

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia

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

Oriol Forés del Ruste

2007

# CAPITOL I



**Caracterització de la  
proteïna Dps1 d'*A. thaliana***



**RESULTATS**



## 1. IDENTIFICACIÓ I CLONATGE DE L'ADNc DE LA DEHIDRODOLIQUEL-PP SINTASA 1 (DPS1) D'A. THALIANA

En el moment d'iniciar el present treball només s'havien clonat els gens que codifiquen per *cis*-preniltransferases de *M. luteus* (Shimizu et al., 1998), *E. coli*, *H. influenza* i *S. pneumoniae* (Apfel et al., 1999), i de *S. cerevisiae* (Sato et al., 1999). El gen de llevat *RER2* (Sato et al., 1999), l'únic gen que codifica per una *cis*-preniltransferasa eucariota clonat fins aleshores, codifica per una dehidrodoliquildifosfat sintasa (dedol-PP sintasa) implicada en la síntesi de dolicol, compost que juga un paper clau en la glicosilació de proteïnes en eucariotes.

Amb la finalitat d'identificar seqüències nucleotídiques en el genoma d'*A. thaliana* amb capacitat per codificar possibles *cis*-preniltransferases implicades en la biosíntesis de dolicol, es va realitzar una busca informàtica en el genoma d'*A. thaliana* en la base de dades del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) amb el programa TBlastN, utilitzant com a “sonda” la seqüència completa d'aminoàcids de la dedol-PP-sintasa (Rer2p) de *S. cerevisiae* (Sato et al., 1999). La búsqueda va donar com a resultat la identificació d'una seqüència nucleotídica en el cromosoma 2 [(seqüència genòmica inversa i complementària 17615-19106 pb ; (número d'accés AC003040 [Lin et al., 1999])] amb capacitat per codificar una dedol-PP-sintasa. Aquesta seqüència genòmica contindria 4 exons que codificarien per una proteïna de 303 aa amb un nivell d'identitat del 36 % amb la Rer2p.

Per definir l'organització real d'exons i introns d'aquest possible gen dedol-PP sintasa d'*A. thaliana* i demostrar la funcionalitat de la proteïna que codifica es va aïllar el corresponent ADNc utilitzant l'estratègia de RT-PCR amb ARN de plàntules d'*A. thaliana*. L'ADNc es va amplificar utilitzant un encebador sentit (1DPSBam) corresponent a una seqüència situada a 5' de l'hipotètic codó d'inici de traducció de la dedol-PP sintasa d'*A. thaliana*, i un encebador antisentit (1DPSEco) complementari a la seqüència localitzada a 3' del codó d'aturada de la traducció. Es va obtenir un producte d'aproximadament 1 Kb (resultat no mostrat), que es va clonar en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy* i es va seqüenciar. La seqüència obtinguda va mostrar que l'ADNc (**figura 25**) té 958 pb i que és idèntica a la seqüència dels 4 exons predits en la seqüència genòmica d'*A. thaliana*, que des d'aquest moment es va anomenar gen *AtDPS1*. La traducció d'aquest ADNc revela un marc obert de lectura que codifica una proteïna de 303 aminoàcids (AtDps1p; **figura 25**). La seqüència de l'ADNc clonat en aquest treball ha estat dipositada en la base de dades EMBL (nº accés: AJ277136). Amb l'anotació actual dels gens d'*A. thaliana*, aquesta seqüència correspon al gen At2g23410.



## Resultats

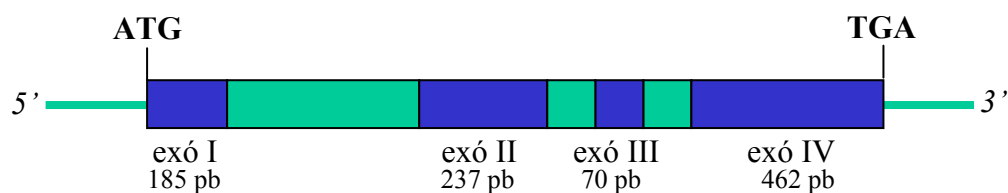
```

1  GGCAAAGCCAAATTAAGTTGTCAACAATGTTGTCTCTTCTTTCTTCTGA
                                M L S L L S S D 8
52  TTCTTCTCTATTATCACTCCTCTTTCTCTTTCTCATCCCTTGTCTCTTTAT
    S S L L S L L F L F L I P C L F I 25
103 CACAAGCTATATAGGCTTCCCTGTGTTCTTGCTAAAACATCGGACTCAT
    T S Y I G F P V F L L K L I G L I 42
154 CAAAATCAAAGCTGCTCGAGACAACGAGAAACGTGATGAGGGAAC TTATGT
    K I K A A R D N E K R D E G T Y V 59
205 TGTCCGCGAGGATGGGTTACAAAAGAGAACTAATGCCGAGACACGTGGCATT
    V R E D G L Q R E L M P R H V A F 76
256 CATACTGGATGGGAACCGGAGATGGGCCAAACGGGCCGATTGACGACGTC
    I L D G N R R W A K R A G L T T S 93
307 ACAAGGCCACGAGGCGGGAGCTAAACGGCTTATAGATATCGCCGAGCTCTG
    Q G H E A G A K R L I D I A E L C 110
358 CTTTCGAGTTGGGGTTTCATACAGTCTCAGCTTTTGCCTTTCTCCACAGAGAA
    F E L G V H T V S A F A F S T E N 127
409 TTGGGGAAGAGACAAGATTGAGATTGATAACTTGATGTCTTTGATCCAACA
    W G R D K I E I D N L M S L I Q H 144
460 CTACCGCAATAAGTCCAACATCAAATCTTCCACAGATCGGAAGTTCGCGT
    Y R N K S N I K F F H R S E V R V 161
512 TTCTGTTATCGGGAATAAAACGAAGATCCCTGAATCTCTCCTCAAAGAAAT
    S V I G N K T K I P E S L L K E I 178
563 CCATGAGATAGAGGAAGCTACCAAAGGCTACAAGAATAAACATCTCATCAT
    H E I E E A T K G Y K N K H L I M 195
614 GGCAGTAGATTACAGCGGAAAATTTGATATCATGCATGCTTGCAAGAGTCT
    A V D Y S G K F D I M H A C K S L 212
665 TGTGAAGAAATCAGAAAAAGGTTGATCCGAGAGGAAGATGTAGACGAGGC
    V K K S E K G L I R E E D V D E A 229
716 ATTGATCGAGAGAGAGCTTTTGACAAAATTGTAGTGACTTCCCAAGTCCTGA
    L I E R E L L T N C S D F P S P D 246
767 TTTAATGATTAGGACAAGTGGAGAACAGAGGATTAGTAACTTCTTCTTGTG
    L M I R T S G E Q R I S N F F L W 263
818 GCAACTTGCTTATTCCGAGCTTTTCTTCTCGCCGGTATTTTGGCCTGATTT
    Q L A Y S E L F F S P V F W P D F 280
869 CGATAAGGATAAGCTTCTAGAGGCTTTGCTTCGTATCAGCGTAGGGAAAG
    D K D K L L E A L A S Y Q R R E R 297
920 ACGATTTGGTTGTTCGGGTTTGATCCACCTTTTCATCCTCTC
    R F G C R V * 303

```

**Fig.25. Seqüència de nucleòtids de l'ADNc i d'aminoàcids de la AtDps1p.** En negre es mostra la seqüència de nucleòtids de l'ADNc i en verd els aminoàcids de la AtDps1p. El codó d'inici de traducció (ATG) i el d'aturada de traducció (TGA) estan marcats en vermell. A l'esquerra es mostra la numeració de nucleòtids de l'ADNc i a la dreta la numeració dels aminoàcids de la AtDps1p.

L'anàlisi de l'estructura del gen *AtDPS1* (figura 26) mostra que posseeix una organització amb 4 exons (exons I-IV) (sent el més curt de 69 pb i el més llarg de 452 pb) i tres introns. A més tots els introns comencen i acaben amb els dinucleòtids GT i AG, respectivament.

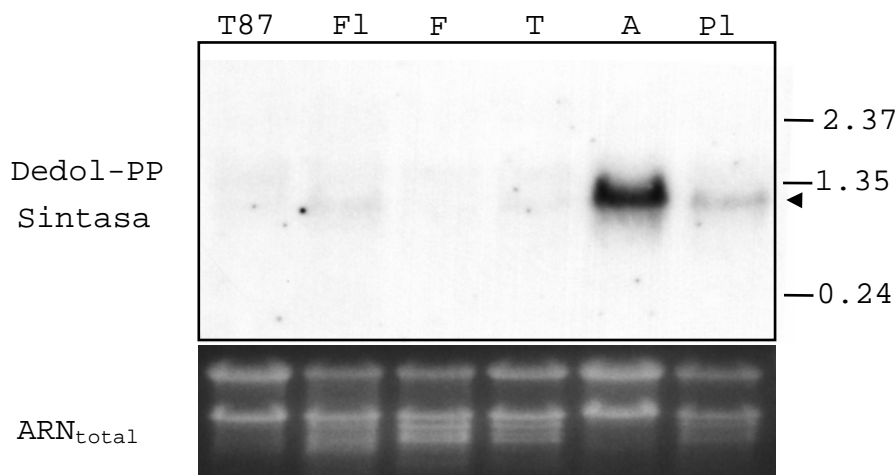


**Fig.26. Organització del gen AtDPS1 en el cromosoma 2 d'*A. thaliana*.** A la part inferior de l'esquema del gen *AtDPS1* es mostra la longitud en pb dels quatre exons.

## 2. ESTUDI DE L'EXPRESSION DEL GEN *AtDPS1*

Un cop clonat un ADNc que codifica per la Dps1p d'*A. thaliana*, es va procedir a analitzar el patró d'expressió del gen *AtDPS1* per Northern blot utilitzant ARN total aïllat de flors, fulles, tiges, arrels, plàntules senceres de 12 dies i cèl.lules de la línia T87 d'*A. thaliana* (var. Columbia; Axelos et al., 1992), utilitzant com a sonda l'ADNc sencer del gen *AtDPS1* marcat amb  $^{32}\text{P}$ . Els experiments es van realitzar en condicions d'alta astringència (Materials i Mètodes, apartat 12) per aconseguir la màxima especificitat possible de la sonda.

El resultat dels experiments de Northern blot (**figura 27**) indica, en primer lloc, que el gen *AtDPS1* s'expressa en tots els teixits analitzats, ja que en totes les mostres la sonda detecta un missatge d'aproximadament 1 Kb, de mida compatible amb la de l'ADNc clonat. En segon lloc, els resultats mostren que aquest gen té, en general, un nivell d'expressió extremadament baix, ja que es necessiten dues setmanes d'exposició a  $-80^{\circ}\text{C}$  per obtenir els resultats mostrats. Només en les arrels es detecta una acumulació apreciable de l'ARNm. De la resta de teixits analitzats, la major acumulació de l'ARNm es dona en les plàntules de 12 dies, probablement degut a l'expressió del gen *AtDPS1* en les arrels de les plàntules.



**Fig.27. Anàlisi de Northern blot de l'ARNm que codifica per la *AtDps1p*.** Amb 15 µg d'ARN total de cultiu cel.lular (T87), flors (Fl), fulles (F), tiges (T), arrels (A) i plàntules de 12 dies (Pl) es va realitzar una electroforesi en un gel d'agarosa-formaldèhid a l'1%. Els ARNm es van transferir a una membrana de nylon. El filtre va ser hibridat amb l'ADNc que codifica per a la *AtDps1p* marcat amb  $^{32}\text{P}$ . La banda d'aproximadament 1 Kb corresponent a l'ARNm que codifica per a la *AtDps1p* s'indica amb un triangle. Les posicions dels marcadors de la mida de l'ARN s'indiquen a la dreta. A sota es mostra el gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi abans de la transferència.

### 3. ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÏNA AtDps1

Com ja s'ha indicat en l'apartat 1, l'anàlisi de la seqüència de l'ADNc del gen *AtDPS1* indica la presència d'un marc obert de lectura que codifica una proteïna de 303 aminoàcids (**figura 25**). La massa molecular predita és de 34975 Da i la proteïna codificada té una identitat global d'un 36 %, un 33% i un 35% (similitud d'un 56, 49 i 53%) respecte de Rer2p de *S. cerevisiae* (Rer2p), de HDSp d'humans (Endo et al., 2003) i de l'hipotètic homòleg de la Rer2p de *Caenorhabditis elegans* (T01G1.1) (Sato et al., 1999). Valors similars d'identitat (37%) i similitud (52-54%) es troben amb les *cis*-preniltransferases d'espècies bacterianes, com les Upps d'*E. coli* (Apfel et al., 1999) i *M. luteus* (Shimitzu et al., 1998). La seqüència de la dedol-PP sintasa d'*A. thaliana* conté les cinc regions conservades, designades I-V (**figura 28**), que són comunes a totes les *cis*-preniltransferases caracteritzades fins ara (Koyama et al., 1999; Liang et al., 2002; Takahashi et al., 2006). Dins d'aquestes regions, la Dps1p d'*A. thaliana* conté els aminoàcids conservats que s'ha vist que són essencials per a l'activitat de les Upps de *M. luteus* i *E. coli* (la numeració dels aminoàcids correspon a la Upps de *M. luteus*): 29D (Regió I) implicat en la unió de l'ió  $Mg^{2+}$ ; 32 G/R (Regió I) implicats en la unió del grup fosfat; 78W/F (Regió III) que uneix FPP; 73F i 74S (Regió III) i 197R i 203R (Regió V) implicats en la unió de l'IPP; 73F, 74S i 77N (Regió III) aminoàcids implicats en la reacció catalítica (Fujihashi et al., 2001; Kharel et al., 2001; Ko et al., 2001).

L'aliniament de les seqüències d'aminoàcids de les dedol-PP sintases de diferents organismes (**figura 28**) posa de manifest que si bé els aminoàcids que es troben desde la Regió I fins a la Regió V estan força conservats, la seqüència aminoacídica dels extrems amino i carboxiterminal presenta una gran diversitat tant en la longitud com en la seqüència d'aminoàcids. De les *cis*-preniltransferases clonades o identificades fins a l'actualitat, només la de *C. elegans* (340 aa) i la humana són més llargues que la d'*A. thaliana*, ja que tenen un extrem C-terminal addicional. D'altra banda les de llevat (286 aa), *E. coli* (252 aa) i *M. luteus* (249 aa) són més curtes, ja que tenen un extrem N-terminal més curt. La de llevat, tot i ser més curta, és la de longitud més similar respecte la d'*A. thaliana* perquè té també un extrem C-terminal addicional.

**Fig.28. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de la dedol-PP sintasa d'*A. thaliana* amb les de *S. cerevisiae* (Sato et al. 1999), humans (Endo et al., 2003), la hipotètica proteïna T01G1.1 de *C. elegans* (Sato et al. 1999) i les Upps d'*E. coli* (Apfel et al. 1999), i de *M. luteus* (Shimizu et al. 1998).** La numeració dels aminoàcids està a la dreta. Els punts s'introdueixen per optimitzar l'aliniament. Els aminoàcids conservats en les sis seqüències estan ombrejats. Els cinc dominis conservats en totes les *cis*-preniltransferases s'indiquen amb caixes. Els aminoàcids implicats en la reacció catalítica, unió dels substrats i del  $Mg^{2+}$  es mostren amb un asterisc.

## Resultats

<i>A. thaliana</i>	MLSLSSDSS	LLSLLFLFLI	PCLFITSYIG	FPVFLCLKLIG	LIKIKAARDN	50
<i>H. sapiens</i>					MSWIKEG	7
<i>S. cerevisiae</i>					M ETDSGIPGHS	11
<i>C. elegans</i>	MGTEPTNF	CSRGERVHHS	TTEAMLSPFH	HCAVMAANLT	ADEEDGWVFA	48

			*      *				
<i>A. thaliana</i>	EKRDEGTYVV	REDGLQRELM	FRHVAFILDG	NRRWAKRAGL	TTS	QGHEAG	99
<i>H. sapiens</i>	ELSLWER..F	CANIKAGPM	FKHIAFIMDG	NRRYAKKCOV	ERQ	EGHSQC	54
<i>S. cerevisiae</i>	FVLKWTKNIF	SRTLRSNCV	FRHVGFMIDG	NRRFAKKEM	.DVKE	GHEAC	60
<i>C. elegans</i>	QQEQPWWQWL	LRRFIASGPI	FRHVAFVMDG	NRRFAKTKHL	GNVIK	GHEKCG	98
<i>E. coli</i>	MLSATQP	LSEKLPAGHC	FRHVAIMDG	NGRWAKKQK	IRA	FGHKAC	45
<i>M. luteus</i>	MFPIKKRKAI	KNNNINAAQI	FKHIAIMDG	NGRWAKQKKM	PRI	KGHYEC	49

Regió I

Regió II

			**    *			
<i>A. thaliana</i>	AKRLIDIAEL	CFELGVHTVS	AFVAFSTENWG	RDKIEIDNLM	SLIQHYRNK.	148
<i>H. sapiens</i>	FNKLAETLRE	CLNLGILEVT	VYAFSIFENFK	RSKSEVDGLM	DLARQKFSRL	104
<i>S. cerevisiae</i>	FVMSRILEL	CYEAGVDIAT	VFAFSIFENFK	RSSREVESLM	TLARERIRQI	110
<i>C. elegans</i>	FTQLAKILDW	CNRFGIREIT	VYAFSIFENFK	RSEEEVSGLM	RLAEKFQKL	148
<i>E. coli</i>	AKSVRRAVSF	AANNIGIEALT	LYAFSSEENWN	RPAQEVSALM	ELFWALD..	93
<i>M. luteus</i>	MQTVKKITRY	ASDLGVKYL	LYAFSTENWS	RPKDEVNYLM	KLPGDFLN..	97

Regió III

<i>A. thaliana</i>	.SNIKFFHRS	EVRVSVICNK	TKIPESLLKE	IHEIEEATKG	YKNKHLIMAV	197
<i>H. sapiens</i>	MEEKEKLQKH	GVCIRVLGDL	HLLPLDLQEL	IAQAVQATKN	YNKCFLNVCF	154
<i>S. cerevisiae</i>	TERGELACKY	GVRIKIIGDL	SLLDKSLLLED	VRVAVETTKN	NKRATLNICF	160
<i>C. elegans</i>	LNDSEKLDEK	RICFRFYGNR	SLLSSRLQKL	MSDIEHRTEN	FDGGRLNVCM	198
<i>E. coli</i>	.SEVKSLHRH	NVRLRIIGDT	SRFNSRLQER	IRKSEALTAG	NTGLTNIAA	142
<i>M. luteus</i>	.TFLPELIEK	NVKVETICFI	DDLDPHTKKA	VLEAKEKTKH	NTGLTLVFAL	146

<i>A. thaliana</i>	DYSGKFDIMH	ACK.SLVKKS	EKGLIREEDV	DEALIERELL	TNCSDFPSPD	246
<i>H. sapiens</i>	AYTSRHEISN	AVREMAWG.V	EQGLLDPSDI	SESLLDKCLY	TNR..SHPD	201
<i>S. cerevisiae</i>	PYTGREELH	AMKETIVQHK	KGA...AI	DESTLESHLY	T..AGVPPLD	203
<i>C. elegans</i>	PYTSRDEIAR	SE.ETIRKHV	KDGKVNVDI	NESMIDACLD	SGCGGTSP.D	246
<i>E. coli</i>	NYGGRWDIVQ	GVR.QLAEKV	QQGNLQPDQI	DEMLNQHVC	M..HELAPVD	189
<i>M. luteus</i>	NYGGRKEIIS	AVQ.LIAERY	KSGEISLDEI	SETHFNEYLF	T..ANMPDPE	193

Regió IV

			*      *			
<i>A. thaliana</i>	LMIRTSGEQR	ISNFFLWOLA	YSELF..SP	VFWPDEFKDK	LLEALASYQR	294
<i>H. sapiens</i>	ILIRTSGER	LSDFLLWQTS	HSCLVFQ..P	VLWPEYTFWN	LFEAILQFQM	249
<i>S. cerevisiae</i>	LLIRTSQVSR	LSDFLLWQAS	SKGVRIELLD	CLWPEFGPIR	MAWILLKFS.	252
<i>C. elegans</i>	LFIRTSGEHR	LSDFLLWQAS	ETHVYFD..D	VLWPEFGYFN	LCKAILNYQ.	293
<i>E. coli</i>	LVIRTSGEHR	ISNFFLWQIA	YAELYF..TD	VLWPEFDEQD	FEGALNAFAN	237
<i>M. luteus</i>	LLIRTSGEER	LSNFFLWQCS	YSEVFV..ID	EFWPDEFNEES	LAQCISIQON	241

Regió V

<i>A. thaliana</i>	RERRFGCRV					303
<i>H. sapiens</i>	NHSVLRQKARD	MYAEERKRQQ	LERDQATVTE	QLLREGLQAS	GDAQLRRTRL	299
<i>S. cerevisiae</i>	FHKSFLNKEY	RLEEGDYDEE	T.....NGD	PIDL.KEKKL	N	286
<i>C. elegans</i>	YVRTTVTKMT	SSKVS.DNA	TSWKMNFSGN	DRDLISVSKI	RPQGNREK	340
<i>E. coli</i>	RERRFGGTEP	GDETA				252
<i>M. luteus</i>	RHRRFGGL					249
<i>H. sapiens</i>	HKLSARREER	VQGFLQALEL	KRADWLARLG	TASA		334

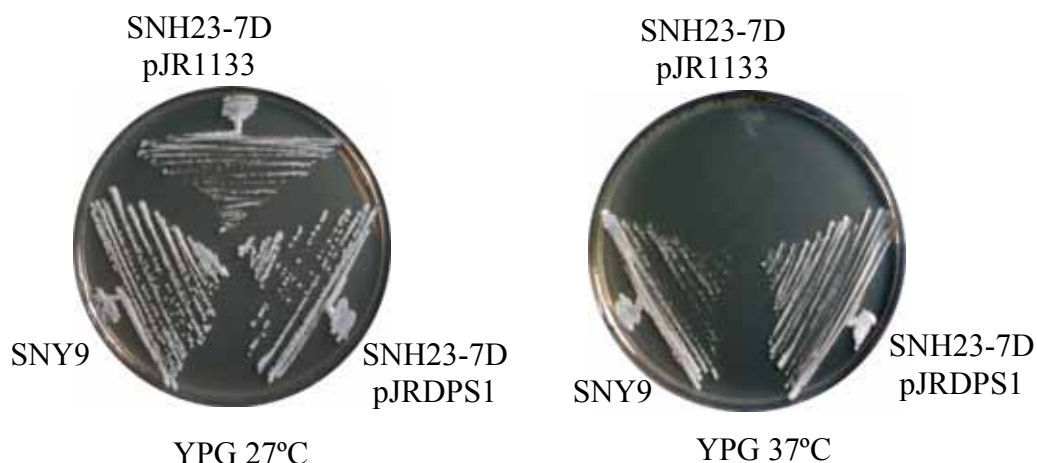
## **4. ANÀLISI FUNCIONAL DE LA Dps1p D'A. THALIANA.**

### **4.1. Complementació funcional de la soca de llevat SNH23-7D.**

La presència en la Dps1p d'*A. thaliana* dels cinc dominis conservats en totes les *cis*-preniltransferases suggeria que la AtDps1p era una dedol-PP sintasa funcional. No obstant, i per confirmar-ho, es va analitzar la capacitat de la AtDps1p per complementar la soca de llevat SNH23-7D que és deficient en activitat *cis*-preniltransferasa (Sato et al., 1999). La soca SNH23-7D és un mutant termosensible portador de la mutació *rer2-2* en el gen que codifica la Rer2p. Aquesta mutació provoca el canvi d'un residu aminoacídic (Ser<sup>209</sup>→Asn) en la regió V de la Rer2p, que fa que l'enzim tingui afectada la capacitat de síntesi de dedol-PP. Com a conseqüència, hi ha una disminució de la síntesi de dolicol en la soca SNH23-7D, que es manifesta per la incapacitat de créixer a 37°C, tot i que si pot créixer a 27°C. A més la soca SNH23-7D presenta altres alteracions fenotípiques: defectes en la glicosilació de proteïnes, una acumulació anormal de membranes del RE i de l'aparell de Golgi, un creixement lent i sensibilitat a la higromicina B.

Per dur a terme l'anàlisi de complementació funcional, la soca SNH23-7D es va transformar amb el plasmidi pJRDPS1, que conté l'ADNc de la AtDps1p d'*A. thaliana* sota el control del promotor de la gliceraldehidfosfat deshidrogenasa (GPD) de llevat, i es va analitzar la seva capacitat de créixer a 27°C i a 37°C. Com a controls es van utilitzar la soca parental SNY9, que conté el gen *RER2* natiu, i la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJR1133. Com s'observa en la **figura 29**, les tres soques creixen a 27°C, tal i com i com era d'esperar, mentre que a 37°C només creixen la soca parental SNY9 i la soca SNH23-7D que expressa la proteïna AtDps1. Aquests resultats demostren que l'expressió de la Dps1p d'*A. thaliana* reverteix el fenotip de termosensibilitat de la soca SNH23-7D. Aquest fet indica que la AtDps1p complementa la mutació *rer2-2* de la soca SNH23-7D.

**Fig. 29. Complementació funcional de la soca de llevat deficient en dedol-PP sintasa SNH37-7D amb la AtDps1p.** La soca salvatge SNY9 i la soca mutant SNH23-7D transformada amb els plasmidis pJR1133 (control) i pJRDPS1, que expressa la proteïna AtDps1, van ser sembrades en medi YPG i incubades a 27°C (4 dies) i a 37°C (2 dies).



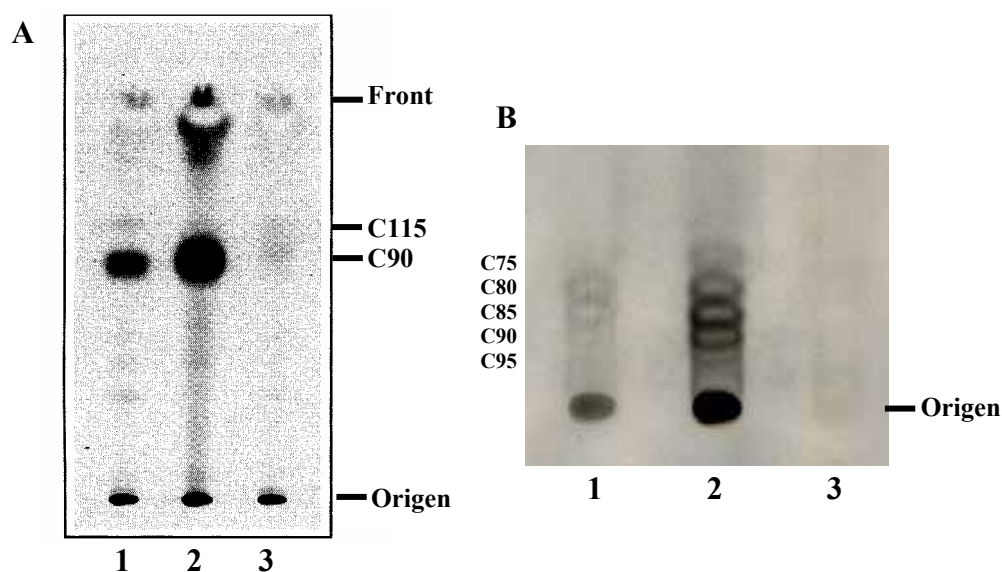
#### 4.2. Assaig d'activitat *cis*-preniltransferasa.

Per demostrar que l'expressió de la proteïna AtDps1 restaura l'activitat *cis*-preniltransferasa en la soca SNH23-7D, es van realitzar assaigs *in vitro* d'activitat *cis*-preniltransferasa en extractes proteics de la fracció p13.000 de la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJRDPS1 utilitzant [1-<sup>14</sup>C]-IPP i FPP com a substrats, tal i com es descriu a materials i mètodes (apartat 19). La fracció p13.000 és on s'havia mesurat l'activitat *cis*-preniltransferasa en llevat (Sato et al., 1999). Com a control, es va dur a terme el mateix experiment en extractes de la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJR1133 i de la soca salvatge SNY9. Com es mostra a la **figura 30**, l'activitat *cis*-preniltransferasa en els extractes de la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJRDPS1 incrementa 5.7 vegades respecte a la soca salvatge (SNY9) i 11 vegades respecte a la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJR1133. Aquest resultat indica que l'expressió de la proteïna AtDps1 restaura l'activitat *cis*-preniltransferasa i demostra que la AtDps1p és una *cis*-preniltransferasa funcional.

Soca	Activitat <i>cis</i> -preniltransferasa	
	pmol/min/mg prot.	% de la SNY9
SNY9	44	100
SNH23-7D[pJRDPS1]	251	570
SNH23-7D[pJR1133]	23	52

**Fig.30.** Activitat *cis*-preniltransferasa en les fraccions p13.000 de les soques SNY9, SNH23-7D-pJRDPS1 i SNH23-7D-pJR1133. L'activitat específica s'expressa en pmol d'IPP[1-<sup>14</sup>C] incorporats en els poliprenols/min./mg. de proteïna, i en percentatge respecte l'activitat de la soca parental SNY9, a la que se li ha assignat el valor 100.

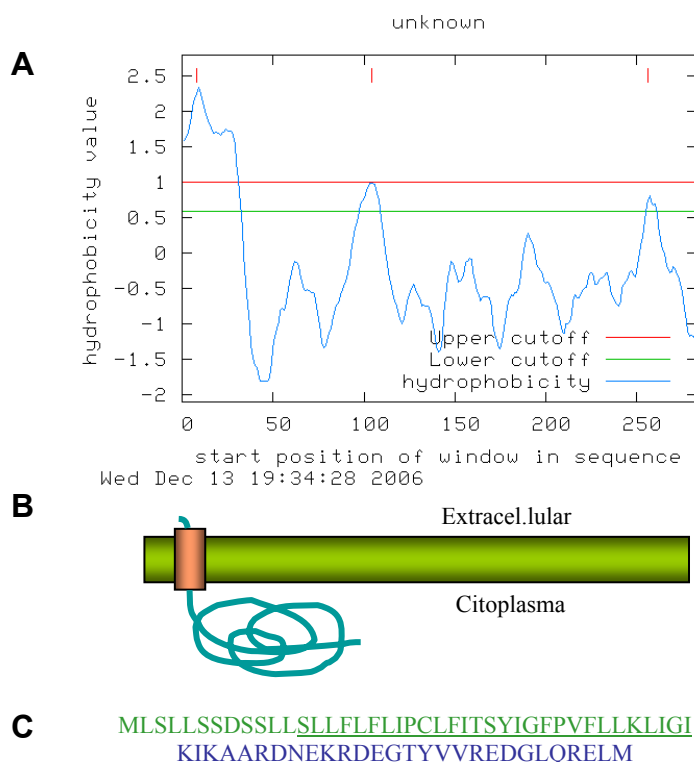
Per determinar la naturalesa i longitud dels productes de reacció de les tres soques en que s'ha assajat l'activitat *cis*-preniltransferasa es va dur a terme una cromatografia en capa fina en fase normal dels productes de reacció. Com es pot observar en la **figura 31 A**, els extractes de la soca SNH23-7D-pJRDPS1 (carril 2) sintetitzen una gran quantitat de productes marcats amb  $^{14}\text{C}$ , identificats com a dolícols ja que migren com el dolícol que té una cadena carbonada de 90C, mentre que la soca salvatge SNY9 (carril 1) sintetitza una quantitat sensiblement inferior de dolícols marcats i la soca SNH23-7D (carril 3) sintetitza una quantitat pràcticament indetectable de dolícols. Per a determinar amb més precisió la mida dels dolícols sintetitzats per les diferents soques, els productes de reacció de l'assaig *cis*-preniltransferasa es van analitzar per CCF en fase reversa. En la **figura 31 B** s'observa que la soca SNY9 (carril 1) sintetitza majoritàriament dolícols de 16 (C80) i 17 (C85) unitats d'isoprè, mentre la soca SNH23-7D-pJRDPS1 (carril 2) sintetitza majoritàriament dolícols de 17 (C85) i 18 (C90) unitats d'isoprè. En canvi, en la soca SNH23-7D (carril 3) no es detecten dolícols mitjançant una CCF en fase reversa. Aquests resultats indiquen que els productes sintetitzats per la AtDps1p en llevat (soca SNH23-7D-pJRDPS1) són lleugerament més grans que els sintetitzats per la soca salvatge SNY9 (**figura 31 B**). En conjunt, els resultats presentats fins a aquest punt demostren que l'ADNc de la DPS1 d'*A. thaliana* codifica per una dedol-PP sintasa funcional.



**Fig. 31.** Anàlisi dels productes de reacció sintetitzats en l'assaig *cis*-preniltransferasa de fraccions de membrana (p13.000) de les soques SNY9 (carril 1), SNH23-7D-pJRDPS1 (carril 2) i SNH23-7D-pJR1133 (carril 3) en presència de  $[1-^{14}\text{C}]$ -IPP i FPP com a substrats. Una vegada s'havia realitzat l'assaig, els productes lipídics es van extreure amb cloroform/metanol i es van analitzar per CCF. **A: Anàlisi per CCF en fase normal.** Es va realitzar una cromatografia de capa fina en una placa de sílica gel-60 amb una mescla benzè/acetat d'etil 95:5 (v/v) com a solvent. Com a estàndards es van utilitzar dolícols de fetge de porc de 18 (C90) i 23 (C115) unitats d'isoprè. **B: Anàlisi per CCF en fase reversa.** Es va realitzar una cromatografia en capa fina en una placa RP18-F amb una mescla d'acetona/aigua 95:5 (v/v) com a solvent. Com a estàndard es va utilitzar dolícol de fetge de porc de 18 (C90) unitats d'isoprè. A l'esquerra s'indiquen les diferents mides dels dolícols.

## 5. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA PROTEÏNA AtDps1

Anteriorment s'havia descrit que la dedol-PP sintasa de llevat Rer2p està unida a regions concretes de les membranes del RE (Sato et al., 1999 i 2001). No obstant, la proteïna Rer2p no té cap domini transmembrana ni cap pèptid senyal N-terminal. En canvi, sí que té la seqüència carboxiterminal KKxx, descrita com a un senyal de retorn al RE en proteïnes de membrana del RE (Townsend et al., 1994) tot i que no s'ha demostrat experimentalment la seva funcionalitat com a tal. A diferència de la proteïna Rer2p de llevat, la proteïna AtDps1 no presenta cap seqüència de retenció o retorn al RE. No obstant, i per estudiar si la AtDps1p presenta alguna característica que la pugui dirigir al RE, hem analitzat el seu perfil d'hidrofobicitat i la seva possible topologia mitjançant eines bioinformàtiques (**figura 32**). Així, el programa TOPPRED (von Heijne, 1992; Claros i von Heijne, 1994) mostra que el domini N-terminal de la Dps1p és altament hidrofòbic i que inclou una seqüència (aminoàcids del 13 al 32) predita com a  $\alpha$ -hèlix que pot constituir un domini de transmembrana. En la regió immediatament adjacent a aquesta zona hidrofòbica es troba una regió extremadament hidrofílica (aminoàcids 42 a 68) amb gran nombre de residus aminoacídics carregats positivament. El programa PSORT (Horton et al., 2006) prediu la localització de la proteïna al RE.



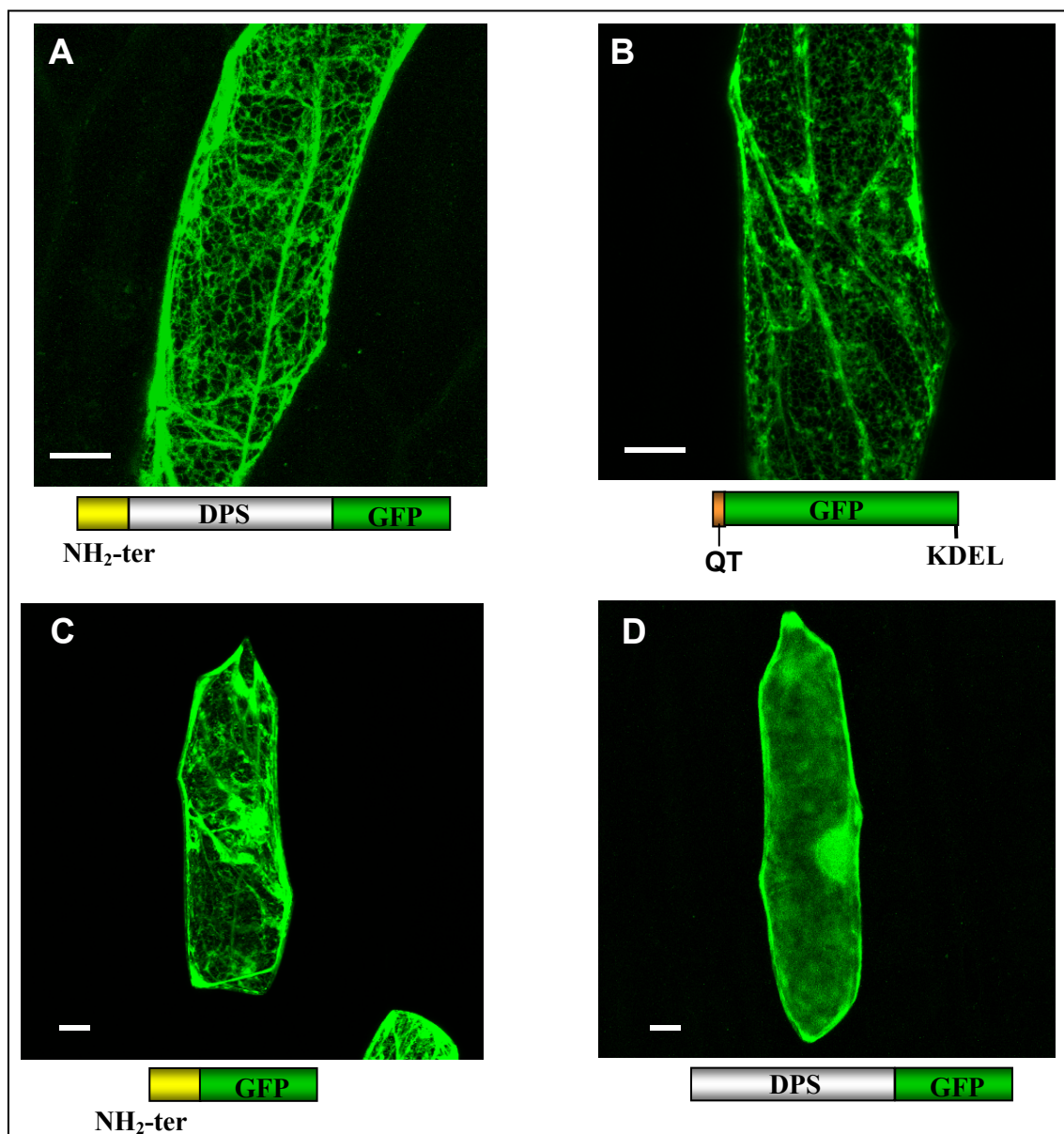


**Fig.32. A: Perfil d'hidrofobicitat de la proteïna AtDps1p.** La línia blava mostra el perfil d'hidrofobicitat dels aminoàcids segons el programa TOPPRED (algoritme Kyle & Doolittle). Les línies verda i vermella marquen el llindar (inferior i superior respectivament) a partir del qual es considera una regió com a domini de transmembrana. **B: Model topològic de la AtDps1p en la membrana del RE.** El programa TOPPRED prediu un únic domini de transmembrana (en taronja). **C: Extrem N-terminal de la AtDps1p.** Es mostren els 69 aminoàcids de l'extrem N-terminal de la AtDps1p. En verd es mostra la regió hidrofòbica i el possible domini de transmembrana està subratllat. La regió adjacent altament hidrofílica es mostra en blau.

Per complementar els estudis realitzats sobre la proteïna AtDps1 es va estudiar la seva localització subcel·lular, mitjançant l'expressió en cèl·lules epidèrmiques de ceba d'una proteïna quimèrica (AtDps1p-GFP) en que la proteïna AtDps1 es va fusionar a l'extrem N-terminal de la proteïna marcador GFP (Green Fluorescent Protein). Com ja s'ha comentat anteriorment, la proteïna AtDps1 no conté cap senyal de localització al RE, però sí un extrem aminoterminal hidrofòbic que podria estar implicat en la localització subcel·lular de la proteïna. Per determinar si aquest extrem N-terminal hidrofòbic és important en la localització subcel·lular de la proteïna AtDps1, es van generar dues proteïnes quimèriques addicionals que es van expressar en cèl·lules epidèrmiques de ceba. En primer lloc, es va fusionar el domini N-terminal hidrofòbic de la proteïna AtDps1 (69 aa; AtDps1pNH<sub>2</sub>) a l'extrem N-terminal de la GFP, i en segon lloc, es va fusionar a l'extrem N-terminal de la GFP una variant de la AtDps1p a la que es van del·leccionar els 69 aa del domini N-terminal hidrofòbic (AtDps1pΔNH<sub>2</sub>). Aquestes 3 construccions es van obtenir per PCR utilitzant com a motllo l'ADNc de la AtDPS1. Els productes amplificats es van clonar en el plasmidi pGFP-MRC (Rodríguez-Concepción et al., 1999), obtenint així els plasmidis pAtDps1pGFP, pAtDps1pΔNH<sub>2</sub>GFP i pAtDps1pNH<sub>2</sub>GFP, en que l'ADNc que codifica per a les diferents proteïnes quimèriques està sota control del promotor constitutiu 35S del virus del mosaic de la col·i-flor (Material i Mètodes, apartat 13). Com a control de localització en el RE es va utilitzar una versió de la GFP que conté a l'extrem N-terminal el pèptid de trànsit al RE de la quitinasa i el senyal de retenció al RE KDEL a l'extrem C-terminal. Totes aquestes construccions es van expressar en cèl·lules epidèrmiques de ceba transformades mitjançant la tècnica de biolística (Material i Mètodes, apartat 13). Els trossos de ceba bombardejats amb les micropartícules de tungstè a les que prèviament es va adherir l'ADNc de les diferents construccions, es van incubar 16 hores en fosc i posteriorment es va observar el patró de fluorescència de les cèl·lules transformades en el microscopi làser confocal.

En la **figura 33** es mostren els resultats obtinguts amb cada una de les construccions. Quan s'analitzen per microscopia làser confocal les cèl·lules epidèrmiques de ceba transformades amb els plasmidis pAtDps1pGFP i pAtDps1pNH<sub>2</sub>GFP, que expressen les proteïnes quimèriques AtDps1p-GFP i AtDps1pNH<sub>2</sub>-GFP, s'observa en els dos casos un patró reticulat de fluorescència verda (**figura 33 A i C**), que és idèntic al patró de fluorescència emesa per la proteïna GFP-KDEL utilitzada com a marcador del RE (**figura 33 B**). En aquestes

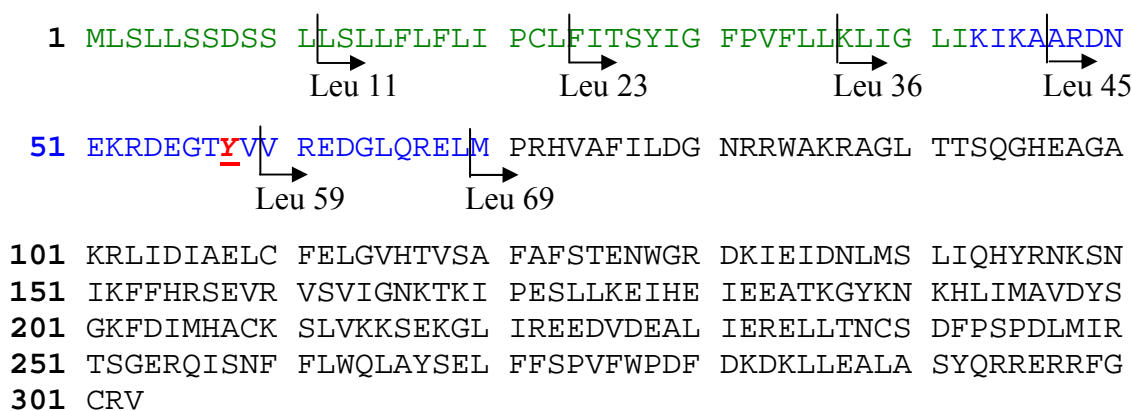
cèl.lules no es detecta fluorescència al citoplasma, a orgànels ni en el nucleoplasma. En canvi, quan s'observa la fluorescència emesa per les cèl.lules epidèrmiques de ceba transformades amb el plasmidi pAtDps1 $\Delta$ NH2GFP, que expressa la proteïna quimèrica AtDps1p $\Delta$ NH2-GFP, es detecta una localització citosòlica i nuclear. Aquests resultats mostren que la proteïna AtDps1-GFP es localitza exclusivament en el RE de les cèl.lules epidèrmiques de ceba, i que el domini N-terminal hidrofòbic de la AtDps1p és necessari i suficient per a la localització de la GFP en el RE de les cèl.lules epidèrmiques de ceba.



**Fig. 33. Localització subcel.lular de les proteïnes de fusió AtDps1p-GFP, AtDps1pNH2-GFP i AtDps1 $\Delta$ NH2-GFP.** Microfotografies de microscopia làser confocal que mostren la distribució de la fluorescència en cèl.lules epidèrmiques de ceba que expressen les proteïnes AtDps1-GFP (A), el marcador de RE GFP-KDEL (B), AtDps1NH2-GFP (C) i AtDps1 $\Delta$ NH2-GFP (D). A sota de cada imatge es representa de forma esquemàtica la proteïna quimèrica expressada en cada cas. **QT**; pèptid de trànsit de la quitinasa. **KDEL**; senyal de retenció al RE. Les imatges són projeccions tridimensionals de 20 seccions d'1 $\mu$ m cada una. Les barres blanques representen 20  $\mu$ m.

## 6. CARACTERITZACIÓ DE L'EXTREM AMINOTERMINAL DE LA AtDps1p D'ARABIDOPSIS THALIANA

Com ja s'ha comentat abans l'extrem aminoterminal de la Dps1p d'*A. thaliana* és la regió més diferenciada respecte la resta de *cis*-preniltransferases d'altres organismes (**figura 28**). Aquest domini està format per 42 aminoàcids que donen a l'extrem N-terminal un caràcter marcadament hidrofòbic, seguit per una regió de 27 aa altament hidrofílica, rica en aa carregats (**figura 29**). Com s'ha demostrat en l'apartat anterior, l'extrem aminoterminal és necessari i suficient per a la localització de la proteïna al RE. D'altra banda, analitzant la seqüència de l'extrem aminoterminal de la AtDps1p també es detecta el motiu KrdEgtY, que és pròxim al motiu consens de fosforilació en tirosines ([RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y) (Hunter T., 1982), fet que suggereix un possible lloc de fosforilació en la tirosina 58 (Y), el qual podria estar implicat en la modulació de l'activitat de la AtDps1p. Aquestes observacions ens han dut a investigar si el domini N-terminal de la AtDps1p, a part de determinar la localització subcel·lular de la proteïna, és important per a la seva funcionalitat tot i que no formi part de les regions conservades entre les diferents *cis*-preniltransferases, i si l'esmentat residu de tirosina està implicat en la regulació de l'activitat de l'enzim.

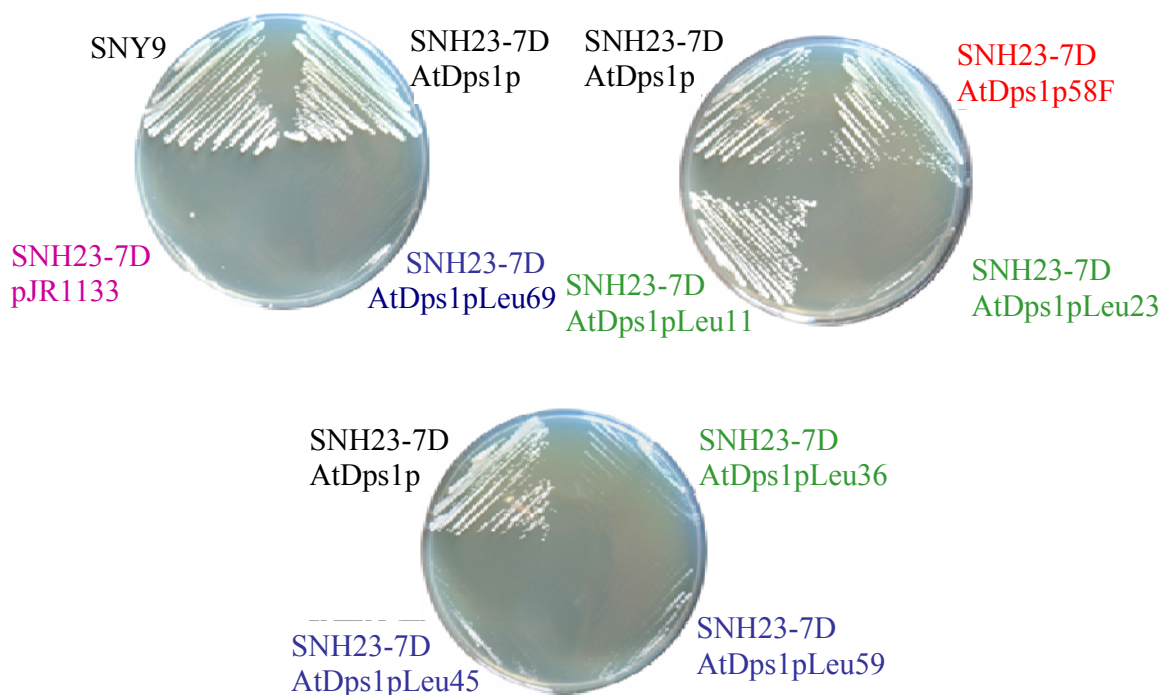


**Fig.34. Seqüència d'aminoàcids de la AtDps1p.** La numeració dels aminoàcids es troba a l'esquerra. La seqüència hidrofòbica de l'extrem aminoterminal s'indica en color verd, la seqüència hidrofílica adjacent en blau i la tirosina 58 (en vermell). Les fletxes indiquen els aminoàcids on comencen les respectives proteïnes deleccionades.

Per a dur a terme aquest estudi es van generar mitjançant PCR una bateria de construccions en el vector pJR1133, per a expressar en la soca SNH23-7D diferents versions de la proteïna AtDps1 en que es van deleccionar, respectivament, 11 (AtDps1pLeu11), 23 (AtDps1pLeu23), 36 (AtDps1pLeu36), 45 (AtDps1pLeu45), 59 (AtDps1pLeu 59) i 69 (AtDps1pLeu69) aminoàcids (**figura 34**). També es va generar una proteïna AtDps1 en que es va substituir la tirosina 58 per una fenilalanina (AtDps1pY58F). Amb aquestes construccions es va transformar la soca de llevat SNH23-7D i es va analitzar la seva capacitat de créixer a 37°C.

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 11.3) la soca SNH23-7D no creix a 37°C però si que ho fa a 27°C, mentre que la soca SNH23-7d que expressa la proteïna AtDps1 i la soca salvatge SNY9 creixen tan a 27°C com a 37°C (**figura 29**).

Els resultats de l'assaig de complementació amb les versions de la AtDps1p truncades per l'extrem aminoterminal es mostren a la **figura 35**. La proteïna AtDps1pLeu11 complementa el fenotip de termosensibilitat de la soca SNH23-7D ja que restaura el creixement a 37°C, en canvi les proteïnes AtDps1p23, 36, 45, 59 i 69, no. Aquests resultats suggereixen que el domini N-terminal hidrofòbic és essencial per a la funcionalitat de la proteïna en llevat, ja que la pèrdua dels 22 primers aminoàcids fa que l'enzim ja no sigui capaç de complementar la soca SNH23-7D. Aquest fet és probablement degut a que al del·leccionar els aminoàcids 12 a 22 es perd el possible domini de transmembrana de la AtDps1p i alterant la localització subcel·lular de l'enzim i com a conseqüència es perdria la seva activitat enzimàtica. D'altra banda, La proteïna AtDps1pY58F no complementa el fenotip de termosensibilitat de la soca SNH23-7D. El fet que la mutació de la tyr58 no afecti la capacitat de la AtDps1p per complementar el fenotip de termosensibilitat a 37°C, suggereix que al menys en llevat la tirosina 58 no és important per a la funcionalitat de la proteïna.



**Fig.35. Complementació funcional de la soca de llevat deficient en dedol-PP sintasa SNH23-7D amb les proteïnes AtDps1pLeu11/23/36/45/59/69 i AtDps1pY58F.** Les soques SNH23-7D que expressen les proteïnes AtDps1pLeu11/23/36/45/59/69 i AtDps1pY58F es van sembrar en medi YPG i es van incubar a 23°C (4 dies) i a 37°C (2 dies). Com a control positiu de creixement es van utilitzar la soca SNY9 i la soca SNH23-7D que expressa la AtDps1p, mentre que com a control negatiu es va utilitzar la soca SNH23-7D transformada amb el plasmidi pJR1133. Només es mostren els resultats de les plaques incubades a 37°C.

## **7 FAMÍLIA GÈNICA DE DEDOL-PP SINTASES D'*A. THALIANA***

El complex patró de bandes detectat per anàlisi de l'ADN genòmic mitjançant Southern Blot (no es mostra) ens va portar a plantejar-nos la possible existència en el genoma d'*A. thaliana* d'una família de gens que codifiquin per dedol-PP sintases. Amb aquest objectiu es va realitzar una busca en les bases de dades que contenen la seqüència del genoma d'*A. thaliana* amb el programa TAIRBlastN utilitzant com a sonda la seqüència aminoacídica completa de la Dps1p d'*A. thaliana*. Com a resultat d'aquesta busca es van trobar fins a 8 gens addicionals que podrien codificar proteïnes homòlogues de la AtDps1p, ja que contenen els cinc dominis conservats en les *cis*-preniltransferases. En funció de la seva localització en el genoma i de la seva homologia amb el gen *AtDPS1*, s'han assignat a les seqüències identificades els següents noms: *AtDPS2* (At2g23410), *AtDPS3* (At5g58784), *AtDPS4* (At5g58780), *AtDPS5* (At5g58782), *AtDPS6* (At5g58770), *AtDPS7* (At2g17570), *AtDPS8* (At5g60500) i *AtDPS9* (At5g60510). A les bases de dades es troben EST's (Expressed Sequence Tags) de l'*AtDPS1* (en arrels, l'*AtDPS2* (en plàntules), l'*AtDps5* (fruits), l'*AtDPS7* (roseta basal) i *AtDPS9* (barreja d'ARNm de diferents teixits, i també resultats d'experiments amb microarrays de tots els possibles gens *DPS* d'*A. thaliana*. Aquestes observacions indiquen que aquests gens s'expressen, tot i que encara no s'ha demostrat que les proteïnes codificades per aquests gens siguin dedol-PP sintases funcionals. L'alineament de les seqüències d'aminoàcids de les 9 possibles Dpsp d'*A. thaliana* es mostra en la **figura 36**.

A partir de l'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids, les nou proteïnes AtDps es poden agrupar en dues famílies diferents, com es pot observar en l'arbre filogenètic (**figura 37**). La primera família estaria formada per les AtDps1-6 i la segona per les AtDps7-9. Les AtDps de la primera família tenen una identitat força elevada amb la AtDps1p (entre un 84% i un 52%) (**figura 38**). Totes elles excepte la AtDps6p presenten l'extrem aminoterminal hidrofòbic. Les AtDps de la segona família (7-9) presenten entre un 28 i un 32% d'identitat respecte la AtDps1p (**figura 38**). Les Dps de la segona família no tenen l'extrem aminoterminal hidrofòbic, però sí que presenten un motiu KKxx a l'extrem carboxiterminal, que com ja s'ha comentat anteriorment pot estar implicat en la localització de proteïnes al RE (Townsend et al., 1994). Els gens *AtDPS1-6* tenen tots la mateixa organització d'exons i introns, excepte el gen *AtDPS6* que no presenta el primer intró. En canvi, els gens que codifiquen per les AtDps de la segona família no tenen introns. Finalment, un altre aspecte a destacar és la disposició dels 9 gens *AtDPS* en el genoma d'*A. thaliana*. Els gens *AtDPS1* i 2 formen un tàndem en el cromosoma 2, els gens *AtDPS8* i 9 formen un tàndem en el cromosoma 5, i els gens *AtDPS3*, 4, 5 i 6 que es troben

Resultats

situats tots quatre al cromosoma 5 un darrere de l'altre. Per la seva banda el gen *AtDPS7* es troba localitzat en el cromosoma 2.

*AtDPS1* (1) MLSL-----LSSDSSLSSLLFLFLIPCLFITSYIGFPVFLKLIQL- IKIKAARDN-  
*AtDPS2* (1) MLSL-----LSTLVALPFLFLIPCLFITSYICFPVFLTKLLGL- IKFKAARDDD  
*AtDPS3* (1) MLSL-----FSVVF~~T~~FLALFLIPGLFISRRLNVPLSLTNILRF- IKI IASKYD-  
*AtDPS4* (1) MLSI-----LSSLLSLLFLFIISCFFITSHFWFPLSLPKILGF- IKITSSRDDY  
*AtDPS5* (1) MLSM-----LWFLLSLLSLLLPCLR-----PCFPAK--GS-LKN-----  
*AtDPS6* (1) MLSLRVPTPTSFDFRRYQAGDLERRWRLS--RDSFLSFSPKFEENRGFRFGVKSSKSD-  
*AtDPS7* (1) MAELPGQIRH-IGGRMSQLEQIYGFLFRVI-----SRRS-  
*AtDPS8* (1) MNTL-EEVDE-STHIFNALMSLMRKFIFRVL-----  
*AtDPS9* (1) MNNTREEVGE-FTQIFNALMSLMRKFIFKVL-----

*AtDPS1* (51) --EKRDEGTYVRED---GLQRELM~~PRH~~VAFILDGNRRWAKRAGLT-TISQGHEAGAKRL  
*AtDPS2* (49) DNEKRDEATCVVREE---ELQRELM~~PRH~~VSFILDGNRRWAKRDGLT-TAQGHEAGTKRI  
*AtDPS3* (48) DEEERNEKRGTMGKEK---QKGRNIMPKHVAVILDGNRRWAEKRGLG-TSEGHEAGARRL  
*AtDPS4* (49) DNEQRDEGTYVVGVE---ELQRELM~~PRH~~VAVIMDGNRRWAKRAGLL-TISQGHEAGAKRL  
*AtDPS5* (51) -KKKIDKGTYYVVGEEETPKELQRELM~~PRH~~VAVIMDGNRRWAKQTGLL-TISQGYEAGAKRL  
*AtDPS6* (57) -----VSFTAEEEEETLPEELHAELM~~PKH~~VAVIMDGNRWAKNRGLQ-FWDGHRAGVEAL  
*AtDPS7* (30) -----SMGPI~~PCH~~I~~AF~~IMDGNRRWAKKCGLL-DGSGHKAGFSAL  
*AtDPS8* (30) -----CVGPI~~PTN~~ISFIMDGNRRWAKKHNLIGLDAGHRAGFISV  
*AtDPS9* (31) -----RVGPI~~PTN~~ISFIMDGNRRWAKKRNLGLDAGHRAGFISV

Regió I

Regió II

*AtDPS1* (104) IDIAELCFELGVHTVS~~AF~~AFSTENWGRDKIEIDNLM~~SLI~~QHYRnKSNIKFFHR---SEVR  
*AtDPS2* (104) IEIAEVCFELGIHTVS~~AF~~AFSTENWGRDKFEVKCLMSLFNHYL-KSNIQYFQR---KEVR  
*AtDPS3* (104) MENAKDCFAMGTNTISL~~AF~~AFSTENWERPEDEVKCLMALFEKYL-ASDMPYLRS---DKIK  
*AtDPS4* (104) IEFSEL~~CF~~KLGIHTVS~~AF~~AFSTENWGRHKIEVKCLMSLIQHYL-KSKIQYFQR---EETR  
*AtDPS5* (109) LEFADL~~CF~~KLGIN~~TV~~S~~AF~~AFSTENWGRHKIEVKCLMYL~~F~~QRYL-KSKIQFQS---KEIR  
*AtDPS6* (111) KEIVELCGK~~WGI~~QVLT~~V~~FAFSTDN~~WIR~~PRIEIDFL~~S~~L~~F~~ERSL-KTEFQNLAK---NNVR  
*AtDPS7* (73) MSMLQCYELGIKYVTI~~YAF~~SIDNFRRKPEEVESVMDL~~M~~LEKI-KSLLEKESIVHQYGIR  
*AtDPS8* (69) KYILQYCKEIGV~~P~~YVTL~~HAF~~GMDNFKR~~G~~PEEVKCVMDL~~M~~LEKV-ELAI~~DQ~~AVSGNMNGVR  
*AtDPS9* (70) KYILQYCKEIGV~~P~~YVTL~~YAF~~GMDNFKR~~G~~PEEVKCVMDL~~M~~LEKV-ELTID~~Q~~AVSGNMNGVR

Regió III

*AtDPS1* (161) VSVIGNKTKIPESLLKEIHEIEEATKGYKNKHLI~~MAVD~~YSGKFDIM~~H~~AC-KSLVKKS---  
*AtDPS2* (160) VSVIGNKTKIPESLLKEIHEIEEATKAYKNKHLI~~MAVD~~YSGKFDIM~~H~~AC-KSLVKKS---  
*AtDPS3* (160) ISVIGNR~~TKL~~PESLLGLIEEVEEATKSYEGKNLI~~IAID~~YSGRYDIL~~Q~~AC-KSLANKV---  
*AtDPS4* (160) VSVIGNLTKIPESLLRTVQEIEEATRSYKKKHLI~~LAID~~YSGRLDIL~~R~~AC-KSIVKKS---  
*AtDPS5* (165) VSVIGNLAKIPESLLRTVHELEEATKSYKKKHLI~~LAID~~YSGRFDIL~~G~~AC-KNIVKKS---  
*AtDPS6* (167) ISII~~GD~~SKL~~PKS~~LLRVINEVEEVT~~KNN~~TRLQ~~LI~~VAVGYS~~GK~~YDVL~~Q~~AC-RGIARRV---  
*AtDPS7* (132) VYFIGNLALLNDQVRAAEKVMKATAKNSRVLLI~~ICIA~~YNSTDEIV~~Q~~AVK~~K~~SCINKS~~ndi~~  
*AtDPS8* (128) IIFAGDLDSLNEHFRAATK~~KL~~MELTEENRDLIV~~V~~CVAYST~~S~~LEIV~~H~~AVR~~K~~SCVR~~K~~C---  
*AtDPS9* (129) IIFAGDLNSLNERFRAATK~~KL~~MELTEENRDLIV~~V~~CVAYST~~S~~VEIV~~H~~AVR~~D~~SCVR~~K~~S---

Regió IV

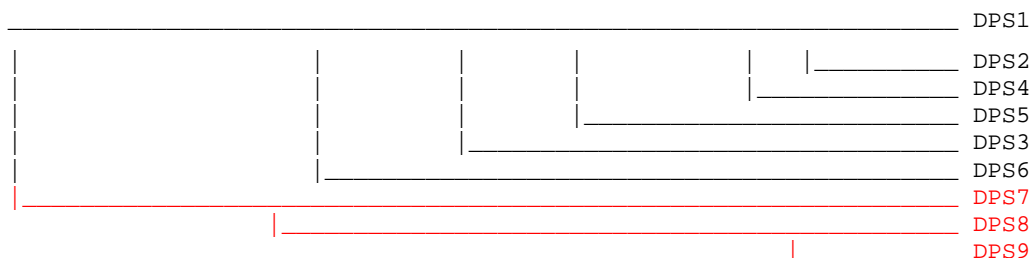
*AtDPS1* (217) EKGLIREEDVDEAL-----IERELLTNCSDFF~~SPDL~~MIRTSGEQRIS~~NF~~  
*AtDPS2* (216) EKGLIREEDVDEAL-----IERELLTNCSDFF~~SPDL~~MIRTSGEQRIS~~NF~~  
*AtDPS3* (216) KDGLIQVEDINEKA-----MEKELLTKCEFF~~PN~~DLLIRTSGEQRIS~~NF~~  
*AtDPS4* (216) EKGLIREEDVDEAL-----IERELLTNCTEFF~~SPDL~~LIRTSGEQRIS~~NF~~  
*AtDPS5* (221) EQGLIREEDVDETL-----FERELQTRCTEFF~~SPDL~~LIRTSGEQRIS~~NF~~  
*AtDPS6* (223) KDGEIEVEEIDERL-----IEEELETNCTEFF~~YPDL~~LIRTSGELRVS~~NF~~  
*AtDPS7* (192) EASNYKHEDSDSDIegtdmenqekKIQLVDIEENMQMSVA--~~PN~~PDILIRSSGETRLS~~NF~~  
*AtDPS8* (185) TNG-----DDLV-----LLELSDVEECMYTSIV--~~VPDL~~VIRTGGDRLS~~NF~~  
*AtDPS9* (186) KTG-----DGSSAL-----ELSDIEECMYTSV--~~VPDL~~VVRTGGDRLS~~NF~~

Regió V

*AtDPS1* (261) FLWQLAYSELFFSPVFWPDFDKDKLLEALASYQRRERRFGCRV  
*AtDPS2* (260) FLWQLAYTELFYSPVLWPDFDKDKLLEALASYQGRERRFGCRV  
*AtDPS3* (260) FLWQSAYTELYFPTVLWPDFGEAEYLEALTWYQQRRRFGRRV  
*AtDPS4* (260) FLWQLAYTELF~~F~~SPVLWPDFDKDKLLEALVSYQRRERRFGCRV  
*AtDPS5* (265) FLWQLAYTEFF~~F~~SPVLWPDFDKQK~~F~~IEALVSYQRRDRRFGSRL  
*AtDPS6* (267) LLWQLAYTELFFAQELWPDFGRSGFIEALMSFQQRQRFFGGRKS  
*AtDPS7* (250) LLWQTGNTQLCSPAALWPEIGLRHLLWAILNFQRNHSYLEKRKKQL  
*AtDPS8* (226) MTWQTSRSLHRTEALWPELGLWHLVWAILKFORMQDYLTKKKLD  
*AtDPS9* (227) MTWQTSRALLHRTEALWPELGLWHLVWAILKFORMQDYLTQKKKHLH

## Resultats

**Fig. 36. Alineament de les seqüències aminoacídiques de la AtDps1p i les 8 possibles AtDPSp addicionals d'*A. thaliana*.** Les cinc regions conservades en les *cis*-preniltransferases estan indicades amb caixes (Regió I-V). Les Dps de la primera família, les que presenten una major identitat amb la AtDps1p, es mostren en negre i la segona família en vermell. L'extrem N-terminal hidrofòbic de les AtDps1-6p es mostra subratllat i en cursiva, mentre que la senyal de retenció al RE carboxiterminal KKxx de les AtDps7-9p es mostra subratllat i en negreta.



**Fig. 37. Arbre filogenètic de les 9 possibles Dps d'*A. thaliana*.** L'arbre s'ha realitzat amb l'algoritme Cluster del programa TreeTop. Les proteïnes Dps de la primera família es mostren en negre i les de la segona família en vermell.

%identitat	Dps1	Dps2	Dps3	Dps4	Dps5	Dps6	Dps7	Dps8	Dps9
<b>Dps1</b>	<b>100</b>	88	55	80	71	52	32	30	29
<b>Dps2</b>	88	<b>100</b>	56	78	72	53	33	33	30
<b>Dps3</b>	55	56	<b>100</b>	59	63	55	34	30	28
<b>Dps4</b>	80	78	59	<b>100</b>	78	55	35	30	28
<b>Dps5</b>	71	72	63	78	<b>100</b>	53	34	29	27
<b>Dps6</b>	52	53	55	55	53	<b>100</b>	30	31	32
<b>Dps7</b>	32	33	34	35	34	30	<b>100</b>	45	44
<b>Dps8</b>	30	33	30	30	29	31	45	<b>100</b>	90
<b>Dps9</b>	29	30	28	28	27	32	44	90	<b>100</b>

**Fig. 37. Taula on es representa els percentatges d'identitat de la AtDps1p i les 8 possibles AtDPSp addicionals d'*A. thaliana*.**

**DISCUSSIÓ**





---

## **1. IDENTIFICACIÓ I CLONATGE DE L'ADNc DE LA DEHIDRODOLIUILL-PP SINTASA 1 D' *A. THALIANA***

La caracterització molecular de la dehidrodoliquil-PP sintasa 1 d'*A. thaliana* (AtDps1) s'ha iniciat amb la identificació d'una seqüència genòmica amb capacitat per codificar una proteïna homòloga a la proteïna Rer2 de llevat. Mitjançant una busca amb eines bioinformàtiques, s'ha identificat en el cromosoma 2 d'*A. thaliana* una seqüència nucleotídica amb capacitat per codificar una dehidrodoliquil-PP sintasa. L'ADNc d'aquesta proteïna s'ha clonat per RT-PCR (**figura 25**) i quan es compara la seqüència de l'ADNc amb la seqüència genòmica (gen *AtDPS1*), s'observa que el gen conté 4 exons que codifiquen per una proteïna de 303 aa, que presenta un nivell d'identitat del 36% amb la proteïna Rer2 de *S. cerevisiae*.

Fins a l'actualitat, en plantes només s'han clonat gens que codifiquen per *cis*-preniltransferases en *A. thaliana* i *Hevea brasiliensis* (Asawatreratanakul et al., 2003). Paral·lelament a l'ADNc que s'ha clonat en aquest treball (Cunillera et al., 2000), també s'ha clonat un ADNc que codifica per la AtDps1p en el grup del Dr.Kang (Oh et al., 2000). L'existència de gens que codifiquen per *cis*-preniltransferases no és exclusiva de plantes, sinó que també es troben en altres organismes, tan procariòtics com eucariòtics. Així, s'han clonat gens que codifiquen per *cis*-preniltransferases en bacteris com *M. luteus* (Sato et al., 1999), *E. coli*, *H. influenzae*, *S. pneumonie* (Apfel et al., 1999), *M. tuberculosis* (Schulbach et al., 2000), arqueobacteris (Hemmi et al., 2001), *S. cerevisiae* (Sato et al., 1999; Schenck et al., 2001) i humans (Endo et al., 2003). La primera *cis*-preniltransferasa clonada va ser la undecaprenildifosfat sintasa (UPPS) de *M. luteus* B-P 26, que catalitza la condensació seqüencial en *cis* de 8 molècules d'IPP amb el FPP per sintetitzar UPP, precursor de l'UPP-P que és un compost lipídic transportador de sucres indispensable per a la síntesis de la paret cel·lular bacteriana (Sato et al., 1999).

## **2. EL GEN *AtDPS1* TÉ UN PATRÓ D'EXPRESSIONI MOLT LOCALITZAT A LES ARRELS**

El patró d'expressió del gen *AtDPS1* ha estat analitzat mitjançant experiments de Northern blot utilitzant com a sonda l'ADNc sencer del gen *AtDPS1* en condicions d'alta astringència per aconseguir la màxima especificitat possible de la sonda. D'aquesta manera s'ha

comprovat que l'ARNm del gen *AtDPSI* s'acumula majoritàriament en les arrels, mentre que en la resta d'òrgans analitzats s'observa una expressió molt feble (**figura 27**). Aquests resultats suggereixen que el gen *AtDPSI* té un patró d'expressió molt especialitzat. La detecció de l'ARNm del gen *AtDPSI* en plàntules es pot explicar per l'expressió del gen en les arrels de les plàntules.

Actualment, es disposa d'informació molt limitada respecte al patró d'expressió dels gens que codifiquen per *cis*-preniltransferases en els organismes eucariotes. La poca informació addicional disponible es troba en bases de dades de microarrays. En la base de dades Genevestigator (Zimmermann et al., 2004), s'observa que el gen *AtDPSI* (At2g23410) s'expressa en tots els teixits, tot i que en la majoria el nivell d'expressió és molt baix. El teixit on s'observa una major expressió del gen són les arrels, tal i com hem observat en l'assaig de Northern blot. També s'observa expressió del gen als fruits, teixit en que no s'ha estudiat l'expressió del gen per Northern blot. Segons el Genevestigator, el nivell d'expressió del gen *AtDPSI* en els fruits és menor que en les arrels, i s'incrementa durant el procés de maduració. Globalment, els resultats de l'assaig de Northern blot i les dades del Genevestigator suggereixen que és en les arrels i els fruits on es necessita un major aport del dedol-PP sintetitzat per la AtDps1p. A més el baix nivell d'expressió del gen *AtDPSI* en les cèl.lules de cultiu, suggereix que la funció de la AtDps1p no està associada a la divisió cel.lular.

### **3. LA PROTEÏNA AtDps1 ÉS UNA DEDOL-PP SINTASA FUNCIONAL**

Tot i tenir un baix grau d'identitat respecte a totes les *cis*-preniltransferases caracteritzades fins a l'actualitat, la seqüència de la AtDps1 d'*A. thaliana* conté les cinc regions conservades en totes les *cis*-preniltransferases (**figura 28**) (Koyama et al., 1999; Liang et al., 2002). Dins d'aquestes regions, la AtDps1p conté els aminoàcids conservats que s'ha vist que són essencials per a l'activitat enzimàtica de les Upps de *M. luteus* i *E. coli*. Aquestes observacions suggerien que la AtDps1p era un ortòleg de la Rer2p. La funcionalitat de la AtDps1p s'ha demostrat mitjançant la complementació funcional amb la proteïna AtDps1 de la soca de llevat mutant pel gen *RER2* SNH23-7D (**figura 29**) i assaigs *in vitro* d'activitat *cis*-preniltransferasa en extractes proteics de la soca SNH23-7D-pJRDPS1, la qual expressa la proteïna AtDps1. La soca SNH23-7D-pJRDPS1 té una activitat *cis*-preniltransferasa 6 vegades

superior a la soca parental SNY9 i 10 vegades superior a la soca mutant SNH23-7D (**figura 30**), i sintetitza dolícols de 85 i 90C majoritàriament (**figura 31**).

Aquests resultats contrasten amb els obtinguts en assaigs d'activitat *cis*-preniltransferasa *in vitro* amb la Dps1p d'*A. thaliana* purificada a partir de l'expressió de l'ADNc en *E. coli*, els quals indiquen que el producte de reacció majoritari és el dolíol-PP de 120 carbonis (Oh et al., 2000). D'acord amb el model actualment acceptat, la longitud del producte de reacció de les *cis*-preniltransferases ve determinada per la mida de la butxaca hidrofòbica de la proteïna en la qual es localitza el producte fins que arriba a la longitud final, en un mecanisme de regulació de la longitud de la cadena similar al de les *trans*-preniltransferases (Fuhihashi et al., 2001; Takahashi et al., 2006). No obstant, els nostres resultats i els de Oh et al. (2000) indiquen que la AtDps1p pot sintetitzar productes de mida diferent, probablement depenent de les condicions de l'entorn on es troba l'enzim. Existeixen evidències que variacions en l'entorn de l'enzim poden afectar la longitud de la cadena carbonada del producte de reacció. Així, s'ha descrit que el producte que es sintetitza en *S. cerevisiae* en presència de membranes del RE és el poliprenol (el producte defosforilat però no reduït) de la mateixa mida que el dolícol final (C80-85), mentre que quan es solubilitza parcialment la preniltransferasa, la part d'aquesta que es solubilitza fabrica poliprenol-PP i a més amb una alta proporció de productes finals amb la cadena carbonada més llarga (C90-95) [Bukhtiyarov et al., 1993; Szkopinska et al., 1996]. Aquest fet, suggereix que la *cis*-preniltransferasa i la fosfatasa que defosforila el poliprenol-PP formen un complex dedicat a la síntesi de poliprenils i que la fosfatasa ajuda a determinar la longitud de la cadena carbonada del producte final. La participació d'altres factors proteïcs en l'activitat *cis*-preniltransferasa també s'ha observat en fetge de rata, on la "Sterol carrier protein-2" estimula les reaccions de condensació mediades per *cis*-preniltransferases (Ericsson et al., 1991). També s'ha detectat una interacció entre la Rer2p i la proteïna Niemann-Pick C2 en *S. cerevisiae* (Kharel et al., 2004). Per tant, és possible que la diferència entre la mida dels dolícols formats en l'assaig *cis*-preniltransferasa en extractes proteïcs de la soca de llevat SNH23-7D que expressa la AtDps1p dut a terme en aquest treball respecte els formats en l'assaig *cis*-preniltransferasa realitzat amb la AtDps1 purificada (Oh et al., 2000), sigui deguda a que en els extractes proteïcs de llevat hi hagi alguna interacció entre la AtDps1p i alguna altra proteïna que limiti la longitud del producte sintetitzat. Un altre factor que afecta la longitud del producte de les *cis*-preniltransferases és la velocitat d'alliberament del producte sintetitzat. Així, la presència de detergents com el Tritó disminueix la longitud de la cadena carbonada sintetitzada al augmentar la velocitat d'alliberament del producte de reacció (Liang et al., 2002; Matsuoka et al., 1991). En tot cas, la longitud real del producte sintetitzat per la AtDps1p s'haurà de determinar *in vivo* en *A. thaliana*.

---

## **4. IMPORTÀNCIA DE L'EXTREM N-TERMINAL DE LA AtDps1p**

### **4.1. L'extrem N-terminal de la AtDps1p localitza la proteïna al RE**

La observació en el microscopi confocal de cèl.lules epidèrmiques de ceba que expressen la proteïna AtDps1-GFP mostra un patró de fluorescència reticulat (**figura 58**). Aquests resultats demostren semi *in vivo* la localització de la proteïna AtDps1 exclusivament al RE. Existeix molt poca informació sobre la localització subcel.lular dels enzims implicats en la síntesi del dolicol en plantes. Així, en fulles d'espínacs s'han descrit dues activitats *cis*-preniltransferasa diferents responsables de la síntesi de poliprenols i dolícols en cloroplastes i microsomes respectivament (Sakaihara et al., 2000). En rata s'ha descrit que la síntesi de dolicol sembla estar associada a les membranes microsomals (Adair i Keller, 1982; Wong i Lennarz, 1982). Més recentment s'ha suggerit que els enzims involucrats en la síntesi del dolicol podrien formar un complex a les membranes del RE per incrementar l'eficiència de la seqüència de reaccions que donen lloc al dolicol. D'acord amb això, està demostrat que la *cis*-preniltransferasa de llevat Rer2p està unida a regions concretes de les membranes del RE (Sato et al. 1999 i 2001). No obstant, la proteïna Rer2p no té cap domini de transmembrana ni cap pèptid senyal. En canvi, si que té el senyal carboxiterminal KKxx, descrit com un senyal de retorn al RE en proteïnes de membrana del RE (Townesley et al., 1994) tot i que no s'ha demostrat experimentalment la seva funcionalitat en la proteïna Rer2p.

Els resultats de la complementació funcional del mutant de llevat SNH23-7D amb la proteïna AtDps1p indiquen que aquesta és correctament dirigida a les membranes del RE de llevat, tot i no presentar el senyal carboxiterminal de retorn a RE KKxx o cap altre motiu carboxiterminal de localització al RE com el motiu KDEL, o els motius bàsics RXR, KR, RRKK i RR presents en diferents proteïnes de membrana (Zerangue et al., 1999; O'Kelly et al., 2000; Chan et al., 2001). El fet que la pèrdua del domini N-terminal alteri la localització subcel.lular de la proteïna AtDps1 i que el domini N-terminal de la AtDps1 localitzi la GFP al RE, demostra que la localització en el RE de la AtDps1p depèn de la presència del domini N-terminal. Aquest domini N-terminal està format per 42 aminoàcids que donen a l'extrem N-terminal un caràcter marcadament hidrofòbic, seguit per una regió de 27 aa altament hidrofílica, rica en aa carregats (**figura 32**). S'ha descrit que la longitud i el grau d'hidrofobicitat dels dominis de transmembrana pot determinar la localització subcel.lular de les proteïnes (Fu et al., 2000). Per tant, és possible que la AtDps1p es localitzi a les membranes del RE a través de la regió hidrofòbica de l'extrem N-terminal. En aquest sentit, la predicció de la topologia de la proteïna AtDps1 mitjançant el programa TOPPRED, indica que aquesta presenta un sol domini

de transmembrana en forma d' $\alpha$ -hèlix (aa del 13 al 32), que es trobaria en la regió hidrofòbica de l'extrem N-terminal de la proteïna, amb l'extrem N-terminal a la llum del RE i el C-terminal citoplasmàtic, i es poden classificar com a proteïnes de transmembrana de tipus III (revisat a Goder i Spiess., 2001; Higy et al., 2004).

#### **4.2 L'extrem N-terminal de la AtDps1p és essencial per a la funcionalitat de l'enzim**

Els estudis de complementació funcional de la soca SNH23-7D amb diferents versions mutades de la AtDps1, en les quals s'ha del·leccionat un nombre creixent d'aminoàcids de l'extrem N-terminal però conservant sempre els aminoàcids que són essencials per a l'activitat enzimàtica de les *cis*-preniltransferases, mostren que la pèrdua del possible domini de transmembrana elimina la funcionalitat de la proteïna AtDps1. Així, al del·leccionar els 11 primers aa la proteïna resultant (AtDps1pLeu11) complementa el fenotip de termosensibilitat de la soca SNH23-7D, però al del·leccionar els 22, 36, 45, 59 i 69 primers aa, les proteïnes resultants (AtDps1pLeu22, 36, 45, 59 i 69) no complementen el fenotip (**figura 35**). El fet que diferents versions de la AtDps1p en que s'ha deleccionat el possible domini de transmembrana però que contenen els aminoàcids conservats en totes les *cis*-preniltransferases no restaurin el creixement a 37°C de la soca SNH23-7D, suggereix que aquest domini és imprescindible per a la correcta localització de l'enzim al RE i per tant, que la síntesi de poliprenil-pp, precursor del dolícol, tingui lloc de forma correcta. Així, la del·lecció dels 11 primers aminoàcids no elimina el domini de transmembrana de la AtDps1p i per tant l'enzim es localitzaria correctament i seria actiu, fet que permetria que complementés la soca SNH23-7D. En canvi, al del·leccionar 22 o més aa de l'extrem N-terminal no es pot formar el domini de transmembrana. Això provocaria una deslocalització de la proteïna, i com a conseqüència es perdria l'activitat enzimàtica i la proteïna resultant no podria complementar la soca SNH23-7D.

Quan s'analitza amb eines bioinformàtiques la regió hidrofílica de l'extrem aminoterminal de la AtDps1p, s'observa la presència del motiu KrdxEgtxY, que és pròxim al motiu consens de fosforilació en tirosines ([RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y) (Hunter T., 1982), fet que suggeriria un possible lloc de fosforilació en la tirosina 58 (Y). Tot i això, l'anàlisi de la complementació funcional de la soca mutant SNH23-7D que expressa la proteïna AtDps1 mutada en la tyr58 (AtDps1pY58F), indica que aquesta és capaç de restaurar el creixement de la soca a 37°C, i per tant suggereix que la tyr58 no estaria implicada en la regulació de l'activitat enzimàtica de la proteïna.

## **6. EXISTEIX UNA FAMÍLIA GÈNICA DE CIS-PRENILTRANSFERASES EN *A. THALIANA***

Com ja s'ha comentat, el gen *AtDPSI* s'expressa majoritàriament en les arrels i els fruits. D'altra banda en *H. brasiliensis*, *Ginkgo biloba* i *Pinus silvestris* el contingut de poliprenols i dolícols varia en funció del teixit, fet que suggeriria l'existència d'almenys tres vies de síntesis en aquestes plantes responsables de la formació de poliprenols de cadena curta, llarga i de dolícols (Tateyama et al., 1999). També s'ha descrit l'existència d'almenys dues activitats *cis*-preniltransferases diferents en fulles d'espínacs (Sakaihara et al., 2000). Aquestes observacions suggerien l'existència de possibles gens que codifiquessin per dedol-PP sintases addicionals en *A. thaliana*. La seqüenciació completa del genoma d'*A. thaliana* ha permès realitzar una busca en les bases de dades que contenen el genoma sencer d'*A. thaliana* amb el programa TAIRBlastN utilitzant com a sonda la seqüència aminoacídica completa de la Dps1p d'*A. thaliana*. Com a resultat d'aquesta busca s'han trobat fins a 8 gens addicionals que codificarien per a proteïnes homòlogues de la AtDps1p (**figura 36**). Aquestes 8 possibles *cis*-preniltransferases contenen els cinc dominis conservats en totes les *cis*-preniltransferases. A partir de l'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids, les dedol-PP sintases d'*A. thaliana* es poden agrupar en dues famílies diferents en funció del grau d'homologia entre elles i de si presenten una regió hidrofòbica en l'extrem aminoterminal com la de la AtDps1p (**figura 36, 37 i 38**). La primera família estaria formada per les AtDps1-6p i totes excepte la AtDps6 presenten la regió hidrofòbica en l'extrem N-terminal. En canvi, les proteïnes que formarien la segona família (AtDps7-p9) no tenen la regió hidrofòbica en l'extrem aminoterminal, però sí que presenten un motiu KKxx a l'extrem carboxiterminal, que com ja s'ha comentat anteriorment pot estar implicat en la localització de proteïnes al RE (Townsend et al., 1994). L'existència d'una família gènica que codifiqués per diferents *cis*-preniltransferases estaria en concordança amb una de les característiques més destacables de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes, com és la presència de famílies multigèniques que codifiquen diferents isoformes d'enzims de la via, com pot ser la HMGR (Stermer et al., 1994), la FPS (Cunillera et al. 1996 i 1997) i la SQS (Kribii et al., 1997) entre d'altres, l'expressió dels quals es regula de forma diferencial. El més destacable de la possible família gènica de dedol-PP sintases d'*A. thaliana* és que consta de 9 gens, mentre que la resta de famílies multigèniques implicades en la síntesi d'isoprenoides consten només de dos o tres gens. Aquest fet es podria explicar perquè les dedol-PP sintases estarien implicades en la síntesi de poliprenols i/o dolícols de diferent mida en funció del teixit i/o l'estadi de desenvolupament, mentre que la resta d'enzims sintetitzen sempre el mateix producte. En *A. thaliana*, el contingut de poliprenols i dolícols encara no s'ha determinat, però en les plantes en

que s'ha analitzat el contingut de poliprenols i dolícols s'ha vist que no existeix una única espècie molecular, sinó que existeix una mescla de diferents espècies moleculars en funció de l'espècie, el teixit i l'estadi de desenvolupament. Així, s'ha observat l'existència de diferents espècies moleculars en funció del teixit en *H.brasiliensis*, *Ginkgo biloba* i *Pinus silvestris* (Tateyama et al., 1999) i també en *Coluria geoides* (Skorupinska et al., 2003). Per tant, és raonable pensar que en *A. thaliana* també hi ha una mescla de varies espècies moleculars en funció del teixits i/o l'estat de desenvolupament. Si existeixen diferents espècies moleculars de poliprenols i dolícols és raonable pensar que seran sintetitzats per diferents *cis*-preniltransferases. En aquest sentit les possibles 9 *cis*-preniltransferases d'*A. thaliana* podrien ser les responsables de la síntesis dels diferents poliprenols i/o dolícols.

Quan s'analitza amb el Genevestigador el perfil d'expressió dels 9 gens que podrien codificar per *cis*-preniltransferases s'observen uns perfils d'expressió molt diferenciats entre ells. Així, com ja s'ha comentat abans el gen *AtDPS1* (At2g23410) s'expressa de forma molt localitzada en arrels i llavors. El gen *AtDPS2* (At2g23410) s'expressa majoritàriament en l'arrel, tot i que menys que en el gen *AtDPS1*, en el pol.len i les llavors. També presenta un nivell d'expressió moderadament elevats en cultius cel.lulars, suggerint un possible paper en la divisió cel.lular. El gen *AtDPS3* (At5g58784) s'expressa de forma molt intensa només en les arrels. El gen *AtDPS4* (At5g58780) s'expressa a les arrels i presenta un màxim d'expressió en les plàntules de dues setmanes. El gen *AtDPS5* (At5g58782) presenta una expressió màxima en les flors (carpels i ovaris) i també s'expressa en les silíques i les llavors. El gen *AtDPS6* (At5g58770) s'expressa de forma moderada en les arrels secundàries, la zona d'elongació de les arrels, fulles de roseta basal. Els nivells màxims d'expressió és dona en les plàntules de dues setmanes, fulles caulinars, flors i silíques. També s'expressa en cultius cel.lulars, tot i que menys que el gen *AtDPS2*. El gen *AtDPS7* (At2g17570) té una expressió màxima en els calls i s'expressa de forma moderada en tota la resta de teixits i estadis de desenvolupament, suggerint un possible paper de gen "housekeeping". El gen *AtDPS8* (At5g60500) s'expressa sobretot en les flors. Finalment, el gen *AtDPS9* (At5g60510) s'expressa de forma majoritària a les arrels amb un màxim en les plàntules de dues setmanes. Globalment, els gens que podrien codificar per possibles *cis*-preniltransferases presenten un patró d'expressió força especialitzat, excepte en el cas del gen *AtDPS7* (At2g17570). També s'observa que en les arrels i els teixits reproductius (flors i fruits) s'expressen la majoria de gens *AtDPS*, fet que suggereix que en aquests teixits seria necessari l'aport de diferents poliprenols i/o dolícols. La presència d'una mescla de més d'una activitat *cis*-preniltransferases en un mateix teixit s'ha descrit en fulles d'espínacs, on en els cloroplastes existeixen una mescla de *cis* i *trans* poliprenols (C<sub>55-60</sub>), glicinoprenols (C<sub>50-55</sub>) i solanesol (C<sub>45</sub>), mentre que en els microsomes hi ha majoritàriament dolícols (C<sub>70-80</sub>) (Sakaihara et al., 2000).



Aquesta multiplicitat gènica per les *DPS* no és exclusiva d'*A. thaliana*. En *S. cerevisiae* s'han clonat 2 gens (*RER2* i *SRT1*) que codifiquen per dues *cis*-preniltransferases, les quals s'han descrit com a dolol-PP sintases (Sato et al., 2001; Schenk et al., 2001). Aquests dos gens presenten patrons d'expressió diferents: mentre que l'expressió del gen *RER2* s'activa en la fase exponencial de creixement, el *SRT1* ho fa en la fase estacionària. A més les proteïnes Rer2p i Srt1p sintetitzen poliprenils-PP de longitud diferent (majoritàriament de 80 i 85 carbonis la Rer2p i 90-95 carbonis la Srt1p) i estudis de localització per immunofluorescència i fusió a la GFP de les dues proteïnes indiquen que la proteïna Rer2p es localitza a regions concretes del RE, mentre que la Srt1p es localitza als cossos lipídics. Aquestes observacions suggereixen que les dues *cis*-preniltransferases de llevat tenen funcions biològiques diferents. Per exemple, s'ha vist que la síntesi dels dolícols de cadena llarga, sintetitzats per la Srt1p, es correlaciona amb l'establiment de condicions on s'incrementen les limitacions en nutrients dels cultius com és el cas de medis sense glucosa, nitrògen i en cultius que han arribat a l'estadi estacionari. Així, la presència dels dos tipus de dolícols en estadi estacionari, permet postular que els dolícols de cadena llarga són els responsables de canvis físico-químics en les membranes cel·lulars que permeten a les cèl·lules de llevat d'adaptar-se a condicions deficientes en algun nutrient per permetre la viabilitat cel·lular a llarg termini (Szkopinska et al., 2002).

**CONCLUSIONS**



1. El gen *AtDPSI* codifica per una proteïna de 303 aa que conté les cinc regions conservades en totes les *cis-preniltransferases*.

2. La AtDps1p és una dehidrodolicol-PP sintasa funcional, ja que complementa els defectes fenotípics i bioquímics de la soca de llevat SNH23-7D.

3. L'anàlisi de l'expressió del gen *AtDPSI* indica que té un patró d'expressió molt especialitzat, amb una acumulació de l'ARNm gairebé exclusiva en les arrels, que suggereix que és en aquest organ on es necessita la major part del dehidrodolicol-PP sintetitzat per la AtDps1p.

4. La AtDps1p presenta una extensió aminoterminal que no existeix en la dehidrodoliquildifosfat sintasa de llevat Rer2p. Els 40 primers aminoàcids li donen a aquesta regió un caràcter marcadament hidrofòbic. La presència d'aquesta regió aminoterminal hidrofòbica és imprescindible per a la funcionalitat de l'enzim d'*Arabidopsis* en llevat.

5. La AtDps1p es localitza al RE en cèl.lules epidèrmiques de ceba. El domini N-terminal hidrofòbic dirigeix la localització de la proteïna al RE.

6. *Arabidopsis thaliana* conté una família multigènica que codifica per *cis-preniltransferases* composta per almenys nou gens, que es poden agrupar en dues subfamílies diferents en funció de l'organització gènica i de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes que codifiquen. La primera està composta pels gens *DPSI-6*, els quals codifiquen per *cis-preniltransferases* que tenen un extrem aminoterminal hidrofòbic. La segona consta dels gens *DPS7-9*, que codifiquen per *cis-preniltransferases* que tenen un motiu KKxx a l'extrem carboxiterminal, descrit com a senyal de retorn al reticle endoplasmàtic.

