

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 II

Caracterització de les proteïnes
Arv d' *A. thaliana*

RESULTATS

1. ARABIDOPSIS THALIANA CONTÉ UNA PETITA FAMÍLIA MULTIGÈNICA QUE CODIFICA Arvp

En el moment d'iniciar aquest treball només s'havia descrit el clonatge dels ADNc codificant per les proteïnes Arv de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) i humans (*Homo sapiens*). El primer ADNc en ser aïllat va ser el de *S. cerevisiae* per complementació funcional, amb una llibreria genòmica de llevat, d'una soca mutant incapaç de créixer en absència dels gens ARE (ACAT-related enzymes), que codifiquen per enzims responsables de l'esterificació d'esterols lliures, evitant-ne una acumulació excessiva que resulta tòxica (Tinkelenberg et al., 2000).

1.1. Identificació i clonatge dels ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A. thaliana*

Per aprofundir en l'estudi del metabolisme lipídic en plantes i, en particular, dels mecanismes implicats en el manteniment de la homeostasi de les diferents espècies lipídiques, ens vam proposar identificar i clonar els gens *ARV* d'*A. thaliana*. En primer lloc, es va determinar el nombre de gens *ARV* presents en el genoma d'*A. thaliana*. Es va utilitzar el programa TBlastN de la base de dades de l'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) per realitzar una busca informàtica en el genoma d'*A. thaliana* a fi d'identificar possibles homòlegs del gen *ARV* de llevat. Utilitzant com a sonda la seqüència aminoacídica de la hipotètica proteïna Arv1 d'*A. thaliana* (número d'accés CAB77721) identificada prèviament (Tinkelenberg et al., 2000), es van detectar dos possibles gens d'*A. thaliana* (At1g01020 i At4g01510, que corresponen a les seqüències genòmiques NM099984 i AAF26477 respectivament) amb capacitat per codificar proteïnes Arv.

Per una banda, la predicció de l'estructura del gen At4g01510 indicava que contindria 9 exons que codificarien per la proteïna de 252 aminoàcids que es va utilitzar com a sonda en la busca en la base de dades. Per altra banda, el gen At1g01020 (NM 099984) contindria tan sols 5 exons que codificarien per un polipèptid de només 128 aminoàcids. Tot i que aquesta seqüència inclou el domini AHD (Arv Homology Domain) típic de les proteïnes Arv, el fet que el gen codifiqués per una proteïna tan curta suggeria que la predicció de la seqüència d'aminoàcids i/o l'estructura del gen no era la correcta. Per mirar d'esbrinar quina és l'organització real d'exons i introns del gen At1g01020 es va realitzar un anàlisi amb més

profunditat. En primer lloc es va dur a terme una busca addicional en la base de dades TAIR (www.arabidopsis.org) utilitzant la mateixa sonda utilitzada en la primera busca, que va permetre identificar una entrada addicional (número d'accés AAF26477) que correspon a una proteïna de 245 aa, que també està anotada com una possible proteïna Arv. Cal destacar que els 118 aa de la seqüència N-terminal d'aquesta possible proteïna Arv coincideixen amb els de la proteïna codificada pels cinc teòrics exons del gen At1g01020. Aquest fet ens va dur a analitzar amb detall la seqüència de nucleòtids situada a 3' de l'hipotètic cinquè exó d'aquest possible gen *ARV*. Aquest anàlisi teòric ens mostrà que la diferència que explicaria la generació de la proteïna de 128 o a la de 245 aa es troba en el cinquè exó. Així, el teòric cinquè exó de la seqüència codificant que donaria lloc a la proteïna de 128 aa tindria 102 nucleòtids i acabaria amb un codó d'aturada de la traducció. En canvi, el que donaria lloc a la proteïna de 245 aa tindria els mateixos primers 72 nucleòtids però s'acabaria en un possible lloc d'splicing d'intró. En aquest cas, no apareixaria el codó d'aturada en el cinquè exó i la hipotètica seqüència codificant del gen At1g01020 tindria 9 exons, els quals podrien codificar per a una proteïna idèntica a la trobada en la segona busca (AAF26477).

Per definir l'organització real d'exons i introns dels hipotètics gens *ARV* d'*A. thaliana* i demostrar la funcionalitat de les proteïnes que codifiquen es van aïllar els corresponents ADNc utilitzant l'estratègia de RT-PCR amb ARN de plàntules d'*Arabidopsis*. En el cas del gen At1g01020 es va amplificar un fragment d'aproximadament 800 pb (**figura 38**) amb els encebadors ARV1Bam (sentit) i ARV1Sal (antisentit) dissenyats a partir de les seqüències nucleotídiques situades a 5' del codó d'inici de la traducció predit i a 3' del codó d'aturada de la traducció del gen At1g01020, respectivament. L'ADNc obtingut es va clonar en el vector *pGEM[®]-T easy* i es va seqüenciar. La seqüència obtinguda mostra que l'ADNc té 825 pb (**figura 39**) i que és idèntica a la seqüència dels 9 exons predits del gen At1g01020, que des d'aquest moment s'ha anomenat gen *AtARV1*. La traducció d'aquest ADNc revela que pot codificar per a una proteïna de 245 aa (**figura 39**).

En el cas del gen At4g01510, tots els intents d'amplificar l'ADNc a partir d'ARN de plàntules de 10 dies utilitzant els encebadors ARV2S (sentit) i ARV2Sal (antisentit), dissenyats a partir de les seqüències nucleotídiques situades a 5' del teòric codó d'inici de la traducció predit i a 3' del codó d'aturada de la traducció del gen At4g01510, respectivament, van resultar fallits. Aquest resultat podria indicar que o bé el gen At4g01510 té un patró d'expressió molt especialitzat i/o un nivell d'expressió molt baix, o bé la predicció sobre el codó d'inici de la traducció del gen At4g01510 no era correcta. De fet, analitzant la seqüència predita del primer

exó del gen At4g01510 es troba un possible codó ATG d'inici de traducció més cap a 3' i en fase amb el codó d'inici de traducció predit. Per averiguar si existeix un ADNc que utilitzi aquest segon ATG com a inici de traducció, es va realitzar una reacció de RT-PCR addicional, utilitzant els encebadors ARV2Bam, que inclou els nucleòtids -23 al -5 respecte el possible codó ATG intern, i ARV2Sal, amb la qual es va amplificar un fragment d'uns 700 pb (**figura 38**) que es va clonar en el vector *pGEM[®]-T easy*. La seqüència d'aquest ADNc té 732 pb i és idèntica a la dels 9 exons predits del gen At4g01510, que des d'aquest moment s'ha anomenat gen *AtARV2*. La seva traducció dona lloc a una proteïna de 228 aminoàcids (**figura 39**) enlloc dels 252 predits en l'entrada de la base de dades CAB77721. Les seqüències dels ADNc ARV1 i ARV2 han estat dipositades en la base de dades GENBANK amb els números d'accés AY758070 i AY758071, respectivament.

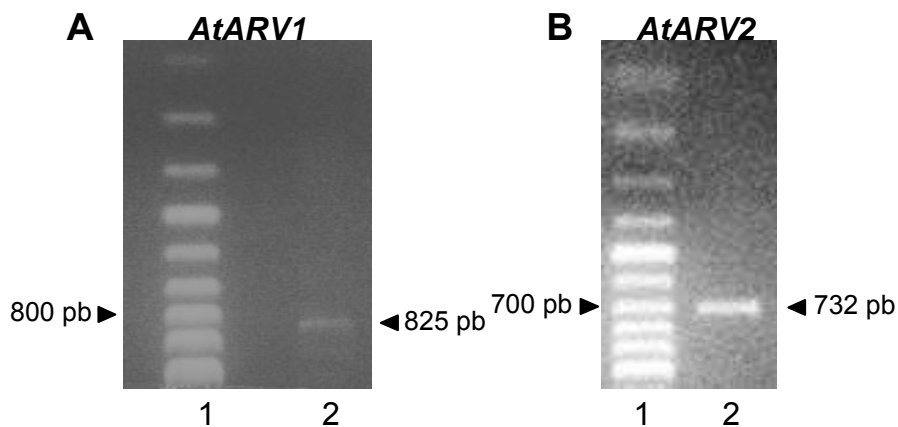


Fig. 38. Amplificació dels ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* per RT-PCR. Les reaccions s'han dut a terme emprant 2,5 µg d'ARN total de plàntules d'*A. thaliana* de 10 dies. En la figura es mostra l'amplificació de l'ADNc del gen *AtARV1* (A carril 2; 825 pb) i de l'ADNc del gen *AtARV2* (B carril 2; 732 pb). En els carrils 1 d'A i B es mostra un marcador de mida d'ADN en que la diferència entre els diferents fragments és de 100 pb.

Fig. 39. Seqüència dels nucleòtids dels ADNc i dels aminoàcids de l'AtArv1p i l'AtArv2p d'*A. thaliana*. En negre es mostren les seqüències de nucleòtids dels ADNc i en verd les dels aminoàcids de l'AtArv1p i l'AtArv2p. Els codon d'inici de traducció (ATG) i els d'aturada de traducció (TGA i TAA) estan marcats en vermell. A l'esquerra es mostren les numeracions dels nucleòtids dels ADNc i a la dreta les numeracions dels aminoàcids de la AtArv1p i la AtArv2p.

1.2. Anàlisi de l'extrem 5' de l'ADNc del gen *AtARV2* d'*A.thaliana*

Els resultats anteriors han posat de manifest que el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV2* es troba a 3' del codó d'inici de la traducció predit inicialment. Com ja s'ha comentat, els dos codons ATG es troben en fase, motiu pel qual existia la possibilitat que en algú altre teixit de la planta es pogués expressar un ARNm més llarg, que contingués el codó ATG distal i, per tant, tingués capacitat per codificar una isoforma Arv2p amb 24 aminoàcids addicionals a l'extrem aminoterminal.

Per mirar d'amplificar aquest hipotètic ADNc més llarg del gen *AtARV2* es van realitzar experiments de RT-PCR partint d'ARN total de diferents òrgans d'*A.thaliana* (arrels, tiges, fulles i flors), de plàntules crescudes durant deu dies en condicions de dia curt (16h de fosc i 8h de llum) i en fosc, i de cèl.lules de la línia cel.lular T87 d'*A.thaliana* (var. Columbia) (Axelos et al., 1992) i utilitzant un encebador oligodT. En les reaccions de PCR es van utilitzar els encebadors antisentit l'A2AS i sentit l'1ARV2 (Materials i Mètodes, apartat 9.3). Com a control de les preparacions d'ARN i de les condicions de les reaccions de RT-PCR, es va analitzar l'expressió del gen de la ubiquitina 10 (*UBQ10*), ja que es considera que és el gen d'ubiquitina amb l'expressió més estable en diferents òrgans i condicions (Sun et al., 1997).

Com es mostra a la **figura 40**, no s'amplifica el fragment corresponent al gen *AtARV2* a partir dels ARNs analitzats. Aquest resultat ens indica que no hi ha un ARNm que inclogui el codó ATG més distal, i per tant, que el gen *AtARV2* comença a traduir-se a partir del codó ATG més intern.

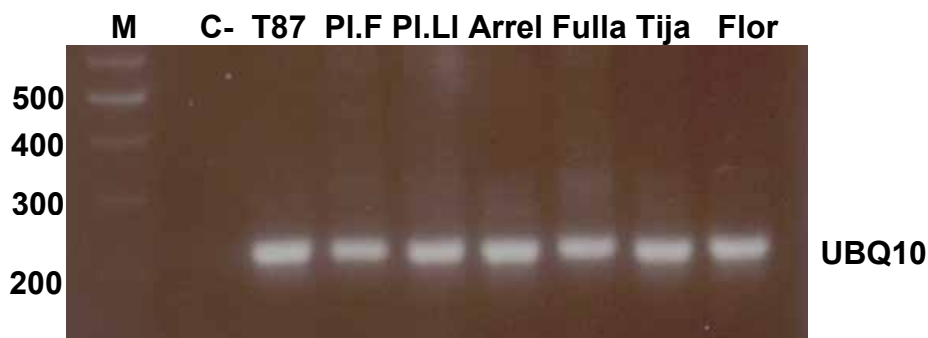


Fig. 40. El gen *AtARV2* genera un ARNm que només inclou el codó ATG més intern. Es va intentar amplificar per RT-PCR l'extrem 5' d'un hipotètic ADNc que codificaria per a una isoforma d'AtArv2p amb 24 aa addicionals a l'extrem aminoterminal. Es va utilitzar 1 µg d'ARN total de diferents teixits d'*A. thaliana* (arrels, tiges, fulles i flors), plàntules de 10 dies crescudes en condicions de dia curt (Pl.Li) i en fosc (Pl.F.), i cèl.lules de la línia T87. Els resultats mostren que en cap cas s'amplifica el fragment de la mida esperada (502 pb). Com a control de les preparacions d'ARN i de les condicions de la reacció de RT-PCR, es va amplificar un fragment de 218 pb de l'ADNc del gen de la ubiquitina 10 (*UBQ10*).

1.3. Organització dels gens *AtARV1* i *AtARV2*

La comparació de l'estructura dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A. thaliana* posa de manifest que ambdós gens poseeixen una organització molt similar, 9 exons i 8 introns (**figura 41**). Els exons equivalents dels dos gens tenen la mateixa mida excepte en l'exó I, on la regió 5' transcrita no traduïda del gen *AtARV1* té com a mínim 71 pb, incloent-hi 15 repeticions GA, en comparació als com a màxim 50 o 60 pb de l'exó I del gen *AtARV2*, l'exó VI, que en el gen *AtARV1* té tres nucleòtids addicionals, i l'exó IX, que en el cas del gen *AtARV1* té 48 nucleòtids més. Pel que fa a les regions intròniques, els introns 3, 4, 5 i 6 del gen *AtARV2* són més llargs. A més tots els introns comencen i acaben amb els dinucleòtids GT i AG, respectivament. La regió 5' transcrita no traduïda (5'-UTR) del gen *AtARV1* inclou 15 repeticions del dinucleòtid GA que podrien tenir un paper en la regulació de l'expressió del gen *AtARV1*, mentre que la regió 5'-UTR del gen *AtARV2*, tot i que té una regió rica en G i A, no presenta les repeticions GA de la regió 5'-UTR del gen *AtARV1*.

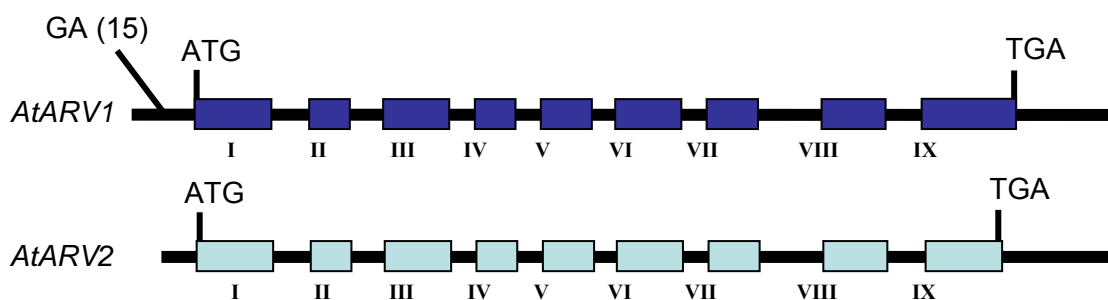


Fig. 41. Organització dels gens *AtARV1* i *AtARV2*.

A més de la conservació estructural dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, l'aliniament de les seves seqüències revela que ambdós gens presenten un elevat grau d'identitat, no només en la regió codificant, on hi ha una identitat global del 75%, sinó també en les regions intròniques, on els valors d'identitat oscil·len entre el 56% i el 69% (**Taula 3**). L'elevada conservació de l'estructura i de la seqüència dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, fins i tot en les regions no codificants, suggereix que ambdós gens s'han originat per una duplicació recent d'un gen ancestral comú.

EXÓ	1*	2	3	4	5	6	7	8	9*
<i>AtARV1</i> (pb)	96	48	90	46	74	83	67	76	104
<i>AtARV2</i> (pb)	96	48	90	46	74	86	67	76	152
Identitat nucleòtids (%)	76	83	80	88	69	68	75	76	65
Identitat aminoàcids (%)	72	69	63	87	44	55	76	70	43

* Les regions 5' i 3' transcrites no traduïdes no han estat considerades en aquest estudi comparatiu.

INTRÓ	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>AtARV1</i> (pb)	92	96	93	68	71	77	153	99
<i>AtARV2</i> (pb)	106	91	248	106	112	113	151	87
Identitat nucleòtids (%)	67	65	56	69	60	61	66	65

Taula 3. Comparació de les mides i percentatge d'identitat a nivell de nucleòtids i d'aminoàcids entre els exons i els introns equivalents del gens *AtARV1* i *AtARV2*, d'*A. thaliana*.

2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS *AtARV1* i *AtARV2*

2.1. Estudi de l'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* per Northern blot

Per tal d'obtenir una primera aproximació del patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, s'han realitzat experiments de Northern blot amb ARN total de diferents òrgans d'*A. thaliana* (arrels, tiges, fulles i flors), de plàntules crescudes durant deu dies en condicions de dia curt (16h de foscor i 8h de llum) i de cèl.lules en cultiu T87 d'*A. thaliana* (Axelos et al., 1997). Com a sondes per a realitzar els experiments es van utilitzar els ADNc sencers dels gens *AtARV1* i *AtARV2* marcats amb ^{32}P . Degut a que les regions codificants dels gens *AtARV1* i *AtARV2* presenten una identitat global del 75% els experiments s'han realitzat en condicions d'alta astringència per tal d'aconseguir la màxima especificitat possible de les sondes.

Els resultats dels experiments de Northern blot (**figura 42**) indiquen, en primer lloc, que els dos gens s'expressen en tots els teixits analitzats, ja que en totes les mostres cada sonda detecta un missatger d'aproximadament 900 pb en el cas del gen *AtARV1* i de 800 pb en el cas del gen *AtARV2*. Ambdós missatgers són d'una mida compatible amb la les dels ADNc clonats. En segon lloc, els resultats de l'anàlisi de Northern blot mostren que els dos gens tenen, en general, un nivell d'expressió molt reduït, ja que es necessiten dues setmanes d'exposició a -80°C per obtenir els resultats mostrats. Només en les cèl.lules en cultiu T87 d'*A. thaliana* hi ha un nivell d'expressió prou elevat per ser detectat amb només dos dies d'exposició. En tercer lloc, els resultats de l'anàlisi de Northern blot mostren que els dos gens tenen un patró d'expressió molt similar.

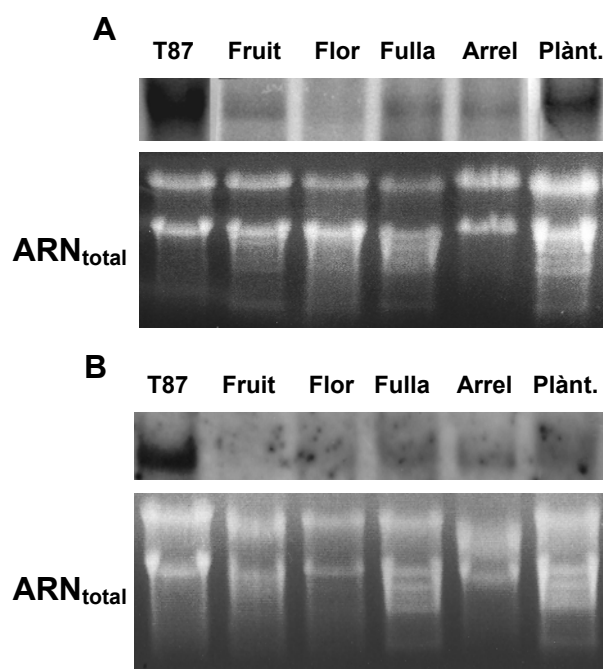


Fig.42. Anàlisi del patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A.thaliana* mitjançant Northern blot. Mostres d'ARN (20 µg per carril) de diferents teixits d'*A. thaliana* (arrels, tiges, fulles, flors, plàntules de deu dies i cèl.lules en cultiu de la línia cel.lular T87) van ser sotmeses a electroforesi en gel a l'1% d'agarosa amb formaldehid, i transferides a membranes de nylon carregades positivament. Les membranes van ser hibridades amb sondes marcades amb ³²P, sintetitzades a partir dels ADNc dels gens *AtARV1* (A) i *AtARV2* (B). El temps d'exposició va ser de 14 dies. Com a control de la càrrega d'ARN, en els panells inferiors d'A i B, es mostren les imatges dels gels tenyits amb bromur d'etidi abans de ser transferides a les membranes de nylon.

2.2. Estudi de l'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* per RT-PCR

Degut al baix nivell d'expressió dels gens *ARV* d'*A. thaliana* que en dificulta la detecció dels transcrits i per garantir l'especificitat de la detecció de l'expressió de cada gen, hem posat a punt la detecció dels ARNm corresponents mitjançant la tècnica de la RT-PCR.

Per dur a terme aquest anàlisi, es van amplificar fragments dels ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* a partir d'ARN total de diferents òrgans d'*A. thaliana* (arrels, tiges, fulles i flors), de plàntules crescudes durant deu dies en condicions de dia curt (16h de fosc i 8h de llum) i de cèl.lules T87 d'*A. thaliana*. Les reaccions de PCR es van dur a terme utilitzant els encebadors sentit A1RTS i A2RTS i els encebadors antisentit A1Sal i A2Sal (Materials i mètodes; Apartat 6), que permeten amplificar fragments d'ADNc de 395 pb en el cas del gen *AtARV1* i de 404 pb en el del gen *AtARV2* (figura 44). Abans de dur a terme aquests experiments i com que els dos fragments que s'esperava amplificar tenen una mida molt similar, es va comprovar l'especificitat de les amplificacions mitjançant la digestió amb enzims de restricció dels fragments d'ADNc amplificats a partir d'ARN d'arrel. El fragment de l'ADNc del

gen *AtARV1* va ser digerit amb l'enzim de restricció *NcoI* per donar lloc a dos fragments de 203 i 192 pb respectivament, mentre que el del gen *AtARV2* va ser digerit amb l'enzim de restricció *XhoI* per donar lloc a dos fragments de 256 i 148 pb respectivament. Com es pot observar a la **figura 43**, la digestió dels dos fragments d'ADNc amb els enzims de restricció fa desaparèixer la banda corresponent al producte d'amplificació i dona lloc a dos fragments més petits de la mida esperada en cada cas.

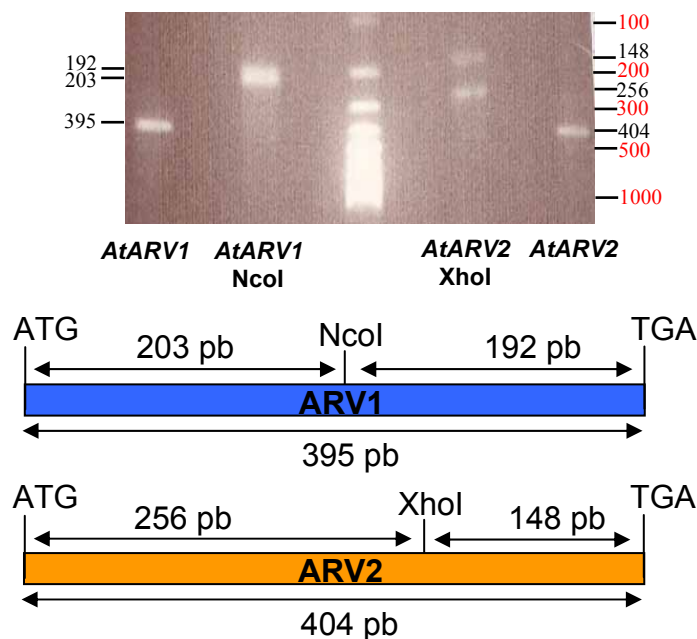


Fig.43. Especificitat de l'amplificació dels ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A.thaliana* mitjançant RT-PCR. Els fragments d'ADNc del gens *AtARV1* (395 pb) i *AtARV2* (404 pb) han estat amplificats per RT-PCR a partir d'1 µg d'ARN total d'arrel. Un cop amplificats els ADNc van ser digerits amb els enzims de restricció *NcoI*, obtenint-se dos fragments de 203 i 192 pb, i *XhoI*, obtenint-se dos fragments de 256 i 148 pb. En vermell es mostren la mida dels fragments d'ADN del marcador.

Un cop es va haver comprovat l'especificitat de les amplificacions dels fragments d'ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, es van realitzar els experiments de RT-PCR per a la detecció dels nivells d'expressió dels dos gens en els diferents teixits analitzats. Com a control de les preparacions d'ARN i les condicions de RT-PCR, es va analitzar l'expressió del gen *UBQ10*. Tal i com s'observa en la **figura 44**, els dos gens s'expressen en tots els teixits analitzats, ja que en totes les mostres s'amplifica un fragment d'ADNc d'aproximadament 395 pb pel gen *AtARV1* i de 404 pb pel gen *AtARV2*. A més, els resultats de l'anàlisi per RT-PCR mostren, al igual que en els experiments de Northern blot, que els dos gens tenen un patró d'expressió molt similar, sent a les fulles on els dos gens presenten un nivell d'expressió més baix.

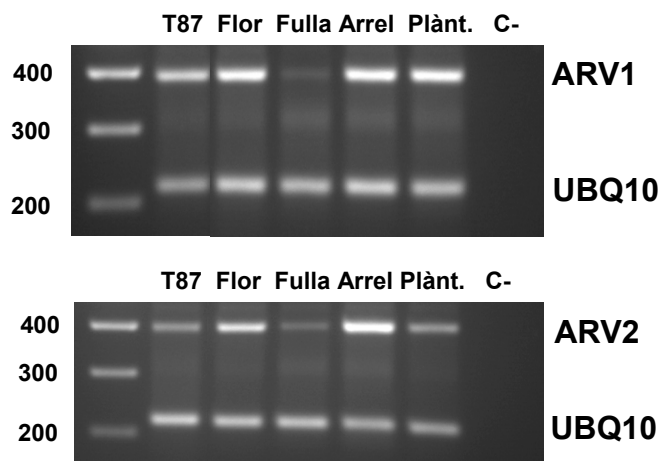


Fig.44. Anàlisi de l'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A. thaliana* mitjançant RT-PCR. Els fragments d'ADNc del gens *AtARV1* (395 pb) i *AtARV2* (404 pb) han estat amplificats per RT-PCR a partir d'1 µg d'ARN total de diferents teixits d'*A. thaliana* (arrels, tiges, fulles, flors i cèl.lules de cultiu T87). Com a control intern s'ha amplificat un fragment de l'ADNc del gen de la *UBQ10* (218 pb).

2.3. Estudi del patró d'expressió espacial i temporal dels gens *AtARV1* i *AtARV2* en plantes transgèniques portadores dels gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS*

Per analitzar en detall el patró d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, es va procedir a l'obtenció de plantes transgèniques d'*A. thaliana* portadores dels gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS*, en els que els promotors dels gens *AtARV1* i *AtARV2* es van fusionar traduccionalment al gen marcador *uidA*, que codifica per a la β-glucoronidasa (GUS) d'*E.coli* (**figura 45**). Per a obtenir els gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS*, es van amplificar per PCR les regions 5' flanquejants dels gens *AtARV1* i *AtARV2*, i es van clonar en fase amb el gen *GUS* en el plasmidi pBI121, segons l'estratègia detallada en l'apartat 12.6.1 de Materials i Mètodes. Aquestes regions, de 1574 i 1534 pb respectivament, comprenen 1547 pb (gen *AtARV1*) i 1519 pb (gen *AtARV2*) de la seqüència situada cap a 5' dels codons d'inici de la traducció, i els primers 27 pb (gen *AtARV1*) i 15 pb (gen *AtARV2*) de la seqüència codificant, incloent-hi el codó d'inici de la traducció. Els plasmidis obtinguts, pBIA1GUS i pBIA2GUS, s'han introduït en *Agrobacterium tumefaciens* per a transformar plantes d'*A. thaliana* (Materials i Mètodes; Apartat 9.6.4) seguint el mètode d'inmersió floral (Clough et al, 1998).

Mitjançant la selecció de les plàntules de la generació F₁ resistents a kanamicina, es van obtenir 15 línies transgèniques independents portadores del gen quimèric

AtARV1:GUS i 10 línies portadores del gen quimèric *AtARV2:GUS*. En aquestes línies es va analitzar l'expressió dels gens quimèrics mitjançant la detecció histoquímica de l'activitat GUS amb el substrat X-Gluc. De totes aquestes línies transgèniques, 5 i 2 línies respectivament no presentaven activitat GUS, raó per la qual van ser descartades. Les línies transgèniques restants, 10 portadores del gen quimèric *AtARV1:GUS* i 8 portadores del gen quimèric *AtARV2:GUS*, presentaven un patró d'expressió repetitiu des d'un punt de vista qualitatiu, si bé des del punt de vista quantitatiu es van observar algunes diferències entre elles. Finalment, es van escollir 3 línies *AtARV1:GUS* (2, 3 i 4) i 2 línies *AtARV2:GUS* (1 i 3) representatives i amb segregació mendeliana del caràcter de resistència a kanamicina, que van ser dutes a homozigosis, obtenint-se respectivament les línies homozigòtiques *AtARV1:GUS* 2.26, 3.15 i 4.11, i les línies homozigòtiques *AtARV2:GUS* 1.13 i 3.25, que es van utilitzar per a realitzar els estudis definitius de tinció histoquímica de l'activitat GUS que es mostren en la **figura 46**.

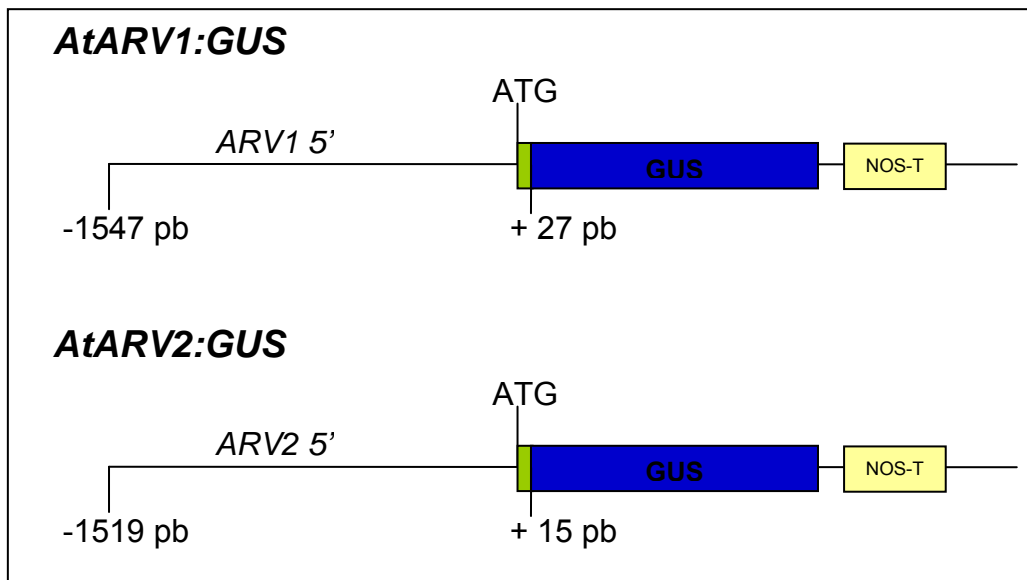
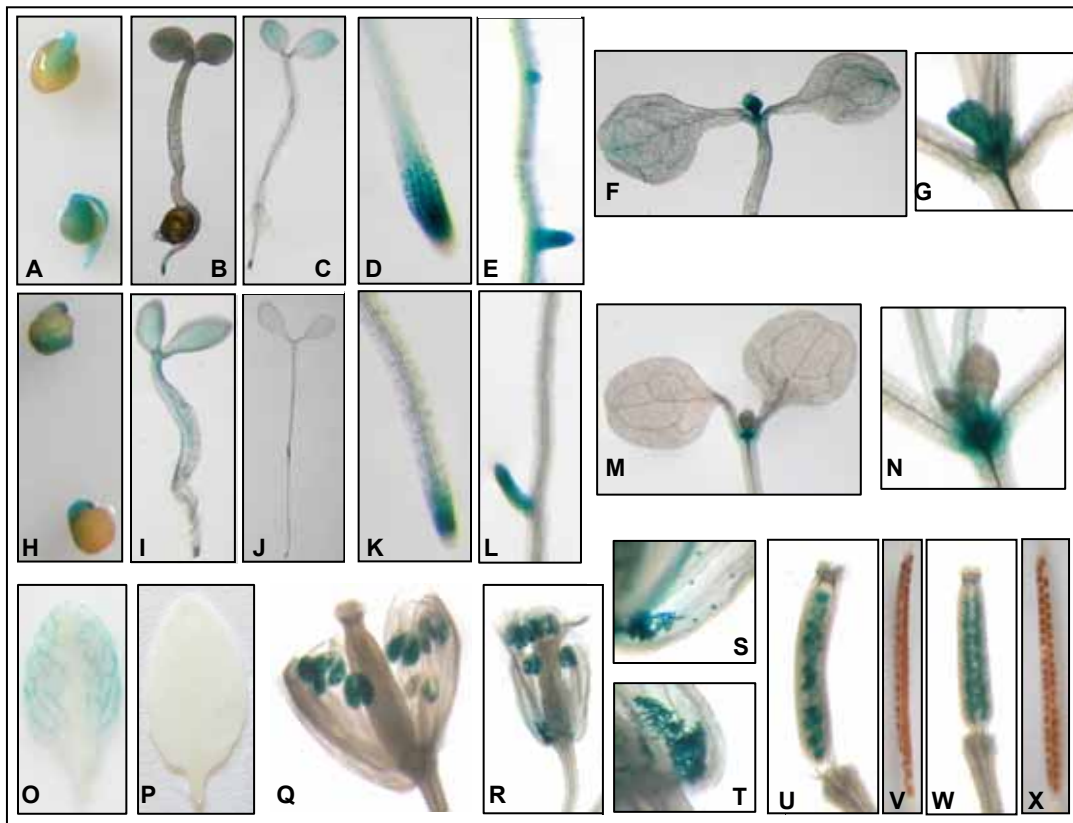


Fig 45. Representació esquemàtica dels gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS*. La regió codificant de l'exó I dels gens *AtARV1* i *AtARV2* es mostra mitjançant les caixes verdes, la regió 5' flanquejant mitjançant una línia, el gen GUS en una caixa blava i el terminador NOS en una caixa groga. També es mostra la posició dels codons d'inici de traducció.

Fig.46. Detecció histoquímica de l'activitat GUS en plantes transgèniques d'*A. thaliana* portadores dels gens quimèrics *AtARV1:GUS* i *AtARV2:GUS*. *AtARV1:GUS*: plàntules d'1 (A), 2 (B) i 3 dies (C); àpex de les arrels (D) i inici de les arrels secundàries (E); plàntules de 10 dies (F) i el detall del seu meristem apical (G); fulla de la rosseta basal (O); Flor madura (Q) i el detall de po.len (S); siliques inmadures (U) i siliques madures (V). *AtARV2:GUS*: plàntules d'1 (H), 2 (I) i 3 dies (J); àpex de les arrels (K) i inici de les arrels secundàries (L); plàntules de 10 dies (M) i el detall del seu meristem apical (N); fulla de la rosseta basal (P); Flor madura (R) i el detall de po.len (T); siliques inmadures (W) i siliques madures (X). Totes les mostres van ser incubades 16 hores en presència del substrat X-Gluc.



Tal i com es mostra en la **figura 46**, en els estadis inicials del desenvolupament vegetatiu s'observa una intensa expressió dels dos transgens, ja que les plàntules d'1 dia presenten una intensa coloració blava (**figura 46, A i H**). Aquesta intensa expressió disminueix de forma dràstica molt ràpidament, ja que als 2 dies desapareix la tinció GUS de gairebé tota la plàntula. En el cas de la fusió *AtARV1:GUS* només s'observa coloració blava al meristem apical de l'arrel, i una lleugera expressió dels transgens en els cotiledons (**figura 46 B**). Al tercer dia s'observa que, tot i que es manté el patró d'expressió observat als 2 dies, la intensitat de l'expressió del gen és encara més baixa (**figura 46, C**). En el cas de la fusió *AtARV2:GUS*, als 2 dies s'observa una tinció molt feble a tota la plàntula, sent una mica més intensa al meristem apical (**figura 46, I**). Al tercer dia ja no s'observa tinció blava en cap part de la plàntula (**figura 46, J**), si bé al observar la plàntula a la lupa i modificant les condicions d'il.luminació de la mostra, es pot arribar a observar una molt lleugera tonalitat blava. A les plàntules de 10 dies, es manté l'expressió dels dos transgens al meristem apical de les arrels primàries i secundàries (**figura 46, D i K**), però s'observa també coloració blava en els punts de l'arrel que donaran origen a les arrels secundàries. Quan l'arrel secundària creix, l'expressió dels transgens al punt d'origen de l'arrel desapareix i només s'expressa al meristem apical de la mateixa (**figura 46, E i L**). També, i tot i que de manera feble i no en totes les plàntules analitzades s'observa coloració blava en el teixit vascular de l'arrel. La diferència més aparent en l'expressió dels dos transgens es dona a la part aèria de les plàntules, i en concret a la zona del meristem apical vegetatiu. En

les plantes *AtARV1:GUS* s'observa una intensa tinció en les fulles emergents (**figura 46, F i G**), mentres que en les plantes *AtARV2:GUS* l'expressió es localitza preferentment al meristem apical (**figura 46, M i N**). En les plàntules *AtARV1:GUS* apareix també una lleugera coloració blava al teixit vascular dels cotiledons (**figura 46, F**), fet que no s'observa en les plàntules *AtARV2:GUS* on només observant la plàntula a la lupa i modificant les condicions d'il.luminació de la mostra es pot arribar a observar una molt dèbil tonalitat blava.

En les fulles de la rosseta basal de plantes adultes només s'observa una feble tinció en el teixit vascular de les plantes *AtARV1:GUS* (**figura 46, O**), mentre que en les plantes *AtARV2:GUS* no s'observa tinció blava aparent (**figura 46, P**), i només a l'observar la plàntula a la lupa i modificant les condicions d'il.luminació de la mostra, es pot arribar a observar una molt feble tonalitat blava. Pel que respecta a la fase reproductiva, els estudis realitzats han mostrat una absència de tinció tan a la tija com a les fulles caulinars, en canvi, s'observa expressió dels transgens a les flors. En aquest cas, la tinció es localitza de forma quasi exclusiva en les anteres (**figura 46, Q i R**), i en particular als grans de pol.len, com es pot observar en el pol.len després de l'antera i que ha quedat retingut dins de la flor (**figura 46, S i T**). Ocasionalment i no en totes les plantes analitzades s'observa una lleugera tinció a l'estil. Durant el desenvolupament del fruit, s'observa tinció blava en els òvuls fertilitzats (**figura 46, U i W**) que desapareix al formar-se les llavors (**figura 46, V i X**). Tot i que no es detecta tinció GUS en les llavors madures, probablement degut a que el substrat no pot atravessar la cutícula de la llavor, sí que es detecta expressió dels transgens en els teixits interns (resultats no mostrats), si la llavor es talla abans d'incubar-la amb el substrat.

En conjunt, aquests resultats mostren que els promotors dels gens *AtARV1* i *AtARV2* presenten patrons d'expressió GUS altament solapants tot i que no idèntics, restringits a teixits on les cèl.lules es divideixen o expandeixen activament, suggerint que la funció de les proteïnes Arv pot ser important per l'expansió i la divisió cel.lular. A més, aquests resultats resulten coherents amb els resultats obtinguts prèviament mitjançant experiments de Northern blot, on s'observa que l'expressió dels gens és més intensa en cèl.lules de cultiu de la línia T87 i en plàntules joves, que són teixits on hi ha una activa divisió i/o expansió cel.lular. A més aquests resultats indiquen, com ja havien mostrat els experiments de Northern blot, que l'expressió dels dos gens és baixa ja que per observar tinció GUS es necessiten, en la majoria de teixits, temps d'incubació amb el substrat de més de 12 hores.

3. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES AtArv1 I AtArv2

3.1. Comparació de la seqüència aminoacídica de les proteïnes AtArv1 i AtArv2

Les proteïnes AtArv1 i AtArv2 d'*A. thaliana* estan compostes per 228 i 242 residus aminoacídics respectivament, sent a l'extrem carboxiterminal on es troba la diferència de longitud entre les dues proteïnes (**figura 47**). Les dues proteïnes Arv1 caracteritzades fins al moment, la de llevat i la d'humans, són més llargues, ja que l'Arv1p de llevat té 321 aminoàcids i la d'humans 271. Els aminoàcids addicionals en la proteïna de llevat estan a l'extrem carboxiterminal, mentre que en la d'humans ho estan a l'extrem aminoterminal (**figura 48**).

L'aliniament de les seqüències aminoacídiques de AtArv1p i AtArv2p (**figura 47**) indica que les dues proteïnes estan altament conservades, ja que presenten una identitat de seqüència global del 66% (amb una similitud del 76%). És interessant destacar que la major homologia de seqüència es troba en el seu extrem aminoterminal, regió que correspon al domini AHD (Tinkelenberg et., 2000) i que inclou un subdomini que conté quatre cisteïnes que podrien formar un dit de zinc.

AtArv1	MAREKKT	CVE	CGHKVKSLEFI	QYSPGNFRLM	KCENC	EEVAD	EYVECELLII	50
AtArv2	MAASEHR	CVG	CGFRVKSLEFI	QYSPGNIIRLM	KCGNCK	EEVAD	EYIECERMII	50
AtArv1	FIDLILHKTK	AYRHLLYNVV	NQESANVOHL	LWKLVLAYLL	LDTYRSLLLR	100		
AtArv2	FIDLILHRPK	VYRHVLYNAI	NPATVNIQHL	LWKLVFAYLL	LDCYRSLLLR	100		
AtArv1	RTNDGSNVSM	SFLFESLEVL	VNVLSANFAF	VFSFAFAAKL	MLV-MPRGKE	149		
AtArv2	KSDEESSFSD	SPVLLS KVL	IGVLSANAAF	IISFAIATKG	LLNEVSRRE	150		
AtArv1	ILLTILISSY	VKIFLFAFPV	WEFPVSVIF I	VDMLVLTNSA	VALKVMTESA	199		
AtArv2	IMLGIFISSY	FKIFLLAMLV	WEFPMSVIF F	VDILLILTSNS	MALKVMTEST	200		
AtArv1	TSRCLAVCFI	AHSIRFLVDQ	ISG-----H	LG SVM*		228		
AtArv2	MTRCLAVCLI	AHLIRFLVGQ	IFEPTIFLIQ	IGSLLQYMSY	FF*	242		

Fig.47. Aliniament de la seqüència aminoacídica de les proteïnes Arv1 i Arv2 d'*A. thaliana*. En caixes negres es mostren els aminoàcids conservats en les dues proteïnes. En caixes grises es mostren els aminoàcids similars entre les dues proteïnes. El recuadre marca la seqüència susceptible de formar una estructura de tipus dit de zinc i les cisteïnes que interaccionarien amb el Zn es mostren en vermell i negreta. El domini "Arv Homology Domain" (AHD) està subratllat en blau. La numeració dels aminoàcids es troba a la dreta. Els guions són espais introduïts per optimitzar l'alineament de les seqüències.

Fig.48. Aliniament de la seqüència aminoacídica de les proteïnes Arv d'*A. thaliana*, *S. cerevisiae* i *H. sapiens*. En caixes negres s'indiquen els aminoàcids conservats en les quatre proteïnes. En caixes grises s'indiquen els aminoàcids conservats en tres de les proteïnes. El recuadre marca la seqüència susceptible de formar una estructura de tipus dit de zinc i les cisteïnes que interaccionarien amb el Zn es mostren en vermell i negreta. El domini AHD està subratllat en blau. Els guions són espais introduïts per optimitzar l'alineament de les seqüències.

Anteriorment s'havia descrit que les proteïnes Arv de *S. cerevisiae* i d'humans podrien ser proteïnes localitzades a les membranes de l'Aparell de Golgi i el RE amb 6 dominis de transmembrana (Tinkelenberg et al., 2000). Per estudiar quina podria ser la topologia de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* vam analitzar les proteïnes AtArv1 i AtArv2 mitjançant eines bioinformàtiques. Així, el programa TOPPRED (von Heijne, 1992; Claros i von Heijne, 1994) ens mostra que les AtArvp tindrien 6 regions hidrofòbiques separades per regions hidrofíliques de diferent longitud (**figura 49, A i B**). Comparant el perfil d'hidrofobicitat de les proteïnes AtArv1 (**figura 49 A**) i AtArv2 (**figura 49 B**) s'observen dues diferències principals. En primer lloc la primera regió hidrofòbica (del l'aa 35 al 60) seria força més hidrofòbica en l'AtArv2p que en l'AtArv1p. En segon lloc, la tercera, quarta i cinquena regions hidrofòbiques d'AtArv1p estarien clarament separades per regions més hidrofíliques, mentre que en AtArv2p estarien més agrupades formant una gran regió hidrofòbica, amb tres regions que presenten un pic d'hidrofobicitat separades per petites regions lleugerament menys hidrofòbiques. Segons el programa TOPPRED aquestes regions hidrofòbiques formarien, en els dos casos, 6 dominis de transmembrana, tot i que en el cas de la proteïna AtArv1 la probabilitat de que la primera regió hidrofòbica (aa 47 a 56), que correspon al subdomini C-terminal del domini AHD, sigui un domini de transmembrana és menor (**figura 49 C i D**).

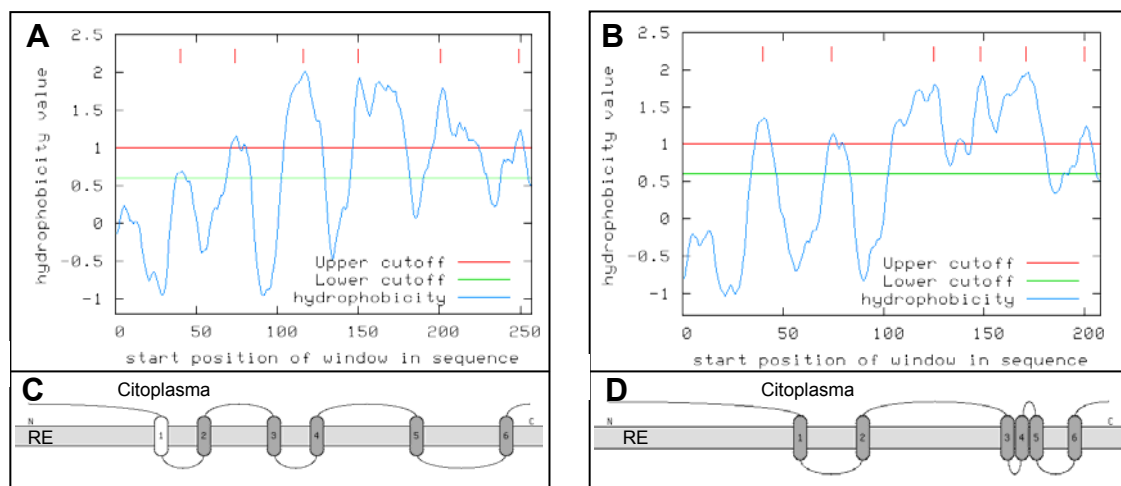


Fig.49. Perfil d'hidrofobicitat i topologia de les proteïnes AtArv1 i AtArv2. La figura mostra els perfils d'hidrofobicitat de les proteïnes AtArv1 (**A**) i AtArv2 (**B**), i els dominis de transmembrana predits per a la proteïna AtArv1 (**C**) i la AtArv2 (**D**) amb el programa TOPPRED. La línia blava mostra el nivell d'hidrofobicitat (segons l'algoritme Kyle & Doolittle) dels aminoàcids al llarg de la proteïna, i les línies verdes i vermelles marquen el llindar (inferior i superior respectivament) a partir del qual es considera una regió com a domini de transmembrana. Els dominis de transmembrana que el programa TOPPRED prediu amb un alt grau de probabilitat estan en gris i els que prediu amb un menor grau de probabilitat es mostren en blanc.

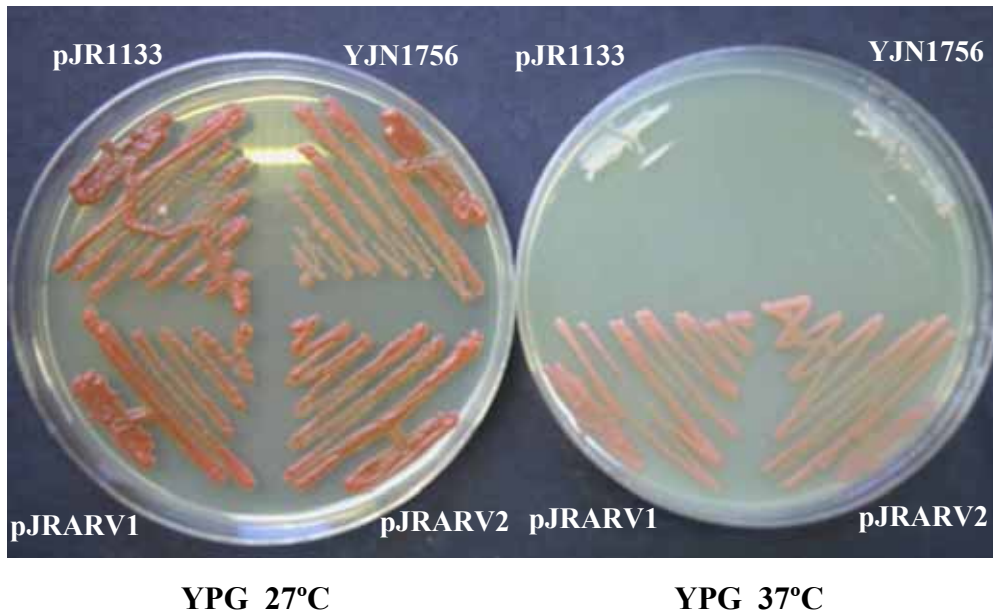
4. AtArv1p I AtArv2p SÓN ELS ORTÒLEGS DE LA PROTEÏNA Arv1p DE LLEVAT

4.1. Les proteïnes AtArv complementen la soca de llevat YJN1756 deficient en la funció Arvp

Per demostrar la funcionalitat de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* es va analitzar la capacitat de AtArv1p i AtArv2p per complementar la soca mutant de llevat (*S. cerevisiae*) YJN1756 deficient en la funció Arv (*arv1Δ*). La soca YJN1756 conté una disrupció del gen *ARV1* (*ARV1::KAN*), dona lloc a cèl·lules *arv1Δ* termosensibles, que poden créixer a 27°C (temperatura permissiva), però no a 37°C (temperatura restrictiva) (Swain et al. 2002).

Per dur a terme l'anàlisi de complementació funcional, la soca YJN1756 es va transformar amb els plasmidis pJRARV1 i pJRARV2, que contenen els ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* sota el control del promotor del gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GPD), i es va analitzar la seva capacitat de créixer a 37°C. Com a control negatiu de creixement a 37°C, la soca YJN1756 també es va transformar amb el vector pJR1133. Tal com s'ha dit anteriorment i s'observa en la **figura 50**, la soca YJN1756 i la soca YJN1756 transformada amb el vector pJR1133 no creixen a 37°C però si a 27°C. En canvi, la soca YJN1756 transformada amb els plasmidis pJRARV1 i pJRARV2 creix tan a 27°C com a 37°C. Aquest resultat indica que els plasmidis pJRARV1 i pJRARV2 complementen la disrupció *ARV1::KAN* de la soca YJN1756, i per tant, confirma que els ADNc *AtARV1* i *AtARV2* codiquen dues isoformes funcionals de les proteïnes Arv.

Fig.50. Complementació funcional de la soca mutant de llevat YJN1756 amb els plasmidis pJRARV1 i pJRARV2. La soca YJN1756 i les soques YJN1756 [pJRARV1], YJN1756 [pJRARV2] i YJN1756 [pJR1133] van ser sembrades en medi YPG i incubades a 27°C i 37°C durant tres i dos dies respectivament.



4.2. AtArv2p suprimeix els defectes del metabolisme lipídic de la soca de llevat YJN1756

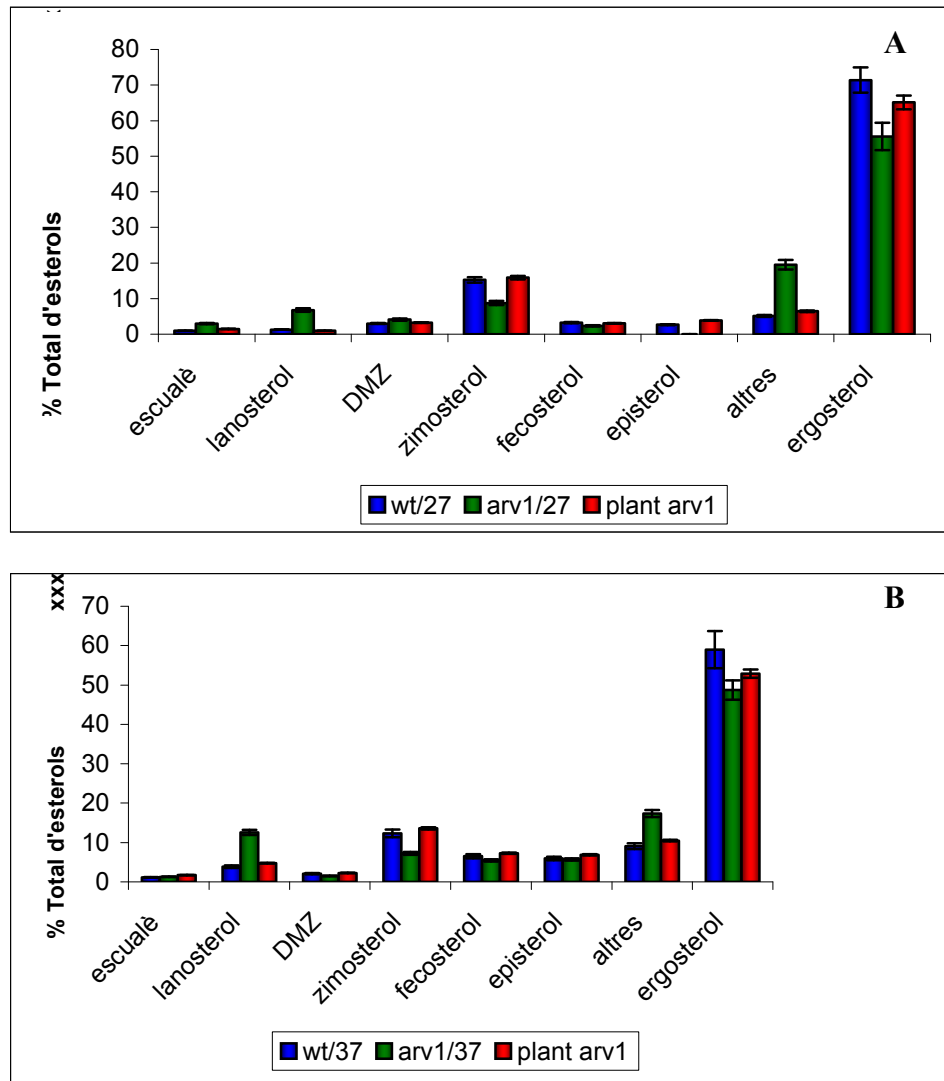
Com ja s'ha descrit en la introducció (apartat 6.3) la pèrdua de funció del gen *ARV1* dóna lloc a una sèrie d'alteracions en el metabolisme lipídic, el resultat de les quals és la impossibilitat de la soca mutant de créixer a 37°C. Entre aquestes alteracions lipídiques destaquen una modificació de la distribució intracel·lular i el perfil d'esterols, una disminució de la síntesi d'esfingolípid i un increment en els nivells de ceramides (precursors de la síntesi d'esfingolípid complex) i del fosfatidilglicerol (Tinkelenberg et al., 2002).

En l'apartat anterior s'ha demostrat que les proteïnes AtArv1 i AtArv2 són capaces de complementar el fenotip de termosensibilitat de la soca mutant de llevat YJN1756 que té inactivat el gen *ARV1*. Per demostrar que la restauració de la capacitat de creixement a 37°C de la soca de llevat YJN1756 per les proteïnes Arv d'*A. thaliana* és realment deguda al restabliment del metabolisme lipídic normal, es va analitzar el perfil lipídic de la soca YJN1756 que sobreexpressa la proteïna AtArv2 i es va comparar amb el de la soca parental W303-1A i el de la soca mutant YJN1756.

4.2.1. Restauració dels nivells d'esterols

En primer lloc es van determinar els nivells de diferents esterols en cèl.lules de llevat W303-1A, cèl.lules *arv1Δ* i cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p crescudes tan a temperatura permissiva (27°C) com restrictiva (37°C) per cromatografia de gasos associada a espectrometria de masses (GC/MS) (Materials i Mètodes, apartat 18.1) (**figura 51, A i B**). Les cèl.lules que sobreexpressen AtArv2p acumulen més ergosterol, l'esterol majoritari de llevat, que les cèl.lules *arv1Δ* a ambdues temperatures, tot i que no s'arriba als nivells de la soca W303-1A. A 27°C (**figura 51 A**) les cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p acumulen un 65% del contingut total d'esterols en forma d'ergosterol, mentre que en cèl.lules de llevat W303-1A i cèl.lules *arv1Δ* els nivells d'ergosterol representen el 71% i el 55% del contingut total d'esterols respectivament. A 37°C (**figura 51 B**) l'ergosterol representa el 55% del contingut total d'esterols en cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p, mentre que en cèl.lules de llevat W303-1A i cèl.lules *arv1Δ* els nivells d'ergosterol són el 59% i el 48% del contingut total d'esterols respectivament. Pel que fa als esterols minoritaris, la sobreexpressió de la proteïna AtArv2 restaura els nivells de tots els intermediaris biosintètics en la soca YJN1756 fins a valors similars als de la soca salvatge (**figura 51, A i B**), incloent-hi els de diversos intermediaris no identificats. En conjunt, i tot i que existeixen petites diferències en els nivells d'esterols entre les cèl.lules *arv1Δ* i les cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p, aquests resultats indiquen que la proteïna AtArv2 és capaç de suplir la funció de la proteïna Arv1 de llevat en el metabolisme dels esterols. També cal destacar que la diferència quantitativament més significativa entre les cèl.lules *arv1Δ* i les cèl.lules W303-1A es dona en els nivells de lanosterol, que s'incrementen en les cèl.lules *arv1Δ* 5,22 vegades a 27°C i 3,25 vegades a 37°C.

Fig.51. La sobreexpressió de AtArv2p restaura els nivells normals d'esterols de la soca YJN1756. Els nivells d'esterols individuals en cèl.lules de llevat salvatge W303-1A (barres blaves), cèl.lules *arv1Δ* (barres verdes) i cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen la proteïna AtArv2 (barres vermelles) es van determinar a 27°C (**A**) i a 37°C (**B**) utilitzant anàlisi per GC/MS. DMZ, dimetilzimoesterol; altres intermediaris de la biosíntesis d'ergosterol no identificats. Els nivells dels diferents esterols es representen com a % del contingut total en esterols. Els valors són la mitja de tres experiments diferents.



4.2.2. Restauració del metabolisme d'esfingolípids

Com ja s'ha comentat en la introducció (apartat 6.3) la proteïna Arv1 de llevat, a part d'estar involucrada en la regulació dels nivells intracel·lulars d'esterols, participa també en la regulació de la biosíntesis i/o metabolisme d'esfingolípids (Swain et al., 2002). Per comprovar si la proteïna Arv2 d'*A. thaliana* era capaç també de restaurar el metabolisme d'esfingolípids en llevat, s'han mesurat els nivells de ceramides, precursors dels esfingolípids complexos, i d'esfingolípids en cèl·lules de llevat W303-1A, cèl·lules *arv1Δ* i cèl·lules *arv1Δ* que sobreexpressen la proteïna AtArv2 crescudes a temperatura restrictiva (37°C).

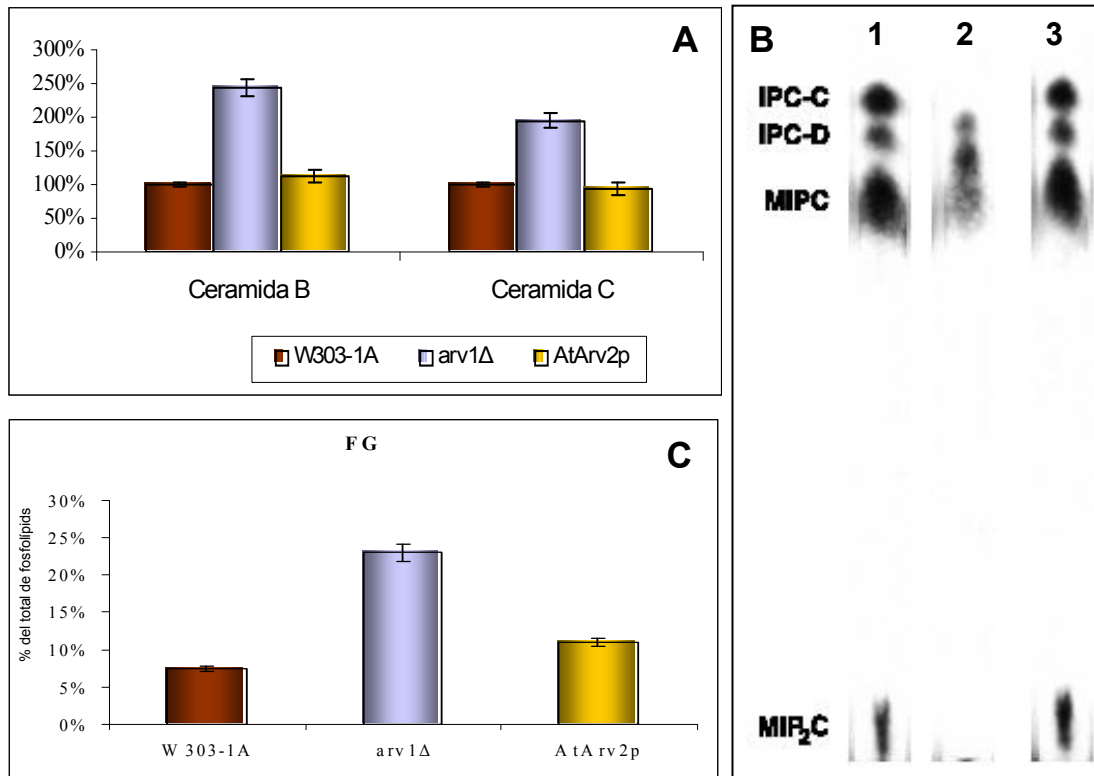
En primer lloc es van examinar els efectes de l'expressió de la proteïna AtArv2 en cèl·lules *arv1Δ* sobre els nivells de les ceramides, ja que són els precursors dels esfingolípids complexos. Encara que els llevats contenen una mescla de cinc tipus de ceramida (ceramides A, B, B', C i D), les quals tenen diferents graus d'hidroxilació, només es van mesurar

els nivells de les ceramides B i C, perquè són les úniques ceramides, els nivells de les quals s'incrementen en les cèl.lules *arv1Δ* (Tinkelenberg et al., 2002). La determinació de les ceramides es va dur a terme mesurant la incorporació de [³H]-dihidroesfingosina a les ceramides (Materials i Mètodes, apartat 18.). Els nivells de les ceramides B i C en les cèl.lules *arv1Δ* són respectivament d'un 245% i un 195% respecte els de les cèl.lules W303-1A, mentre que les cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen la proteïna AtArv2 tenen un nivells d'un 113% i d'un 94% respectivament (**figura 52 A**).

Per acabar de confirmar la capacitat de la proteïna AtArv2 de suplir la funció de la proteïna Arv1 de llevat en el metabolisme dels esfingolípids, es va investigar si la sobreexpressió d'AtArv2p podria reestablir la biosíntesis d'esfingolípids complexos en les cèl.lules *arv1Δ*, la qual està sèriament compromesa a 37°C (temperatura restrictiva) (Tinkelenberg et al., 2002). Per aconseguir-ho es va mesurar la incorporació de [³H]-inositol als esfingolípids (Materials i Mètodes, apartat 18.3). La biosíntesis d'esfingolípids és gairebé inexistent en les cèl.lules *arv1Δ*, ja que el nivell d'esfingolípids marcats és molt baix (**figura 52 B**). En canvi la sobreexpressió d'AtArv2p en les cèl.lules *arv1Δ* restaura la biosíntesis normal d'esfingolípids, ja que els nivells d'incorporació de [³H]-inositol a les espècies de inositolfosforilceramides (IPC) IPC-C i IPC-D, de manosa inositolfosforilceramida (MIPC) i de manosa diinositolfosforilceramida (MI₂PC) en les cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen la proteïna AtArv2 són idèntics als de les cèl.lules W303-1A (**figura 52 B**).

En conjunt, tots aquests resultats indiquen que la proteïna AtArv2 també és capaç de suplir la funció de la proteïna Arv1 de llevat en el metabolisme dels esfingolípids.

Fig.52. La sobreexpressió d'AtArv2p restaura el metabolisme lipídic normal d'esfingolípids i fosfolípids en les cèl.lules *arv1Δ*. (A) **Nivells de ceramides.** Nivells de ceramida B i ceramida C en cèl.lules W303-1A (barres marrons), *arv1Δ* (barres violeta) i *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p (barres taronges). Als nivells de ceramides B i C de la soca W303-1A se'ls ha donat un valor del 100%. Les cèl.lules van ser marcades durant 20 minuts amb [³H]-dihidroesfingosina a 37°C i es van deixar créixer 3 hores més en medi sense el substrat radioactiu. Les ceramides van ser extretes i es van resoldre per CCF unidimensional utilitzant cloroform/metanol/àcid acètic (95:4.5:0.5, v/v). (B) **Biosíntesis d'esfingolípids.** Les cèl.lules W303-1A, *arv1Δ* i *arv1Δ* que sobreexpressen AtArv2p es van incubar durant 5 hores a 37°C en presència de [³H]-inositol. Els esfingolípids marcats van ser extrets, deacilats i resolts per CCF unidimensional utilitzant cloroform/metanol/àcid acètic/aigua (16:6:4:1.6, v/v). (C) **Nivells de fosfatidilglicerol (FG).** Les cèl.lules es van marcar amb [³²P]-ortofosfat durant 20 minuts a 37°C. Els fosfolípids es van extreure i posteriorment analitzar per CCF. El contingut de FG s'expressa coma % del contingut total de fosfolípids. Els valors són la mitja de tres experiments diferents.



4.2.3. Restauració del metabolisme de fosfolípids

Estudis anteriors han mostrat que a 37°C el mutant YJN1756 té uns nivells de fosfatidilglicerol incrementats respecte la soca salvatge W303-1A (Swain et al., 2002). Per comprovar si la proteïna AtArv2 també pot suplir la funció de la proteïna Arv1 de llevat en el metabolisme de fosfolípids es van mesurar els nivells de fosfatidilglicerol (FG) en cèl.lules de llevat W303-1A, cèl.lules *arv1Δ* i cèl.lules *arv1Δ* que sobreexpressen la proteïna AtArv2 crescudes a temperatura restrictiva (37°C), ja que és el fosfolípid, el nivell del qual es veu més afectat en les cèl.lules *arv1Δ* a aquesta temperatura (Tinkelenberg et al., 2002). La determinació del FG es va dur a terme mesurant la incorporació de [³²P]-ortofosfat al FG (Materials i Mètodes, apartat 18.4). Els nivells de FG en les cèl.lules W303-1A són d'un 7,5% del total de fosfolípids, mentre que en les cèl.lules *arv1Δ* són d'un 23% (**figura 52 C**). La sobreexpressió de la proteïna AtArv2 fa disminuir els nivells de FG de les cèl.lules *arv1Δ* fins a un 11% del contingut total d'esfingolípids (**figura 52 C**), valor pròxim al de les cèl.lules W303-1A.

En conjunt, tots els resultats descrits en aquest apartat indiquen que la proteïna AtArv2 és capaç de suplir la funció de la proteïna Arv1 de llevat en el metabolisme dels esterols, esfingolípids i FG, i per tant demostren que la proteïna AtArv2 és verdaderament un ortòleg de la proteïna Arv1 de llevat.

5. ANÀLISIS FUNCIONAL DE LA REGIÓ N-TERMINAL DE LA PROTEÏNA AtArv2

Com ja s'ha comentat abans el domini AHD és la regió més conservada entre les proteïnes Arv de diferents espècies. Aquesta elevada conservació de seqüència suggereix que la presència de l'AHD és important per a la funció de la proteïna. Un cop comprovada la funcionalitat de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* s'ha intentat identificar regions del domini AHD de 68 aminoàcids de les proteïnes AtArv que siguin crítiques per a la seva activitat. En el domini AHD d'AtArv1p i AtArv2p poden distingir-se un subdomini N-terminal, que està format pels primers 35 aa, i un subdomini C-terminal de 33 aminoàcids, que està format pels aa 36 a 68 i que està més conservat entre les diferents espècies que el subdomini N-terminal. Si s'analitza el perfil d'hidrofobicitat de l'AHD (**figura 53**) s'observa que el subdomini N-terminal ric en cisteïnes és lleugerament hidrofílic, mentre que el subdomini C-terminal inclou una seqüència hidrofòbica (aminoàcids 47-56) rica en leucines i isoleucines (en negreta i cursiva en la **figura 53**), que com s'ha comentat en l'apartat 3.2 podria constituir un domini de transmembrana, i dues regions força hidrofíliques (aminoàcids 36-46 i 57-68) adjacents a la seqüència hidrofòbica.

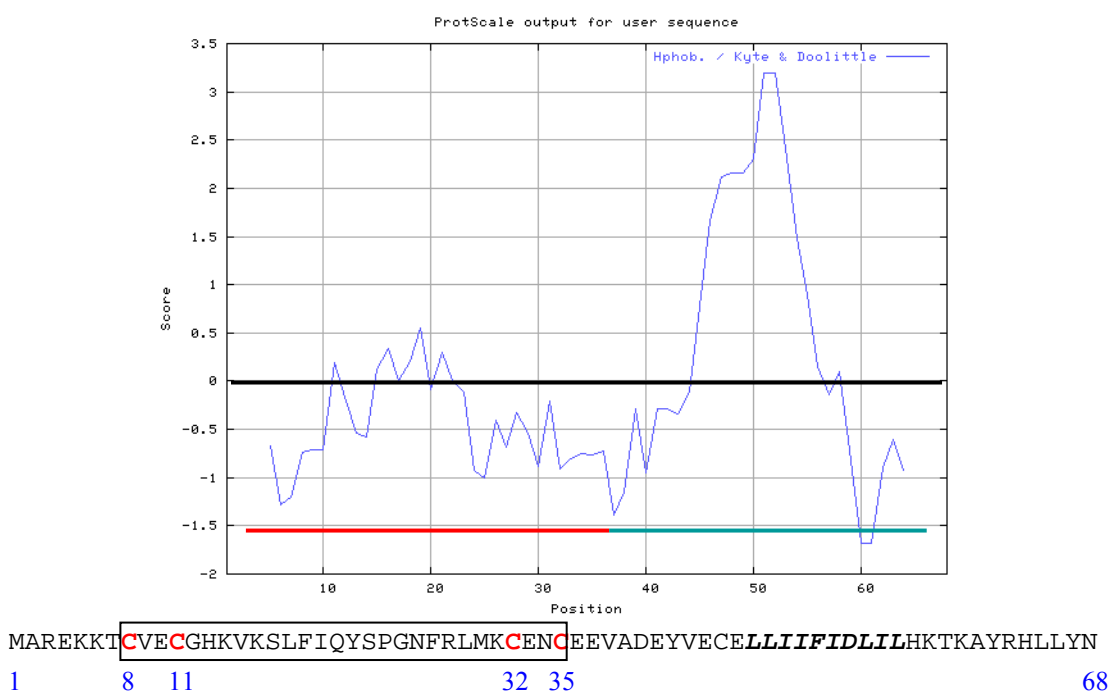


Fig.53. Perfil d'hidrofobicitat del domini AHD de la proteïna AtArv2. La seqüència dels 68 primers aa de la proteïna AtArv2p s'ha analitzat amb l'algoritme Kyle & Doolittle del programa ProtScale (www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl). La línia negra marca el límit entre aminoàcids hidrofílics (aminoàcids situats per sota de la línia) i hidrofòbics (aminoàcids situats per sobre de la línia). La línia vermella indica el subdomini N-terminal del domini AHD i la línia blava el subdomini C-terminal del domini AHD. A sota es mostra la seqüència aminoacídica del domini AHD. El subdomini N-terminal està requadrat. Les quatre cisteïnes que formarien el possible dit de zinc estan en negreta i vermell. Els aminoàcids que formen la regió hidrofòbica del domini AHD es mostren en negreta i en cursiva.

5.1. Assaig de complementació funcional de la soca YJN1756 amb versions mutades d'AtArv2p-HA

Per a dur a terme aquest estudi es va generar mitjançant PCR una bateria de construccions (**figura 54**) en el vector pJR1133 per a expressar en la soca YJN1756 diferents versions de la proteïna AtArv2p amb el domini AHD modificat: pJRArv2p4Ser-HA, que expressa la proteïna sencera amb les cisteïnes 8, 11, 32 i 35 mutades en serines, pJRArv2p Δ 35-HA, pJRArv2p Δ 46-HA, pJRArv2p Δ 56-HA i pJRArv2p Δ 68-HA, que són construccions que codifiquen per a deleccions successives dels 35, 46, 56 i 68 primers aminoàcids de la proteïna AtArv2p, i pJRArv2p Δ 36-46-HA i pJRArv2p Δ 47-56-HA, que construccions per a expressar deleccions parcials dels 11 aminoàcids immediatament anteriors a la regió hidrofòbica del subdomini C-terminal de l'AHD (aa 36 a 46) i dels 10 aminoàcids que formarien la regió hidrofòbica del subdomini C-terminal de l'AHD (aa 47 a 56). Per a poder determinar el nivell de proteïna expressada mitjançant Western blot en la soca YJN1756 transformada amb les diferents construccions, a l'extrem C-terminal de totes les proteïnes es va fusionar l'epítot de l'hemaglutinina (HA) (Mo et al., 2005). Amb les diferents construccions realitzades es va transformar la soca mutant de llevat YJN1756 i es va realitzar l'assaig de complementació funcional del fenotip de termosensibilitat a 37°C. També es van realitzar corbes de creixement en medi líquid a 37 °C de les mateixes soques per estudiar-ne les cinètiques de creixement.

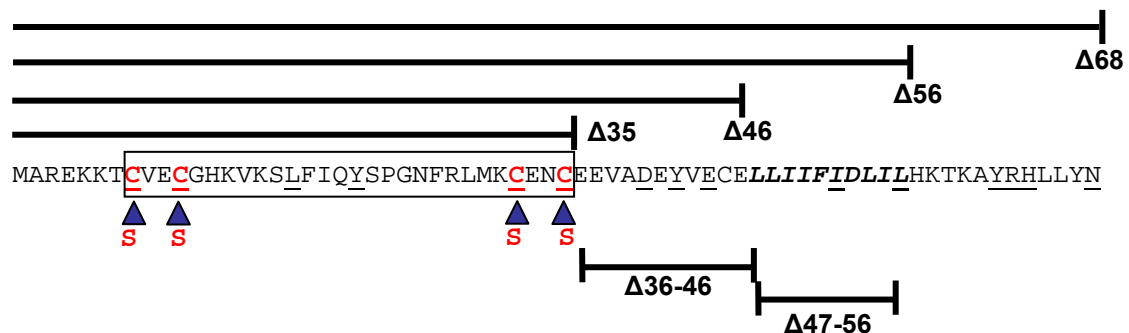


Fig. 54. Seqüència d'aminoàcids del domini AHD d'AtArv2p i modificacions realitzades en el domini AHD. Els 15 aminoàcids del domini AHD conservats en *A. thaliana*, llevat i humans estan subratllats. El subdomini N-terminal està requadrat. Les quatre cisteïnes que formarien el possible dit de zinc i que s'han mutageneïtzat en serines estan en negreta i vermell. Els aminoàcids de la regió hidrofòbica del subdomini C-terminal estan en negreta i cursiva. Les seqüències del domini AHD de lesionades s'indiquen amb les barres negres.

Per a dur a terme l'anàlisi de complementació funcional, es va transformar la soca YJN1756 amb els plasmidis pJRArv2p4Ser-HA, pJRArv2p Δ 35-HA, pJRArv2p Δ 46-HA, pJRArv2p Δ 56-HA, pJRArv2p Δ 68-HA, pJRArv2p Δ 36-46-HA i pJRArv2p Δ 47-56-HA, que contenen els ADNc que codifiquen per les diferents proteïnes AtArv2p mutades (**figura 54**) sota

el control del promotor de la GPD de llevat, i es va analitzar la seva capacitat de créixer a 37°C. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la **figura 55**. L'expressió en la soca YJN1756 de la proteïna AtArv2p-HA amb les quatre cisteïnes del subdomini N-terminal del domini AHD mutades (Arv2p4Ser-HA) permet que la soca creixi a 37°C, però s'observa que les colònies són més petites, fet que indica un creixement més lent. Sorprenentment, l'expressió de la proteïna AtArv2p-HA a la que s'ha deletat els 35 primers aminoàcids (Arv2pΔ35-HA), que corresponen al subdomini N-terminal del domini AHD, no només permet créixer a la soca YJN1756 a 37°C, sinó que a més el creixement és idèntic al que presenta la soca YJN1756 quan s'expressen les proteïnes AtArv1p-HA i AtArv2p-HA. L'expressió de la resta de proteïnes mutades (Arv2pΔ46-HA, Arv2pΔ56-HA, Arv2pΔ68-HA, Arv2pΔ36-46-HA i Arv2pΔ47-56-HA) no complementa el fenotip de termosensibilitat de la soca YJN1756.

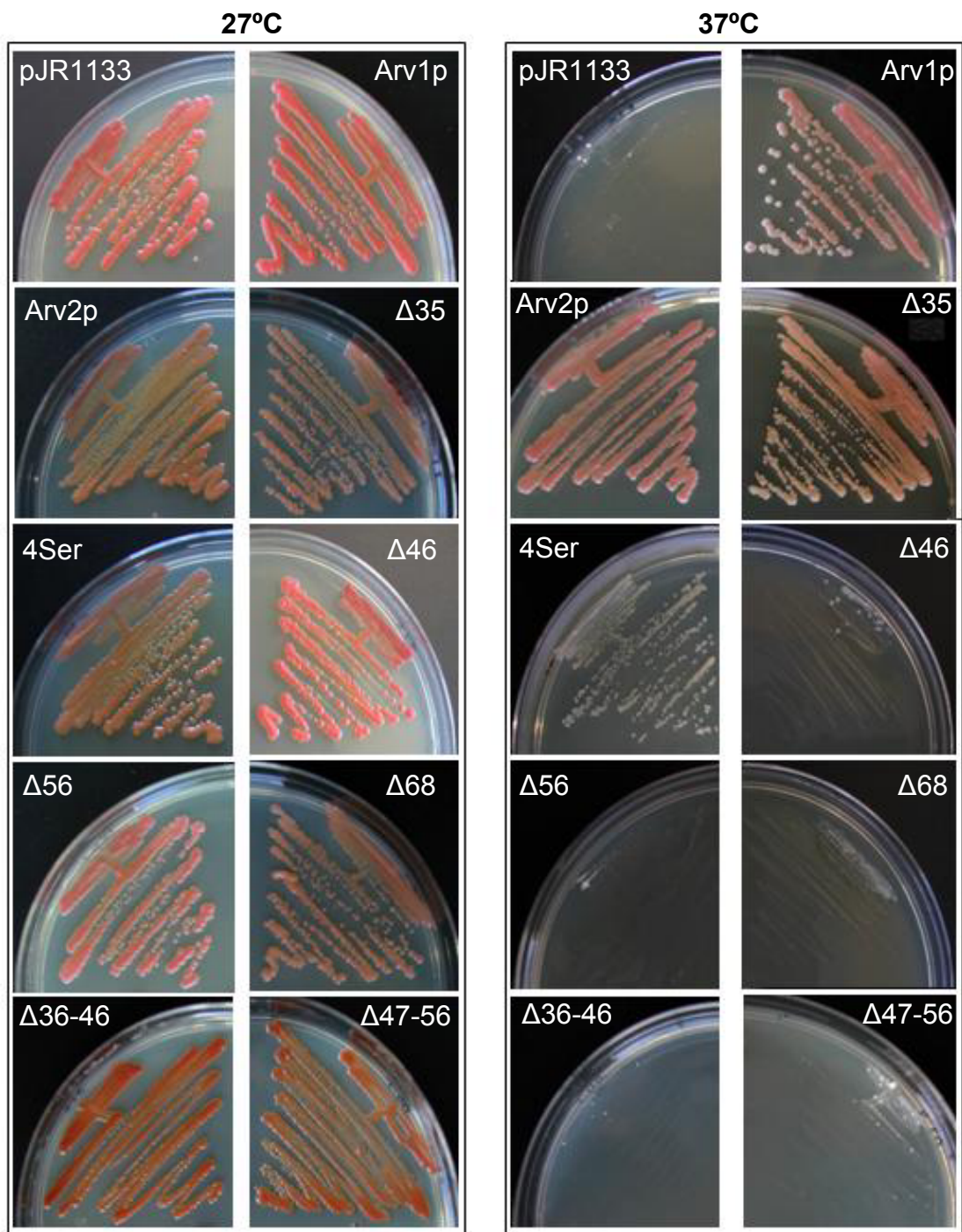


Fig.55. Complementació funcional de la soca mutant de llevat YJN1756 transformada amb els plasmidis pJRArv2p4Ser-HA, pJRArv2pΔ35-HA, pJRArv2pΔ46-HA, pJRArv2pΔ56-HA, pJRArv2pΔ68-HA, pJRArv2pΔ36-46-HA i pJRArv2pΔ47-56-HA. Les diferents soques van ser sembrades en plaques de medi YPG i incubades a 27°C i 37°C durant tres i dos dies respectivament. Com a controls positius es van utilitzar les soques YJN1756 [pJRArv1p-HA] i YJN1756 [pJRArv2p-HA] i com a control negatiu la soca YJN1756 [pJR1133]

5.2. Cinètica de creixement en medi líquid de la soca YJN1756 portadora de versions mutades d'AtArv2p-HA

Per tal de confirmar els resultats de la complementació del fenotip de termosensibilitat de la soca YJN1756 amb les diferents versions mutades de la proteïna AtArv2p, es va dur a terme un estudi de la cinètica de creixement en medi líquid de les diferents soques transformades. Com a control negatiu es va utilitzar la soca YJN1756 [pJR1133] i com a control positiu es va utilitzar la soca salvatge parental W303-1A.

Per a realitzar aquest experiment es van inocular colònies individuals de totes les soques en medi mínim amb els suplementes adequats fins a una O.D. $_{600} \approx 1-1,5$. Les cèl·lules es van diluir fins a una O.D. $_{600} \approx 0.05-0.1$ en medi YPG, es van incubar a 37°C i es va mesurar l'evolució d'absorbància dels cultius a diferents temps. Com s'observa a la **figura 56**, els resultats d'aquest experiment confirmen les observacions de l'apartat anterior. La soca YJN1756 [pJRArv2p Δ 35-HA] creix igual que la soca YJN1756 [pJRArv2p-HA], mentre que la soca YJN1756 [pJRArv2p4Ser-HA] creix però ho fa més lentament. En canvi, les soques control W303-1A i YJN1756 [pJR1133] i les soques YJN1756 [pJRArv2p Δ 46-HA], YJN1756 [pJRArv2p Δ 56-HA], YJN1756 [pJRArv2p Δ 68-HA], YJN1756 [pJRArv2p Δ 36-46-HA] i YJN1756 [pJRArv2p Δ 47-56-HA] no creixen a 37°C.

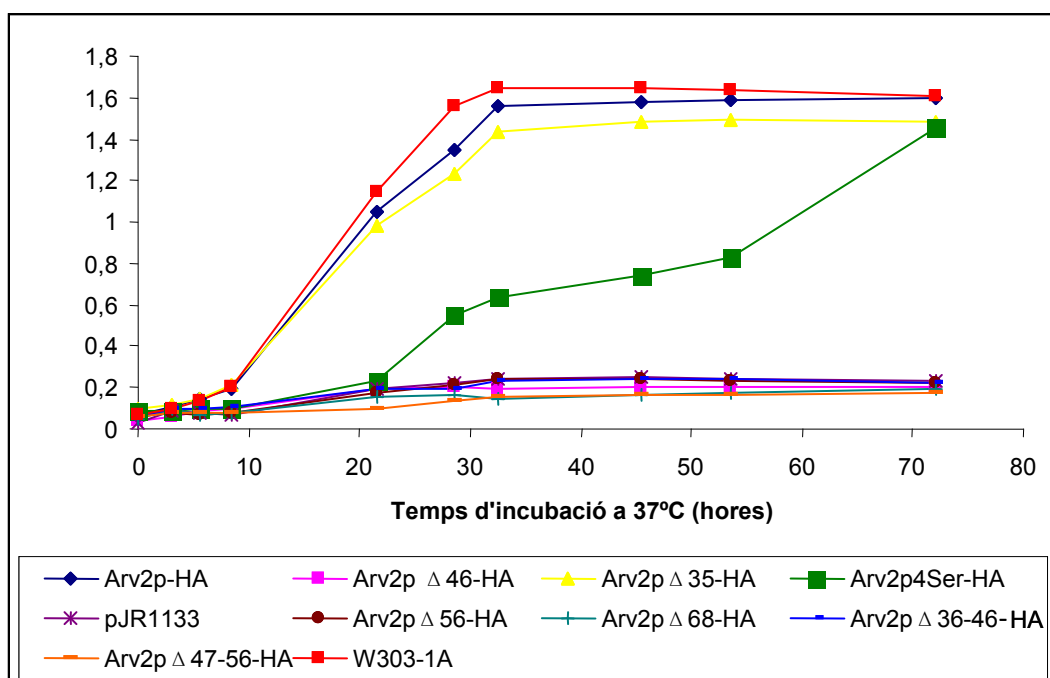


Fig. 56. Cinètica de creixement en medi líquid de les soques W303-1A, YJN1756 [pJR1133], YJN1756 [pJRArv2p-HA], YJN1756 [pJRArv2p4Ser-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ35-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ46-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ56-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ68-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ36-46-HA] i YJN1756 [pJRArv2pΔ47-56-HA]. Colònies individuals de les diferents soques van ser inoculades en medi mínim i incubades a 27°C fins a una O.D.600≈1-1.5. Aleshores les cèl·lules es van diluir en medi YPG líquid fins a una O.D.600≈0.05-0.1 i es va determinar l' O.D.600 als temps indicats. L'anàlisi es va dur a terme amb al menys cinc colònies independents de cada soca. A la figura es mostra una corba representativa de cada soca.

5.3. Anàlisi per Western blot de l'expressió de AtArv1p-HA, AtArv2p-HA i les diferents versions mutades d'AtArv2p-HA

Per tal de completar els assaigs de complementació funcional dels apartats anteriors, es van determinar els nivells de la proteïna expressada en cada una de les diferents soques estudiades mitjançant assaigs de Western blot amb un anticòs policlonal comercial contra l'epítot de l'hemaglutinina (HA; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA.) (Materials i Mètodes, apartat 15). Per a dur a terme l'experiment, es van fraccionar en un gel SDS-PAGE 35 µg de proteïna del sobrenedant de 10.000 xg d'extractes proteics obtinguts d'un cultiu líquid de cada soca. Com a control negatiu es va utilitzar la soca YJN1756 [pJR1133].

Com es pot observar a la **figura 57**, en els extractes de les soques YJN1756 [pJRArv1-HA] i YJN1756 [pJRArv2-HA] es detecta una proteïna majoritària d'una massa molecular coherent amb la deduïda a partir de la seqüència d'aminoàcids d'AtArv1p i AtArv2p, 29.2 i 27.1 kD respectivament. En els extractes de les soques que expressen versions mutades de la proteïna AtArv2p, les soques YJN1756 [pJRArv2pΔ35-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ56-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ68-HA] i YJN1756 [pJRArv2pΔ47-56-HA], es detecten nivells similars de les corresponents proteïnes respecte als de la proteïna AtArv2p expressada per la soca YJN1756 [pJRArv2p-HA], que també tenen una massa molecular coherent amb la teòrica, de 23, 20.5, 19 i 25.9 kD respectivament. Per altra banda, en l'extracte de la soca YJN1756 [pJRArv2p4Ser-HA] es detecta una proteïna de la massa molecular esperada (27 kD) però en uns nivells inferiors als de la proteïna AtArv2p en la soca YJN1756 [pJRArv2p], mentre que en els extractes de les soques YJN1756 [pJR1133], YJN1756 [pJRArv2pΔ46-HA] i YJN1756 [pJRArv2pΔ36-46-HA] l'anticòs no detecta cap proteïna. Aquests resultats suggereixen que la complementació parcial del fenotip de termosensibilitat observat en la soca YJN1756 [pJRArv2p4Ser-HA], tan en medi líquid com sòlid, podria ser deguda als baixos nivells d'expressió de la proteïna mutada. El fet que no es detecti l'expressió de les proteïnes AtArv2pΔ46-HA i AtArv2pΔ36-46-HA, suggereix que l'eliminació dels aminoàcids 36 a 46 de la proteïna AtArv2p provoca que la proteïna no s'acumuli. A més, el fet que en les soques YJN1756 [pJRArv2pΔ56-HA], YJN1756 [pJRArv2pΔ68-HA] i YJN1756 [pJRArv2pΔ47-56-

HA] es detectin quantitats similars de proteïna respecte les soques YJN1756 [pJRArv1-HA] i YJN1756 [pJRArv2-HA] i de la massa molecular esperada indica que la incapacitat d'aquestes proteïnes de complementar el fenotip de termosensibilitat no és deguda als nivells de la proteïna sinó a la pèrdua de funció de les proteïnes mutades. En conjunt, aquests resultats indiquen que per a la funcionalitat de les proteïnes AtArv és essencial la integritat del subdomini C-terminal del domini AHD.

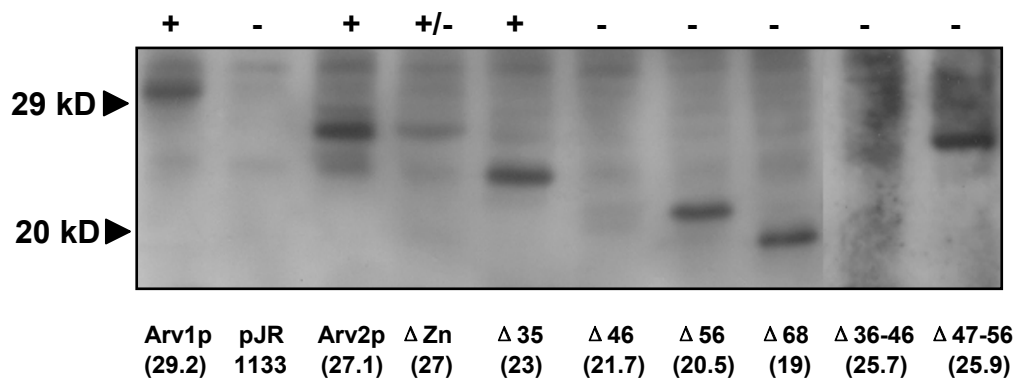


Fig.57. Anàlisi per Western blot de l'expressió d'AtArv1p, AtArv2p i les diferents versions mutades d'AtArv2p en la soca de llevat YJN1756. Anàlisi per Western blot d'extractes de proteïna (35 µg) de les soques de llevat amb les que es van realitzar els experiments de complementació funcional del fenotip de termosensibilitat de la soca de llevat YJN1756 (figura 55). Totes les proteïnes van ser marcades amb l'epítot HA. Els extractes proteics es van obtenir per ebullició de les cèl.lules amb tampó d'extracció. Aquests extractes es van centrifugar a 10.000 xg i es va recollir el sobrenedant. Es van fraccionar 35 µg de proteïna dels sobrenedants per SDS-PAGE al 15% i es van transferir a una membrana de PVDF. Com a anticòs primari es va utilitzar un anticòs policlonal anti-HA (Santa Cruz Biotec.) a una dil.lució 1:200 i com a anticòs secundari es va utilitzar un anticòs anti-IgG de conill conjugat a peroxidasa a una dil.lució 1:5000. La massa molecular predita de cada proteïna (en kD) s'indica entre parèntesis. Les posicions dels marcadors de massa molecular s'indiquen a l'esquerra. A sobre de cada carril s'indica amb el símbol + les proteïnes que complementen el fenotip de termosensibilitat de la soca YJN1756, amb el símbol - les que no el complementen i amb el símbol +/- les que el complementen parcialment.

6. LOCALITZACIÓ SUBCEL.LULAR DE LES PROTEÏNES AtArv1 I AtArv2

Anteriorment s'havia descrit que la proteïna Arv1 de *S. cerevisiae* es localitza en el reticle endoplasmàtic (RE) o en l'aparell de Golgi, probablement dependent de la fase de creixement (Swain et al., 2002), mentre que en humans la proteïna Arv1p es localitza al RE (Liu, 2004). En el cas de les proteïnes Arv d'*A. thaliana* l'anàlisi amb eines bioinformàtiques prediu una proteïna de membrana amb 6 segments transmembrana. Per complementar els estudis realitzats sobre les proteïnes AtArv1 i AtArv2 es va estudiar la localització subcel.lular d'ambdues proteïnes. Per a realitzar aquest estudi, es van generar construccions que codifiquen per a les proteïnes quimèriques GFP-AtArv1p i GFP-AtArv2p, fusionant les dues proteïnes a l'extrem C-terminal de la proteïna marcador GFP. Per estudiar si el domini AHD és important

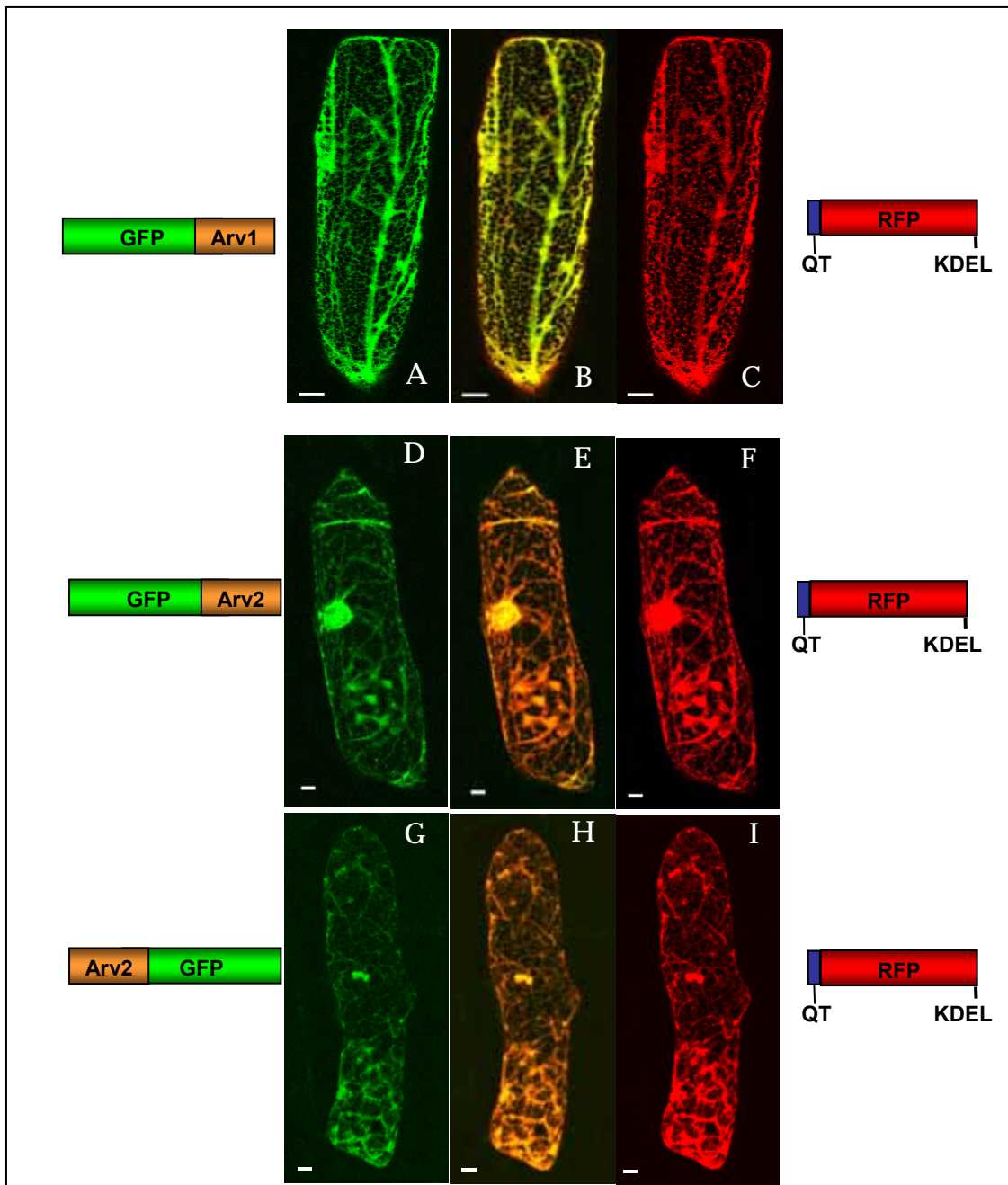
per a la localització subcel.lular de les proteïnes AtArv es van generar construccions en que la versió mutada de la proteïna AtArv2 a la que s'havia del.leccionat el domini AHD sencer (AtArv2p Δ 68) i el domini AHD de la proteïna AtArv2 (AtArv2pAHD) es van fusionar a l'extrem C-terminal de la proteïna marcador GFP, obtenint-se les proteïnes quimèriques GFP-AtArv2p Δ 68 i GFP-AtArv2pAHD. Per a generar aquestes construccions es van amplificar per PCR les seqüències corresponents dels ADNc AtARV1 i AtARV2 i es van insertar en el plasmidi pGFP-MRC (Rodríguez-Concepción et al., 1999), que conté una versió millorada de la GFP (S65CGFP) sota el control del promotor 35S del virus del mosaic de la col-i-flor, obtenint-se els plasmidis pGFP-AtArv1p, pGFP-AtArv2p, pGFP-AtArv2p Δ 68 i pGFP-AtArv2pAHD. També es va generar una proteïna quimèrica en que es va fusionar la proteïna AtArv2 a l'extrem N-terminal de la proteïna marcador GFP amb l'objectiu de determinar si el canvi en la posició relativa de la proteïna i la GFP altera la localització subcel.lular de la proteïna quimèrica. Aquesta construcció es va generar amplificant per PCR l'ADNc del gen *AtARV2* i es va clonar en el vector pGFP-MRC-N, versió del plasmidi pGFP-MRC en que es van incorporar dianes de restricció a 5' de la seqüència que codifica la GFP, obtenint-se el plasmidi pAtArv2p-GFP. Com a control de localització subcel.lular al reticle endoplasmàtic (RE) es va utilitzar una variant de la proteïna fluorescent vermella de *Discosoma* (T3RE-DsRed) a la que s'havia fusionat el pèptid de trànsit al RE de la quitinasa i el senyal de retenció al RE KDEL (Materials i Mètodes, apartat 13). Un cop obtingudes les construccions, es van expressar de forma transitòria en cèl.lules epidèrmiques de ceba transformades mitjançant la tècnica de biolística. Per a això, es van bombardejar trossos de ceba amb micropartícules de tungstè sobre les que prèviament s'havia precipitat l'ADN de les diferents construccions juntament amb la construcció que expressa la proteïna marcador de RE T3RE-DsRed (apartat 13 de Material i Mètodes). Després d'una incubació de 16h en fosc per a permetre l'expressió dels gens quimèrics, es va analitzar el patró de distribució de la fluorescència en les cèl.lules transformades mitjançant observació al microscopi làser confocal.

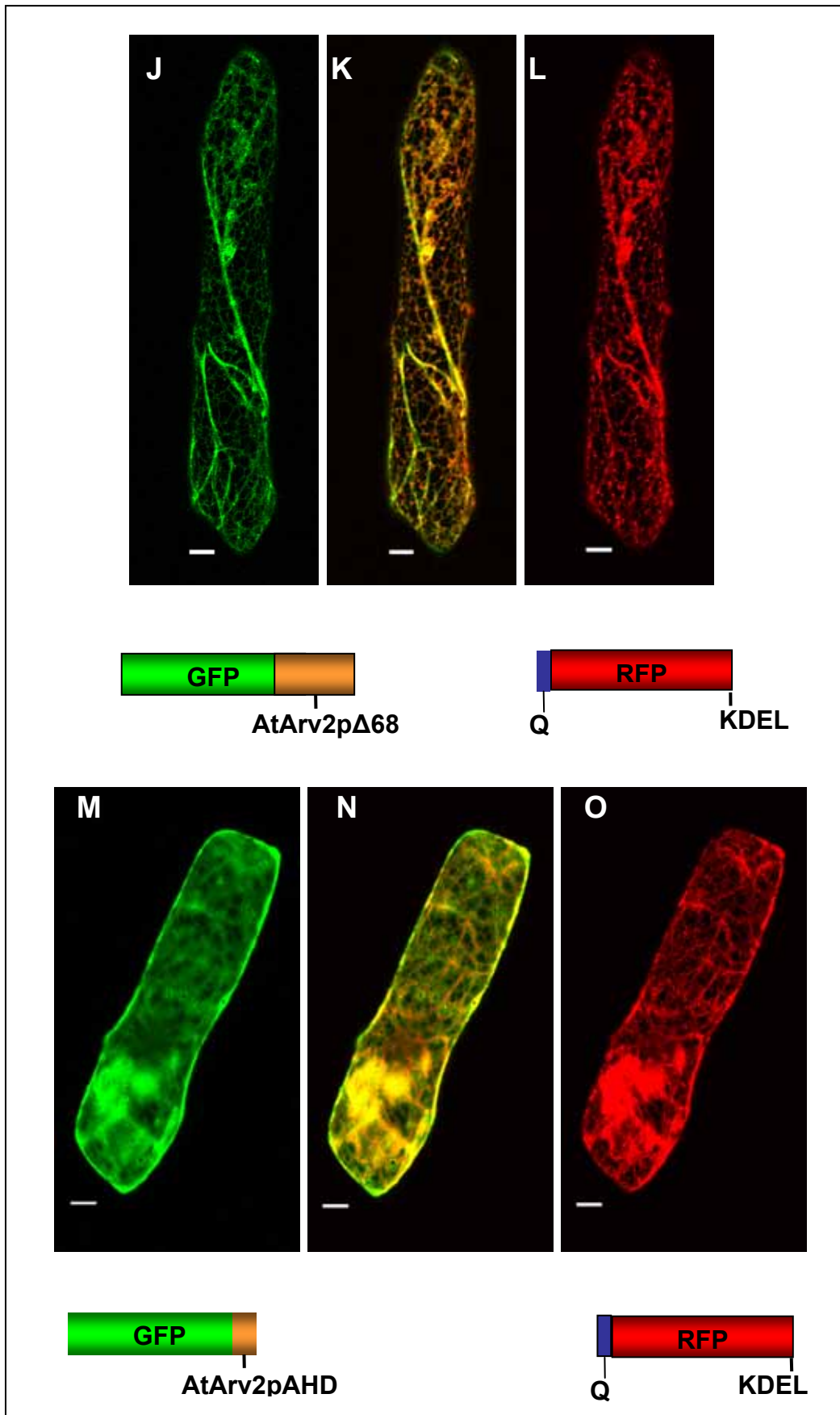
En la **figura 58** es mostren els resultats obtinguts amb cada una de les construccions. L'anàlisi per microscopia confocal de les cèl.lules que expressen les proteïnes quimèriques GFP-AtArv1p, GFP-AtArv2p i AtArv2p-GFP revela en els tres casos un patró reticulat de fluorescència verda (**figura 58 A, D i G**), que és idèntic al patró de fluorescència vermella emesa per la proteïna T3RE-DsRed (**figura 58, B, E i H**). En aquestes cèl.lules no es detecta fluorescència al citoplasma, a organel·les ni en el nucleoplasma. La superposició d'imatges de la fluorescència derivada de la GFP i la T3RE-DsRed (**figura 58, C, F i I**) confirma que les proteïnes GFP-AtArv1p, AtArv1p-GFP i GFP-AtArv2 co-localitzen amb la T3RE-DsRed, fet

que demostra que en les cèl.lules epidèrmiques de ceba les dues proteïnes AtArv es localitzen de forma exclusiva al RE.

L'anàlisi per microscopia làser confocal de cèl.lules transformades que expressen les proteïnes quimèriques GFP-AtArv2p Δ 68 i GFP-AtArv2pAHD, revela en el primer cas un patró reticulat de fluorescència verda (**figura 58, J**), que és idèntic al patró de fluorescència vermella emesa per la proteïna T3RE-DsRed (**figura 58, K**). La superposició d'imatges de la fluorescència derivada de la GFP i la T3RE-DsRed (**figura 58, L**) confirma que la proteïna GFP-AtArv2p Δ 68 co-localitza amb la T3RE, fet que demostra que en les cèl.lules epidèrmiques de ceba la proteïna AtArv2p Δ 68 es localitza de forma exclusiva al RE. En el segon cas s'observa el patró característic de fluorescència de la GFP sola amb una distribució de la fluorescència verda en tota la cèl.lula, (**figura 58, M**). La superposició d'imatges de la fluorescència derivada de la GFP i la T3RE-DsRed (**figura 58, N**) confirma que la proteïna GFP-AtArv2pAHD no co-localitza amb la T3RE-DsRed (**figura 58, O**). El conjunt dels resultats demostra que les proteïnes AtArv1 i AtArv2 es localitzen exclusivament al reticle endoplasmàtic. També demostren que la localització de les proteïnes AtArv al RE no depèn del domini AHD i suggereixen que la falta de complementació funcional del fenotip de termosensibilitat de la soca de llevat YJN1756 per les proteïnes AtArv2 a les que s'ha alterat el subdomini C-terminal del domini AHD no és deguda a un canvi en la localització subcel.lular.

Fig. 58. Localització subcel.lular de les proteïnes quimèriques GFP-AtArv1p, GFP-AtArv2p, AtArv2p-GFP, GFP-AtArv2p Δ 68 i GFP-AtArv2pAHD. Microfotografies de microscopia làser confocal mostren la distribució de la fluorescència en cèl.lules epidèrmiques de ceba expressant la proteïna T3RE-DsRed en combinació amb les proteïnes GFP-AtArv1p (Panells A-C), GFP-AtArv2p (Panells D-F), AtArv2p-GFP (Panells G-I), GFP-AtArv2p Δ 68 (Panells J-L) i GFP-AtArv2pAHD (Panells M-O). **AHD**; Arv1 Homology Domain. **QT**; pèptid de trànsit de la quitinasa. **KDEL**; senyal de retenció al RE. La co-localització de la GFP i la DsRed es mostra en groc. Les imatges són projeccions tridimensionals de 20 seccions d'1 μ m cada una. Les barres blanques representen 20 μ m. En els esquemes que representen les diferents proteïnes quimèriques, les caixes verdes representen la GFP, les caixes vermelles la RFP, les caixes blaves el pèptid de trànsit de la quitinasa i les caixes taronges les proteïnes que s'han fusionat a la GFP.





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

Un cop demostrat que *A. thaliana* conté dos gens homòlegs al gen *ARV1* de llevat, els quals codifiquen per dues proteïnes funcionals que es localitzen al RE, el següent pas seria començar a investigar quina és la funció biològica d'aquestes proteïnes. Per a això, una de les eines de que es disposa actualment, especialment si es treballa amb *A. thaliana*, són els mutants de pèrdua de funció. En aquest treball s'ha iniciat la caracterització del mutant insercional SALK_090151 (Apartat 1 dels Materials i Mètodes) de la col.lecció SALK del Salk Institute (CA, USA), que segons s'indica a la pàgina web <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> l'ADN-T està inserit a +16 pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV1*. També s'ha iniciat la caracterització del mutant insercional ET8675 (Apartat 1 dels Materials i Mètodes) de la col.lecció "Enhancer Trap" del Cold Spring Harbour, que segons indica la pàgina web www.cshl.org conté un transposó inserit a -6 pb respecte el codó d'inici de la transcripció del gen *AtARV2*.

7.1. Confirmació de la posició de la inserció per PCR

El primer pas en la caracterització del mutant SALK_090151, que hem anomenat mutant *arv1*, va ser confirmar per PCR sobre ADN genòmic que la inserció en la posició indicada del gen *AtARV1*. A més aquest pas va servir per identificar plantes homozigòtiques per a l'al.lel mutant. Per a dur-ho a terme, es va obtenir ADN genòmic de 15 plantes diferents, i per a cada una de les plantes analitzades es van dur a terme dues reaccions de PCR (punt 16.2 dels Materials i Mètodes) utilitzant un encebador antisentit comú (A1-3') situat a 3' de la inserció, i dos encebadors sentit, un d'intern de l'ADN-T (Lba1) i l'altre a 5' de la mateixa (A1-5') (**figura 59**). D'aquesta manera si una planta és heterozigòtica per a l'al.lel mutat s'amplifiquen dos fragments, un de 917 pb corresponent al fragment que s'amplifica amb l'encebador A1-3' i l'encebador Lba1, i un altre de 566 pb, corresponent a l'amplificació de la seqüència compresa entre els encebadors A1-3' i A1-5'. Si la planta és homozigòtica per a l'al.lel mutat només s'amplifica el fragment de 917 pb.

En la **figura 59** es mostren els resultats de les amplificacions per PCR amb ADN genòmic de 5 plantes independents. De les 5 plantes, una (Sk 2.6) és heterozigòtica per a

l'al.lel mutat, ja que com s'observa a la figura s'han amplificat tan el fragment de 917 pb com el de 566 pb. Les 4 plantes restants (Sk 2.7, 2.8, 2.9 i 2.10) són homozigòtiques, ja que només s'ha amplificat el fragment de 917 pb. Aquests resultats confirmen que l'ADN-T està situat a la posició indicada.

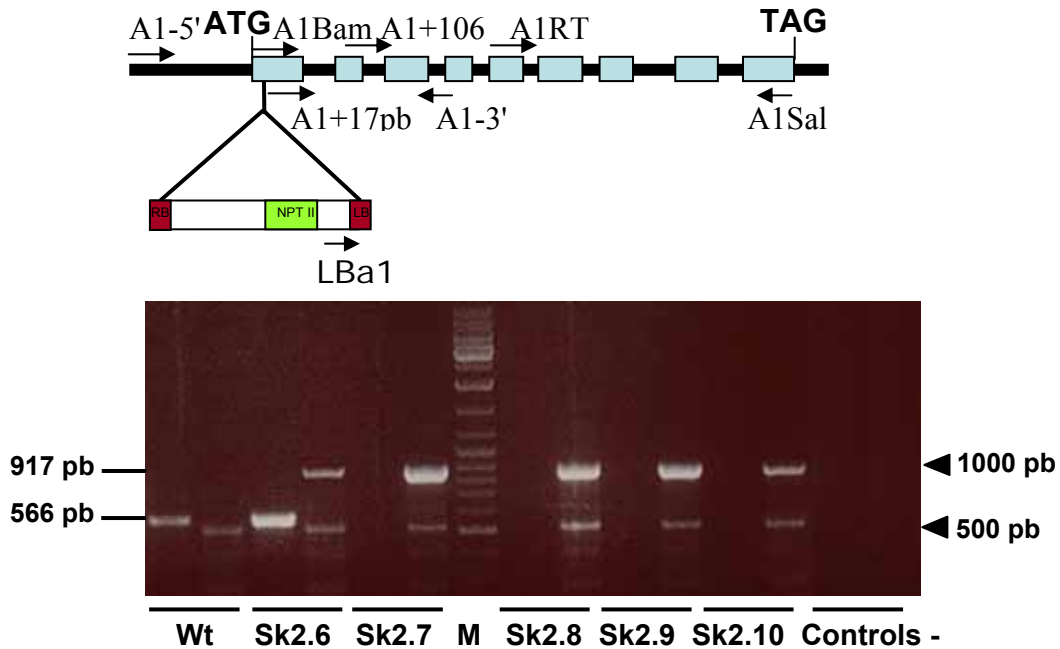


Fig.59. Confirmació per PCR de la posició de la inserció d'ADN-T en el mutant SALK_090151. Els fragments amplificats en cas d'haver-hi l'al.lel mutat del gen *AtARV1* (917pb) i en el cas de l'al.lel salvatge (566 pb), es van obtenir per PCR a partir d'ADN genòmic de plàntules de 10 dies de 5 línies independents del mutant SALK_090151. Per a cada planta analitzada, en el carril de l'esquerra es mostra l'amplificació amb els encebadors A1-5' i A1-3' i en el carril de la dreta es mostra l'amplificació amb els encebadors Lba1 i A1-3'. En les línies heterozigòtiques s'amplifiquen els dos fragments, mentre que en les homozigòtiques per a la inserció només s'amplifica el fragment de 917 pb. En l'esquema del gen *AtARV1* es mostra la posició de l'ADN-T en el gen *AtARV1* i la posició dels encebadors utilitzats per determinar la posició de la inserció i analitzar els nivells d'ARNm del gen *AtARV1*. A la dreta es mostren la mida de tres dels fragments del marcador d'ADN (M).

En el cas del del mutant d'inserció ET8675, que hem anomenat mutant *arv2*, mitjançant reaccions de PCR sobre ADN genòmic de 7 plantes diferents es van identificar plantes homozigòtiques per a l'al.lel mutat i es va confirmar la posició de la inserció. Per a les PCRs es va utilitzar un encebador sentit comú (A2-5') situat a 5' del transposó inserit i com a encebadors antisentit es van utilitzar els encebadors A2-3', que permet ampliar un fragment de 1530 pb del gen *AtARV2*, i l'encebador DS5.1, situat en el transposó i que ens permet detectar la presència de l'al.lel mutat mitjançant l'amplificació d'un fragment de 750 pb. En les plantes heterozigòtiques per a l'al.lel mutat s'amplifiquen els dos fragments, mentre que en les plantes homozigòtiques s'amplifica només el fragment de 750 pb.

En la **figura 60** es mostren els resultats de les amplificacions per PCR amb ADN genòmic de 7 plantes independents. De les 7 plantes, 4 (ET 2.1, 4.1, 6.1 i 8.1) són heterozigòtiques per a l'al.lel mutat ja que com s'observa a la figura s'han amplificat tan el fragment de 750 com el de 1350 pb. En les 3 plantes restants (ET11.1, 14.4 i 16.4) només s'ha amplificat el fragment de 1350 pb, per tan són plantes homozigòtiques per a l'al.lel mutat. Aquests resultats també confirmen la posició del transposó inserit.

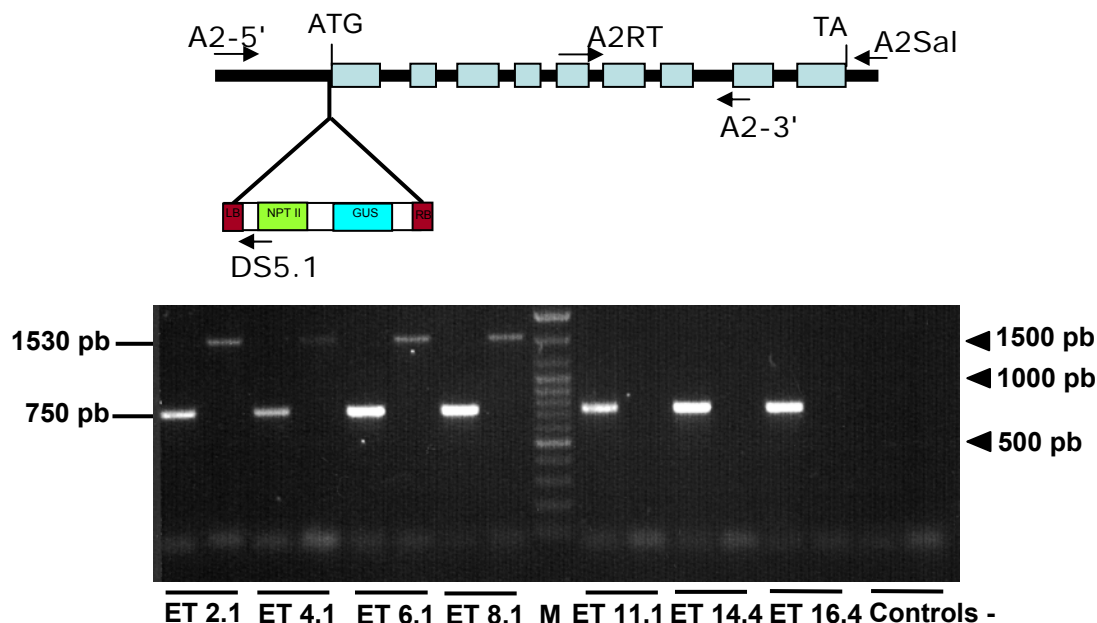


Fig.60. Confirmació per PCR de la posició de la inserció d'ADN-T del mutant ET8675. Els fragments amplificats en cas de l'al.lel mutat (750pb) i en el cas de l'al.lel salvatge (1530 pb), es van obtenir per PCR a partir d'ADN genòmic de plàntules de 10 dies de 7 línies independents del mutant ET8675. Per a cada planta analitzada, en el carril de l'esquerra es mostra l'amplificació amb els encebadors de l'al.lel mutat i en el carril de la dreta es mostra l'amplificació amb els encebadors de l'al.lel salvatge. En les línies heterozigòtiques s'amplifiquen els dos fragments, mentre que en les homozigòtiques per a la inserció només s'amplifica el fragment de 750 pb. En l'esquema del gen *AtARV2* es mostra la posició del transposó inserit en el gen *AtARV2* i la posició dels encebadors utilitzats per determinar la posició de la inserció i analitzar els nivells d'ARNm del gen *AtARV2*. A la dreta es mostren la mida de tres dels fragments del marcador d'ADN (M).

7.2. Nivells d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A. thaliana* en el mutant *arv1*

El següent pas en la caracterització del mutant *arv1* va ser determinar si la inserció situada aproximadament a +16 pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV1* provoca la inactivació del gen. Paral·lelament es va determinar el nivell d'expressió del gen *AtARV2*.

Per a això, es van amplificar fragments dels ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* mitjançant reaccions de RT-PCR a partir d'ARN total de plàntules de 10 dies de la línia homocigòtica per a l'al·lel mutant Sk2.8. Les reaccions de PCR es van dur a terme amb els encebadors sentit A1RT i A2RT i els encebadors antisentit A1Sal i A2Sal respectivament (**figures 59 i 60**). Els fragments amplificats (**figura 61**) van ser de 395 pb en el cas de l'ADNc *AtARV1* i de 404 pb en el cas de l'ADNc *AtARV2*, els quals es corresponen amb la mida esperada. Com a control de les preparacions d'ARNm i de les reaccions de PCR es va amplificar un fragment de 296 pb de l'ADNc del gen de la actina 2 (*ACT2*).

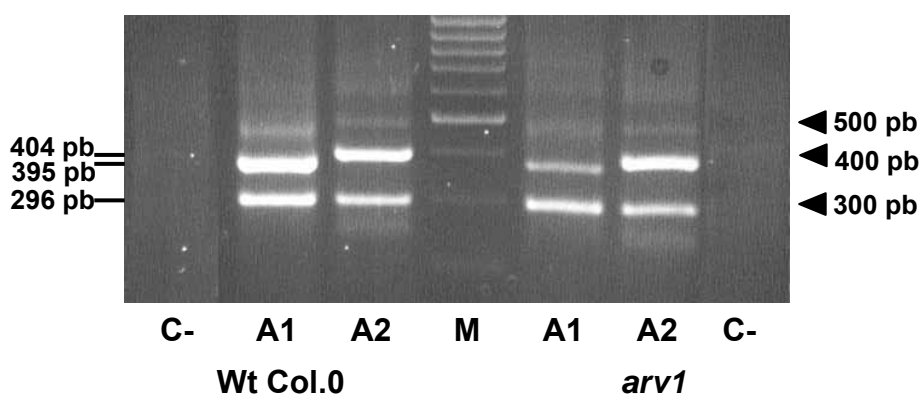


Fig.61. Determinació dels nivells d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* en el mutant *arv1* mitjançant RT-PCR. Els fragments de l'ADNc del gens *AtARV1* (A1; 395 pb) i *AtARV2* (A2; 404 pb) van ser amplificats per RT-PCR a partir d'1 µg d'ARN total de plàntules de 10 dies. Com a control intern es va amplificar un fragment de l'ADNc del gen de la *ACT2* (296 pb). A l'esquerra de la figura es mostren les mides dels fragments amplificats i a la dreta la mida de tres dels fragments del marcador d'ADN (M).

Com es mostra en la **figura 61**, en el mutant *arv1* continua detectant-se una banda corresponent a l'amplificació del fragment de 395 pb de l'ADNc del gen *AtARV1*, tot i que la intensitat de la banda és molt menor respecte a la planta control. Pel que fa al gen *AtARV2*, s'observa una banda corresponent a l'amplificació del fragment de 404 pb de l'ADNc *AtARV2* de la mateixa intensitat tan en el mutant com en la planta control. Aquests resultats mostren que el mutant *arv1* tot i tenir una inserció d'un ADN-T a +16 pb de l'ATG, el gen *AtARV1*, encara expressa un ARNm tot i que els nivells d'ARNm són menors als detectats en la planta control. És a dir, el mutant *arv1* és un mutant "knock-down" i no un mutant "knock-out", com es podria esperar per la posició de la inserció d'ADN-T.

Com s'ha demostrat abans (Apartat 5.1), la pèrdua dels 35 primers aa de la proteïna AtArv2p no altera la capacitat de la proteïna per complementar la soca mutant de llevat YJN1756, per tant l'ARNm del gen *AtARV1* que s'expressa en el mutant *arv1* podria codificar per una proteïna funcional. Per a determinar de forma aproximada a partir de quina posició de la

seqüència codificant comença a expressar-se l'ARNm de l'al.lel mutant *arv1* i si l'ARNm resultant pot codificar per una proteïna Arv funcional, es va amplificar l'ADNc del gen *AtARV1* en les mateixes condicions que en l'experiment anterior amb tres encebadors sentit diferents i l'encebador antisentit comú A1Sal. Els tres encebadors sentit són: A1Bam (que permet amplificar un fragment de l'ADNc a partir de la posició +1 respecte el codó d'inici de la traducció), A1+17 (que permet amplificar un fragment de l'ADNc a partir de la posició +17 respecte el codó d'inici de la traducció, just a 3' de la posició on segons la base de dades de la col.lecció SALK s'ha inserit l'ADN-T) i A1+106 (que permet amplificar un fragment de l'ADNc a partir de la posició +106 pb respecte el codó d'inici de la traducció, és a dir, a 3' del codó que codifica per la quarta cisteïna del domini AHD). Com s'observa en la **figura 62** en el cas de les plantes control es detecta amplificació dels fragments d'ADNc del gen *AtARV1* de la mida esperada (825, 732 i 695 pb respectivament) amb els tres diferents encebadors sentit, mentre que en el cas del mutant *arv1* només es detecta amplificació, i amb molta menys intensitat, de fragments d'ADNc de la mida esperada (732 i 695 pb respectivament) en el cas dels encebadors A1+17 i A1+106.

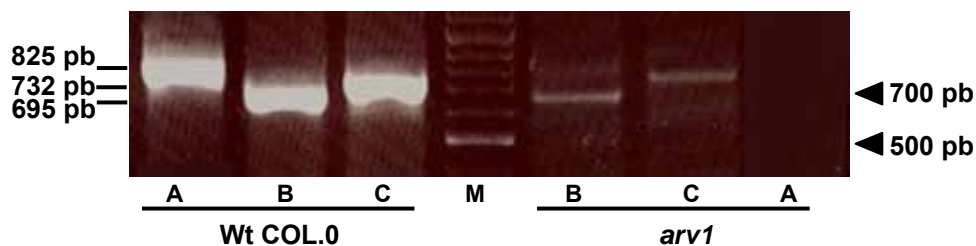


Fig.62. Determinació de l'expressió de l'ARNm del gen *AtARV1* en el mutant *arv1* mitjançant RT-PCR. Es van amplificar fragments de l'ADNc del gen *AtARV1* amb l'encebador antisentit comú A1Sal i els encebadors sentit A1Bam (A; 825 pb), l'encebador A1+106 (B: 695 pb) i l'encebador A1+17 (C: 732 pb) tan en plantes control (Col. 0) com en plantes mutants *arv1*. Aquests ADNc van ser amplificats per RT-PCR a partir d'1 µg d'ARN total de plàntules de 10 dies. A l'esquerra de la figura es mostren les mides dels fragments amplificats i a la dreta la mida de dos dels fragments del marcador d'ADN (M).

Aquest resultat mostren que la inserció d'ADN-T només anul·la l'expressió de l'ARNm sencer. En canvi sí que s'expressa, tot i que a un nivell molt inferior respecte a les plantes control, un ARNm que podria començar al voltant de la posició +17 pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV1*. Aquest ARNm podria codificar per una proteïna que si es comença a traduir pel codó ATG que correspon a la Met30 de la AtArv1p contindria el subdomini C-terminal del domini AHD amb els 6 últims aa del subdomini N-terminal del domini AHD, incloent-hi dues de les cisteïnes que formarien el possible dit de zinc del domini AHD. Aquesta proteïna seria teòricament funcional, ja que com s'ha demostrat abans, la delecció del subdomini N-terminal del domini AHD no altera la funcionalitat de la proteïna AtArv1.

7.4. Nivells d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* d'*A. thaliana* en el mutant *arv2*

En el cas del mutant *arv2*, un cop confirmada l'existència d'un transposó inserit al voltant de la posició +16 pb respecte el codó ATG del gen *AtARV2*, es va determinar el nivell d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* en el mutant *arv2*. Per a això, es van amplificar els ADNc dels gens *AtARV1* i *AtARV2* mitjançant reaccions de RT-PCR a partir d'ARN total de plàntules de 10 dies de 3 línies homozigòtiques independents utilitzant un encebador oligodT. Les reaccions de PCR es van dur a terme utilitzant els encebadors sentit A1RT i A2RT i els encebadors antisentit A1Sal i A2Sal respectivament (Materials i mètodes; apartat 6). Els fragments amplificats (**figura 63**) han estat de 395 pb per l'amplificació de l'ADNc *AtARV1* i de 404 pb per la de l'ADNc *AtARV2*.

Com es mostra en la **figura 63**, en cap de les 3 línies homozigòtiques analitzades es detecta la banda corresponent a l'amplificació de l'ADNc del gen *AtARV2*, que si es detecta en la planta salvatge. Pel que fa al gen *AtARV1*, s'observa un lleuger increment de la banda corresponent a l'amplificació de l'ADNc del gen *AtARV1* en les 3 línies del mutant ET8675 respecte a la salvatge. Aquest resultat demostra que la inserció de l'ADN-T a -6 pb respecte el codó d'inici de la traducció del gen *AtARV2* anula completament l'expressió del gen *AtARV2*.

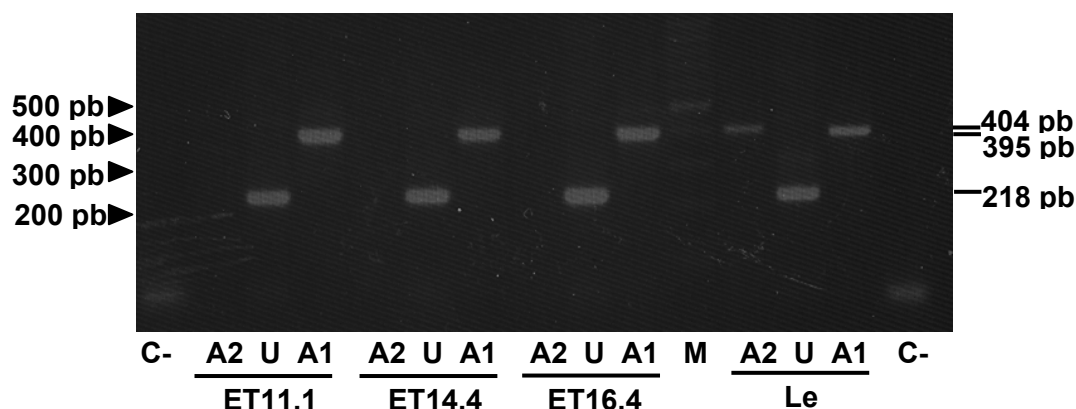


Fig.63. Determinació dels nivells d'expressió dels gens *AtARV1* i *AtARV2* del mutant ET8675 mitjançant RT-PCR. Els ADNc del gens *AtARV1* (A1; 395 pb) i *AtARV2* (A2; 404 pb) van ser amplificats per RT-PCR a partir d'1 µg d'ARN total de plàntules de 10 dies. Com a control intern es va utilitzar un fragment de l'ADNc del gen de la *UBQ10* (U; 218 pb). A l'esquerra es mostren les mides de quatre dels fragments del marcador d'ADN (M) i a la dreta es mostren les mides dels fragments amplificats.

7.5. Anàlisi fenotípic dels mutants SALK_090151 i ET8675

Per determinar si la inactivació del gens *AtARV1* i *AtARV2* provoca alguna alteració fenotípica durant el desenvolupament de les plantes, s'ha comparat tot el desenvolupament de plantes homozigòtiques dels mutants SALK_090151 i ET8675 amb plantes control Col.0 i Le, respectivament. Per a això, s'ha analitzat el creixement i desenvolupament de 12 plantes de la línia homozigòtica Sk2.8 del mutant Salk_09015, 12 plantes Col.0, 15 plantes de la línia homozigòtica ET16.4 del mutant ET8675 i de 15 plantes Le, en diferents condicions de fotoperíode des de la germinació fins a la producció de llavors. Fins al moment no s'ha detectat cap alteració fenotípica en els mutants SALK_090151 i ET8675. Aquest resultat suggereix que l'absència d'un dels dos gens pot ser suplerta per l'altre, fet que indicaria una possible redundància funcionals dels gens *AtARV1* i *AtARV2*.

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

Com ja s'ha comentat en la introducció, tot i que els mecanismes a nivell molecular que regulen l'homeostasi lipídica encara són poc entesos, estudis recents suggereixen l'existència d'una regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids en animals i llevats. Pel que fa a les plantes, estudis recents suggereixen que aquesta regulació coordinada també hi té lloc. En concret, la inhibició de la via de síntesi d'esterols en plantes de porro amb fenpropimorf, inhibidor de la cicloeucaalenol-obtusifoliol isomerasa, no només altera de forma notable el perfil d'esterols sinó que també altera els nivells d'altres espècies lipídiques. Així mentre l'inhibidor fa disminuir de forma importants els nivells de fosfolípids com la fosfatidilserina i esfingolípids com la glucosilceramida, també incrementa els nivells de TAG (Hartmann et al., 2002). Per aprofundir en l'estudi de la regulació coordinada d'esterols i esfingolípids en plantes hem inhibit la via de síntesi d'esfingolípids i n'hem estudiat els efectes sobre la via de síntesi d'esterols en *A. thaliana* mesurant l'activitat HMGR (un dels principals enzims reguladors de la síntesi d'esterols) i els nivells d'esterols. La inhibició de la síntesi d'esfingolípids s'ha dut a terme amb dos inhibidors que actuen en dos punts diferents de la ruta,

la miriocina, que inhibeix la serina-palmitoil transferasa, i la fumonisina β_1 , que inhibeix la ceramida sintasa.

8.1. Activitat HMGR en plantes tractades amb miriocina

Per estudiar els efectes de la inhibició de la via de síntesi d'esfingolípid amb miriocina sobre la via de síntesi d'esterols, s'ha determinat l'activitat de la HMGR en la fracció sobrenedant de 200 x g d'extractes de plantes Col.3 crescudes durant 20 dies en medi MS i després en medi MS suplementat amb 0.1, 0.5, 1, 2.5 i 10 μM de miriocina durant 3, 9 i 14 dies. Com s'observa en la **figura 64**, als 3 dies ja s'observa una disminució significativa de l'activitat HMGR, respecte a les plantes crescudes en medi MS sense inhibidor, particularment a 0.5 i 1 μM . La disminució d'activitat HMGR és menor en la resta de concentracions assajades (0.1, 2.5 i 10 μM). Els nivells d'activitat HMGR en les plàntules crescudes durant 9 o 14 dies en presència de la miriocina presenten un comportament similar respecte al que presenten les plàntules crescudes amb l'inhibidor durant 3 dies. A partir d'aquests resultats vam decidir continuar l'estudi dels efectes de la miriocina en la via de síntesi d'esterols deixant créixer les plàntules durant 9 dies en presència de l'inhibidor.

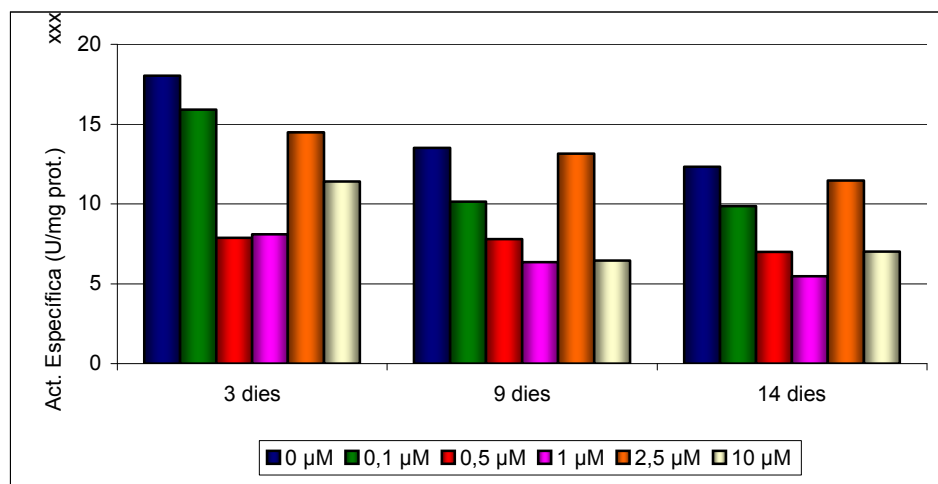


Fig.64. Efecte de la miriocina sobre el nivell d'activitat HMGR. Activitat HMGR en plantes Col.3 que es van créixer durant 20 dies en medi MS, i després durant 3, 9 i 14 dies més en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.1, 0.5, 1, 2.5 i 10 μM de miriocina. L'activitat HMGR es va medir en tots els casos en la fracció 200 x g dels extractes de les plantes senceres i s'expressa com a activitat específica (U d'HMGR).

L'assaig d'activitat HMGR en plàntules tractades amb miriocina durant 9 dies es va repetir tres vegades amb resultats idèntics (**figura 65 A**). A una concentració de miriocina de 0,1 μM es produeix una lleugera disminució de l'activitat HMGR, la qual és màxima a 0,5 μM , concentració en la qual l'activitat HMGR dismuneix al voltant de 2.5 vegades. Al augmentar la concentració de l'inhibidor (1 i 2,5 μM) es recupera l'activitat de l'enzim, de tal manera que a la concentració de 2,5 μM , s'obtenen nivells d'activitat només lleugeraments inferiors als de plantes crescudes sense l'inhibidor. En canvi, en les plantes crescudes amb la dosi màxima de miriocina assajada (10 μM) els valors d'activitat HMGR tornen a disminuir fins a valors similars als obtinguts a 1 μM .

Per demostrar que la inhibició observada no es deu a un efecte inhibitori directe de la miriocina sobre la HMGR, es va mesurar l'activitat HMGR en presència de les mateixes concentracions de miriocina. Com es pot observar a la **figura 65 B**, cap de les concentracions de miriocina assajades té efectes directes sobre l'activitat HMGR.

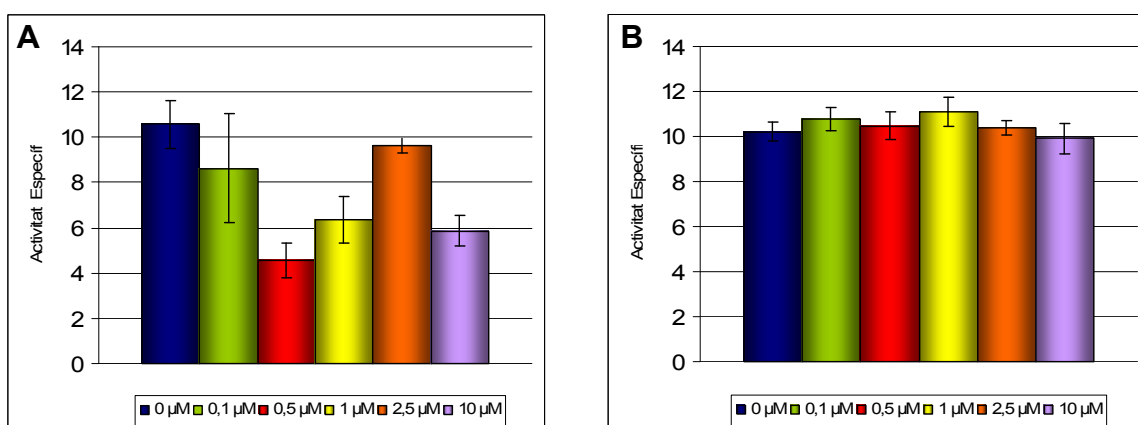


Fig.65. Efecte de la miriocina sobre el nivell d'activitat HMGR. **A:** Activitat HMGR en plantes Col.3 que es van créixer durant 20 dies en medi MS, i després durant 9 dies més en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.1, 0.5, 1, 2.5 i 10 μM de miriocina. **B:** Activitat HMGR mesurada en presència de les concentracions de miriocina indicades. L'activitat HMGR es va medir en tots els casos en la fracció 200 x g dels extractes de les plantes senceres i s'expressa com a activitat específica. Els valors obtinguts són la mitja \pm desviació estàndar de tres experiments.

8.2. Activitat HMGR en plantes tractades amb fumonisina β_1

Els efectes de la inhibició de la via de síntesis d'esfingolípids amb fumonisina β_1 sobre la via de síntesis d'esterols, s'ha estudiat mitjançant la determinació de l'activitat HMGR en la fracció sobrenedant de 200 x g d'extractes de plantes Col.3 crescudes durant 28

dies en medi MS i després en medi MS suplementat amb 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 μM de fumonisina β_1 durant 5 i 9 dies. Com s'observa en la **figura 66**, als 5 dies només s'observa un lleuger increment de l'activitat HMGR, respecte a les plantes crescudes en medi MS sense inhibidor a 1 μM , mentre que a la resta de concentracions no s'observa cap alteració en els nivells d'activitat HMGR. Als 9 dies s'observa un increment més evident de l'activitat HMGR a 0.5 i 1 μM , mentre que a la resta de concentracions no s'observa cap alteració en els nivells d'activitat HMGR. A partir d'aquests resultats vam decidir continuar l'estudi dels efectes de la fumonisina β_1 en la via de síntesis d'esterols deixant créixer les plàntules durant 9 dies en presència de l'inhibidor.

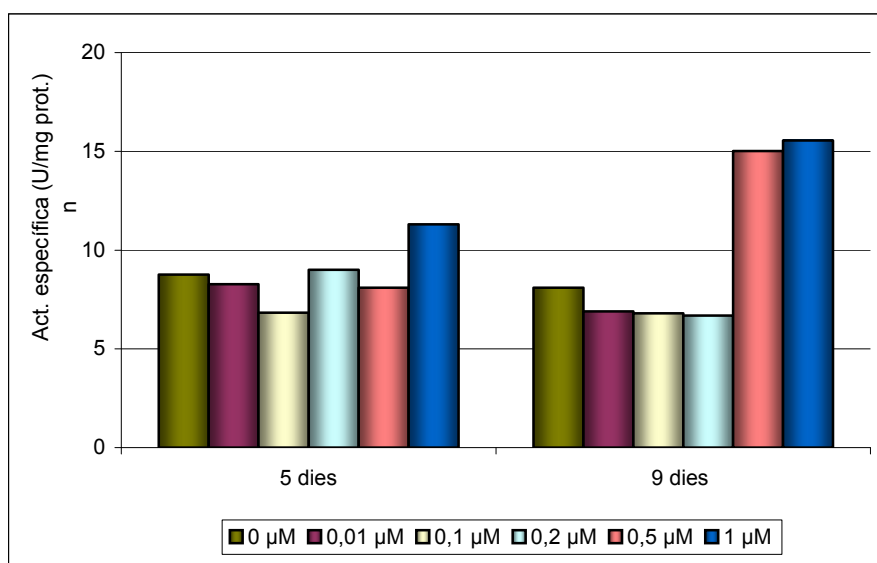


Fig.66. Efecte de la fumonisina β_1 sobre el nivell d'activitat HMGR. Activitat HMGR en plantes Col.3 que es van fer créixer durant 28 dies en medi MS, i després durant 9 dies més en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 μM de fumonisina β_1 . L'activitat HMGR es va medir en tots els casos en la fracció 200 x g dels extractes de les plantes senceres i s'expressa com a activitat específica.

L'assaig HMGR es va repetir en plàntules tractades amb fumonisina β_1 durant 9 dies, i els resultats (**figura 67 A**) ens confirmen els resultats mostrats a la figura 66. A les concentracions més baixes (0.01, 0.1 i 0.2 μM) no es detecta variació en els nivells d'activitat HMGR, mentres que en les dues concentracions més altes (0.5 i 1 μM) s'observa un augment de l'activitat HMGR de gairebé dues vegades.

De nou, i per demostrar que els efectes observats no es deuen a un efecte directe de la fumonisina β_1 sobre la HMGR, es va mesurar l'activitat HMGR en presència de les mateixes concentracions de fumonisina β_1 . Com es pot observar a la **figura 67 B**, cap de les concentracions de fumonisina β_1 assajades té efectes directes sobre l'activitat HMGR.

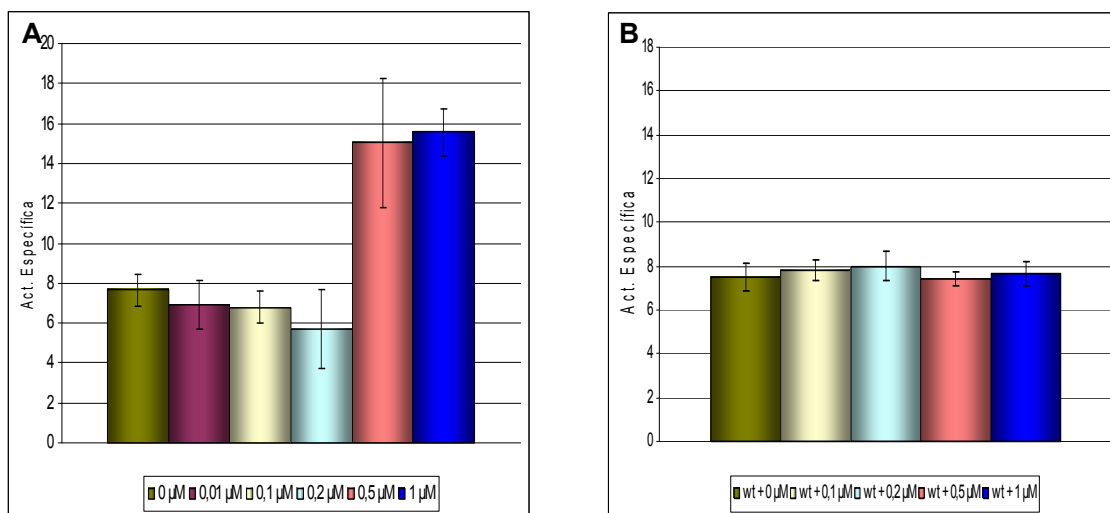


Fig.67. Efecte de la fumonisina β_1 sobre el nivell d'activitat HMGR. **A:** Activitat HMGR en plantes Col.3 que es van fer créixer durant 28 dies en medi MS, i després durant 9 dies més en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 μM de fumonisina β_1 . **B:** Activitat HMGR mesurada en presència de les concentracions de fumonisina β_1 indicades. L'activitat HMGR s'ha medid en tots els casos en la fracció 200 x g dels extractes de les plantes senceres i s'expressa com a activitat específica. Els valors obtinguts són la mitja \pm desviació estàndar d'almenys dos experiments

En conjunt, aquests resultats indiquen que la inhibició de la biosíntesis d'esfingolípid afecta l'activitat de la HMGR, i suggereixen que existeix una regulació coordinada d'ambdues vies. A més, el fet que la inhibició de la biosíntesis d'esfingolípid a dos nivells diferents (SPT i ceramida sintasa) de la via provoqui efectes oposats sobre l'activitat HMGR, suggereix que alguna base hidroxilada de cadena llarga (LCB's), que com ja s'ha comentat en la introducció (**figura 15**) són el producte de la SPT i substrat de la ceramida sintasa, podria actuar com a mediador en aquesta resposta coordinada.

8.3. Anàlisi per Western blot dels nivells de proteïna HMGR en plantes tractades amb miriocina i fumonisina β_1

En l'apartat anterior s'ha demostrat que la inhibició de la biosíntesis d'esfingolípid provoca canvis en l'activitat HMGR. Per determinar si aquests efectes són deguts a canvis en els nivells de proteïna HMGR, es van dur a terme anàlisis per western blot de la fracció sobrenedant 200 x g de les plantes tractades amb miriocina i fumonisina β_1 . Com es pot veure a la **figura 68**, l'anticòs detecta una banda majoritària d'aproximadament 63 KDa, corresponent a la isoforma HMGR1S, i una banda més feble d'aproximadament 69 KDa, corresponent a la isoforma HMGR 1L. A diferència de l'activitat HMGR, que disminueix per efecte del tractament amb miriocina, no s'observa disminució de la quantitat de proteïna HMGR en les diferents mostres de plantes tractades amb concentracions creixents de miriocina (**figura**

68, A). Pel que respecta a les plantes tractades amb diferents concentracions de fumonisina β_1 , tampoc s'observa cap canvi en la quantitat de proteïna HMGR en les diferents mostres de plantes tractades amb concentracions creixents de fumonisina β_1 . Aquests resultats suggereixen els canvis d'activitat HMGR en resposta a la inhibició de la biosíntesis d'esfingolípids són deguts a mecanismes que actuen a nivell post-traduccionals.

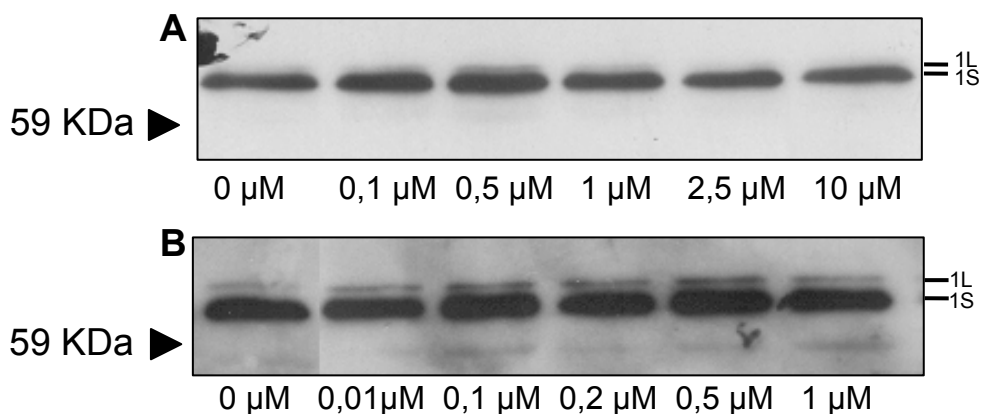


Fig.68. Anàlisi per western blot dels nivells de proteïna HMGR en plantes tractades amb miriocina (A) i fumonisina β_1 (B). Es van fraccionar en cada carril 3 μg de proteïna de la fracció sobrenedant 200 x g d'extractes de plantes Col.3 tractades durant 9 dies en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.1, 0.5, 1, 2.5 i 10 μM de miriocina i amb 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 μM de fumonisina β_1 . Com a anticòs primari es va utilitzar un anticòs policlonal de conill generat contra el domini catalític comú de les isoformes HMGR1S i 1L a una dil.lució 1:5000 i com a anticòs secundari es va utilitzar un anticòs anti-IgG de conill conjugat a peroxidasa a una dil.lució 1:10000. La posició del marcador de massa molecular s'indica a l'esquerra.

8.4. Determinació dels nivells d'esterols en plantes tractades amb miriocina i fumonisina β_1

En els apartats anteriors s'ha demostrat que la miriocina inhibeix indirectament l'activitat de la HMGR, mentre que la fumonisina β_1 en produeix un increment. Per estudiar si aquests efectes sobre l'activitat HMGR es tradueixen realment en una variació en els nivells dels productes finals majoritaris de la via del MVA, els esterols, es van determinar els nivells d'aquests productes en plantes Col.3 creixudes en medi MS durant 20 i 28 dies respectivament, i després durant 9 dies en medi MS suplementat amb 0,5 μM de miriocina i 1 μM de fumonisina β_1 , ja que són les concentracions dels inhibidors que produeixen un efecte més important sobre l'activitat HMGR. El contingut en esterols de les mostres es va analitzar per cromatografia de gasos acoblada a un espectòmetre de masses (Apartat 17; Materials i Mètodes).

Resultats

A les plantes tractades amb 0,5 μM de miriocina s'observa una disminució en el contingut total d'esterols d'un 18% respecte al contingut d'esterols de plantes control crescudes sempre en absència d'inhibidor (**figura 69 A**). Pel que respecta als tres esterols majoritaris en *A. thaliana* els nivells de sitosterol han disminuït un 14%, els de campesterol un 15 %, mentres que la disminució més important es dona en els nivells d'estigmasterol, els quals disminueixen un 328%. Els nivells de isofucosterol, cicloartenol i altres esterols disminueixen un 29%, un 28% i un 25%, respectivament. Aquests resultats indiquen que la inhibició de la via de síntesis d'esfingolípids amb miriocina produeix una disminució en el flux de la via que es tradueix en una disminució en els nivells d'esterols. En les plantes tractades amb fumonisina β_1 (**figura 69 B**) no es detecta cap canvi important en els nivells d'esterols, si bé en general s'observa una lleugera tendència a la disminució dels nivells d'esterols.

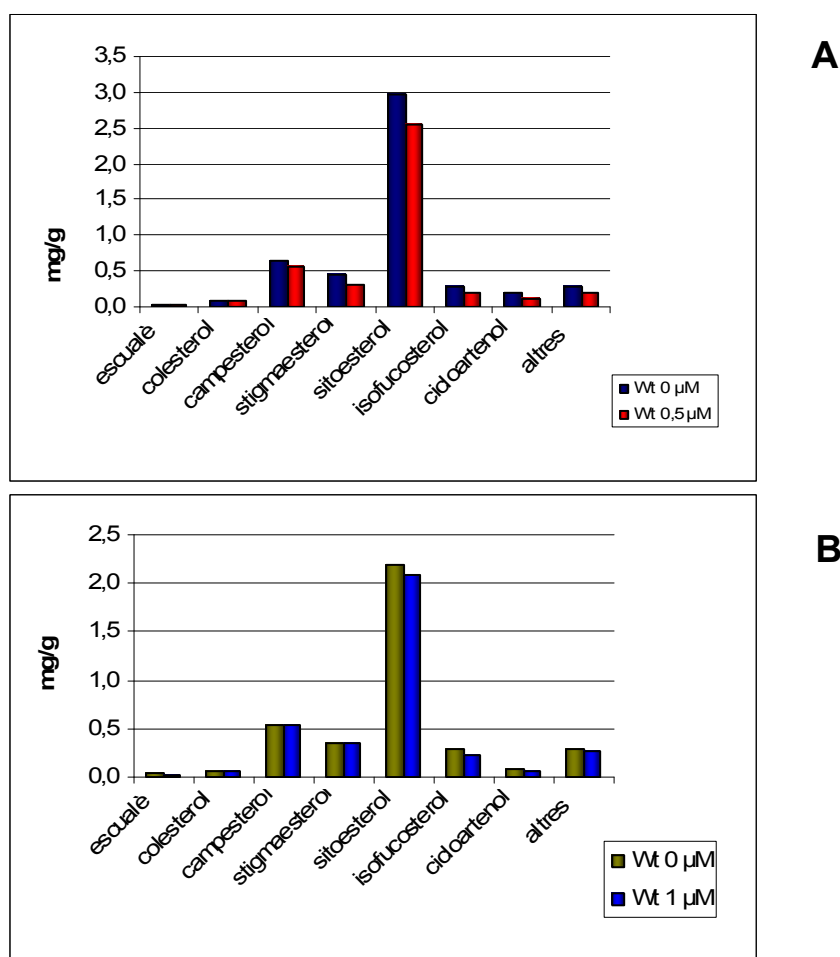


Fig.69. Determinació dels nivells d'esterols en plantes tractades amb miriocina (A) i fumonisina β_1 (B). Els resultats es comparen amb els obtinguts amb plantes control crescudes en absència dels inhibidors. Es van analitzar plantes crescudes en medi MS durant 20 i 28 dies respectivament, i després crescudes durant 9 dies en medi MS amb 0,5 μM de miriocina i 1 μM de fumonisina β_1 . El contingut en esterols es va analitzar per GC/MS. Els nivells dels diferents esterols s'expressen com a mg d'esterols per g de teixit sec. A la figura es mostra un resultat representatiu de tres experiments.

8.5. Activitat HMGR en plantes que sobreexpressen la proteïna HMGR1S tractades amb miriocina

En l'apartat 8.1 s'ha demostrat que la inhibició de la via de síntesis d'esfingolípids amb miriocina produeix una disminució de l'activitat HMGR, tot i que aquesta inhibició no és deguda a una disminució en la quantitat de proteïna HMGR com s'observa en l'anàlisi per western blot mostrat a l'apartat 8.3. Aquests fets suggereixen que la inhibició de l'activitat HMGR per la miriocina té lloc a través d'un mecanisme post-traduccional. Per investigar aquesta possibilitat es van analitzar els efectes de la miriocina en plantes transgèniques que expressen l'ADNc que codifica per la isoforma HMGR1S sota el control del promotor constitutiu 35S del virus del mosaic de la col-i-flor (Manzano et al., 2004). Aquestes plantes contenen uns nivells d'activitat HMGR 20 vegades superiors als de les plantes control. Per a dur a terme aquest experiment es van créixer plantes Columbia 24 (C24) i plantes HMGR1S en plaques amb medi MS durant 20 dies i després es van passar a plaques amb medi MS que contenen 0,5 μ M de miriocina durant 9 dies.

Com s'observa en la **figura 70**, els resultats preliminars mostren que tan en les plantes control C24 com en les plantes HMGR1S la miriocina provoca una disminució de l'activitat HMGR d'unes dues vegades. Aquest resultat ens indica que els efectes de la miriocina sobre l'activitat HMGR tenen lloc a nivell post-transcripcional, ja en les plantes HMGR1S l'expressió de la isoforma HMGR1S no està sotmesa a la regulació de la transcripció del gen salvatge. A més, aquest resultat, juntament amb el fet que la reducció de l'activitat HMGR que provoca la miriocina no s'acompanya d'una disminució en els nivells de proteïna HMGR (com es mostra en l'apartat 8.3), ens indiquen que la miriocina provoca una disminució de l'activitat HMGR mitjançant un mecanisme post-traduccional.

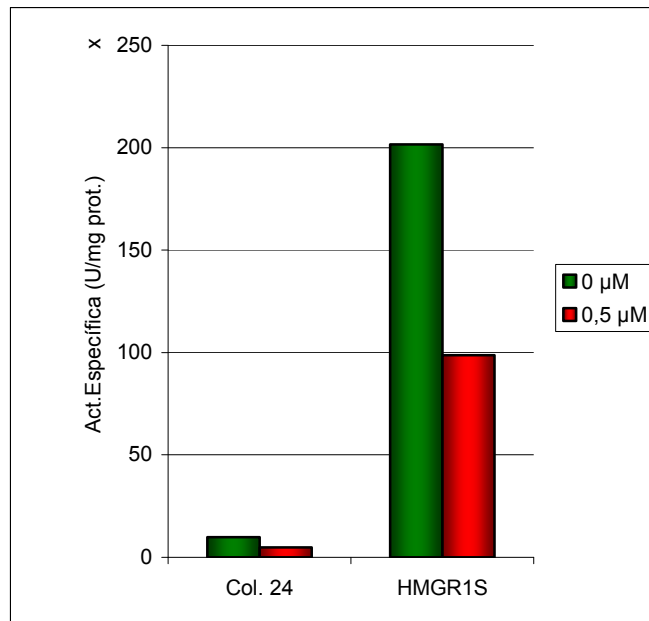


Fig.70. Efecte de la miricic acid sobre el nivell d'activitat HMGR de plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S. Activitat HMGR en plantes salvatges control (Col.24) i plantes que sobreexpressen la isoforma curta de la proteïna HMGR1 (HMGR1S), que es van créixer durant 20 dies en medi MS, i després durant 9 dies més en medi MS i en medi MS suplementat amb 0.5 μM de miricic acid. L'activitat HMGR es ha medid en tots els casos en la fracció 200 x g dels extractes de les plantes senceres i s'expressa com a activitat específica.