Aquest mètode es fonamenta en la precipitació selectiva de l'RNA enfront del DNA genòmic amb LiCl 2 M.

PROCEDIMENT

1. En nitrogen líquid, i evitant sempre que es descongeli la mostra, moldre el teixit en un morter fins a obtenir una pols molt fina. Cal tenir en compte que aquest és un pas crític en el procés, ja que si no es trenquen bé els teixits l'extracció d'RNA no es veurà afavorida.

2. Transferir el teixit mòlt a un erlenmeyer on hi hagi 10 ml de tampó d'extracció i 3.3 ml de fenol per g de teixit.
3. Homogenitzar la mescla utilitzant un Politró, durant 2 min a velocitat 5-6.
4. Afegir 3.3 ml de cloroform per g de teixit.
5. Repetir l'homogenització (pas 3).
6. Repartir la mostra en tubs Falcon-50, i incubar 20 min a 50°C.
7. Centrifugar 15 min a 8.000×g a 4°C.
8. Recuperar la fase aquosa, afegir-li la meitat de volum de fenol i agitar vigorosament. Afegir igual volum de cloroform que de fenol. Agitar altre cop. Centrifugar 15 min a 8.000×g a 4°C.
9. Repetir l'extracció amb fenol-cloroform (pas 8) dues vegades més.
10. Extreure la fase aquosa dues vegades amb igual volum de cloroform.
11. Recuperar la fase aquosa, mesurar-ne el volum (V) i repartir-lo en Corex 30.
12. Precipitar els àcids nucleics afegint V/10 d'acetat sòdic 3 M pH 5.2 i 2V d'etanol absolut. Deixar-ho precipitar a -20°C una hora com a mínim.
13. Recuperar RNA i DNA centrifugant 30 min a 10.000 rpm en el rotor SS34 a 4°C. Descartar el sobrenedant, i rentar el sediment amb etanol al 70%.
14. Un cop el sediment està ben sec, es resuspèn amb aigua DEPC i s'afegeix prou LiCl 8 M perquè quedi a una concentració final de LiCl 2 M. Es deixa en gel a 4°C durant una nit, a fi de precipitar selectivament l'RNA.
15. Recuperar l'RNA centrifugant 30 min 10.000 rpm en el rotor SS34 a 4°C. Retirar el sobrenedant amb cura, i assecar el sediment.
16. Resuspèn l'RNA amb aigua DEPC, transferir-lo a un tub eppendorf i guardar-lo a -80°C.

La quantitat final d'RNA obtinguda es quantifica determinant la seva absorbància a 260, 280 i 340 nm, tenint en compte que 1 OD₂₆₀=40 µg RNA/ml, que la relació OD₂₆₀/OD₂₈₀ ha de ser propera a 2 i que OD₃₄₀ ha de ser pràcticament nul·la.

El rendiment del procés d'obtenció d'RNA varia en funció del teixit en qüestió i de la quantitat de teixit de partida. Com més resistent és el teixit (cas de les arrels i tiges) menor serà la quantitat d'RNA obtinguda, i també podrà ser menor la seva qualitat. Es recomana no partir de més de 5-10 g de teixit, per tal d'assegurar una bona trituració amb el morter. Considerant aquests factors, en general el rendiment del procés oscil·la entre 0.1-2 µg RNA/g teixit de partida.

SOLUCIONS

Tampó d'extracció:

Tris-HCl	0.18 M
EDTA	4.5 mM
LiCl	0.09 M
SDS	1 %
	pH 8.2 (HCl)

5.2 Electroforesi i transferència d'RNA.

L'electroforesi dels RNAs es realitza en gels desnaturalitzants d'agarosa 1% (p/v) i formaldehid 2.2 M, preparats amb tampó MOPS 1×. Es carreguen 30 µg d'RNA total de cada teixit, que es tracten de la manera següent: 30 µg d'RNA total resuspendos en 5 µl d'aigua DEPC, als quals s'afegeixen 5 µl de MOPS 5×, 3.5 µl de formaldehid, 10 µl de formamida i 0.5 µl de bromur d'etidi 2 mg/ml. Les mostres així preparades es desnaturalitzen escalfant 5 min a 70°C. Després s'atemperen en gel, se'ls afegeixen 2.5 µl de tampó de càrrega i es carreguen en el gel.

Abans de carregar les mostres en el gel, es realitza un "pre-running" de 5 min a 50 volts, per eliminar possibles impureses del gel. L'electroforesi es realitza a 30-40 volts, sense submergir el gel en el tampó de l'electroforesi MOPS 1×, i cobrint el gel amb plàstic transparent, per evitar l'evaporació del formaldehid del gel. Cada 30 min es recomana moure el tampó d'electroforesi d'una banda a l'altra dels elèctrodes.

L'electroforesi s'atura quan el front ha recorregut $\frac{3}{4}$ parts del gel. Seguidament, es fan dos rentats del gel en tampó fosfats 25 mM pH 6.5, i es procedeix a transferir l'RNA en tampó fosfats 25 mM pH 6.5 a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham). La transferència té lloc per capilaritat durant tota una nit. Al matí, es renta el filtre amb tampó fosfats 25 mM pH 6.5, i es fixa l'RNA escalfant dues hores a 80°C.

SOLUCIONS

Tampó MOPS 5×

MOPS	0.2 M
Acetat sòdic pH 5.3	50 mM
EDTA pH 8	5 mM

Tampó de càrrega 10×

Glicerol	50%
EDTA pH 8	1 mM
Blau de bromfenol	0.25%

5.3. Hibridació i rentats.

Les condicions de la hibridació i dels posteriors rentats han estat escollides per aconseguir que les sondes utilitzades fossin específiques pel seu corresponent missatger.

HIBRIDACIÓ

En tots els experiments de Northern blot, el filtre ha estat incubat en solució d'hibridació durant dues hores en un bany d'agitació a 42°C. Transcorregut aquest temps, el filtre és incubat durant tota una nit, en el bany d'agitació a 42°C, en solució d'hibridació nova a la qual s'afegeixen 2×10^6 cpm/ml de la sonda marcada amb ^{32}P .

Solució d'hibridació:

NaCl	1 M
Fosfat sòdic pH 6.5	50 mM
Formamida	50% (v/v)
Denhardt's	7.5×
SDS	1%
DNA de salmó	500 µg/ml
Sulfat de dextrà	10% (p/v)

Preparació extemporània, i afegint els components en l'ordre indicat.

RENTATS

Les condicions de rentat en els experiments de Northern blot utilitzant sondes específiques pels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* són les següents:

- dos rentats de 15 min a temperatura ambient en SSC 2× i SDS 0.1%
- dos rentats de 15 min a 40°C en SSC 1× i SDS 0.1%
- un rentat de 15 min a 40°C en SSC 0.1× i SDS 0.1%
- un rentat de 15 min a 40°C en SSC 0.1×

Les condicions de rentat en el Northern blot utilitzant com a sonda el fragment del gen 25 S rRNA de blat són les següents:

- dos rentats a temperatura ambient en SSC 2× i SDS 0.5%
- dos rentats a 55°C en SSC 2× i SDS 0.5%
- dos rentats a 55°C en SSC 0.1× i SDS 0.5%

5.4. Sondes utilitzades.

Sonda FPS1: fragment de 370 pb que s'extén de la posició +2323 a la posició +2701 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, generat per digestió *BglII-HindIII* de la regió 3' d'aquest gen (veure figures 16 i 23).

Sonda FPS1L: fragment de 289 pb que s'extén des de la posició -309 a la posició -20 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* (veure figura 23), generat per amplificació per PCR d'aquest gen, utilitzant com a encebadors els oligonucleòtids següents:

- encebador sentit: s'extén de la posició -309 a la -290 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*

5'-GTTCCATCGAAAGAGGCCAC-3'

- encebador antisentit: complementari a la seqüència compresa entre les posicions -20 a la -41 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*

5'-GCCTTTTTTATTGTCATTGCCC-3'

Sonda FPS2: fragment de 450 pb que s'extén de la posició +2544 a la posició +2997 del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, generat per tall *BglII-KpnI* de la regió 3' d'aquest gen (veure figura 16).

Sonda 25S rRNA: fragment de 900 pb generat pel tall *BamHI-EcoRI* del plasmidi pTA250, que conté el gen rRNA 25 S citoplasmàtic de blat (Gerlach *et al.* 1979).

Les sondes varen ser marcades amb ^{32}P radiactiu amb $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, utilitzant el kit de marcatge *Random Primers DNA labeling kit* (Boehringer Mannheim).

6. RACE.

La tècnica de RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*) va ser descrita inicialment per Frohman *et al.* (1988), i ha estat utilitzada amb diverses modificacions.

6.1. Detecció de missatgers.

L'existència d'un missatger pot ser demostrada mitjançant retrotranscripció d'un fragment de la seva seqüència, i posterior amplificació per PCR. És necessari disposar d'encebadors específics pel missatger que es desitgi detectar. En aquest cas, es desitjava detectar l'existència del missatger FPS1L, per la qual cosa es van dissenyar els encebadors:

- FPS 5: 5'-CCTGTGGAT(G/A)TGATTGCGAAG

Encebador per la Transcriptasa reversa, complementari a la seqüència compresa entre les posicions +763 a la +783 del gen *FPS1*, i de la posició +652 a la +672 del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. Donada l'elevada homologia en la regió codificant dels dos gens (només una base diferent), l'encebador reconeix simultàniament els dos missatgers

- FPS 4: 5'-CCATACCAACCTGAGGAACTCTG-3'

Encebador antisentit específic pel missatger FPS1, utilitzat en l'amplificació per PCR, complementari a la seqüència codificant compresa entre les posicions +654 a +666 i +730 a +739 del gen *FPS1*. L'encebador està interromput per l'intró 4 del gen *FPS1*.

- FPS 6: 5'-GGCGTTTTTCGGGAGAAGAAGG-3'

Encebador sentit específic pel missatger FPS1L, utilitzat en la PCR, que s'extén de la posició -97 a la -77 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*.

PROCEDIMENT

1. Tractament de l'RNA total amb DNAsa I.

En un volum final de 100 µl,	20 µg	RNA total
	25 mM	MgCl ₂
	10 mM	Tris-HCl pH 7,8
	40 u	RNAsin (Promega)
	30 u	DNase I RNase free (Boehringer)

Incubar 75 min a 37°C.

Afegir 1 µl SDS 20% per inactivar l'enzim.

2. Fer una extracció amb fenol-cloroform, i precipitar l'RNA total afegint 10 µl d'acetat sòdic 3 M i 200 µl d'etanol absolut. Rentar el precipitat amb etanol al 70%.

Resuspendre l'RNA en 30µl d'aigua DEPC, i quantificar a l'espectrofotòmetre.

3. Reacció de retrotranscripció.

En un volum final de 20 µl,	1 µg	RNA total tractat amb DNAsa I
	10 pmols	encebador antisentit
	10 mM	DTT
	1×	Tampó de transcripció
	10 u	RNAsin (Promega)
	0,5 mM	dATP
	0,5 mM	dCTP
	0,5 mM	dTTP
	0,5 mM	dGTP
	200 u	Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.)

Incubar 1 hora a 37°C.

4. Reacció de PCR.

En un volum final de 50 µl,	5 µl	reacció retrotranscripció
	10 pmols	encebador sentit
	10 pmols	encebador antisentit
	1,5 mM	MgCl ₂
	0,2 mM	dATP
	0,2 mM	dCTP
	0,2 mM	dTTP
	0,2 mM	dGTP
	1×	tampó PCR
	0,5 u	Taq polimerasa (Pharmacia)

Condicions de la PCR: sense haver afegit l'enzim, escalfar 1 min a 82°C. Afegir l'enzim, i realitzar 35 cicles de desnaturalització de 35 segons a 94°C, hibridació de 45 segons a 60°C i extensió de 2 min a 72°C. Finalitzar amb una extensió de 7 min a 72°C.

5. Els fragments de DNA generats en l'amplificació poden ser clonats en el vector pGEM-T (Promega).

6.2. Clonatge dels cDNAs FPS1L i FPS2.

Els cDNAs FPS1L i FPS2 van ser clonats aplicant una estratègia de transcriptasa reversa seguida d'una amplificació per PCR (RT-PCR). Aquest mètode es basa en la síntesi de la primera cadena d'un banc de cDNA utilitzant un encebador adaptador-oligodT i la transcriptasa reversa, i una posterior amplificació específica pel cDNA que es desitja clonar, utilitzant com a encebadors un oligonucleòtid de la regió 5' d'aquest cDNA i el mateix adaptador, sense el fragment oligodT. En la figura 9 es mostra un esquema de l'estratègia seguida pel clonatge del cDNA FPS2.

DESCRIPCIÓ DELS ENCEBADORS UTILITZATS.

Adaptador-(dT)₁₇

5'-GACTCGAGTCGACATCGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Encebador antisentit utilitzat per la síntesi de la primera cadena del banc de cDNA. Conté les dianes de restricció *XhoI* (en cursiva) i *SalI* (subratllada), i 17 restes de timina.

Adaptador

5'-GACTCGAGTCGACATCGGG-3'

Encebador antisentit utilitzat per l'amplificació per PCR.

FPS6

5'-GGCGTTTTTCGGGAGAAGAAGG-3'

Encebador sentit per la PCR específic pel gen *FPS1*, situat en la regió líder de l'mRNA FPS1L, i que s'extén de la posició -97 a la -77 del gen.

FPS2

5'-GGTCCACATTTGGCTTTGCAC-3'

Encebador sentit per la PCR específic pel gen *FPS2*, situat en la regió líder del missatger FPS2, i que s'extén des de la posició -41 a la -20.

PROCEDIMENT

1. Reacció de retrotranscripció.

En un volum final de 20 µl:

5 µg	poli(A) ⁺ d'inflorescències
45 pmols	encebador adaptador-(dT) ₁₇
10 mM	DTT
1,5 mM	dATP
1,5 mM	dCTP
1,5 mM	dTTP
1,5 mM	dGTP
10 u	RNAsin (Promega)
1×	Tampó RT
400 u	Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.)

Incubar 2 hores a 42 °C.

Ràpidament, refredar en gel.

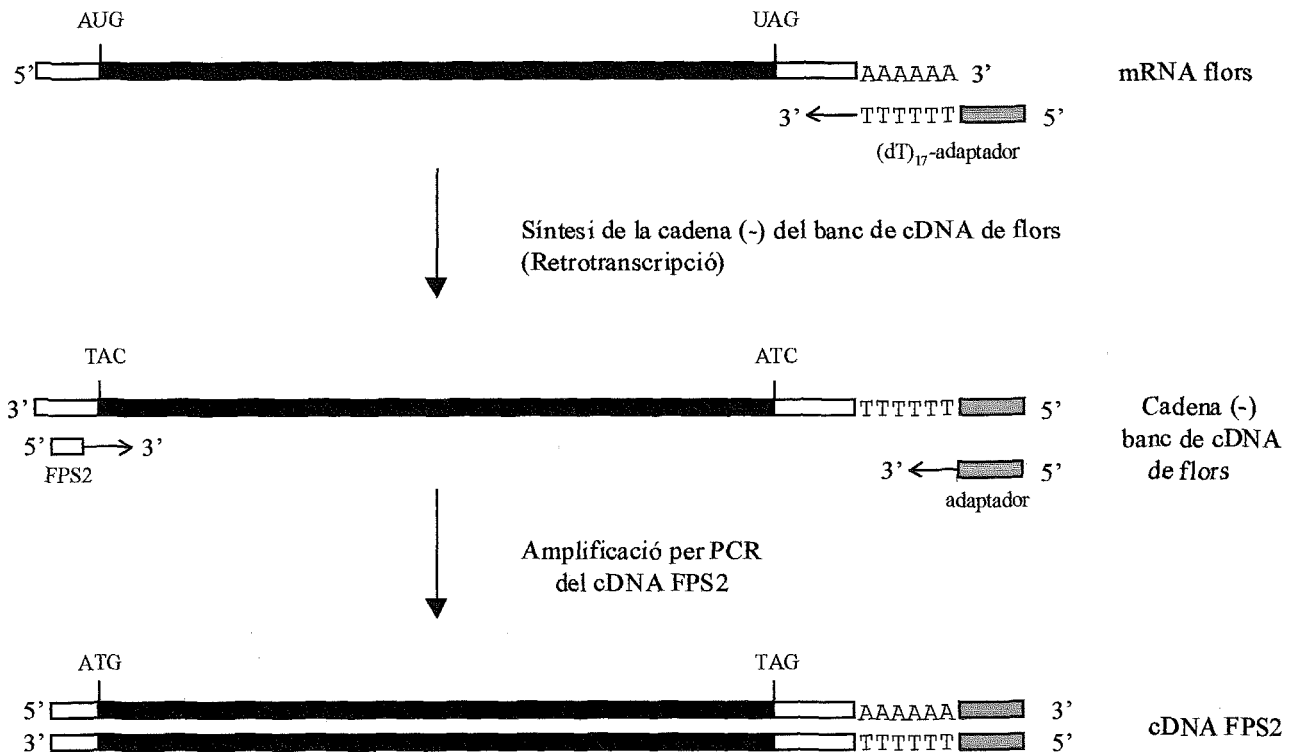


Figura 9. Esquema de l'estratègia utilitzada pel clonatge del cDNA FPS2 d'*Arabidopsis*. A partir de la fracció poli(A)⁺ purificada d'RNA total de flors d'*Arabidopsis*, es va sintetitzar la primera cadena (cadena -) d'un banc de cDNA de flors, utilitzant com encebador per la transcriptasa reversa l'oligonucleòtid "adaptador" que té unida en el seu extrem 3' una seqüència oligod(T)₁₇. Posteriorment, es va procedir a amplificar per PCR el cDNA FPS2, utilitzant com encebadors el mateix oligonucleòtid antisentit "adaptador" i l'oligonucleòtid sentit FPS2, un encebador específic pel cDNA FPS2, derivat de la regió 5' transcrita no traduïda. El fragment de DNA amplificat per PCR va ser purificat en gel d'agarosa i clonat en el vector pGEM-T. Per facilitar la comprensió de l'esquema, els dibuixos no estan fets a escala.

2. Amplificació per PCR.

En un volum final de 50 µl:	2 µl	cadena senzilla del banc de cDNA
	25 pmols	encebador sentit específic (FPS2 o FPS6)
	25 pmols	encebador adaptador
	1,5 mM	MgCl ₂
	0,2 mM	dATP
	0,2 mM	dCTP
	0,2 mM	dTTP
	0,2 mM	dGTP
	1×	tampó PCR
	1 u	Taq polimerasa (Pharmacia)

Condicions de la PCR: desnaturalitzar 5 min a 95°C abans d'afegir la Taq polimerasa. Abaixar la temperatura fins a 72°C, i afegir la Taq polimerasa. Fer una hibridació d'1 min a 58°C i una primera etapa d'extensió de 40 min a 72°C. Seguir amb quaranta cicles de desnaturalització durant 40 segons a 94°C, hibridació d'1 min a 58°C i extensió de 3 min a 72°C. Finalitzar amb una extensió final de 15 min a 72°C.

3. Clonatge dels cDNA.

El producte resultant de l'amplificació de PCR va ser purificat a través d'un gel agarosa, i clonat en el vector pGEM-T (Promega). Els plasmidis que contenen els cDNA FPS1L i FPS2 van ser anomenats pcNC3 i pcNC2, respectivament.

Els cDNA van ser subclonats en el plasmidi pBluescript i seqüenciats.

6.3. Determinació de l'inici de transcripció del gen *FPS2*.

L'inici de transcripció del gen *FPS2* va ser determinat mitjançant una variant de la tècnica de *RACE*, utilitzant el kit *5'-Amplifinder RACE Kit (Clontech Laboratories)*. En la figura 10 es mostra un esquema de l'estratègia utilitzada.

DESCRIPCIÓ DELS ENCEBADORS UTILITZATS

Anchor I

5'-CACGAATTC~~ACTATCGATTCTGGAACCTTCGAGG~~-3'

Oligonucleòtid que es lliga a l'extrem 3' de la cadena senzilla de cDNA. La seva seqüència inclou la diana de restricció *EcoRI*, indicada en cursiva.

Anchor II

5'-CTGGTTCGGCCACCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAG-3'

Oligonucleòtid que és parcialment complementari (seqüència subratllada) a l'encebador anchor I, que s'utilitza com a encebador sentit en l'amplificació per PCR.

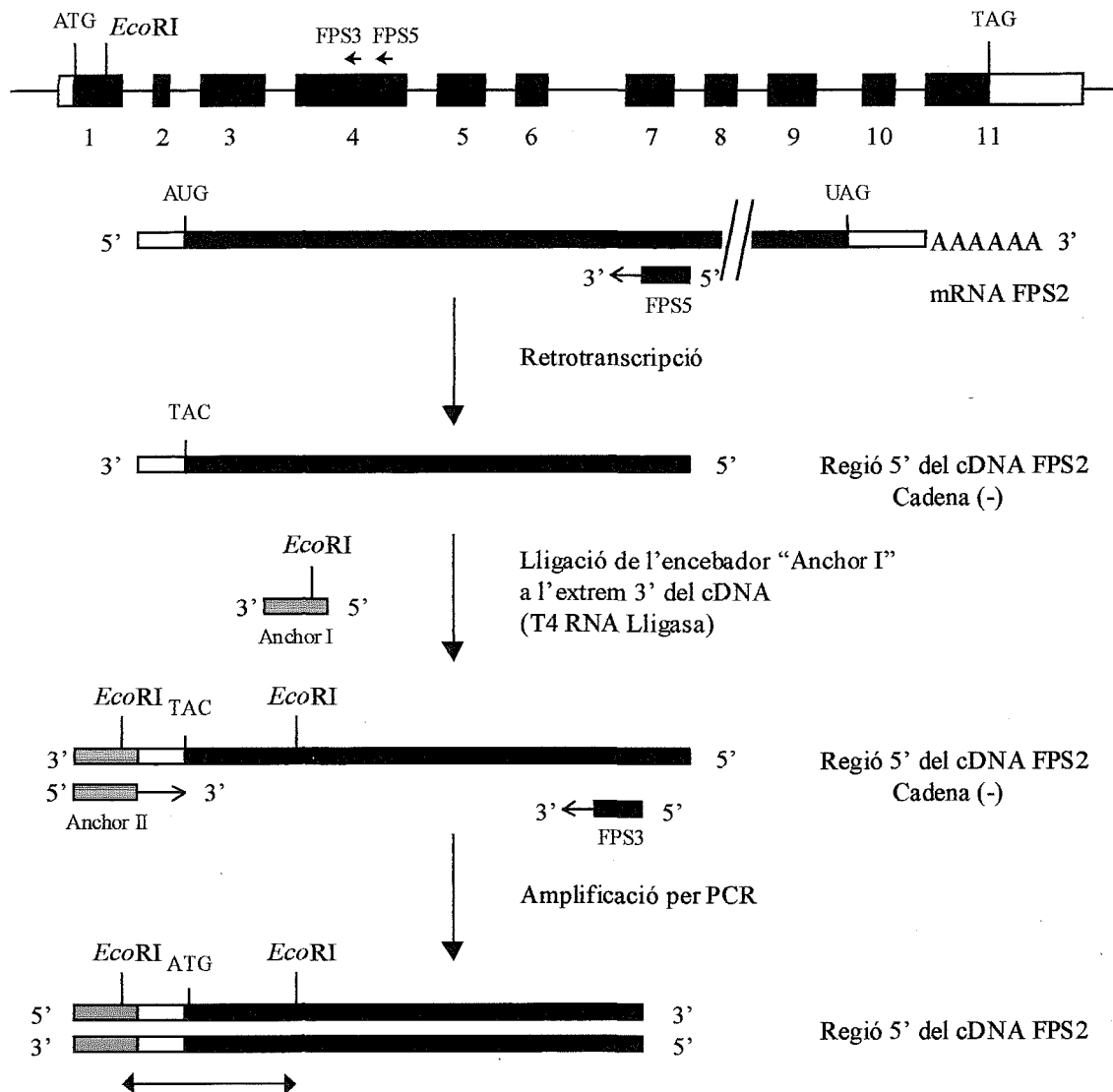
GEN *FPS2*

Figura 10. Esquema de la determinació de l'extrem 5' de l'mRNA FPS2 d'*Arabidopsis* mitjançant l'estratègia de RACE. A la part superior de la figura, es representa de forma esquemàtica el gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, a fi de referenciar les posicions dels encebadors antisentit específics FPS3 i FPS5 (representats amb fletxes), que són complementaris a les seqüències nucleotídiques +312/+335 i +373/+393 del cDNA FPS2 (figura 17), i es mostra també la diània de restricció *EcoRI*. Utilitzant l'encebador FPS5, es van retrotranscriure 5 µg de la fracció poli(A)⁺ obtinguda a partir d'RNA de flors d'*Arabidopsis*. Un cop purificada la cadena (-) de la regió 5' del cDNA FPS2 sintetitzada, mitjançant l'enzim T4 RNA lligasa es va unir l'oligonucleòtid "Anchor I" a l'extrem 3' de la cadena senzilla del cDNA. Seguidament, s'amplificà la regió 5' del cDNA FPS2 utilitzant com a encebadors específics l'oligonucleòtid sentit "Anchor II" (complementari a l'oligonucleòtid "Anchor I") i l'oligonucleòtid antisentit FPS3. El producte de PCR va ser purificat en un gel d'agarosa, digerit amb *EcoRI* i clonat en el vector pUC19. Per facilitar la comprensió de l'esquema, els dibuixos estan fets sense mantenir les proporcions de les mides reals.

FPS5

5'-CCTGTGGATATGATTGCGAAG-3'

Oligonucleòtid complementari a la seqüència nucleotídica +373 a +393 del cDNA FPS2 d'*Arabidopsis* (figura 10). S'utilitza com a encebador per a la transcriptasa reversa.

FPS3

5'-GGCTTTCTAAACCAACAAGGTGG-3'

Oligonucleòtid complementari a la seqüència nucleotídica +312 a +335 del cDNA FPS2 (figura 10). S'utilitza com a encebador antisentit específic pel cDNA FPS2 en la reacció de PCR.

PROCEDIMENT

a) Síntesi i purificació de la cadena senzilla de cDNA.

1. Mesclar 5 µg de fracció poli(A)⁺ de l'RNA d'inflorescències d'*Arabidopsis* amb 10 pmols de l'encebador antisentit FPS5 en un volum final de 10 µl.
Desnaturalitzar escalfant 5 min a 65°C.
2. Afegir 20 µl de solució de transcripció i incubar 30 min a 52°C.

Solució de transcripció:	9,2 µl	H ₂ O
	9 µl	tampó de transcripció 4×
	1,6 µl	RNAsin (Promega) 40 u/µl
	3,7 µl	dNTP 10 mM cada un
	0,5 µl	AMV reverse transcriptase
3. Afegir 1 µl EDTA 0,5 M per aturar la reacció.
4. Afegir 2 µl NaOH 6 N i incubar 30 min a 65°C, per hidrolitzar l'RNA.
5. Afegir 2 µl d'àcid acètic 6 N.
6. Afegir 80 µl de la solució NaI 6M.
7. Afegir 8 µl de la suspensió de GENO-BIND™. Les partícules de GENO-BIND™ permetran separar la cadena de cDNA de l'excés d'encebador, ja que l'encebador presenta major afinitat per les partícules que el cDNA.
Agitar i mantenir en gel 10 min.
8. Centrifugar a 4°C durant 10 segons a màxima velocitat d'una microcentrífuga de sobretaula.
Descartar el sobrenedant.
9. Afegir 500 µl d'etanol al 80% i resuspendre el sediment completament, si cal amb l'ajut d'una pipeta automàtica.
10. Repetir els passos 8 i 9.
11. Centrifugar a 4°C durant 30 segons a màxima velocitat. Descartar el sobrenedant i assecar el sediment.
12. Resuspendre el sediment amb 50 µl d'aigua DEPC.

13. Escalfar la mostra durant 5 min a 65°C per separar el cDNA del GENO-BIND™.
14. Centrifugar 2 min a màxima velocitat a temperatura ambient.
15. Recuperar només 45 µl del sobrenedant, que conté el cDNA, per evitar arrossegar part del GENO-BIND™.
16. Precipitar el cDNA afegint 20 µg de glicogen, 5 µl d'acetat sòdic 2M i 100 µl d'etanol al 95%. Deixar precipitar durant 30 min a -20°C.
17. Centrifugar 15 min a màxima velocitat i a 4°C. Descartar el sobrenedant, i rentar el sediment amb etanol al 80%.
18. Assecar el sediment, i ressuspendre'l amb 6 µl d'aigua DEPC.

b) Lligació amb l'encebador anchor I i amplificació per PCR.

- | | | |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|
| 19. Preparar la reacció de lligació: | 2,5 µl | cDNA de cadena senzilla (del pas 18) |
| | 2 µl | encebador anchor I (4 pmols) |
| | 5 µl | tampó de lligació 2× |
| | 0,5 µl | T4 RNA lligasa (20 u/µl) |

Incubar 16-20 hores a temperatura ambient.

20. Diluir 1:10 la reacció de lligació.

21. Amplificació per PCR.

Per un volum final de 50 µl,	40,5 µl	H ₂ O
	1 µl	dilució de lligació
	5 µl	tampó PCR 10×
	1 µl	dNTP (10 mM cada NTP)
	1 µl	encebador anchor II 10 µM
	1 µl	encebador FPS4 10 µM
	0,5 µl	AmpliTaq® DNA polimerasa

Condicions de l'amplificació: seguint les recomanacions del kit, abans d'afegir els encebadors es realitza una desnaturalització d'1 min a 82°C. Tot seguit, s'afegeixen els encebadors, i es procedeix a realitzar 35 cicles de desnaturalització de 45 segons a 94°C, hibridació de 45 segons a 60°C i extensió de 2 min a 72°C. Finalitzar amb una extensió de 7 min a 72°C.

c) Clonatge i seqüenciació del fragment amplificat.

El fragment amplificat per PCR va ser digerit amb *EcoRI*, purificat en un gel d'agarosa 2% i clonat en el corresponent lloc del vector pUC19. Es va transformar la soca XL1-Blue d'*Escherichia coli*, i les colònies obtingudes van ser transferides a filtres de nitrocel.lulosa (Millipore). Els filtres van ser hibridats amb el fragment de 800 pb *XhoI/EcoRI* (posicions -531/+238 del gen, fig. 14) que conté la regió 5' flanquejant del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. Es va seqüenciar DNA provinent de setze colònies transformades independents identificades per la sonda.

7. PROTECCIÓ ENFRONT LA DIGESTIÓ AMB RNAsa.

Els experiments de protecció enfront l'RNAsa van ser duts a terme seguint els protocols descrits en el manual *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997), excepte algunes modificacions, com fou la purificació de la ribosonda sintetitzada en un gel de poliacrilamida al 5% i urea 8 M.

7.1. Preparació de la ribosonda.

Es va generar per PCR un fragment de DNA que s'extenia de la posició -201 a la posició +141 del gen *FPSI* d'*Arabidopsis*. Aquest fragment de DNA va ser clonat entre les posicions *EcoRI* i *HindIII* del vector pSP65. Per eliminar la possibilitat d'artefactes generats per la PCR, el subcló va ser seqüenciat. El plasmidi resultant (pSRIB) va ser linialitzat amb *HindIII* i utilitzat com a motllo per a la transcripció *in vitro*, realitzada amb l'SP6 RNA polimerasa (Promega), seguint les recomanacions indicades. La ribosonda antisentit sintetitzada té una mida de 351 nucleòtids, dels quals 342 corresponen al gen *FPSI*, i 9 deriven del vector pSP65.

SÍNTESI I PURIFICACIÓ DE LA RIBOSONDA

1. Reacció de marcatge.

El marcatge de la ribosonda es realitza amb [α - 32 P]rUTP 10 μ Ci/ μ l i 300 μ Ci/ μ mol. Les condicions escollides per al marcatge foren una activitat específica de 300 Ci/mmol i una concentració de ribonucleòtid marcat (suma de nucleòtid fred i calent) 15 μ M. La resta de ribonucleòtids (rATP, rCTP i rGTP) s'utilitzaren a una concentració final de 500 μ M cada un.

Reacció de marcatge:	H ₂ O DEPC qsp	20 μ l
	tampó 5 \times	4 μ l
	DTT 100 mM	2 μ l
	RNAsin (Promega)	1 μ l
	rATP 10 mM	1 μ l
	rCTP 10 mM	1 μ l
	rGTP 10 mM	1 μ l
	rUTP 300 μ M	1 μ l
	DNA motllo	500 ng
	[α - 32 P]rUTP	40 μ Ci
	SP6 RNA polimerasa	1 μ l

Incubar 1h a 40°C.

2. Degradació del DNA motllo.

Afegir 1 μ l de DNAsa I RNAsa free, i incubar 15 min a 37°C.

3. Afegir 2 μ l de tRNA 10 mg/ml i 27 μ l d'H₂O DEPC.

4. Fer una extracció amb fenol/cloroform i dues extraccions amb cloroform.

5. Precipitar la ribosonda afegint 200 µl d'acetat amònic 2,5 M i 750 µl d'etanol absolut. Deixar precipitar un mínim de 30 min a -80°C .
6. Recollir el precipitat centrifugant 30 min a 4°C a velocitat màxima d'una microcentrífuga de sobretaula. Rentar el sediment amb 200 µl d'etanol 70%, i assecat-lo completament.
7. Resuspendre el sediment amb 50 µl d' H_2O DEPC, i repetir la precipitació (passos 5 i 6) dues vegades més.
8. Resuspendre el sediment en 50 µl de solució d'hibridació.
9. Comptar dues al·líquotes d'1 µl.
El rendiment del marcatge i la purificació fins aquest punt oscil·la entre $7 \times 10^5 - 10^6$ cpm/µl de ribosonda.
La mostra es guarda a -80°C fins l'endemà.
10. Afegir 50 µl de tampó de càrrega a la mostra. Escalfar la mostra 3 min a 70°C i carregar-la repartida entre dos pous preparatius d'un gel de poliacrilamida al 5% i urea 8M.
11. L'electroforesi té lloc en tampó TBE durant 2 hores a 60 w (30 mA i 2000 volts).
12. Cobrir el gel (que queda unit a un dels dos vidres usats per preparar el gel) amb plàstic transparent adhesiu. Contactar una pel·lícula amb el gel durant 5 min. Revelar aquesta pel·lícula posarà de manifest la posició en el gel de la banda corresponent a la ribosonda.
13. Col·locar la pel·lícula revelada sota el vidre que suporta el gel, i retallar la banda corresponent a la ribosonda.
14. Repartir la mostra entre dos tubs eppendorf.
15. Repetir el pas 12, per assegurar-se d'haver retallat completament la banda corresponent a la ribosonda.
16. Afegir 300 µl de tampó d'elució a cada una de les dues bandes retallades. Moldre la mostra amb l'ajut d'una punta de pipeta, i deixar eluir durant 4 h a temperatura ambient.
17. Centrifugar 10 min a velocitat màxima, i passar el sobrenedant a dos tubs eppendorf nous.
18. Precipitar la ribosonda afegint 1 µl de tRNA 10 mg/ml i 900 µl d'etanol absolut a cada tub. Deixar precipitar un mínim d'1 h a -80°C .
19. Recuperar el precipitat centrifugant a velocitat màxima durant 30 min a 4°C . Rentar el sediment amb etanol 70%, i assecat-lo.
20. Resuspendre el sediment en 40 µl de solució d'hibridació.
Comptar dues al·líquotes d'1 µl, per quantificar la ribosonda purificada. El rendiment sol oscil·lar entre 75.000 i 150.000 cpm/µl.

SOLUCIONS

Solució d'hibridació:

4 parts de formamida desionitzada
1 part de tampó d'hibridació 5×

Tampó d'hibridació 5×

NaCl 4 M
PIPES 400 mM
EDTA 10 mM

Ajustar pH 6,4 amb NaOH 10 N. Guardar a -20°C .

Tampó de càrrega 2x:

Blau de bromfenol	0,3%
Xilè de cianol	0,3%
EDTA pH 7,5	10 mM
Formamida desionitzada	97,5%

Tampó d'elució:

Acetat amònic	0,5 M
EDTA pH 8	1 mM
SDS	0,1 %

Tampó TBE 5x:

Tris base	0,445 M
Àcid bòric	0,445 M
EDTA	10 mM

7.2. Protecció enfront la digestió amb RNAsa.

Els experiments de protecció enfront l'RNAsa van ser duts a terme utilitzant la fracció poliA⁺ d'RNA d'inflorescències d'*Arabidopsis*. Com a control de l'especificitat de l'experiment, es va usar tRNA de llevat. Per la digestió de l'RNA es va utilitzar l'enzim RNase ONE (Promega). Es van assajar diferents condicions de protecció, que van consistir en variar la quantitat d'RNA poliA⁺, la quantitat de ribosonda i la quantitat i temps d'actuació de l'RNAsa.

1. En un volum final de 30 µl, preparar les diferents hibridacions:

- 8 µg de poliA⁺ amb 250.000 cpm de ribosonda
- 8 µg de poliA⁺ amb 500.000 cpm de ribosonda
- 16 µg de poliA⁺ amb 250.000 cpm de ribosonda

La ribosonda i la fracció RNA poliA⁺ han d'estar resuspesos en tampó d'hibridació. Cal tenir en compte que caldrà preparar tantes hibridacions com diferents condicions de digestió es desitgi assajar posteriorment.

En paral·lel, cal preparar les hibridacions que actuaran com a control, que es realitzen utilitzant tRNA de llevat enlloc d'RNA poliA⁺.

2. Escalfar les mostres 5 min a 90°C.

3. Incubar les mostres a 42°C durant tota la nit.

Per fer la incubació, les mostres s'introdueixen dins un vial de plom invertit, i aquest vial es submergia en un bany d'aigua a 42°C.

4. A cada hibridació de 30 µl, afegir 270µl de tampó de digestió 1x i la quantitat d'RNase ONE que es desitgi assajar (9 unitats, 12 unitats i 18 unitats). Incubar de 60 a 120 min a temperatura ambient

5. Aturar l'RNase ONE afegint 15 µl SDS 20%.

6. Precipitar els fragments protegits afegint 1 µl tRNA 10 mg/ml i 825 µl d'etanol absolut. Deixar precipitar durant dues hores a -80°C.

7. Centrifugar en una microcentrífuga de sobretaula a màxima velocitat durant 30 min a 4°C per recuperar els precipitats. Rentar-los amb etanol al 70% i assecar-los.

8. Resuspendre els sediments amb 3 µl d'H₂O.

9. Afegir 3 µl de tampó de càrrega, escalfar les mostres 3 min a 70°C i carregar-les en un gel de poliacrilamida al 5% i urea 8 M. Com a control de l'estat de la ribosonda, es carrega en el gel una alíquota de la ribosonda purificada (1000 cpm, 5000 cpm i 10.000 cpm). Com a marcador de mida, es carrega una reacció de seqüència coneguda de DNA.

L'electroforesi té lloc en tampó TBE a 60 wats (30 mA i 2.000 v) fins que el colorant blau de bromfenol (equivalent a una mida de 35 pb) surt del gel. El gel es fixa, s'asseca i s'exposa a una pel·lícula.

La mida dels fragments d'RNA protegits es calcula segons està descrit en els manuals.

SOLUCIONS

Tampó de digestió 10x:

TrisHCl pH 7,5	100 mM
EDTA	50 mM
Acetat sòdic	2 M

8. MUTAGÈNESI DIRIGIDA.

8.1. Obtenció de DNA de cadena senzilla.

L'obtenció de DNA de cadena senzilla es va fer a partir de construccions preparades en el plasmidi pBluescript.

PROCEDIMENT:

1. Transformar la soca d'*E. coli* RZ1032 (F⁺, ung⁻, dut⁻) amb el plasmidi que conté el DNA que es desitja mutagenitzar. L'interès d'utilitzar aquesta soca és que en replicar el DNA plasmídic introdueix uracils, fet que augmenta el rendiment en la posterior obtenció de plàsmids mutagenitzats.
2. Un cop identificades les colònies transformades amb el plasmidi desitjat de la soca RZ1032, preparar un pre-cultiu de 2 ml LB-ampicil.lina 100 µg/ml, i incubar-lo durant una nit a 37°C.
3. A partir del pre-cultiu, inocular un nou cultiu de 2 ml LB-ampicil.lina 100 µg/ml, i deixar-lo créixer fins que tingui una DO₆₀₀ de 0,3, que correspon aproximadament a 2,5×10⁸ cèl.lules/ml.
4. Infectar aquest cultiu cel.lular amb el fag R408, tenint en compte que la multiplicitat d'infecció ha de ser 40/1 (40 fags/cèl.lula).

El fag R408 està modificat en el seu genoma de tal manera que produeix proteïnes fàgiques que permeten l'empaquetament de pBluescript (fagèmid), i està molt reduïda la capacitat d'empaquetar el seu propi genoma.

5. Incubar durant 6-7 h a 37°C amb agitació perquè tingui lloc la infecció.
6. Centrifugar 1,5 ml del cultiu en un tub eppendorf, a 14.000×g en una centrífuga de sobretaula. Recuperar 1,45 ml del sobrenedant i transferir-lo a un nou tub.
7. Centrifugar altre cop, i recuperar només 1,35 ml del sobrenedant.
8. Centrifugar una tercera vegada, i recuperar finalment 1,25 ml del sobrenedant.
9. Afegir 250 µl de Solució I i mesclar per inversió. Incubar 15 min a temperatura ambient.
10. Centrifugar 15 min a temperatura ambient a 14.000×g. Decantar completament el sobrenedant.
11. Resuspendre el pellet en 400 µl TE.
12. Per eliminar proteïnes, fer dues extraccions amb fenol-cloroform, i tres extraccions amb cloroform.
13. Per concentrar el DNA, afegir 35 µl de Solució II i 2,5 volums d'etanol absolut. Deixar que el DNA precipiti durant una nit a -20°C.
14. Recuperar el DNA centrifugant 30 min a 14.000×g.
15. Descartar el sobrenedant, rentar el sediment amb etanol al 70% i assecar-lo.
16. Resuspendre la mostra en 20 µl TE.

SOLUCIONS:

Solució I:

PEG 8000 20%
NaCl 2,5 M

Les dues solucions s'autoclaven.

Solució II:

Tris-HCl pH 7,5 50 mM
LiCl 5 M

8.2. Síntesi de la cadena mutagenitzada.

1. Fosforilació de l'oligonucleòtid que conté la mutació.

Reacció de fosforilació:	1 µl	oligonucleòtid 50 µM (50 pmols)
	1 µl	ATP 10 mM
	1 µl	tampó PNK 10 ×
	2,5 µl	polinucleòtid kinasa 10 U/µl (25 U)
	4,5 µl	H ₂ O

Incubar 45 min a 37°C.

2. Hibridació de l'oligonucleòtid fosforilat amb la cadena senzilla purificada.

Reacció d'hibridació:	3 µl	reacció de fosforilació (15 pmols cebador)
	9 µl	cadena senzilla purificada (veure pas 16 apartat 13.1)
	3 µl	tampó d'hibridació 5×

La mostra s'incuba en un bany d'aigua durant 4 min a 55°C, i després es deixa que la temperatura baixi sola fins 20°C en 35 min.