

Tesi Doctoral

# **Anàlisi funcional de la regió N-terminal de l'HMG-CoA reductasa d'Arabidopsis**

Memòria presentada per

**Pablo Leivar Rico**

per optar al grau de

**Doctor en Bioquímica**

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Narciso Campos Martínez i

el Dr. Albert Boronat i Margosa

al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la

Facultat de Química de la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat de Bioquímica i Biologia Molecular

Bienni 1997-99

# AGRAÏMENTS

Al començar a escriure aquestes línies me n'adono que no és tan fàcil com semblava, doncs resulta complicat plasmar en paraules la varietat d'agraïments que un sent vers tothom que d'una manera o altra ha contribuït a la realització d'aquest treball.

Volia començar agraint, amb tota sinceritat, a la persona que m'ha permès iniciar-me en aquesta professió i que, en tot moment, ha demostrat confiar en la meva feina i en les meves capacitats. Per això i més, gràcies Albert. Gracias Narciso, por tu contribución al pulido de todo este trabajo. Finalmente has demostrado una implicación encomiable que merece todo mi agradecimiento, y mi deseo que la continuación del proyecto os lleve a tardes de gloria.

Un segon grup d'agraïments corresponen a tota aquella gent que, de manera desinteressada, ha aportat un granet de sorra per construir aquesta tesi. Gracias Alejandro (y a quien le corresponda del laboratorio del Dr. Csaba Koncz) por pasarme a pily, menchu, gigi, lola y demás amiguitos, y por tus buenos ánimos y consejos que tanto me han ayudado. A la Montse Arró del laboratori del Dr. Albert Ferrer, que, de manera indirecta, sempre està present en les nostres tesis, gràcies pels anticossos anti-reductasa. A la Dra. Margarita Torrent, per haver-me passat el pKar6-GFP, i al Dr. Ian Moore, per haver aportat el vector GFP-KDEL. També volia agrair de manera especial a tota la gent dels serveis de seqüenciació i microscopia confocal dels serveis científic-tècnics de la Universitat de Barcelona, així com a tot el personal del departament. Gracias señor Manolo por tu trato tan cercano.

Hi ha un grup de persones que per la seva experiència i proximitat han tingut una influència manifesta sobre la meva *maduresa científica*. Sin ninguna duda, Manuel, muchísimas gracias por tantas cosas, pero en especial por ayudar-me a tener confianza en mi mismo, y por los buenos consejos y asesoramiento en momentos muy importantes para mi. Mucha suerte en tu merecida carrera científica. También tengo palabras muy emotivas para Jaume, aun no me acabo de creer donde estaré el año que viene!!...muchísimas gracias por tu ayuda y tus consejos desinteresados. Mike...tu también eres uno de ellos!! Gracias mil por ser un tío excepcional y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. També tinc unes paraules molt especials pel Xavi, per les grans discussions *reductosomals* que hem pogut mantenir i per la teva meritòria persistència i manera d'entendre la vida... has estat un exemple per mi en molts dels aspectes.

Carles, Víctor... sense paraules!!! Heu sigut, en tots els sentits, exemplars. Al Víctor li he d'agrair els meus primers *pinitos* en reductasa...entranyable. He disfrutat moltíssim discutint de tantes matèries, o, més aviat, sentint-te discutir...quina *labia*. I el Carles...que dir? em sento que hem estat autèntics germans al laboratori. Els dos heu estat unes referències excel·lents, i de veritat, us trobaré faltar. Y tú quien eres? Lorenzo, uno simpático, no? Desde luego, el tan preciado enlace entre trabajo y ocio, la cantidad de vivencias compartidas, esos momentos carcajada y esos otros de angustia. En definitiva, un amigo. També és obligat agrair a tanta gent que ha permès una convivència excel·lent en el dia a dia del laboratori. A la Patricia, que

tot i arribar la última, ha aportat una gran frescura a l'ambient del laboratori, con gente como tu se hace muy fácil trabajar, suerte y espero que sigamos coincidiendo... A la Susi, *mi discípula prefe*, que per equivalència ens ha permès aprendre tantes coses junts, ens veurem a SF? A l'Ana Ramos (qué valiente y cercana!), a l'Ester Diez (sort per la següent tesi?), al Ludo, a la Queralt. També he d'agrair a d'altres que en un moment o altre han passat pel laboratori: la Mari i l'Ana del Arco (vaja ambient de gimnàs, eh?), al compañero poeta Ivan, al que tanto estrañamos, a los compadres venidos del mismo Chile Eric, Rodrigo y Blanquita, a l'Elisa de milano, a l'Ana super-matilda de Vic, a la Ester Ibáñez (a pel segon!) a la Paqui, a la Ruth, a la Cinta, a la Puri, a l'Elias, al Toni Comaposada. I *como no*, a l'Ana Orozco, que ha estat un suport excel·lent en el dia a dia, tant a nivell tècnic com a nivell humà.

He d'agrair de manera molt especial a la Meritxell Antolín del laboratori del Dr. Santiago Imperial. Ella ha contribuït de manera directa en aquest treball, i la seva aportació ha permès arribar una mica més lluny en alguns del aspectes: visca el comando levadura!!! Però al laboratori veí també hi ha una gran quantitat d'amiguets. Per amics l'Oscar, amb qui hem compartit feina, amics i teletubie, oi? Moltíssimes gràcies per haver-me cuidat tan bé quan ho he necessitat, i quan no...també!!! Als Jordis, uno sin y el otro con, heu estat companys magnífics, un desde temps ja de la carrera, i, l'altre, per donar-nos joventut i genuïtat. Però també al Víctor, a la Montse petita, al chiquitin, al Cristóbal o al Joan, i, a més a més, a la Dra. Montse Busquets, al Dr. Santiago Imperial i al Dr. Antonio Cortés. També és de justícia agrair a tots els homòlegs farmacèutics: Núria, Oriol, Toni, Àngels, Dr. Albert Ferrer i, per suposat, al Manzano, amb qui hem pogut compartir estones de feina i d'oci vàries amb bastant d'èxit, sobretodo de las segundas, verdad? També hi ha hagut una gran interacció amb altres companys del departament, i per tant ofereixo el meu reconeixement per tots ells. Entre ells voldria fer menció explícita pel Paco i pel Javi, sempre atents amb els *pull-downs*, i, per suposat, a Mario super-starr, el más dicharachero de por estos lares.

I arriba tota aquella colla de gent que pel seu suport anímic constant, tenen una importància vital per una bona feina. Visca tota la colla del calçot, masiera o acané, i també als ja Scottish (es mucho papel..., eh Parriqui?), els moments que he passat amb vosaltres han estat realment entranyables. Al saca (hop-hop, quin gran amic) i la Eva (visca les empanades!), als companys MacLuis i la MacSònia, i el MacCarlos (ya chilla Genova...presente!! desde villaabajo, sort en la vostra aventura!!), al clan precoç MacParra i MacBuixadé (i MacSuperman, presente!!; us veurem a la costa oest??), al MacLegumbres i la MacBlanca (radio bamba aquí presente!!!... quants moments imborrables!!), i al MacPallas i la MacVero (beures, mixos, triskas y niebla...presentes!!), al Rafa i a la Núria (no estaréis con una gente, no?), al Lorenzo somos raperos, a la Fernan (todo el dia iendo y viniendo... suerte amiga), Camilo (vaya estilo!), Patrícia (aquí no s'esmorza o què?), Gerlac, Eulàlia (6 euros, sí, al punt de trobada), Josep Maria, O.sanz (y ese ping-pau!!), Neus... a tots, que superman us acompanyi!!

Si fins ara tot eren agraïments, ara venen les disculpes. Efectivament hi ha molta altra gent que per la dedicació que implica una tesis ha quedat, en certa manera, descuidada. En aquest apartat estan els considerats amigotes de sempre: el Lluís, no t'oblidis, sempre seràs el cocoliso sixty, l'Axel, a veure quan et doctores en guitarra, que t'estem esperant!!, i el Raúl,

que també te queremos ver en el cine little brother!!! Peluquis heu demostrat tenir una paciència impressionant amb mi, no sabeu com ho valoro.

Y también hay palabras para mi familia Carretera de Almeria: Carreteros-Paulet, Maribel, Provi, Laurica, Inés, Gaspar, Pacope, Linde, Cortés, Peluca, Caroline, Huevo, Luzma..y muchos que me olvido. Por activa o por pasiva, podría contaros millones de anécdotas vuestras.

Afortunadament, aquest període de cinc anys m'ha permès explorar altres habilitats, que ben segur m'han ajudat a tirar això endavant. Dani, Mireia, Joana, Aina, Carmina, he passat grans estones amb vosaltres que espero recuperar un cop haguem passat aquest tràmit tant intens. Us esperem, a tots, als US. Moltíssimes gràcies a tota la colla de lindy hopperos, Vicky, Laura, Jaume i demés, encara que ara estem desapareguts, espero tornar a involucrar-me en aquesta moguda tan sana i apassionant. També volia agrair a tots els companys de feina (aupa genètica!) i amics (visca la colla de *nenes* del Santana) de la Sara, doncs d'una manera o altra hem coincidit quantitat de vegades en aquests anys.

Muchas gracias por el apoyo y comprensión de toda la familia Cervantes-Roldán: Maria Luisa y Pedro, esos suegros tan modernos y digitalizados, Berta i Jordi *Fi-gueres*, els millors companys *queixaladeros* de la zona!, y, por supuesto, a la Tata, a Leandro y a Malali.

Finalmente, es de justicia agradecer a quienes dedico esta tesis. Muchísimas gracias Mamá, Papá y Dani por todo lo que representáis para mi, en especial por vuestra adaptación, comprensión, apoyo y ayuda que me habéis ofrecido todos estos años. Este agradecimiento lo hago extensivo a Elvira y al resto de familia de Barcelona (Fernando, Isabel, Sílvia, Marta, Xavi y David), y a la familia y amigos de Medina de pomar, Aldeamayor de San Martín, Mojados y derivados, a quienes no he podido ir a ver desde hace tiempo.

Amb ningú no he compartit amb més profunditat que amb tu, Sara, el que representa fer una tesis. No tinc cap dubte que tot això ha pogut ser construït gràcies a un treball en equip, infinites gràcies per ajudar-me a *créixer* en tots els sentits...



# ÍNDEX

## **ABREVIATURES** .....i

## **1. INTRODUCCIÓ**

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.1   | IMPORTÀNCIA BIOLÒGICA I COMPLEXITAT BIOSINTÈTICA DELS ISOPRENOIDES VEGETALS.....  | 1  |
| 1.1.1 | Distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides .....  | 2  |
| 1.1.2 | La ruta del mevalonat .....   | 2  |
| 1.1.3 | L'enzim HMG-CoA reductasa catalitza una etapa limitant de flux en la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics.....                | 3  |
| 1.2   | FAMÍLIES MULTIGÈNIQUES IMPLICADES EN LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES CITOSÒLICS: INTRODUCCIÓ A L'ESPECIALITZACIÓ FUNCIONAL ..... | 5  |
| 1.2.1 | Especialització funcional de les isoformes d'HMGR en plantes .....  | 6  |
| 1.2.2 | La família multigènica <i>HMG</i> d' <i>Arabidopsis</i> .....   | 7  |
| 1.2.3 | Existeix una especialització funcional de les isoformes d'HMGR d' <i>Arabidopsis</i> ? .....                                  | 8  |
| 1.3   | L'HMGR DE PLANTES.....  | 9  |
| 1.3.1 | Estructura .....  | 9  |
| 1.3.2 | Regulació .....   | 10 |
| 1.3.3 | Importància del domini N-terminal en la regulació i localització subcel·lular de l'HMGR de plantes .....                      | 12 |
| 1.4   | MODELS D'ORGANITZACIÓ DE LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES CITOSÒLICS .....  | 15 |
| 1.4.1 | Organització de la via en canals metabòlics .....   | 15 |
| 1.4.2 | Subcompartimentació de l'HMGR en subdominis del reticle endoplasmàtic.....  | 15 |
| 1.4.3 | La regió N-terminal citosòlica com a candidata a determinar mecanismes específics d'isoforma .....                            | 17 |
| 1.5   | LA PROTEÏNA FOSFATASA 2A (PP2A).....  | 19 |
| 1.5.1 | Estructura i funció .....   | 19 |
| 1.5.2 | La subunitat reguladora B'' de la PP2A .....  | 21 |
| 1.5.3 | La PP2A de plantes .....  | 22 |
| 1.6   | LES QUINESINES.....   | 24 |
| 1.6.1 | Funció biològica i diversitat .....   | 24 |
| 1.6.2 | La quinesina de tipus I o convencional .....  | 25 |
| 1.6.3 | Les quinesines de plantes .....   | 28 |

## **OBJECTIUS**

|                 |    |
|-----------------|----|
| OBJECTIUS ..... | 31 |
|-----------------|----|

## 2. MATERIALS I MÈTODES

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.1    | EL MATERIAL BIOLÒGIC.....  | 33 |
| 2.1.1  | Soques bacterianes.....  | 33 |
| 2.1.2  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 33 |
| 2.1.3  | Línia cel·lular T87.....   | 34 |
| 2.1.4  | <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 34 |
| 2.2    | ELS ANTICOSSOS.....  | 34 |
| 2.3    | ELS PLASMIDIS.....   | 35 |
| 2.3.1  | El sistema del doble híbrid.....   | 35 |
| 2.3.2  | Localització subcel·lular.....   | 39 |
| 2.3.3  | Vectors per l'expressió de proteïnes en plantes transgèniques.....                           | 40 |
| 2.3.4  | Expressió en <i>E.coli</i> .....   | 40 |
| 2.3.5  | Transcripció-traducció <i>in vitro</i> .....   | 41 |
| 2.3.6  | Clonatge dels cDNAs complets corresponents a PR2A1, PR2A2 i KLC1.....                        | 42 |
| 2.4    | ELS OLIGONUCLEÒTIDS.....   | 43 |
| 2.5    | MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC.....  | 45 |
| 2.5.1  | Mètodes de treball en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                                  | 45 |
| 2.5.2  | Condicions de cultiu d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                               | 45 |
| 2.5.3  | Manteniment de la línia cel·lular T87.....   | 46 |
| 2.5.4  | Condicions de cultiu de les plantes d' <i>Arabidopsis</i> .....                              | 46 |
| 2.6    | IDENTIFICACIÓ DE L'HMGR EN TEIXITS VEGETALS.....   | 47 |
| 2.6.1  | Preparació de teixits d' <i>Arabidopsis</i> .....  | 47 |
| 2.6.2  | Immunodetecció de l'HMGR en extractes de teixits.....  | 48 |
| 2.6.3  | Fraccionament subcel·lular de l'HMGR per centrifugació diferencial.....                      | 48 |
| 2.6.4  | Solubilització de les diferents isoformes de l'HMGR amb detergents.....                      | 49 |
| 2.7    | LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR.....   | 50 |
| 2.7.1  | Microbombardeig de fulles d' <i>Arabidopsis</i> .....  | 50 |
| 2.7.2  | Transformació de les cèl·lules de la línia T87 mediada per <i>Agrobacterium</i> .....        | 51 |
| 2.7.3  | Immunolocalització de l'HMGR en cèl·lules de la línia T87.....                               | 52 |
| 2.7.4  | Microscopia làser confocal.....  | 53 |
| 2.8    | ANÀLISI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID.....         | 53 |
| 2.9    | CRIVELLATGE D'UNA GENOTECA DE cDNA D'ARABIDOPSIS MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID..... | 53 |
| 2.10   | GST PULL-DOWN.....   | 54 |
| 2.10.1 | Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST a partir d' <i>E.coli</i> .....        | 54 |
| 2.10.2 | Transcripció-traducció <i>in vitro</i> .....   | 55 |
| 2.10.3 | Assaig d'interacció de tipus GST pull-down.....  | 55 |
| 2.10.4 | Fluorografia.....  | 56 |
| 2.11   | PURIFICACIÓ DEPENDENT DE CALCI DE L'HMGR EN UNA MATRIU D'AFINITAT AMB GST-PR2A1.....         | 56 |
| 2.12   | PURIFICACIÓ DE L'HMGR1L EN UNA MATRIU D'AFINITAT AMB GST-KLC1.....                           | 57 |
| 2.13   | OBTENCIÓ DE LES PLANTES TRANSGÈNIQUES D'ARABIDOPSIS HA:KLC1 I HA:TPR.....                    | 59 |
| 2.13.1 | Preparació de les plantes d' <i>Arabidopsis</i> per a la seva transformació.....             | 59 |
| 2.13.2 | Transformació pel mètode floral simplificat <i>floral dip</i> .....                          | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 2.13.3 Selecció de les plantes transformants .....                           | 59 |
| 2.13.4 Immunodetecció i fraccionament subcel·lular d'HA:KLC1 i d'HA:TPR..... | 60 |
| 2.14 BIOINFORMÀTICA.....   | 61 |

### 3. RESULTATS

|   |    |
|---|----|
| 3.1 IDENTIFICACIÓ DE LES ISOFORMES D'HMGR EN DIFERENTS TEIXITS I FRACCIONS<br>SUBCEL·LULARS D'ARABIDOPSIS .....   | 63 |
| 3.1.1 Immunodetecció de l'HMGR en teixits d'Arabidopsis .....   | 63 |
| 3.1.2 Fraccionament de l'HMGR per centrifugació diferencial .....   | 64 |
| 3.1.3 Solubilitat de les diferents variants electroforètiques de l'HMGR.....  | 65 |
| 3.2 PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE<br>L'ENZIM.....  | 67 |
| 3.2.1 Substitució del domini catalític de les isoformes de l'HMGR per la GFP .....  | 67 |
| 3.2.2 Localització subcel·lular de les quimeres 1L:GFP, 1S:GFP i 2:GFP en fulles<br>d'Arabidopsis .....   | 68 |
| 3.2.3 Localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP, 1L:GFP i 2:GFP en cèl·lules de la<br>línia T87 .....  | 70 |
| 3.3 IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES QUE INTERACCIONIN AMB LA REGIÓ N-TERMINAL<br>CITOSÒLICA DE L'HMGR .....  | 72 |
| 3.3.1 El doble híbrid com a eina per l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna .....  | 72 |
| 3.3.2 Cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L<br>(NT1L) .....   | 73 |
| 3.3.3 Capacitat d'homo i heterodimerització dels enzims que catalitzen les primeres<br>etapes de la via del mevalonat .....   | 75 |
| 3.3.4 Interacció proteïna-proteïna entre els enzims que catalitzen les primeres etapes de<br>la via del mevalonat.....  | 77 |
| 3.4 CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE L'HMGR AMB LES SUBUNITATS REGULADORES<br>PR2A1 I PR2A2 DE LA PP2A .....   | 79 |
| 3.4.1 PR2A1 i PR2A2 formen part d'una família multigènica a Arabidopsis .....   | 79 |
| 3.4.2 PR2A1 i PR2A2 són membres de la família B'' de subunitats reguladores de la PP2A<br>.....   | 82 |
| 3.4.3 PR2A1 i PR2A2 interaccionen específicament amb la regió N-terminal citosòlica de<br>les isoformes HMGR1S i HMGR1L, però no amb la de l'HMGR2.....   | 86 |
| 3.4.4 Purificació depenent de calci de les isoformes HMGR1L i HMGR1S mitjançant una<br>matriu d'afinitat amb PR2A1.....   | 87 |
| 3.4.5 La interacció de PR2A1 amb l'HMGR1 s'acota a una seqüència peptídica d'onze<br>aminoàcids que inclou els residus d'arginina del motiu conservat i una regió adjacent rica<br>en prolina ..... | 90 |
| 3.4.6 Paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en la localització<br>subcel·lular de la quimera 1S:GFP.....   | 92 |
| 3.5 CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE L'HMGR AMB LA KLC1, UNA PROTEÏNA AMB<br>SIMILITUD A LA CADENA LLEUGERA DE QUINESINA DE TIPUS I O CONVENCIONAL.....  | 94 |
| 3.5.1 KLC1 forma part d'una família multigènica en Arabidopsis .....  | 94 |
| 3.5.2 KLC1 té similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I.....   | 96 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.5.3 | Detecció del transcrit KLC1 en teixits d'Arabidopsis .....                    | 98  |
| 3.5.4 | La regió 1Lextra de l'HMGR1L està implicada en la interacció amb KLC1.....    | 99  |
| 3.5.5 | Purificació de l'HMGR1L mitjançant una matriu d'afinitat que conté KLC1 ..... | 101 |
| 3.5.6 | Identificació de dos dominis funcionals en la KLC1 .....                      | 101 |

## 4. DISCUSSIÓ

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.1   | IDENTIFICACIÓ DE LES ISOFORMES DE L'HMGR EN DIFERENTS TEIXITS I FRACCIONS SUBCEL·LULARS D'ARABIDOPSIS.....                                     | 105 |
| 4.1.1 | Les isoformes HMGR1S i HMGR1L es distribueixen diferencialment en Arabidopsis ... ..   | 105 |
| 4.1.2 | Les isoformes HMGR1S i HMGR1L es troben en fraccions subcel·lulars diferents ..  | 106 |
| 4.1.3 | Solubilització de les isoformes HMGR1S i HMGR1L amb detergents.....  | 108 |
| 4.2   | EL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR DETERMINA LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'ENZIM .....   | 109 |
| 4.2.1 | Les isoformes HMGR1S i HMGR2 es localitzen en el reticle endoplasmàtic i en estructures vesiculars.....  | 109 |
| 4.2.2 | El domini 1Lextra determina l'acumulació de la isoforma HMGR1L en el RE.....   | 111 |
| 4.2.3 | Paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en el transport de la isoforma HMGR1S a les estructures vesiculars.....           | 112 |
| 4.3   | INTERACCIONS DE L'HMGR AMB ALTRES PROTEÏNES.....   | 114 |
| 4.3.1 | La regió N-terminal citosòlica i el domini catalític de l'HMGR estan implicats en interaccions proteïna-proteïna.....                          | 114 |
| 4.3.2 | Els enzims AACT, HMGS, HMGR I MVK no interaccionen en el sistema del doble-híbrid .....  | 115 |
| 4.4   | LES ISOFORMES HMGR1L I HMGR1S INTERACCIONEN AMB LA SUBUNITAT REGULADORA B'' DE LA PP2A .....   | 117 |
| 4.4.1 | Les proteïnes PR2A1 i PR2A2 formen part de la família de subunitats reguladores B'' de la PP2A .....   | 117 |
| 4.4.2 | Les proteïnes PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la regió N-terminal citosòlica comuna entre les isoformes HMGR1L i HMGR1S.....                   | 117 |
| 4.4.3 | Paper del calci en la interacció de PR2A1 amb l'HMGR .....   | 118 |
| 4.4.4 | Els residus d'arginina del motiu conservat i una regió adjacent rica en prolina estan implicats en la interacció de l'HMGR1 amb la PR2A1 ..... | 120 |
| 4.4.5 | Implicacions funcionals de la interacció de PR2A1 i PR2A2 amb les isoformes HMGR1L i HMGR1S.....   | 121 |
| 4.4.6 | Diversitat d'isoformes de la subunitat reguladora B'' de la PP2A d'Arabidopsis.....  | 124 |
| 4.5   | LA ISOFORMA HMGR1L INTERACCIONA AMB KLC1.....  | 125 |
| 4.5.1 | KLC1 presenta similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I.....  | 125 |
| 4.5.2 | Identificació de dominis funcionals en KLC1 .....  | 126 |
| 4.5.3 | La regió 1Lextra de la isoforma HMGR1L està implicada en la interacció amb la KLC1 .....   | 128 |
| 4.5.4 | Implicacions funcionals de la interacció de la KLC1 amb l'HMGR1L .....   | 129 |
| 4.6   | MODEL INTEGRAT DE SUBCOMPARTIMENTACIÓ DE LA BIOSÍNTESIS DE MEVALONAT.....  | 131 |

**CONCLUSIONS**

CONCLUSIONS ..... 133

**BIBLIOGRAFIA**

BIBLIOGRAFIA..... 137



**ABREVIATURES**

|            |   |
|------------|---|
| AACT       | Acetoacetil Coenzim A tiolasa                                       |
| AD         | Domini d'activació de GAL4  |
| AMP        | Adenosina 5'-monofosfat   |
| ASBD       | Domini d'unió a la subunitat A de la PP2A                           |
| 3-AT       | 3-amino-1,2,4-triazol   |
| ATP        | Adenosina 5'-trifosfat  |
| BD         | Domini d'unió al DNA de GAL4  |
| BSA        | Sèrum d'albumina bovina   |
| CD         | Domini catalític de l'HMGR  |
| cDNA       | DNA còpia   |
| CG-NAP     | <i>Centrosome and Golgi localized PKN-associated protein</i>        |
| CoA        | Coenzim A   |
| C-terminal | Carboxi-terminal  |
| Da, kDa    | Dalton, kilodalton  |
| DM         | Domini de membrana de l'HMGR  |
| DMAPP      | Dimetilal·lildifosfat   |
| DMSO       | Dimetilsulfòxid   |
| DNA        | Àcid desoxirribonucleic   |
| DXP        | Desoxixil·lulosa 5-fosfat   |
| DO         | Densitat òptica   |
| DTT        | Ditiotreitol  |
| EDTA       | Àcid etilendiaminotetracètic  |
| EGTA       | Àcid etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracètic |
| EST        | <i>Expressed sequence tag</i>                                       |
| FPP        | Farnesildifosfat  |
| FPS        | Farnesildifosfat sintasa  |
| G3P        | D-gliceraldehid 3-fosfat  |
| GFP        | Proteïna fluorescent verda  |
| GGPP       | Geranilgeranildifosfat  |
| GGPS       | Geranilgeranildifosfat sintasa                                      |
| GPP        | Geranildifosfat   |
| GPS        | Geranildifosfat sintasa   |
| GRIP1      | <i>Glutamate receptor interacting protein 1</i>                     |
| GST        | Glutatió-S-transferasa  |
| HMG-CoA    | 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzim A                                 |
| HMGR       | HMG-CoA reductasa   |
| HMGS       | HMG-CoA sintasa   |
| HRK        | HMGR quinasa  |

## 1.1 IMPORTÀNCIA BIOLÒGICA I COMPLEXITAT BIOSINTÈTICA DELS ISOPRENOIDES VEGETALS

Les plantes sintetitzen una gran varietat de compostos isoprenoides que es correspon amb una gran diversitat d'estructures i funcions (figura 1). Alguns d'aquests compostos isoprenoides són essencials pel creixement i desenvolupament de la planta (fitohormones, pigments fotosintètics, esterols, etc.) mentre que d'altres juguen un paper important en la interacció de la planta amb el seu entorn, com per exemple els monoterpens volàtils o els sesquiterpens de defensa (revisat a McCaskill, 1998; Chappell, 2002). En contrast amb la seva gran diversitat, tots els compostos isoprenoides deriven d'un precursor comú de cinc àtoms de carboni, l'isopentenil difosfat (IPP). Per l'addició successiva d'IPP sobre el seu isòmer actiu (el dimetilal·lildifosfat o DMAPP) es sintetitzen una sèrie de prenildifosfats de cadena lineal per l'acció de les prenilttransferases (figura 1). D'aquesta manera es sintetitzen el geranildifosfat o GPP (de 10 carbonis o C10), el farnesildifosfat o FPP (C15) i el geranilgeranildifosfat o GGPP (C20). A partir d'aquests prenildifosfats deriven les diferents branques de la via, on es produeixen elongacions electrofíliques, ciclacions i reordenacions per tal d'originar tota la varietat d'isoprenoides. (revisat a Gray, 1987; Chappell, 1995b; McGarvey i Croteau, 1995). En base a això, els isoprenoides s'han classificat en funció del nombre de carbonis. Així, els compostos de 5 carbonis (C5) s'anomenen hemiterpens i deriven de l'IPP; els compostos C10 s'anomenen monoterpens i deriven del GPP; els compostos C15 s'anomenen sesquiterpens i deriven del FPP; els compostos C20 s'anomenen diterpens i deriven del GGPP. Per condensació de dues molècules de FPP es produeixen els triterpens (C30), mentre que per condensació de dues molècules de GGPP es produeixen els tetraterpens (C40). Es pot observar que tots els isoprenoides tenen un número de carbonis múltiple de 5, doncs deriven del precursor IPP o isoprè. En conjunt, estem davant d'una via metabòlica extremadament complexa i ramificada, i de vital importància per la planta.

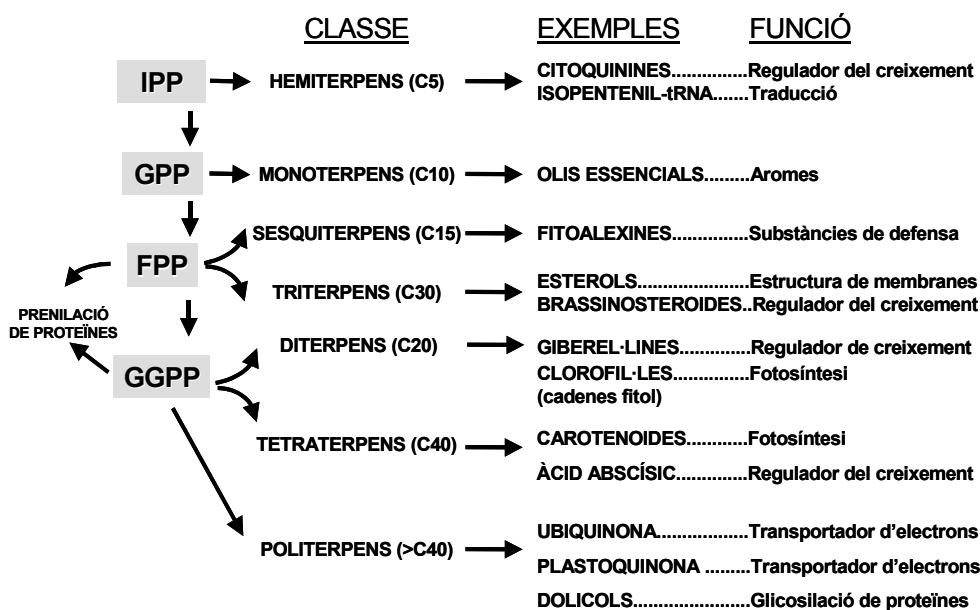
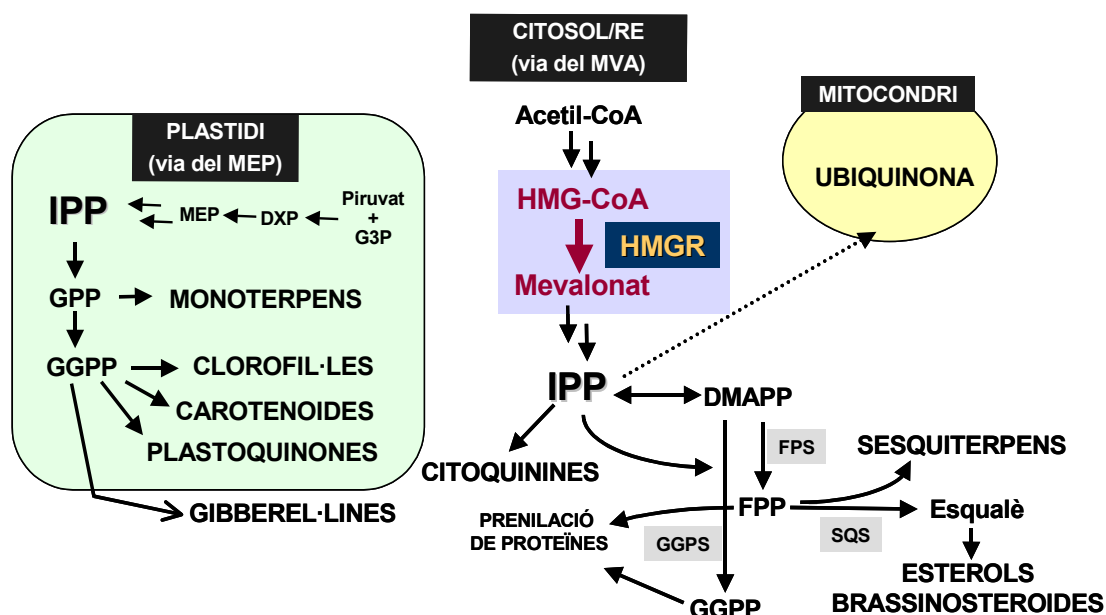


Figura 1. Esquema de la biosíntesi d'isoprenoides a partir dels prenildifosfats IPP, GPP, FPP i GGPP.

### 1.1.1 Distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides

En els últims anys, s'ha pogut establir que en les plantes existeixen dues rutes de biosíntesi d'IPP independents que operen en diferents compartiments subcel·lulars. Per una part, la ruta del mevalonat (MVA) està localitzada en el citosol/reticle endoplasmàtic i utilitza acetil-CoA per la producció d'IPP (figura 2). L'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR), objecte d'estudi del present treball, catalitza la conversió d'HMG-CoA en mevalonat, etapa considerada com a limitant de flux en la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics. D'altra banda, la ruta del metileritritol-4-fosfat (MEP), que s'ha dilucidat recentment, utilitza piruvat i gliceraldehid-3 fosfat (G3P) per a la producció d'IPP i està localitzada als plastidis (revisat a Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). La compartimentació subcel·lular de la via permet la biosíntesi d'isoprenoides al citosol/reticle endoplasmàtic o RE (on es produeixen principalment esterols), als plastidis (on es produeixen bàsicament les cadenes de fitol de les clorofil·les i els carotenoides) i als mitocondris (on es produeix l'ubiquinona).

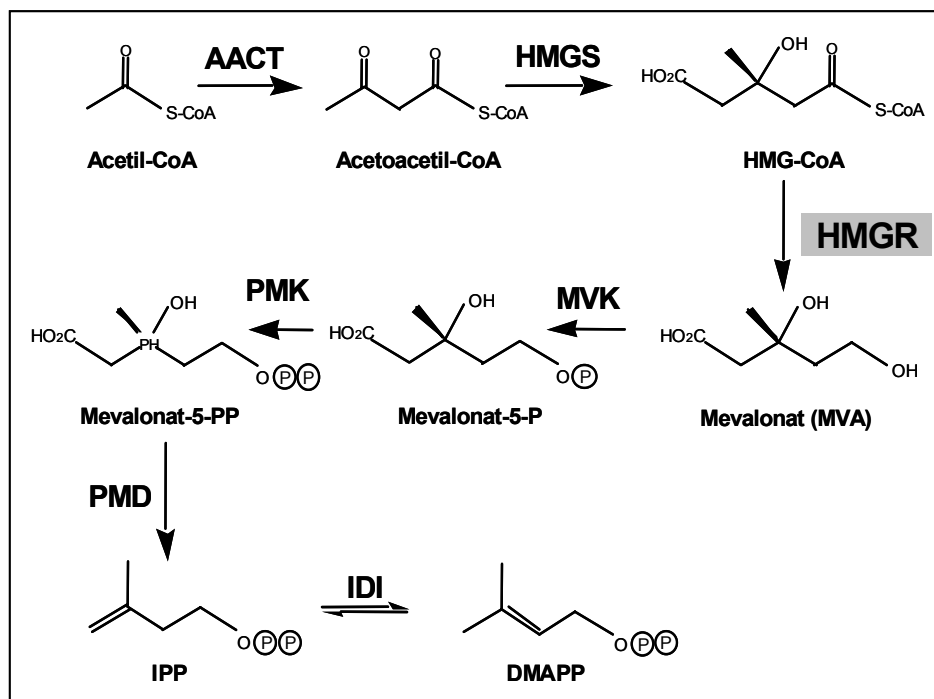


**Figura 2.** Esquema simplificat de la distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides en cèl·lules vegetals (adaptat de Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). S'ha destacat la reacció catalitzada per l'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR), objecte d'estudi del present treball. També es mostra les reaccions catalitzades per l'esqualè sintasa o SQS (primera etapa específica de la biosíntesi d'esterols), la farnesildifosfat sintasa o FPS i la geranilgeranildifosfat sintasa o GGPS.

### 1.1.2 La ruta del mevalonat

Tal com s'ha indicat anteriorment, la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics es produeix a partir de l'IPP generat a través de la ruta del MVA. Aquesta ruta metabòlica (revisada a McGarvey i Croteau, 1995) s'inicia amb la condensació seqüencial de tres molècules d'acetil-CoA (figura 3) per produir 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzim A (HMG-CoA), i s'aconsegueix en dues reaccions independents catalitzades pels enzims acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) i HMG-CoA sintasa (HMGS). L'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR) redueix l'HMG-CoA i produeix MVA, que

és la primera molècula específica de la ruta. Posteriorment, el MVA és doblement fosforilat per l'acció de la mevalonat quinasa i la fosfomevalonat quinasa (MVK i PMK, respectivament). Finalment, l'enzim mevalonat 5-difosfat descarboxilasa (PMD) promou la descarboxilació del mevalonat-5-PP per donar lloc a la molècula d'IPP. L'enzim IPP isomerasa (IDI) catalitza la isomerització de l'IPP en el seu isòmer actiu DMAPP.



**Figura 3.** La ruta del mevalonat. AACT: acetoacetil-CoA tiolasa; HMGS: HMG-CoA sintasa; MVK: mevalonat quinasa; PMK: fosfomevalonat quinasa; PMD difosfomevalonat descarboxilasa; IDI: IPP isomerasa (adaptat de González, 2002).

### 1.1.3 L'enzim HMG-CoA reductasa catalitza una etapa limitant de flux en la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics

L'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzim A reductasa (HMG-CoA reductasa o HMGR) catalitza la conversió irreversible d'HMG-CoA en mevalonat, utilitzant NADPH com a donador d'electrons i requerint d'un grup tiol reduït per una activitat òptima. L'HMGR ha estat àmpliament estudiada en mamífers i en llevat, doncs catalitza una etapa limitant de flux en la biosíntesi de colesterol i ergosterol, respectivament (revisat a Goldstein i Brown, 1990; Hampton, 2002). En aquests sistemes, la cèl·lula exerceix un control molt fi sobre l'activitat HMGR, que s'aconsegueix mitjançant múltiples mecanismes reguladors que actuen a temps curts (inhibició competitiva, efectes al·lostèrics, fosforilació reversible i proteòlisi regulada mediada per proteosoma) i a llarg termini (transcripcional). També s'han descrit mecanismes que controlarien l'estabilitat del missatger i l'eficiència traduccional (revisat per Goldstein i Brown, 1990).

En el cas de les plantes, s'ha proposat que l'HMGR també catalitza la primera etapa limitant per la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics com els esterols (Stermer *et al.*, 1994;

Chappell *et al.*, 1995; González, 2002). Tot i així, donada la complexitat biosintètica i la diversitat de funcions que exerceixen els isoprenoides en les plantes, és lògic pensar que tant la organització de la via com els mecanismes de regulació de les activitats enzimàtiques (com l'HMGR) siguin, fins i tot, més complexes que en animals o llevats. A continuació, es presenten alguns aspectes d'organització gènica, regulació i estructura de l'HMGR de plantes que, efectivament, suggereixen una divergència respecte els models d'animal i de llevat (Chappell, 1995b; McGarvey i Croteau, 1995; McCaskill, 1998).



## 1.2 FAMÍLIES MULTIGÈNIQUES IMPLICADES EN LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES CITOSÒLICS: INTRODUCCIÓ A L'ESPECIALITZACIÓ FUNCIONAL

Un aspecte característic de la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics en plantes és que molts dels enzims de la via estan codificats per famílies multigèniques. Són nombroses les aportacions que s'han fet en aquest sentit en diferents sistemes vegetals, on el nombre de gens de cada família varia en funció de l'espècie. A tall d'exemple, la família multigènica de l'HMGR presenta 2 gens en *Arabidopsis*, 3 en arròs, 4 en tomàquet o 9 en patata. En el cas d'*Arabidopsis*, diferents enzims de la via presenten famílies multigèniques (taula 1). No és estrany que els diferents gens de cada família s'expressin de manera diferencial i/o produeixin isoformes enzimàtiques amb localitzacions subcel·lulars diferents. Aquests fets suggereixen que la maquinaria biosintètica d'isoprenoides s'ajusta finament a les necessitats d'isoprenoides específics de cada teixit o tipus cel·lular.

**Taula 1.** Famílies multigèniques que codifiquen per alguns dels enzims de la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics en *Arabidopsis* (adaptat de Marín, 2003).

| Enzim                                     | Gens         | Isoformes | Característiques                                      | Referències  |
|---|--------------|-----------|---|--|
| Acetoacetyl-CoA tiolasa (AAT)             | <i>AAT1</i>  | AAT1      | Citosòlica; Expressió constitutiva                    | (Ahumada, 2001)  |
|   | <i>AAT2</i>  | AAT2      | Peroxisomal; Expressió en inflorescències i en arrels |  |
| HMG-CoA sintasa (HMGS)                    | <i>HMGS1</i> | HMGS      |   | Diez i col, comunicació personal                             |
| HMG-CoA reductasa (HMGR)                  | <i>HMG1</i>  | HMGR1L    | Expressió en plàntules, arrels i inflorescències      | (Enjuto <i>et al.</i> , 1994)                                |
|   |              | HMGR1S    | Expressió constitutiva                                | (Lumbreras <i>et al.</i> , 1995)                             |
|   | <i>HMG2</i>  | HMGR2     | Expressió en teixits meristemàtics i florals          | (Enjuto <i>et al.</i> , 1995)                                |
| Mevalonat quinasa (MVK)                   | <i>MVK</i>   | MVK       | Expressió constitutiva                                | (Lluch, 2000)  |
| Fosfomevalonat quinasa (PMK)              | <i>PMK</i>   |           |   |  |
| Mevalonat 5-difosfat descarboxilasa (PMD) | <i>PMD1</i>  | PMD1      |   | (Cordier <i>et al.</i> , 1999)<br>(Lange i Ghassemian, 2003) |
|   | <i>PMD2</i>  | PMD2      |   |  |
| Farnesildifosfat sintasa (FPS)            | <i>FPS1</i>  | FPS1L     | Mitocondrial; expressió en inflorescències            | (Cunillera <i>et al.</i> , 1997)                             |
|   |              | FPS1S     | Citosòlica; Expressió constitutiva                    | (Cunillera <i>et al.</i> , 1996)                             |
|   | <i>FPS2</i>  | FPS2      | Expressió en inflorescències                          | (Cunillera <i>et al.</i> , 2000)                             |
| Esqualè sintasa (SQS)                     | <i>SQS1</i>  | SQS1      | citosòlica/RE   | (Del Arco, 1999)   |
|   | <i>SQS2</i>  | SQS2      |   |  |

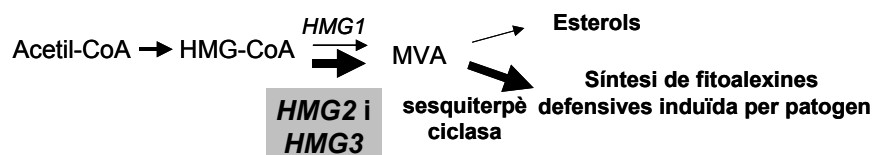
### 1.2.1 Especialització funcional de les isoformes d'HMGR en plantes

S'ha proposat que la presència de múltiples gens i isoformes en molts enzims de la via possibilitaria l'ajust de la maquinaria biosintètica als requeriments d'isoprenoides específics en resposta a diferents estímuls. En el cas de l'HMGR, enzim codificat pels gens *HMG*, existeixen diferents exemples que reforcen aquesta idea. En patata, s'ha vist que quan es produeix una ferida s'indueix l'expressió dels gens *HMG1* i *SQS*, fet que precedeix a un increment en la producció d'esterols (Choi *et al.*, 1992). S'ha interpretat que aquesta acumulació d'esterols serviria per reparar les membranes cel·lulars lesionades (figura 4). Ara bé, si es realitzen tractaments amb un elicitör fúngic o amb patògens després de la ferida, s'observa una inducció dels gens *HMG2* i *HMG3* (enlloc de l'*HMG1*) i del gen de la sesquiterpè ciclasa, fets que finalment determinen una acumulació de fitoalexines de defensa. Aquests resultats clarament apunten a que existeix una especialització funcional de les isoformes de l'HMGR de patata: mentre que la isoforma codificada pel gen *HMG1* està implicada en la biosíntesi d'esterols, les isoformes codificades pels gens *HMG2* i *HMG3* estan implicades en la biosíntesi de sesquiterpens.

• FERIDA...



• FERIDA + TRACTAMENT AMB PATOGENS O ELICITORS...

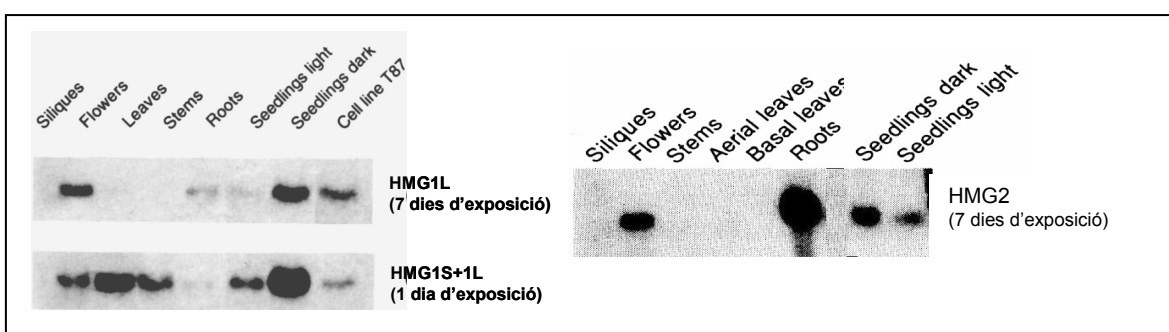
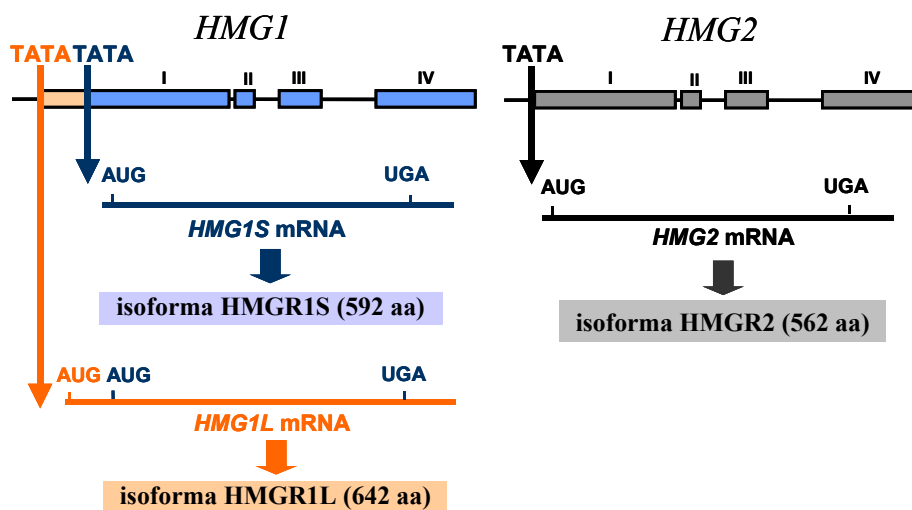


**Figura 4.** Especialització funcional dels gens *HMG1*, *HMG2* i *HMG3* de patata.

Un altre exemple molt clar té lloc durant el desenvolupament del fruit de tomàquet. En les primeres fases del desenvolupament del tomàquet, hi ha una elevada expressió del gen *HMG1* que es correlaciona amb la fase de creixement del fruit, on, per tant, hi ha un gran requeriment d'esterols per sintetitzar noves membranes. Rodríguez-Concepción i col·laboradors van observar que si en aquest estadi s'injectava l'elicitör fúngic àcid araquidònic es reprimia l'expressió del gen *HMG1* i s'indueix l'expressió del gen *HMG2* (Rodríguez-Concepción i Grisse, 1999). Això provocava una aturada en el creixement del fruit, fet que suggereix que la isoforma codificada pel gen *HMG1*, però no l'*HMG2*, està implicada en la biosíntesi d'esterols necessària pel creixement del fruit. De nou, els resultats apunten a que les isoformes codificades per cada gen *HMG* estan implicades en la biosíntesi exclusiva d'algun grup d'isoprenoides, la qual cosa implica que dins la família existeix una especialització funcional dels diferents gens *HMG*.

### 1.2.2 La família multigènica *HMG* d'Arabidopsis

Tal com es mostra a la taula 1, *Arabidopsis* conté dos gens d'*HMG* (*HMG1* i *HMG2*) que codifiquen per 3 isoformes d'*HMGR* (*HMGR1S*, *HMGR1L* i *HMGR2*) que s'expressen de manera diferencial (Enjuto *et al.*, 1994). El gen *HMG1* produeix dos transcrits derivats de la utilització de dos inicis de transcripció alternatius (figura 5) (Lumbreras *et al.*, 1995). El transcrit curt, que s'acumula a alts nivells i de forma generalitzada, codifica per la isoforma curta de l'*HMGR1* (*HMGR1S*). El transcrit llarg s'acumula a nivells menors i només en alguns teixits (flors, plàntules etiolades i cèl·lules de la línia T87), i codifica per la isoforma llarga de l'*HMGR1* (*HMGR1L*). L'*HMGR1L* és idèntica a l'*HMGR1S* però presenta una extensió de 50 aminoàcids en posició N-terminal (regió 1Lextra). Finalment, el gen *HMG2* s'expressa a nivells baixos en determinats teixits meristemàtics i florals (Enjuto *et al.*, 1995) i codifica per la isoforma *HMGR2*. És de destacar que tots els gens s'expressen més en plàntules etiolades que en plàntules crescudes en llum (figura 5).



**Figura 5.** Esquema i expressió dels gens *HMG1* i *HMG2* d'Arabidopsis. A la part superior es mostra un esquema dels gens *HMG1* i *HMG2* on les caixes representen els exons. El transcrit *HMG1L* presenta un codó AUG proximal i produeix la isoforma *HMGR1L*, que és idèntica a l'*HMGR1S* però conté una extensió aminoterminal de 50 aminoàcids. A la part inferior es mostra el patró d'expressió dels transcrits *HMG1S* i *HMG1L* (extret de Lumbreras *et al.*, 1995) i del gen *HMG2* (extret de Enjuto *et al.*, 1994). Entre parèntesi s'ha indicat els temps de contacte de cadascun dels films revelats, que és indicatiu dels nivells d'expressió dels gens.

### 1.2.3 Existeix una especialització funcional de les isoformes d'HMGR d'Arabidopsis?

El fet que els gens *HMG* d'Arabidopsis s'expressin de manera diferencial podria indicar que les corresponents isoformes estarien especialitzades en la producció d'isoprenoides concrets en cadascun dels teixits. Tot i així, les dades que es tenen fins ara només són a nivell d'expressió gènica, i, per tant, faltaria comprovar si aquestes diferències es corresponen amb una distribució tissular diferencial de les isoformes d'HMGR.

D'altra banda, les tres isoformes d'HMGR (HMGR1S, HMGR1L i HMGR2) s'han sobreexpressat en plantes transgèniques d'Arabidopsis (González, 2002). En les diferents línies transgèniques obtingudes s'hi va mesurar l'activitat HMGR i el contingut d'esterols, un dels productes finals majoritaris de la via. En el cas de la sobreexpressió de l'HMGR1S es van obtenir plantes amb nivells d'activitat HMGR incrementats quatre cops, que comportaven un increment en el contingut d'esterols de l'ordre de 3 vegades. Aquestes dades van confirmar que l'HMGR1S catalitza una etapa limitant de flux en la biosíntesi d'esterols en Arabidopsis. Per contra, la sobreexpressió de les isoformes HMGR1L i HMGR2 no van produir increments destacables d'activitat HMGR ni de contingut d'esterols.

Recentment, s'han caracteritzat mutants per inserció de T-DNA en els gens *HMG1* i *HMG2* (Muranaka *et al.*, 2003). Si bé no s'ha observat cap efecte fenotípic aparent pel mutant *HMG2*, el mutant *HMG1* mostra un fenotip dràstic amb diferents característiques: 1) inhibició de l'elongació de les arrels i de l'expansió dels cotilèdons en plàntules, 2) enanisme en planta adulta, 3) esterilitat masculina per manca d'elongació del tub pol·línic, i 4) senescència avançada en les fulles. Aquests fenotips són rescatats per l'addició de mevalonat de manera exògena, cosa que suggereix que els fenotips són deguts a una deficiència en la producció de mevalonat per part de la planta. Molecularment, les plantes mutants mostren nivells disminuïts en el contingut d'esterols (reducció d'un 40% respecte el control).

L'anàlisi de plantes transgèniques i mutants confirma que la isoforma HMGR1S és una isoforma "housekeeping", implicada en la biosíntesi basal d'isoprenoides essencials per la planta com els esterols. Això s'havia suggerit prèviament, ja que l'HMGR1S s'expressa de manera forta i generalitzada (Enjuto *et al.*, 1994). El fet que les isoformes HMGR1L i HMGR2 s'expressin de manera feble i en teixits determinats suggereix que aquestes isoformes exercien funcions més específiques que encara no s'han determinat. En base al patró d'expressió s'ha suggerit que l'HMGR2 estaria implicada en la biosíntesi d'isoprenoides en teixits amb elevades taxes de divisió com els meristems (Enjuto *et al.*, 1995). Totes aquestes evidències indiquen que, en Arabidopsis, també existiria una especialització funcional de les diferents isoformes d'HMGR.

## 1.3 L'HMGR DE PLANTES

### 1.3.1 Estructura

L'HMGR de plantes és una proteïna de membrana que conté dos segments transmembrana i les regions N- i C-terminal encarades al citosol (figura 6). Aquest model topològic ha estat demostrat per assaigs bioquímics i genètics, de manera que s'ha pogut determinar que la proteïna s'insereix eficientment en la membrana del reticle endoplasmàtic (Campos i Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996; Re *et al.*, 1997). Tanmateix, l'HMGR de plantes es divideix en quatre regions o dominis: la regió N-terminal citosòlica (NT), el domini de membrana, la regió *linker* i el domini catalític (CD).

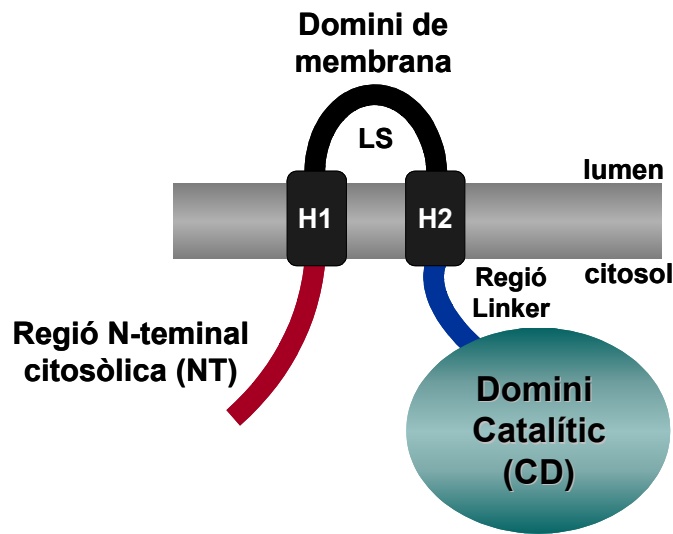
El domini catalític s'estén sobre la regió C-terminal de l'enzim, i presenta una elevada similitud en tots els organismes. En l'HMGR humana, aquest domini ha estat cristal·litzat (Istvan *et al.*, 2000), i s'ha vist que forma un tetràmer on les quatre subunitats donen lloc a quatre centres catalítics, cadascun d'ells format a la interfase de dos monòmers. En el cas de plantes no existeixen evidències directes de si el domini catalític oligomeritza, tot i que s'ha suggerit que l'HMGR d'*Hevea* i de rave formaria tetràmers (Bach, 1987) mentre que l'HMGR de patata formaria dímers (Kondo i Oba, 1986).

El conjunt de regions situades en posició N-terminal del domini catalític de l'HMGR de plantes constitueix un domini que no té referent en cap altre organisme. És per això que inicialment es va anomenar com a domini N-terminal d'HMGR específic de plantes. Aquest domini agrupa tres regions: 1) el domini de membrana, que inclou els dos segments transmembrana H1 i H2 i la regió del lumen (LS). Aquest domini està molt conservat entre les HMGR de plantes; 2) la regió *linker*, que és una regió molt divergida que connecta els dominis de membrana i catalític; 3) la regió N-terminal citosòlica (NT), que també és una regió divergida i candidata a conferir propietats específiques per a cada isoforma. Tal com es discutirà més endavant, aquesta regió podria determinar la localització subcel·lular de l'enzim (Campos i Boronat, 1995).

Les grans diferències entre l'HMGR de plantes i la de mamífers o llevat, recauen, de fet, en la seqüència i estructura dels seus dominis N-terminal. En el cas de l'HMGR de mamífers, aquest domini conté 8 segments transmembrana (Olender i Simon, 1992) i constitueix un domini sensor dels nivells d'esterols (Kuwabara i Labouesse, 2002). Aquest domini és capaç de determinar una proteòlisi regulada de l'enzim en resposta a nivells creixents de colesterol. D'altra banda l'enzim de llevat conté 7 segments de membrana seguint l'esquema de l'HMGR d'animals (Hampton *et al.*, 1996).

La divergència estructural entre el domini N-terminal de l'HMGR de plantes respecte el de mamífers o llevat podria estar reflectint diferents propietats de l'enzim entre aquests organismes. Donada l'especial importància i la diversitat dels compostos isoprenoides en plantes, es pot preveure que en aquests organismes existeixi una divergència en la regulació i/o la localització subcel·lular de la seva maquinària biosintètica. A continuació, es recullen alguns

dels aspectes de regulació i de localització subcel·lular de l'HMGR de plantes que, efectivament, confirmen aquesta divergència.



**Figura 6.** Estructura de l'HMGR de plantes. LS: regió del lumen; H1 i H2: regions transmembrana 1 i 2. El domini N-terminal de l'enzim està format per la regió N-terminal citosòlica, el domini de membrana i la regió *linker*.

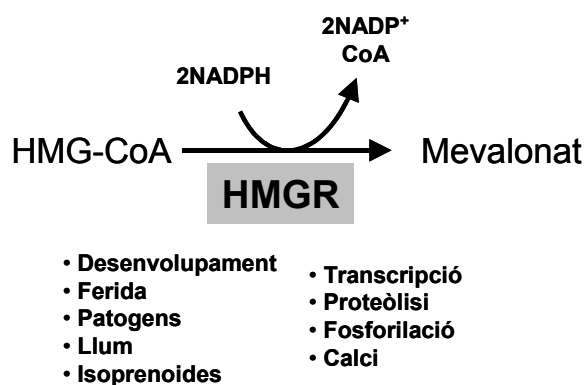
### 1.3.2 Regulació

S'ha descrit que l'activitat HMGR de plantes es pot regular en resposta a estímuls de desenvolupament i ambientals (revisat a Stermer *et al.*, 1994). També s'han implicat alguns efectors que mediarrien aquestes respostes (figura 7), tot i que moltes de les dades que es tenen s'han obtingut a través d'evidències indirectes.

Pel que fa als estímuls que actuen durant el desenvolupament, s'ha observat que els teixits que contenen nivells més alts d'activitat HMGR són aquells amb elevades taxes de divisió i de creixement cel·lular. Aquest fet s'ha correlacionat amb l'elevada demanda d'esterols que presenten aquests teixits per la síntesi de noves membranes cel·lulars. Per exemple, durant el desenvolupament del fruit de tomàquet s'ha observat que els pics d'activitat HMGR es concentren en les etapes de creixement del fruit, les quals impliquen divisió i elongació cel·lular (Rodríguez-Concepción i Grisse, 1999). També s'han detectat nivells incrementats d'expressió i activitat HMGR en fulles joves (amb taxes de divisió més elevades) respecte de fulles madures, tant de patata com d'*Arabidopsis* (Learned i Connolly, 1997; Korth *et al.*, 2000).

L'activitat HMGR també està regulada per diferents factors ambientals. D'una banda, la inducció de l'activitat HMGR en resposta a ferida i a l'atac per patògens (comentada en l'apartat 1.2.1) s'ha interpretat en termes de reparació de membranes cel·lulars (producció d'esterols) i defensa (producció de fitoalexines sesquiterpèniques). D'altra banda, és conegut que la llum regula negativament l'activitat HMGR, en un procés dependent de fotorreceptors com el fitocrom (Learned, 1996; Learned i Connolly, 1997). De fet, s'ha establert una correlació inversa entre la

quantitat de llum amb la qual es creix la planta i els nivells d'activitat HMGR. Això es posa de manifest de manera molt clara en plàntules crescudes en foscor, on l'activitat HMGR és superior. En el cas d'*Arabidopsis*, s'ha vist que en plàntules crescudes en foscor els gens *HMG1* i *HMG2* presenten nivells d'expressió més elevats (figura 5). També s'ha suggerit que alguns isoprenoides influeixen en els nivells d'activitat HMGR (Stermer *et al.*, 1994; Cowan *et al.*, 1997). Això es duria a terme per regulació de tipus *feed-back* o per l'acció de reguladors del creixement vegetal, molts dels quals són de naturalesa isoprenoide (citoquinines, brassinosteroides, giberel·lines i ABA). Recentment s'ha descrit que el bloqueig de la biosíntesi d'esterols per inhibició de l'esqualè sintasa en cèl·lules de tabac provoca un increment d'expressió i d'activitat HMGR (Wentzinger *et al.*, 2002).

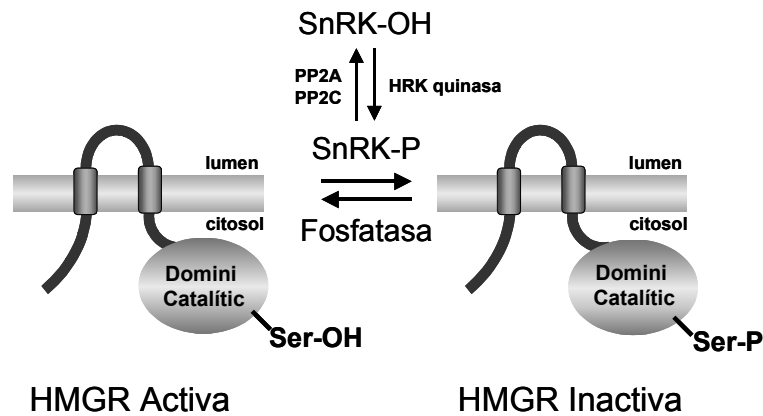


**Figura 7.** Recull de factors que influeixen sobre l'activitat HMGR de plantes. A l'esquerra hi ha diferents estímuls que afecten l'activitat HMGR, i a la dreta possibles mecanismes reguladors d'aquesta activitat.

Moltes de les respostes a factors de desenvolupament i ambientals són de tipus transcripcional i, sovint, impliquen l'activació selectiva d'un determinat gen *HMG*. Al marge dels efectes transcripcionals, s'han descrit altres mecanismes moleculars reguladors de l'activitat HMGR, tot i que encara es desconeix en quines respostes fisiològiques hi estarien implicats. Així, s'ha vist que l'activitat HMGR de plantes, tal com ocorre amb les HMGR de mamífers, és sensible a l'acció de les cisteín-proteases (Stermer *et al.*, 1994). S'ha determinat que en presència d'inhibidors específics d'aquestes proteases es poden detectar nivells d'activitat HMGR 10 vegades superiors. D'altra banda, en la regió linker d'algunes seqüències d'HMGR de plantes s'ha identificat una seqüència PEST (Caelles *et al.*, 1989), seqüència característica de proteïnes amb elevades taxes de proteòlisi.

De manera equivalent al que succeeix en mamífers, diversos estudis han posat de manifest que l'HMGR de plantes s'inactiva per fosforilació reversible d'una serina conservada en el domini catalític (figura 8) (Mackintosh *et al.*, 1992; Sugden *et al.*, 1999). Les principals diferències recauen en el fet que la quinasa responsable de la fosforilació de l'HMGR de plantes (HRK, d'HMGR quinasa, que posteriorment s'ha renombrat com SnRK, de Snf-1 related kinase) no es regula per AMP. *In vitro*, s'ha vist que les SnRKs de plantes són activades per fosforilació mediada per la HRK quinasa de mamífers i inactivades per defosforilació mediada per la proteïna fosfatasa 2A i 2C (PP2A i PP2C). Això dóna idea del grau de conservació d'aquests

processos entre mamífers i plantes. D'altra banda, s'ha pogut purificar una HRK de coliflor capaç de fosforilar i inactivar el domini catalític de l'HMGR1 d'*Arabidopsis* expressat i purificat a partir d'*E.coli* (Dale *et al.*, 1995). Aquest procés és revertit per l'addició d'un excés de fosfatasa PP2A bovina. També s'ha pogut identificar que el residu fosforilat correspon a la serina 577, el qual està conservat en moltes espècies. Malauradament, totes aquestes evidències *in vitro* no s'han acompanyat d'estudis sobre el sentit fisiològic que pot tenir aquesta fosforilació. Tampoc es tenen dades sobre la fosfatasa que seria responsable de la defosforilació de l'enzim.



**Figura 8.** Inactivació de l'HMGR per fosforilació.

El calci i la calmodulina també podrien estar involucrats en la regulació de l'activitat HMGR (revisat a Stermer *et al.*, 1994). En *Hevea*, un tractament amb calci i amb una calmodulina derivada del làtex incrementa 2,5 cops l'activitat HMGR. Els autors van observar que aquesta activació estava mediada per fosforilació reversible. En pèsol, en canvi, s'ha observat que concentracions baixes de calci són capaces d'inhibir l'activitat HMGR microsomal de manera independent de proteases i de calmodulina. Les diferències entre un i altre cas poden ser degudes a l'origen dels extractes o a les diferents maneres de processar els mateixos. En qualsevol cas, no queda clar de quina manera ni en resposta a què es donaria aquesta modulació de l'activitat HMGR per calci.

### 1.3.3 Importància del domini N-terminal en la regulació i localització subcel·lular de l'HMGR de plantes

El fet que tant el substrat com el producte de la reacció catalitzada per l'HMGR siguin aparentment solubles contrasta amb la localització en la membrana de l'enzim. Aquest fet suggereix que el domini N-terminal de l'HMGR (que conté el domini de membrana) podria estar implicat en algun aspecte de regulació i/o de localització subcel·lular de l'enzim, tal com succeeix en l'HMGR de mamífers i llevat.

La importància del domini N-terminal en la regulació de l'HMGR de plantes ha quedat palesa recentment (González, 2002). Es van generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressaven una versió truncada de l'HMGR1 que només contenia el domini catalític i que,



per tant, no presentava el domini N-terminal (plantes CD1). La comparació entre les plantes CD1 i les plantes 1S (que sobreexpressaven l'HMGR1S completa) va revelar que les primeres acumulaven nivells 3 o 4 cops superiors d'activitat HMGR i de proteïna codificada pels transgens. A més, les plantes CD1 eren capaces d'acumular 4 vegades més esterols que les plantes 1S. Considerant que els nivells dels RNA missatgers dels transgens eren inclús inferiors en les plantes CD1, els resultats clarament indiquen que el domini N-terminal té un paper en el control dels nivells de proteïna i activitat HMGR.

Pel que fa a la localització de l'HMGR de plantes, en experiments *in vitro* s'ha vist que el domini N-terminal és necessari i suficient per la inserció co-traduccional de la proteïna en el reticle endoplasmàtic (RE) (Campos i Boronat, 1995). Aquest procés és mediat per la *SRP* (*signal recognition particle*), la qual reconeix els segments transmembrana H1 i H2 de l'HMGR (que actuen de seqüències senyal internes). Aquestes dades han servit per argumentar que el destí subcel·lular primari de l'enzim és el RE. D'altra banda, de l'anàlisi de múltiples seqüències primàries d'HMGRs vegetals s'ha deduit que, a la regió N-terminal citosòlica (NT) de l'enzim, existeix un motiu conservat ric en residus d'arginina (figura 9). Tot i que hi ha certa variació en aquest motiu, es pot definir un consens: M[D,E][L,V,I]RRR. És a dir, la metionina inicial, un aminoàcid amb càrrega negativa, un aminoàcid hidrofòbic i tres arginines. És lògic especular que un motiu tan conservat hauria d'exercir una funció rellevant i, consegüentment, la regió N-terminal citosòlica esdevindria una regió important per l'enzim. En aquest sentit, és destacable que aquest motiu presenta homologia amb el motiu de dues-arginines present en la regió N-terminal citosòlica d'algunes proteïnes de membrana de tipus II de mamífers, i que actuen com a senyal de retenció en el RE (Schutze *et al.*, 1994). En base al consens de retenció en RE definit en cèl·lules animals es poden establir tres classes de motius en les HMGRs de plantes (figura 9): els motius consens (grup I), els motius propers al consens (grup II), i els motius variació del consens (grup III). Tot plegat, les dades apunten a que la regió N-terminal citosòlica podria tenir un paper en la localització de l'enzim en el RE.

Tot i així, existeixen múltiples treballs en els quals s'ha suggerit que l'HMGR estaria present a organel·ls com mitocondris o cloroplastes (revisat a Bach, 1987). Per exemple, en *Arabidopsis* s'ha descrit que un 60-80% d'activitat HMGR està present en una fracció que sedimenta a 16.000xg, també dita fracció organel·lar (González, 2002), de forma que només un 20-40% de l'activitat queda associada a la fracció que sedimenta a 105.000xg (fracció microsomal, enriquida en membranes derivades de RE, Golgi i membrana plasmàtica). La detecció d'activitat en la fracció organel·lar s'ha atribuït a la possible presència de l'HMGR en algun organel·ls dens com peroxisomes, mitocondris o cloroplastes. D'acord amb aquestes observacions, recentment s'ha identificat una isoforma d'HMGR humana en peroxisomes (Breitling i Krisans, 2002). Tot i així, els estudis basats en fraccionament subcel·lular i detecció d'activitat enzimàtica sovint han estat desacreditats degut a possibles contaminacions entre fraccions durant el procés de disrupció cel·lular i fraccionament. Per tant, tot i l'àmplia acceptació de l'HMGR com a proteïna de RE, la identitat de l'estructura que sedimenta a 16.000xg on es detecta activitat HMGR continua essent desconeguda.

|              |                     |  |
|--------------|---------------------|--|
| Grup I       | <b>MDLRRR</b>       | <b>At-HMGR1S</b> , Ll1, St4  |
|              | <b>MDVRRR</b>       | Bv1, Ca1, Ca2, Ca3, Cpa1, Gm1, Le1, Le2, Le3, Lh1, Lp1, Lp2, Md1, Mt1, Ns1, Nt1, St1, St2, St3, Te1, Te2 |
|              | <b>MDVRR</b>        | Os1  |
|              | <b>MDARRR</b>       | Mt2  |
|              | <b>MDIRRR</b>       | Rs1, Rs2   |
|              | <b>MDSRRR</b>       | Cr1  |
|              | <b>MDLRRK</b>       | Aa1, Aa2   |
|              | <b>MEVRRR</b>       | Os3, Mc1   |
|              | <b>MELRRR</b>       | Ma1  |
|              | <b>MEHRRR</b>       | Ps1  |
| <b>MDRRR</b> | Cm1                 |  |
| Grup II      | <b>MEDLRRR</b>      | <b>At-HMGR2</b>  |
|              | <b>MDEVRRR</b>      | Hb3  |
|              | <b>METHRR</b>       | Gh1  |
|              | <b>MDVHRR</b>       | Mt3  |
|              | <b>MDLHRR</b>       | Gm2  |
|              | <b>MEASRR</b>       | Gh2  |
| Grup III     | <b>MKKK</b>         | <b>At-HMGR1L</b>   |
|              | <b>MKVK</b>         | Md2  |
|              | <b>MDVRQQR</b>      | Ta1  |
|              | <b>MDVQQK</b>       | Mt5  |
|              | <b>MDVHQR</b>       | Ps2  |
|              | <b>MEAHR</b>        | Ga1  |
|              | <b>MDTTGRLHHRKH</b> | Hb1  |
|              | <b>MAVEGRRR</b>     | Os2  |
|              | <b>MEVQRQ</b>       | Mt4  |
|              | <b>MEVRGG</b>       | Zm1  |

Consens de la senyal de retenció en RE en cèl·lules animals

**MRRXX**  
**MXRRX**  
**MXRRR**  
**MRXXR**  
**MXRRX**

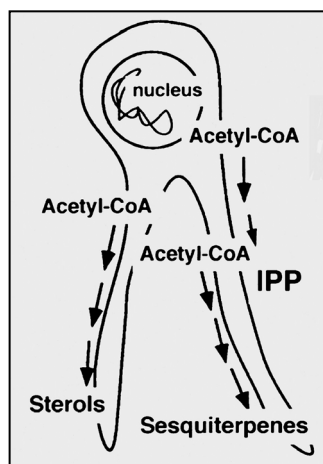
**Figura 9.** Motiu N-terminal conservat en les HMGR de plantes (adaptat i ampliat de Campos i Boronat, 1995). Les isoformes d’HMGR de plantes es poden classificar en tres grups en funció de la similitud del seu motiu N-terminal conservat amb el consens de la senyal de retenció en el RE descrit en cèl·lules animals (Schutze *et al.*, 1994). Les seqüències del grup I tenen dos arginines en posicions de 1 a 5 i, per tant, s’ajusten al consens. Les seqüències del grup II tenen les arginines un residu més allunyat de l’extrem N-terminal i, per tant, es desvien lleugerament del consens. En les seqüències del grup III existeix major diversitat d’aminoàcids bàsics i del seu posicionament respecte l’extrem N-terminal. Els aminoàcids bàsics (R, K y H) es destaquen en vermell. Les seqüències han estat deduïdes a partir de clons de cDNA o ESTs depositades en les bases de dades públiques.

El número d’accessió de les seqüències en el GenBank i la espècie a que pertanyen són els següents: **At-HMGR1S** (P14891), **AtHMGR1L** (AAB35696) i **At-HMGR2** (P43256) d’*Arabidopsis thaliana*; **Aa1** (AAA68965) i **Aa2** (AAA68966) d’*Artemisia annua*; **Bv1** (BI543436) de *Beta vulgaris*; **Ca1** (AAB69726), **Ca2** (AAB69727) i **Ca3** (P48021) de *Camptotheca acuminata*; **Cm1** (BAA36291) de *Cucumis melo*; **Cpa** (AAD28179) de *Capsicum annuum*; **Cr1** (Q03163) de *Catharanthus roseus*; **Gm1** (AW132229) i **Gm2** (BE211556) de *Glycine max*; **Ga1** (BF277945) de *Gossypium arboreum*; **Gh1** (AAC05088) i **Gh2** (AAC05089) de *Gossypium hirsutum*; **Hb1** (P29057) i **Hb3** (Q00583) d’*Hevea brasiliensis*; **Ll1** (BG153912) de *Lupinus luteus*; **Le1** (L40938), **Le2** (P48022) i **Le3** (número no disponible) de *Lycopersicon esculentum*; **Lh1** (AW616289) de *Lycopersicon hirsutum*; **Lp1** (BG136352) i **Lp2** (BG137251) de *Lycopersicon pennellii*; **Md1** (AAK95406) i **Md2** (AAL03986) de *Malus x domestica*; **Mt1** (BG644380), **Mt2** (BE999267), **Mt3** (AW685537), **Mt4** (AW686600) i **Mt5** (AW584544) de *Medicago truncatula*; **Mc1** (BE577251) de *Mesembryanthemum crystallinum*; **Ma1** (AAD03789) de *Morus alba*; **Ns1** (Q01559) de *Nicotiana glauca*; **Nt1** (AAB87727) de *Nicotiana tabacum*; **Os1** (P48019), **Os2** (CAA92821) i **Os3** (AAD38873) d’*Oryza sativa*; **Ps1** (AAL37041) i **Ps2** (número no disponible) de *Pisum sativum*; **Rs1** (S29622) i **Rs2** (S29623) de *Raphanus sativus*; **St1** (P48020), **St2** (AAB52551), **St3** (AAB52552) i **St4** (BE472635) de *Solanum tuberosum*; **Te1** (AAC15475) i **Te2** (AAC15476) de *Tagetes erecta*; **Ta1** (BE430132) de *Triticum aestivum*; i **Zm1** (CAA70440) de *Zea mays*.

## 1.4 MODELS D'ORGANITZACIÓ DE LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES CITOSÒLICS

### 1.4.1 Organització de la via en canals metabòlics

El fet que molts dels enzims de la via estiguin codificats per famílies multigèniques (apartat 1.2), juntament amb l'existència d'especialització funcional de les isoformes codificades pels diferents gens de cada família (apartat 1.2.1), ha servit per proposar un model d'organització de la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics en canals metabòlics o metabolons (Chappell, 1995a). En aquest model, els intermediaris de les reaccions es canalitzen eficientment d'enzim a enzim sense que difonguin al medi. Cada canal metabòlic estaria format per una agrupació d'isoenzims determinada, i estaria especialitzat en la biosíntesi d'un determinat grup d'isoprenoides. Per exemple, mentre que un canal metabòlic estaria dedicat a la biosíntesi d'esterols, un altre es dedicaria a la biosíntesi de sesquiterpens (figura 10). El model prediu que determinats subdominis del reticle endoplasmàtic o determinades estructures del citoesquelet estarien especialitzades en la formació de determinats metabolons. El model també implica que cada isoforma tindria la informació necessària per accedir a un determinat metaboló, ja sigui per assolir la seva localització subcel·lular o per interaccionar amb altres isoenzims o proteïnes del complex. Aquest model tant atractiu i versàtil ha guanyat molts adeptes desde que es va proposar l'any 1995, tot i que encara no s'han aportat evidències experimentals directes en favor del mateix.

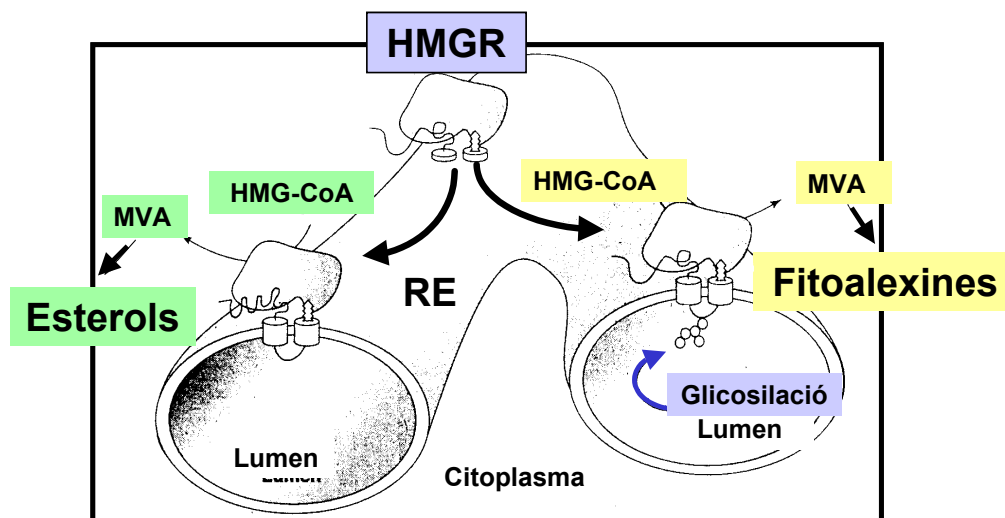


**Figura 10.** Model d'organització de la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics en canals metabòlics (adaptat de Chappell, 1995b).

### 1.4.2 Subcompartimentació de l'HMGR en subdominis del reticle endoplasmàtic

En el context del model general d'organització de la via de síntesi d'isoprenoides en canals metabòlics, s'ha proposat que cada isoforma de l'HMGR podria estar subcompartimentada en diferents subdominis del RE. En aquests subdominis, les diferents isoformes s'especialitzarien en la biosíntesi exclusiva d'un grup d'isoprenoides. Això implica que

cada isoforma tindria la informació necessària per localitzar-se en aquests suposats subdominis. En aquest sentit, s'ha suggerit que les diferències en el motiu N-terminal conservat entre les diferents isoformes d'HMGR podrien determinar la localització en un o altre subdomini del RE (Campos i Boronat, 1995; Lumbreras *et al.*, 1995). A més, posteriorment s'ha determinat que algunes isoformes de l'HMGR presenten un lloc de N-glicosilació en la regió del lumen del RE (regió LS, figura 6), que, *in vitro*, s'ha observat que és funcional (Denbow *et al.*, 1996). Altres autors han observat en diferents espècies vegetals que aquelles isoformes d'HMGR associades a la producció de sesquiterpens, presenten el lloc de glicosilació (McCaskill, 1998). Aquest motiu està absent en aquelles isoformes associades a la biosíntesi constitutiva d'esterols. Aquesta correlació ha permès proposar als autors un model de subcompartimentació de l'HMGR en el RE: les isoformes d'HMGR especialitzades en la biosíntesi de fitoalexines sesquiterpèniques serien glicosilades i dirigides a un subdomini del RE diferent al de les HMGR especialitzades en la biosíntesi d'esterols (figura 11). Aquest model es veu reforçat pel fet que el RE de les cèl·lules vegetals és un sistema dinàmic i amb nombrosos subdominis especialitzats en múltiples funcions (Staehelein, 1997).



**Figura 11.** Model de subcompartimentació de les isoformes d'HMGR en diferents subdominis del RE (adaptat de McCaskill, 1998).

Existeixen alguns antecedents en altres organismes en favor de la subcompartimentació de l'HMGR en el RE. En llevat —on existeixen dues isoformes codificades per dos gens— s'ha descrit que mentre la isoforma HMG1p es troba en el RE perinuclear, l'HMG2p es troba en el RE perifèric (Hampton *et al.*, 1996). Aquest comportament de les proteïnes de llevat s'ha associat al fet que responen a estímuls diferents: mentre que l'HMG1p és estable, l'HMG2p es degrada ràpidament en resposta a un increment en el flux de la via de biosíntesi d'esterols.

Aquest model, però, limita la localització de les isoformes de l'HMGR en el RE, quan, de fet, en les plantes s'ha detectat activitat HMGR en una fracció que sedimenta a 16.000xg (vegeu apartat 1.3.3). Aquesta observació suggereix que hi ha una redistribució de determinades isoformes de l'HMGR desde el RE cap a altres organel·les, sense descartar que aquests suposats organel·les siguin, de fet, subdominis especialitzats del RE.

En l'actualitat, un dels reptes més interessants consisteix en esbrinar si les diferents isoformes de l'HMGR de plantes es localitzen en compartiments subcel·lulars diferents (ja siguin subdominis del RE o altres orgànels). D'altra banda, com ja s'ha comentat anteriorment, també sembla prioritari conèixer si la presència de l'HMGR en la fracció que sedimenta a 16.000xg es correspon a la presència de la proteïna en alguna estructura cel·lular determinada. Molt probablement el domini N-terminal de cada isoforma (incloent la regió N-terminal citosòlica, el domini de membrana i la regió *linker*) tindrà una influència directa en els processos de transport de l'HMGR a compartiments subcel·lulars determinats. La identificació de les seqüències peptídiques responsables del transport i localització subcel·lular de l'HMGR i la caracterització dels mecanismes moleculars implicats constitueix, clarament, un dels reptes de futur.

### **1.4.3 La regió N-terminal citosòlica com a candidata a determinar mecanismes específics d'isoforma**

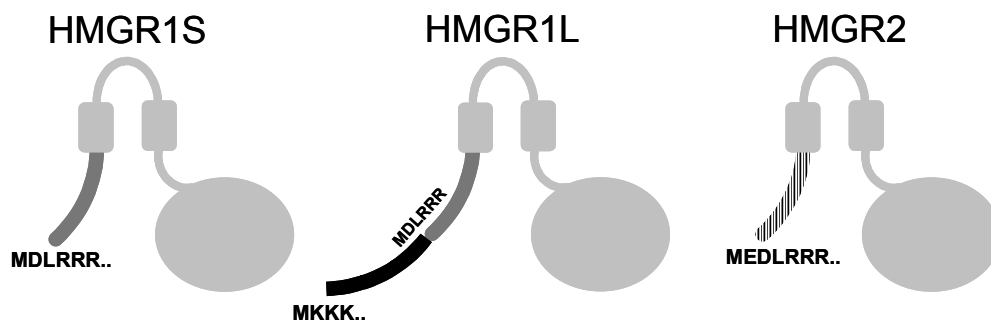
El concepte d'especialització funcional de les diferents isoformes d'HMGR significa que cada isoforma estaria implicada en la biosíntesi d'un grup determinat d'isoprenoides. Per què aquesta especialització sigui possible, cada isoforma ha de tenir propietats exclusives que, per exemple, podrien venir determinades per diferències de regulació o de localització subcel·lular. En aquest sentit, la regió N-terminal citosòlica (NT) de l'HMGR (figura 6) és una regió candidata per definir propietats específiques d'isoforma. D'una banda, aquesta és una regió que està prou divergida entre isoformes com per determinar-ne mecanismes reguladors específics. De l'altra, ja s'ha comentat que aquesta regió conté el motiu N-terminal conservat en les HMGRs vegetals que presenta homologia amb senyals de retenció en el RE (apartat 1.3.3), fet que converteix a aquesta regió en candidata a determinar la localització subcel·lular final de l'enzim (Campos i Boronat, 1995). Els processos que confereixin especialització a les isoformes d'HMGR estaran possiblement determinats per proteïnes que interaccionin específicament amb aquesta regió.

L'estudi d'aquests processos en la planta model *Arabidopsis thaliana* presenta alguns avantatges. Primerament, és un sistema on l'HMGR està àmpliament caracteritzada. *Arabidopsis* presenta dos gens (*HMG1* i *HMG2*) que s'expressen diferencialment i que codifiquen per tres isoformes: HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 (apartat 1.2.2). També es coneix que les tres isoformes s'insereixen en membranes derivades del RE. Respecte a la seva seqüència, les isoformes d'*Arabidopsis* contenen les característiques típiques de l'HMGR: presència del motiu N-terminal conservat en la regió N-terminal citosòlica (figura 9) i d'un possible lloc de glicosilació addicional en la regió del lumen de la isoforma HMGR2.

D'altra banda, cada isoforma d'HMGR d'*Arabidopsis* presenta certes particularitats en la regió N-terminal citosòlica que les fa molt interessants per a la cerca de mecanismes específics d'isoforma. Primerament, cal considerar la longitud aminoacídica d'aquesta regió: mentre que la regió NT citosòlica de l'HMGR2 té 32 aminoàcids, les corresponents regions en l'HMGR1S i 1L contenen 50 i 100 aminoàcids, respectivament. En referència al motiu N-terminal conservat també presenten diferències (figura 9): si l'HMGR1S s'ajusta al consens, l'HMGR2 és propera al mateix, mentre que l'HMGR1L en representa una variació (figura 12). Considerant l'homologia d'aquest motiu amb els senyals de retenció en RE en cèl·lules animals (Schutze *et al.*, 1994),

s'ha especulat que les variacions que existeixen entre les diferents isoformes d'HMGR d'Arabidopsis en el motiu conservat podrien estar relacionades amb el transport diferencial de les mateixes a subdominis específics del RE (Campos i Boronat, 1995; Lumberras *et al.*, 1995).

Les diferències entre les isoformes HMGR1S i HMGR1L també centren l'interés en la regió NT citosòlica. L'HMGR1L és una isoforma idèntica a l'HMGR1S, però presenta una extensió de 50 aminoàcids a l'extrem N-terminal. El fet que aquesta extensió bloquegi directament la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1S fa pensar que pugui tenir conseqüències en la seva localització subcel·lular.



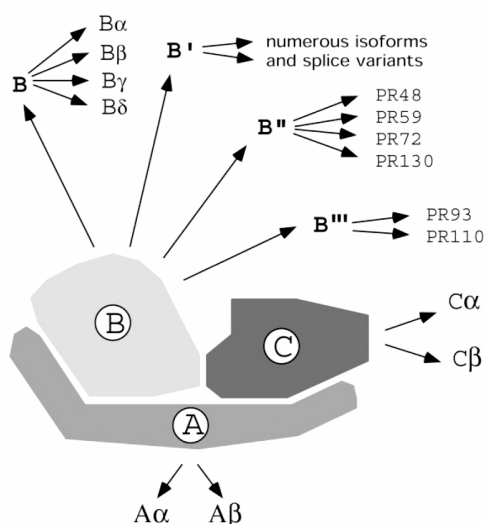
**Figura 12.** Representació de les isoformes d'HMGR en Arabidopsis. S'ha ressaltat la regió N-terminal citosòlica i els motius N-terminal conservats.

## 1.5 LA PROTEÏNA FOSFATASA 2A (PP2A)

### 1.5.1 Estructura i funció

La fosforilació reversible de proteïnes constitueix una modificació posttraduccional implicada en la regulació de múltiples processos cel·lulars. No és d'estranyar, doncs, que processos tant diversos com l'activitat enzimàtica, la proteòlisi, el transport subcel·lular o la interacció proteïna-proteïna estiguin modulats per fosforilació. D'acord amb això s'han descrit múltiples proteïnes fosfatases amb capacitat de controlar l'estat de fosforilació de les seves proteïnes diana. Una de les serina/treonina fosfatases majoritàries és la proteïna fosfatasa 2A o PP2A (Millward *et al.*, 1999; Janssens i Goris, 2001; Schonthal, 2001).

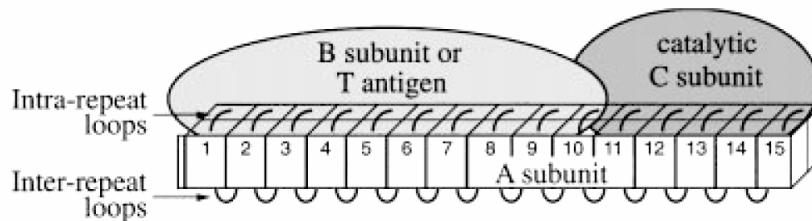
La PP2A conté un nucli heterodimèric format per una subunitat catalítica de 36kDa (PP2A-C o subunitat C), i una subunitat A o estructural de 65 kDa (PR65 o PP2A-A). En aquest nucli dimèric s'hi pot afegir una tercera subunitat reguladora (subunitat B o PP2A-B) que modula l'activitat i li confereix especificitat de substrat i/o localització subcel·lular al complex (Janssens i Goris, 2001). La gran diversitat de fosfatases PP2A radica, bàsicament, en el fet que existeixen múltiples variants de subunitats reguladores B (figura 13).



**Figura 13.** Estructura de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A). S'hi representen les subunitats A (estructural), C (catalítica) i B (reguladora) del complex PP2A. En mamífers existeixen dues isoformes de subunitats A i C ( $\alpha$  i  $\beta$ ). La subunitat B és encara més variable, ja que existeixen 4 famílies independents (B, B', B'' i B''') formades per diferents membres (adaptat de Schonthal, 2001).

La subunitat A o PR65 actua de subunitat estructural del complex atés que serveix de punt d'anclatge per les subunitats PP2A-C i PP2A-B. La subunitat A ha estat cristal·litzada (Groves *et al.*, 1999) i s'ha vist que està formada per 15 repeticions imperfectes de 39 aminoàcids situades en tàndem. Aquestes repeticions s'anomenen motius HEAT, i estructuralment són 2 hèlix superposades separades per un *loop*. De fet, constitueixen un motiu d'interacció proteïna-proteïna, que li permet unir a la subunitat reguladora PP2A-B per N-terminal i a la subunitat catalítica PP2A-C per C-terminal (Strack *et al.*, 2002). El model que

s'ha proposat és que les repeticions HEAT d'1 a 10 de la PR65 participarien en la unió a la subunitat B (figura 14), mentre que les repeticions 11-15 estarien implicades en la unió a la subunitat C (Ruediger *et al.*, 1994; Groves *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2003a). El fet que les subunitats B tenen un únic lloc d'unió a la PR65 explica que siguin mútuament excloents.

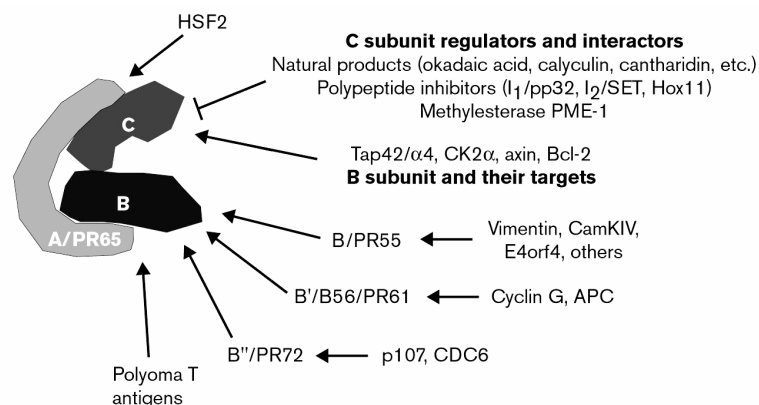


**Figura 14.** Model d'unió de les subunitats B i C als diferents motius HEAT de la subunitat estructural PR65 (adaptat de Zhou *et al.*, 2003a).

Un altra característica de la PP2A recau en el fet que existeixen isoformes per a cadascuna de les subunitats del complex (figura 13). En animals, les subunitats A i C presenten dues isoformes cadascuna, mentre que la subunitat B o reguladora presenta múltiples variants que es poden agrupar en 4 famílies independents. Moltes de les subunitats coexisteixen en la cèl·lula, cosa que permet un gran ventall de combinacions que probablement tindran propietats particulars. Aquesta versatilitat permetria la implicació de la PP2A en múltiples processos cel·lulars tals com el cicle cel·lular, el desenvolupament, la transducció de senyal, el transport o el metabolisme (Millward *et al.*, 1999). Les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  de les subunitats A i C s'expressen a diferents nivells i en diferents moments en el desenvolupament (Zhou *et al.*, 2003a; Zhou *et al.*, 2003b), i s'ha vist que estan involucrades en processos independents. Zhou i col·laboradors demostren que l'especialització funcional de les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  de les subunitats A i C no ve donada per la seva capacitat d'unir exclusivament alguna de les variants de subunitat B, ni tampoc perquè confereixi propietats catalítiques diferencials. La implicació d'una PP2A en un procés específic sovint ve determinada per la subunitat B o reguladora, cosa que ha fet que en els últims anys es dediquessin molts esforços per cercar dianes cel·lulars que interaccionin amb aquestes subunitats (figura 15). Tot i així, també s'han descrit nombroses proteïnes que interaccionen amb les subunitats A i C.

La gran divergència existent entre les diferents famílies de subunitats B reguladores recolza la participació de les mateixes en múltiples processos. Tot i així s'ha pogut determinar dos dominis conservats, ASBD1 i ASBD2 (A subunit binding domain 1 i 2), que permetrien la unió de les subunitats B a la subunitat A (Li i Virshup, 2002).





**Figura 15.** Interaccions descrites entre les diferents subunitats de la PP2A i altres proteïnes (adaptat de Virshup, 2000).

### 1.5.2 La subunitat reguladora B'' de la PP2A

El primer membre identificat de la família B'' de subunitats reguladores de la PP2A va ser la PR72 humana, i la seva variant estesa per N-terminal PR130 (Hendrix *et al.*, 1993). S'ha observat que PR130 interacciona amb CG-NAP (*de centrosome and Golgi localized PKN-associated protein*), un mòdul senyalitzador o adaptador molecular (*scaffolding protein*) que recluta diverses proteïnes com les fosfatases PP2A i PP1, o les quinases PKA i PKN (Takahashi *et al.*, 1999). Un altre membre de la família, l'homòleg PR59 de ratolí, es va identificar com a proteïna que interacciona amb p107, una proteïna relacionada amb retinoblastoma (Voorhoeve *et al.*, 1999). Els autors van veure que la sobreexpressió de PR59 en cèl·lules U2-OS provocava una aturada del cicle cel·lular en la fase G1, atribuïble a la defosforilació de p107 mediada per PR59. La proteïna PR48 humana també ha estat identificada com a membre de la família. Es va descriure que PR48 interaccionava amb Cdc6, un component essencial dels complexos pre-replicatius del DNA (Yan *et al.*, 2000). De nou, la sobreexpressió de PR48 en cèl·lules HeLa va provocar una aturada del cicle cel·lular en la fase G1, aquest cop atribuïble a la defosforilació de Cdc6 mediada per PR48 que evitaria l'inici de la replicació del DNA.

Una troballa molt significativa ha estat la recent identificació de dos motius d'unió a calci de tipus *EF-hand* (EF1 i EF2) en la seqüència primària de PR72 (Janssens *et al.*, 2003). A través d'aquests motius la PR72 uneix calci, fet que potencia la seva interacció amb la subunitat PR65 *in vitro*. Els autors proposen que es tracta d'una interacció dependent de calci. També assignen una funció específica als motius EF: d'una banda, EF2 uneix calci amb més afinitat que EF1, determina la unió dependent de calci a PR65 i promou la localització nuclear de PR72. De l'altra, els autors descriuen que la sobreexpressió de PR72 en cèl·lules U2-OS provoca una aturada en el cicle cel·lular en fase G1, un procés parcialment dependent de la integritat d'EF1. La importància dels resultats radica en el fet que per primer cop s'implica al calci com a regulador de la PP2A. Aquest fet seria exclusiu de la família B'', doncs els motius *EF-hand* estan conservats en tots els membres d'aquesta família. Això situa a la PP2A com a potencial sensor del calci intracel·lular i/o com a efector del senyal de calci.

Una altra particularitat de la família B'' és que no presenta homòlegs en llevat (Janssens i Goris, 2001). Això és encara més sorprenent donat que la resta de subunitats de la PP2A (A, C, B i B') sí tenen equivalent en aquest organisme. Aquest fet impedeix que es pugui predir la funció dels homòlegs de la família B'' existents en plantes.

### 1.5.3 La PP2A de plantes

Les fosfatases també exerceixen funcions essencials en les plantes. No és d'estranyar, doncs, que en el genoma d'*Arabidopsis* s'hagin identificat 110 gens que codifiquen per subunitats catalítiques de proteïnes fosfatasa (Kerk *et al.*, 2002). Al marge de les subunitats catalítiques, en plantes també s'han identificat homòlegs de totes les subunitats del complex de PP2A. Això fa pensar que aquest enzim també tindrà un paper preponderant en múltiples processos cel·lulars. En el cas d'*Arabidopsis* s'han identificat 5 gens que codifiquen per la subunitat catalítica o C (Ariño *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 1994; Pérez-Callejón *et al.*, 1998). També s'han identificat 3 gens que codifiquen per la subunitat estructural PR65 (Slabas *et al.*, 1994). Referent a la subunitat B o reguladora, s'han identificat homòlegs de les famílies B, B' i B'': 2 gens que codifiquen per la subunitat B (Rundle *et al.*, 1995; Corum *et al.*, 1996), 9 gens que codifiquen per la subunitat B' (Latorre *et al.*, 1997; Haynes *et al.*, 1999; Terol *et al.*, 2002), 5 gens que codifiquen per la subunitat B'' (Hendershot *et al.*, 1999; Camilleri *et al.*, 2002) i un gen, *TONNEAU2*, que codifica per una nova subfamília B'' (Camilleri *et al.*, 2002).

Diversos estudis conclouen que l'estructura del complex de PP2A en plantes és equivalent al de vertebrats i llevats (Haynes *et al.*, 1999; Camilleri *et al.*, 2002). També s'ha constatat que la majoria de subunitats s'expressen en tots els teixits analitzats. Aquest fet ofereix la possibilitat que es puguin formar una gran diversitat de complexos de PP2A, cosa que permetria a la planta respondre de manera ràpida i efectiva a estímuls ambientals així com la capacitat de mantenir la plasticitat en el seu desenvolupament (Haynes *et al.*, 1999). És notable destacar que per simple combinatòria amb totes les subunitats identificades en *Arabidopsis* es poden establir 255 complexos de PP2A diferents.

A nivell funcional, en plantes, la PP2A s'ha implicat en diferents processos: control de l'activitat de diferents enzims (MacKintosh, 1992; Dong *et al.*, 2001), regulació del transport d'auxines (Rashotte *et al.*, 2001), germinació de llavors (Chang *et al.*, 1999), transducció del senyal d'àcid abscísic o ABA (Kwak *et al.*, 2002), resposta a etilè (Larsen i Cancel, 2003), control del temps de floració (Kim *et al.*, 2002) i resposta a diferents estressos com la calor, la salinitat o la sequera (Latorre *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2003).

Pel que fa a la subunitat B'', en plantes només s'ha descrit un gen que s'expressa de manera ubiqua i no s'indueix ni per xoc tèrmic ni per estrès induït per fred (Hendershot *et al.*, 1999). Els autors anticipen que existeix un gen addicional pertanyent a aquesta família en *Arabidopsis*. Posteriorment, i amb el genoma d'*Arabidopsis* ja seqüenciat, Camilleri i col·laboradors descriuen 5 gens B'', i un gen relacionat, *TONNEAU2*, que codifica per una nova subfamília de subunitats B'' que també conté representants en vertebrats (Camilleri *et al.*, 2002). El producte del gen *TONNEAU2* juga un paper essencial en el control de la organització

del citoesquelet microtubular cortical. Un mutant de *TONNEAU2* mostra alteracions en les xarxes de microtúbuls corticals, impeding la correcta formació de la banda preprofàsica en la mitosis. Això acaba provocant alteracions en la morfologia i organització cel·lular, que, finalment, afecta al patró morfogenètic de la planta.

Fins el moment s'han identificat diferents proteïnes que s'uneixen a les subunitats A i C de la PP2A en plantes (Harris *et al.*, 1999; Jackson i Soll, 1999; Kim *et al.*, 2002; Awotunde *et al.*, 2003; Larsen i Cancel, 2003). Tot i així, la identificació de les dianes cel·lulars de les múltiples subunitats B existents constitueix un dels reptes de futur, doncs permetrà establir mecanismes concrets per a cada procés regulat per la PP2A.

## 1.6 LES QUINESINES

### 1.6.1 Funció biològica i diversitat

Les proteïnes de la superfamília de les quinesines (KIFs) són responsables del transport intracel·lular mitjançat per microtúbuls. Han estat implicades en múltiples processos cel·lulars com el transport vesicular, el transport de complexos proteics i de mRNA, el transport i posicionament d'òrgans, la formació i elongació del fus acromàtic, la segregació de cromosomes, la dinàmica dels microtúbuls, la morfogènesi cel·lular o la funció de cilis i flagels (revisat a Manning i Snyder, 2000; Goldstein, 2001; Karcher *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002). Tots aquests processos impliquen un reconeixement específic entre les quinesines i les molècules o estructures que han de ser transportades.

Tots els membres de la superfamília de quinesines només tenen en comú la presència d'un domini motor de tipus quinesina, que inclou les regions d'unió a ATP i a microtúbuls. El domini motor transforma l'energia química emmagatzemada en l'ATP en moviment. La resta de la seqüència és molt variable en cada quinesina (domini *tail*) i determina l'especificitat d'unió a les diferents dianes cel·lulars. La posició del domini motor en la seqüència polipeptídica ha servit per classificar les KIFs en tres tipus diferents: les que tenen el domini motor en posició N-terminal (o de tipus N), les que el tenen en posició intermitja (o de tipus M) i les que el tenen en C-terminal (o de tipus C). Un estudi recent indica que la majoria de KIFs humanes i de ratolí són de tipus N (Miki *et al.*, 2001). A més, s'ha observat que la posició del domini motor determina la direccionalitat del transport: les quinesines amb domini motor a C-terminal es mouen del pol positiu al pol negatiu dels microtúbuls (o en sentit retrògrad), mentre que la resta de quinesines es mouen en sentit contrari o anterògrad (Endow, 2002).

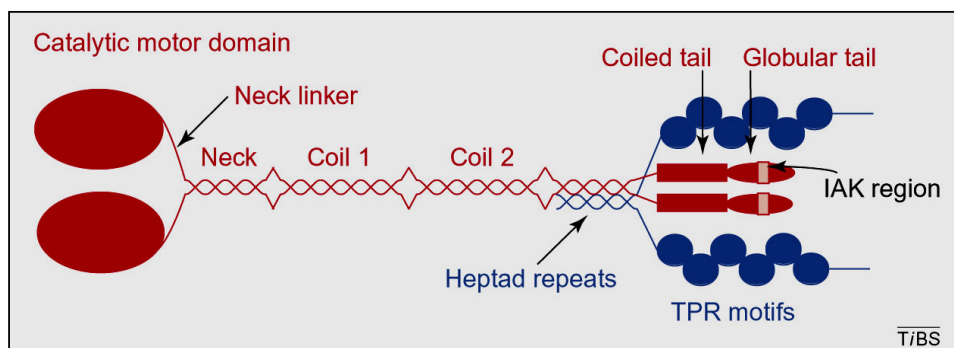
En base a consideracions filogenètiques emprant el domini motor de les KIFs, s'han establert 9 famílies de quinesina (Reddy i Day, 2001), encara que en treballs més recents altres autors proposen 14 classes i 16 famílies (Miki *et al.*, 2001). En aquest últim treball, els autors comenten que el nombre de KIFs en un genoma és proporcional al tamany del mateix. Així, identifiquen 45 KIFs en humans, 23 en *Drosophila*, 21 en *C.elegans* i 6 en llevat.

La implicació de les KIFs en determinats processos cel·lulars sovint ve donada per la interacció específica del domini *tail* amb la càrrega a transportar. En els últims anys, la utilització de mètodes bioquímics i genètics han portat a la identificació de proteïnes que interaccionen amb les KIFs corresponents a diferents famílies. Aquestes proteïnes s'han classificat en tres classes funcionals: 1) reguladores de les KIFs; 2) dianes directes pel transport; i 3) reguladores o adaptadores de la unió de les KIFs a les càrregues a transportar (revisat a Manning i Snyder, 2000; Goldstein, 2001; Kamal i Goldstein, 2002; Karcher *et al.*, 2002).

### 1.6.2 La quinesina de tipus I o convencional

La primera quinesina identificada va ser la de tipus I o convencional, que participava del transport intracel·lular mitjançat per microtúbuls en l'axó gegant del calamar *Loligo pealei* (Vale *et al.*, 1985). La quinesina convencional és de tipus N-terminal i estructuralment és un heterotetràmer format per dues cadenes pesades (KHC) i per dues cadenes lleugeres (KLC) (Bloom *et al.*, 1988). La KHC exerceix la funció motora, mentre que la KLC normalment està implicada en el reconeixement de les proteïnes que actuen de receptor pel transport (revisat a Verhey i Rapoport, 2001). La KHC es divideix en 4 dominis (figura 16): 1) el domini motor catalític, que es situa en posició N-terminal i conté les regions d'unió a ATP i a microtúbuls; 2) el connector *neck* i el domini *neck*, que coordinen el moviment dels dos dominis motors del dímer de KHC i determinen la direccionalitat del moviment a través dels microtúbuls (revisat a Endow, 2002; Kasprzak i Hajdo, 2002); 3) els *coils 1 i 2* del domini *stalk*, que són responsables de l'homodimerització de les 2 KHC. Un tercer domini *coil (heptad repeats)* seria el lloc d'unió a les KLCs (Diefenbach *et al.*, 1998); i 4) el domini *tail* (format pel *coiled tail* i el *globular tail*), que juga un paper en la regulació de l'activitat motora.

Pel que fa a la KLC, conté 3 dominis destacables. Primerament, la regió N-terminal conté 4 repeticions conservades i contigües de tipus *Heptad*, que formen una estructura alfa-helicoidal de tipus *coiled coil* que s'associa amb la corresponent estructura de la KHC. D'altra banda, la regió central de la KLC està formada per 6 repeticions de tetratricopèptid o TPR, que són repeticions imperfectes de 34 aminoàcids amb estructura d'alfa-hèlix (Gauger i Goldstein, 1993; Gindhart i Goldstein, 1996). La regió TPR constitueix un típic domini d'interacció proteïna-proteïna que està implicat en la interacció de la KLC amb les dianes cel·lulars. La particularitat de la regió TPR de les KLCs és que cada repetició de 34 aminoàcids està separada per un *linker* de 8 aminoàcids. Finalment, la KLC presenta un petit domini globular divergit en posició C-terminal que podria estar implicat en la localització subcel·lular o en la regulació de la quinesina. Actualment, es coneixen pocs receptors de quinesina, la qual cosa fa de la identificació de noves dianes de la KLC un objectiu de gran interès (Manning i Snyder, 2000; Karcher *et al.*, 2002).



**Figura 16.** Estructura de la quinesina de tipus I o convencional. La quinesina I és un tetràmer format de 2 KHC's (en vermell) i 2 KLC's (en blau). Adaptat de Verhey i Rapoport, 2001.

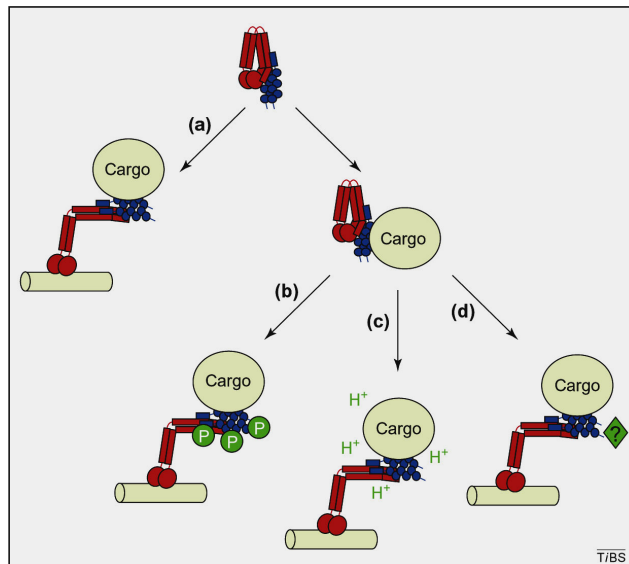
En humans, s'han identificat 3 variants de KHC convencional: KIF5A o nKHC, KIF5B o uKHC, i KIF5C o xKHC (revisat a Miki *et al.*, 2001). Pel que fa a la KLC, s'han identificat dos gens tant en humans com en ratolins (Rahman *et al.*, 1998). Aquests dos gens, però, presenten un elevat nombre de variants produïdes per *splicing* alternatiu. La quinesina convencional ha estat implicada àmpliament en el transport d'òrgans i vesícules embolcallades de membrana en els axons de les neurones (anomenats genèricament com *membrane-bounded organelles* o MBOs), i ho fan de manera anterògrada cap al pol positiu dels microtúbuls. Altres estudis recents han implicat a la quinesina de tipus I en el transport de mitocondris, lisosomes, oligòmers de tubulina i complexos amb mRNA (revisat a Miki *et al.*, 2001). En molts d'aquests processos, la KLC és responsable de la unió a les dianes. Tot i així, en el fong *Neurospora crassa* no s'han identificat KLCs, cosa que implica que la KHC convencional seria suficient per la unió a les dianes a transportar (Seiler *et al.*, 2000), probablement a través del domini *coiled tail* (figura 16). Cal dir que aquesta quinesina de *Neurospora* està implicada en el transport intracel·lular en les hifes del fong (Seiler *et al.*, 1997).

També s'ha constatat que, en la cèl·lula, la major part de quinesina I està lliure (no unida als MBOs ni als microtúbuls) i inactiva. Això evita moviments fútils de la mateixa a través dels microtúbuls quan no hi ha requeriments de transport. Per tant, la inhibició de l'activitat quinesina i la seva unió als MBOs i/o als microtúbuls són processos regulats. Diverses dades apunten a que el domini *tail* de la KHC està implicat en ambdós processos, a través del mecanisme que es presenta a continuació. La quinesina inactiva estaria en una conformació plegada on la regió IAK del domini *tail* globular contacta i inhibeix el domini motor (figura 16). Això és possible perquè s'estableix una interacció del *coiled tail* amb el domini *neck* de la KHC (revisat a Manning i Snyder, 2000; Verhey i Rapoport, 2001). Pel que fa a l'activació del procés de transport, existeixen diferents models (figura 17). El més senzill proposa que la pròpia unió a la càrrega a transportar desbloquejaria la auto-inhibició de la quinesina (figura 17a). Un segon model (figura 17b-d) implicaria que, amb posterioritat a la unió a la càrrega a transportar, es requeriria un mecanisme addicional per activar a la quinesina (com per exemple fosforilació, canvis en el pH o d'altres). En aquest sentit, recentment, s'ha observat que la fosforilació de la KLC per la GSK3 inhibiria la unió de la quinesina als MBOs (Morfini *et al.*, 2002). Aquests tipus de procés també pot tenir un paper en l'alliberament i reciclatge de la quinesina un cop la càrrega ha assolit la seva destinació.

A hores d'ara ja s'han identificat, en els MBOs, diferents proteïnes receptores per la quinesina (revisat a Kamal i Goldstein, 2002; Schnapp, 2003). La quinectina, una proteïna integral de membrana del RE, va ser la primera proteïna proposada com a receptor de quinesina. Tot i així, diferents treballs han posat en dubte que es tractés d'un receptor universal de quinesina, i, actualment, està en discussió la seva funció. Una altre receptor trobat és l'APP (*amyloid precursor protein*), una proteïna de membrana que s'uneix al domini TPR de la KLC. S'ha proposat que l'APP podria actuar com a receptor de quinesina, i estaria present en les membranes de les diferents vesícules que han de ser transportades. Altres proteïnes que s'uneixen al domini TPR de la KLC són les proteïnes adaptadores (o *scaffolding proteins*) JIP1, JIP2 i JIP3 (de *c-Jun N-terminal kinase* o *JNK-interacting proteins*). Les JIPs es troben en un complex amb proteïnes senyalitzadores com JNK, DLK o la proteïna de membrana ApoER2. Es

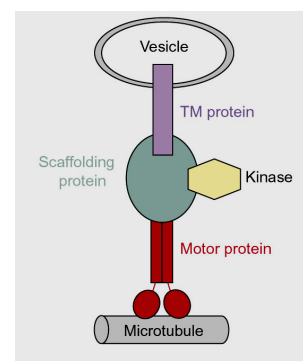
conclou que les vesícules amb ApoER2 són transportades per la quinesina via JIP, amb la qual cosa per primer cop s'involucren els complexos senyalitzadors amb el transport vesicular mediat per quinesina. D'altra banda, recentment s'ha identificat que el domini *tail* de la KHC (KIF5) interacciona amb GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein*), una molècula adaptadora. Presumiblement, les quinesines determinen el transport del receptor de glutamat (una proteïna de membrana) a través de GRIP1.

**Figura 17.** Models d'activació de l'activitat motora de la quinesina I. A la part superior es mostra la conformació auto-inhibitòria de la quinesina, on les KHCs estan en vermell i les KLCs en blau. El microtúbul està representat com un cilindre de color groc. *Cargo*: càrrega transportada. Adaptat de Verhey i Rapoport, 2001.



Del conjunt d'aquestes dades es desprèn que les quinesines s'uneixen als receptors per dos possibles dominis: el domini TPR de la KLC (cas de JIP i APP) o el domini *tail* de la KHC (cas de GRIP1 i de *Neurospora*). També s'observa que existeixen dos models d'interacció de la quinesina amb les càrregues transportades: interacció directa amb proteïnes integrals de membrana (cas de la quinectina i de l'APP) o interacció a través d'una proteïna adaptadora o *scaffolding protein* (cas de JIP-ApoER2, figura 18, i de GRIP-receptor de glutamat). Un dels reptes de futur consisteix en esbrinar si les proteïnes de membrana fan de receptors de quinesina exclusivament o bé tenen altres funcions. D'altra banda, és d'interès conèixer si diferents proteïnes adaptadores determinen una selecció de les vesícules transportades.

**Figura 18.** Model d'unió de la quinesina I a la càrrega transportada a través d'una proteïna adaptadora o *scaffolding protein*. TM: proteïna transmembrana present a la càrrega (Adaptat de Verhey i Rapoport, 2001).



### 1.6.3 Les quinesines de plantes

En els últims anys s'han identificat i caracteritzat varies quinesines en plantes. La majoria d'elles participen en el procés de citoquinesi. Un estudi bioinformàtic sobre la base del genoma d'*Arabidopsis*, ha permès identificar 61 gens que codifiquen per polipèptids amb dominis motors de tipus quinesina (Reddy i Day, 2001). Això converteix *Arabidopsis* com l'eucariota seqüenciat amb més nombre de quinesines, amb una *ratio* d'un 0.24% de gens de quinesina respecte el total de gens. Aquestes dades contrasten amb el nombre de gens de quinesina identificats al genoma humà: només 45 (un 0.13% respecte el total dels gens). La majoria dels 61 membres agrupen en 7 de les 9 famílies de quinesina, mentre que d'altres quedarien com a orfes. A diferència d'altres organismes, un gran nombre de quinesines d'*Arabidopsis* (21 de les 61) són de tipus C-terminal. Un fet que sorprèn en 16 d'aquestes 21 quinesines és que, tot i que s'agrupen en la família de tipus C-terminal a nivell filogenètic, estructuralment no tenen el domini motor situat en C-terminal. Aquestes peculiaritats fan impossible predir la direccionalitat del seu moviment. Així doncs, la gran diversitat de quinesines en plantes ens indica que probablement també estan implicades en múltiples processos cel·lulars.

Tal com s'ha mencionat anteriorment, moltes de les quinesines de plantes caracteritzades fins el moment han estat implicades en citoquinesi, on els microtúbuls hi juguen un paper fonamental a diferents nivells: 1) formació de la banda preprofàsica (que posteriorment determina el pla de divisió); 2) formació del fragmoplast (on s'origina el fus acromàtic) i transport de vesícules derivades de Golgi a la regió equatorial; i 3) fusió de les vesícules per la formació de la placa cel·lular. S'han identificat quinesines que participen en diferents punts del procés de citoquinesi (Nishihama *et al.*, 2002; Strompen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Marcus *et al.*, 2003). Altres quinesines vinculades a la citoquinesi també han estat implicades en la morfogènesi de tricomes (Folkers *et al.*, 2002) o en la separació dels productes de la meiosi masculina prèvia a la formació del gra de pol·len (Yang *et al.*, 2003).

Al marge de la citoquinesi, les quinesines han estat implicades en altres processos. Per exemple, el gen *FRA1* d'*Arabidopsis* té una funció essencial i dependent de microtúbuls en el dipòsit orientat de les microbrilles de cel·lulosa en la paret cel·lular, la qual cosa determina l'eix d'elongació cel·lular (Zhong *et al.*, 2002). D'altra banda, diferents estudis citològics, bioquímics i genètics han posat de manifest que les quinesines tenen un paper en la germinació i elongació del tub pol·línic, on participen en el moviment d'òrgans i vesícules mitjançant per microtúbuls (revisat per Romagnoli *et al.*, 2003). Tot i així, no s'ha identificat el gen o gens que codifiquen per les quinesines implicades en aquest procés. Finalment, també s'han identificat dues quinesines d'*Arabidopsis* que podrien tenir una funció en la dinàmica mitocondrial (Itoh *et al.*, 2001).

El transport mediat per quinesina implica un reconeixement molecular entre la quinesina i el receptor present a la càrrega a transportar. En aquest sentit, recentment s'han identificat proteïnes que interaccionen i que, per tant, són potencialment receptors de les quinesines. Així, s'han trobat proteïnes que interaccionen amb la KCBP d'*Arabidopsis* (kinesin-like calmodulin



binding protein) (Reddy *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2000; Folkers *et al.*, 2002), o amb la quinesina NACK1 de tabac (Nishihama *et al.*, 2002). Tot i així, de moment no es tenen dades de si aquestes i altres proteïnes que interaccionen amb les quinesines de plantes (Kong i Hanley-Bowdoin, 2002; Bouquin *et al.*, 2003) són receptors pel transport o bé són proteïnes reguladores de la funció quinesina.

Pel que fa a la quinesina de tipus I o convencional (KHC convencional), sorprèn que, fins el moment, no n'hi ha cap caracteritzada en plantes. En el cas d'*Arabidopsis*, de les 61 quinesines identificades en el seu genoma només s'ha identificat un gen possible, AtMAA21.110 (Reddy i Day, 2001). Altres organismes com *Drosophila* i *C.elegans* també contenen un únic gen de KHC convencional, mentre que en llevat no se n'ha identificat cap (Miki *et al.*, 2001). Els autors discuteixen que, tot i que el domini *tail* d'AtMAA21.110 és curt (només 100 aminoàcids) i no mostra cap homologia amb altres quinesines, s'hi pot identificar una regió de tipus *coiled coil* entre els aminoàcids 377 i 415, que podria correspondre al lloc d'unió amb la KLC. La predicció de la seqüència AtMAA21.110 no és del tot fiable, i, de fet, no existeixen dades de si aquest gen s'expressa o no. D'altra banda, els autors indiquen que alguns gens que codifiquen per KLCs són predits en el genoma d'*Arabidopsis*, però encara no s'han estudiat experimentalment. En aquest sentit, només existeix una cita en la literatura on es descriu una regió genòmica en *Lotus japonicus* que conté un gen que codifica per un polipèptid amb similitud amb les KLCs (Thykjaer *et al.*, 1997).



## **OBJECTIUS**

En totes les espècies de plantes analitzades existeixen varies isoformes de l'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR) codificades per petites famílies multigèniques. En el cas d'Arabidopsis, existeixen dos gens (*HMG1* i *HMG2*) que codifiquen per tres isoformes de l'enzim: HMGR1L, HMGR1S i HMGR2. Múltiples estudis suggereixen que les isoformes d'HMGR de plantes estarien implicades en la síntesi d'isoprenoides particulars. Aquest model d'especialització funcional de les isoformes d'HMGR està basat en estudis d'expressió gènica en diferents estadis del desenvolupament o en resposta a diferents estímuls. Tot i així, a l'inici d'aquesta tesi, no es tenien dades contrastades de la distribució de les isoformes d'HMGR en diferents teixits ni de la seva distribució subcel·lular. Aquest darrer aspecte era particularment interessant, doncs s'havia suggerit que l'especialització funcional de les isoformes d'HMGR podria venir determinada, en part, per diferències en la seva localització subcel·lular. En aquest sentit, en el domini N-terminal de les HMGRs s'havien identificat dues regions que hi podrien estar implicades: el domini de membrana i la regió N-terminal citosòlica. En el domini de membrana s'havien identificat dues seqüències hidrofòbiques que determinen la inserció de l'enzim al reticle endoplasmàtic (RE). En la regió N-terminal citosòlica s'havien identificat possibles senyals de transport intracel·lular que actuarien probablement a través de la interacció amb altres proteïnes. Amb aquests antecedents, i utilitzant Arabidopsis com a sistema d'estudi, es van proposar els següents objectius:

1. Estudi de la distribució tissular i subcel·lular de les diferents isoformes de l'HMGR.
2. Determinació del paper del domini N-terminal de les diferents isoformes de l'HMGR en la seva localització subcel·lular.
3. Identificació i caracterització de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de les HMGRs.



Les tècniques d'anàlisi i de manipulació de DNA, RNA i proteïnes d'ús més comú emprades en aquest treball van ser realitzades segons el manual de protocols *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1989). Les metodologies que es descriuen a continuació són més específiques i la majoria d'elles es van posar a punt per a realitzar aquest treball.

## 2.1 EL MATERIAL BIOLÒGIC

### 2.1.1 Soques bacterianes

*Escherichia coli*:

Soques utilitzades per amplificar el DNA plasmídic:

**DH5 $\alpha$** : endA1 hsdR17( $r_k^- m_k^+$ ) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 supE44  $\Delta$ (lacIZYA-argFV169) deoR ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)

**XL-1 blue**: supE44 hsdR17( $r^- m^+$ ) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac F'[proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)].

Soques utilitzades per l'expressió de proteïnes:

**BL21**: F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal dcm lon<sup>-</sup>

**BL21DE3 pLysS**: F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal dcm  $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]

*Agrobacterium tumefaciens*:

**GV3101 pMP90RK** (Koncz i Schell, 1986)

### 2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Les soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en els experiments de doble híbrid van ser obtingudes de la casa comercial Clontech Laboratories, Inc. Per les característiques dels promotors que dirigeixen l'expressió del gen selector *HIS3* i del gen *reporter lacZ*, l'expressió és diferent en les dues soques. Així doncs, la soca Y190 presenta una expressió basal elevada (*leaky*) del gen *HIS3* que genera soroll de fons, mentre que l'expressió basal d'aquest gen seleccionable en la soca CG-1945 és inferior. Pel que fa al gen *reporter lacZ*, la soca Y190 presenta uns bons nivells d'expressió, mentre que la soca CG-1945 presenta nivells d'expressió baixos que poden generar falsos negatius. És per això que, en molts casos, per determinar el creixement en absència d'histidina, es va utilitzar la soca CG-1945, i, per determinar l'activació del gen *reporter lacZ*, es va utilitzar la soca Y190.

A continuació, es presenten les característiques de les soques de llevat Y190 i CG-1945, extretes del catàleg de Clontech K1604-1.

| <i>Soca</i>    | <i>Genotip</i>   | <i>Reporters</i> | <i>Marcadors de transformació</i> |
|----------------|--|------------------|-----------------------------------|
| <b>CG-1945</b> | MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801,<br>ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112,<br>gal4-542, gal80-538, cyh <sup>r</sup> 2,<br>LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3<br>URA3::GAL4 <sub>17-mers(x3)</sub> -CyC1 <sub>TATA</sub> -lacZ | HIS3, lacZ       | trp1, leu2, cyh <sup>r</sup> 2    |
| <b>Y190</b>    | MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801,<br>ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112,<br>gal4Δ, gal80Δ, cyh <sup>r</sup> 2,<br>LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -HIS3 <sub>TATA</sub> -HIS3<br>URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ               | HIS3, lacZ       | trp1, leu2, cyh <sup>r</sup> 2    |

### 2.1.3 Línia cel·lular T87

La línia cel·lular T87 (Axelos *et al.*, 1992) derivada de fulles d'*Arabidopsis* va ser cedida amablement per la Dra. Michèle Axelos ("Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes", CNRS-INRA, Toulouse).

### 2.1.4 *Arabidopsis thaliana*

Els experiments descrits en aquesta memòria es realitzaren amb l'espècie *Arabidopsis thaliana* varietat Columbia-3 (Lehle Seeds, USA). És la varietat utilitzada en el programa de seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*.

## 2.2 ELS ANTICOSSOS

Els anticossos primaris utilitzats han estat els següents:

- anti-hemaglutinina:

*anti-HA high affinity, rat monoclonal antibody clone 3F10*, Roche Molecular Biochemicals, referència 1867423. Dilució per western blot 1:1000.

- anti-CD1:

anticossos policlonals obtinguts de conill i generats contra el domini catalític de l'HMGR1 (CD1) recombinant expressat a *E.coli* (Dale *et al.*, 1995). Aquests anticossos van ser amablement cedits per la Dra. Montse Arró del laboratori del Dr. Albert Ferrer. Dilució 1:10.000 per *western blot* i 1:500 per immunofluorescència

- anti-CD1 clarificat:

Els anticossos policlonals anti-CD1 presenten una sèrie d'IgGs contaminants que reconeixen proteïnes d'*E.coli* que, probablement, estaven presents com a proteïnes contaminants en l'extracte de la proteïna CD1 recombinant punxada en els conills. Per tal d'alliberar aquests anticossos de les IgGs contaminants, es van clarificar seguint el següent procediment:

- Barregeu 15 µl de l'anti-CD1 i 280 µl de solució de bloqueig (vegeu l'apartat 2.6.2.).
- Afegiu 100 µl d'una matriu d'agarosa que ha estat en contacte amb un extracte proteic d'*E.coli* i que, per tant, conté una càrrega important de proteïnes que s'uneixen inespecíficament a la matriu
- Incubeu 20 min a 4°C en agitació orbital
- Centrifugueu i recupereu el sobrenedant, que estarà lliure de les IgGs contaminants. S'espera que aquestes hagin quedat retingudes en el sediment, és a dir, en la matriu amb proteïnes d'*E.coli* que s'hi havien unit inespecíficament.
- Repetiu aquest procediment tres cops més
- Afegiu azida sòdica al 0.1% al sobrenedant final i guardeu-lo a 4°C

Els anticossos secundaris utilitzats són els següents:

- anti-rat peroxidase:

*rabbit anti-rat, PO conjugated*, Dako. Dilució 1:3000 per western blot.

- anti-rabbit peroxidase:

*anti-rabbit peroxidase*, Amersham. Dilució 1:10000 per western blot.

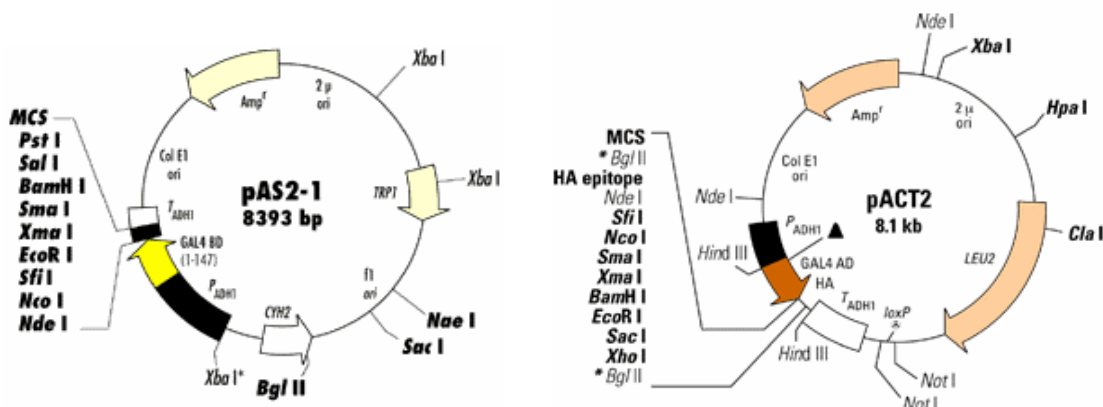
- anti-rabbit AlexaFluor-350:

Alexa Fluor 350 anti-rabbit IgG, Molecular probes. Dilució 1:300 per immunofluorescència.

## 2.3 ELS PLASMIDIS

### 2.3.1 El sistema del doble híbrid

Els diferents subdominis de l'HMGR així com els enzims de la via del mevalonat van ser subclonats en els plasmidis comercials pAS2-1 i pACT2 (Clontech), per l'expressió en llevat de les proteïnes de fusió amb els domini d'unió al DNA (BD) i d'activació (AD) del factor de transcripció GAL4.



### 2.3.1.1 Fusions amb els enzims de la via del mevalonat d'Arabidopsis

| CONSTRUCCIÓ      | NOM ENZIM                          | PLASMIDI | DIANES                       |
|------------------|------------------------------------|----------|------------------------------|
| <b>BD-AACT1</b>  | AACT1 (acetoacetil-CoA tiolasa 1)  | pAS2-1   | <i>Bam</i> HI i <i>Sal</i> I |
| <b>AD-AACT1</b>  | AACT1 (acetoacetil-CoA tiolasa 1)  | pACT2    | <i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I |
| <b>BD-AACT2</b>  | AACT2 (acetoacetil-CoA tiolasa 2)  | pAS2-1   | <i>Nco</i> I i <i>Sal</i> I  |
| <b>AD-AACT2</b>  | AACT2 (acetoacetil-CoA tiolasa 2)  | pACT2    | <i>Nco</i> I i <i>Xho</i> I  |
| <b>BD-HMGS</b>   | HMGS (HMG-CoA sintasa)             | pAS2-1   | <i>Nde</i> I i <i>Eco</i> RI |
| <b>AD-HMGS</b>   | HMGS (HMG-CoA sintasa)             | pACT2    | <i>Nde</i> I i <i>Xho</i> I  |
| <b>BD-MVK</b>    | MVK (mevalonat quinasa)            | pAS2-1   | <i>Eco</i> RI i <i>Sal</i> I |
| <b>AD-MVK</b>    | MVK (mevalonat quinasa)            | pACT2    | <i>Nco</i> I i <i>Xho</i> I  |
| <b>BD-HMGR1S</b> | HMGR1S (HMG-CoA reductasa 1 curta) | pAS2-1   | <i>Nde</i> I i <i>Eco</i> RI |
| <b>AD-HMGR1S</b> | HMGR1S (HMG-CoA reductasa 1 curta) | pACT2    | <i>Nde</i> I i <i>Xho</i> I  |

### 2.3.1.2 Fusions amb els diferents subdominis de les isoformes HMGR1S, HMGR1L i HMGR2

#### 2.3.1.2.1 Fusions realitzades per restricció:

| CONSTRUCCIÓ       | DOMINI (aminoàcids) | PLASMIDI | DIANES                       | OBTINGUT DE:   |
|-------------------|---------------------|----------|------------------------------|--|
| <b>AD-NT1L</b>    | 1-100 HMGR1L        | pACT2    | <i>Nco</i> I i <i>Bam</i> HI | BD-NT1L  |
| <b>AD-1Lextra</b> | 1-50 HMGR1L         | pACT2    | <i>Nco</i> I i <i>Bam</i> HI | BD-1Lextra   |
| <b>BD-CD1</b>     | 166-592 HMGR1S      | pAS2-1   | <i>Nde</i> I i <i>Eco</i> RI | pCD1 (Dale <i>et al.</i> , 1995)                       |
| <b>AD-CD1</b>     | 166-592 HMGR1S      | pACT2    | <i>Nde</i> I i <i>Eco</i> RI | pCD1 (Dale <i>et al.</i> , 1995)                       |
| <b>BD-CD2</b>     | 139-592 HMGR2       | pAS2-1   | <i>Nde</i> I i <i>Sma</i> I  | pCD2 ( <i>Nde</i> I/ <i>Cla</i> Irom) (González, 2002) |
| <b>AD-CD2</b>     | 139-592 HMGR2       | pACT2    | <i>Nde</i> I i <i>Bam</i> HI | BD-CD2   |



## 2.3.1.2.2 Fusions realitzades per PCR:

| Construcció         | Domini (aminoàcids) | Plasmidi | Dianes                      | Primer forward        | Primer reverse        |
|---------------------|---------------------|----------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>BD-NT1L</b>      | 1-100 HMGR1L        | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>BD-1Lextra</b>   | 1-50 HMGR1L         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | NT1LR- <i>BamHI</i>   |
| <b>BD-NT1S</b>      | 1-50 HMGR1S         | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | NT1NF- <i>NcoI</i>    | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>AD-NT1S</b>      | 1-50 HMGR1S         | pACT2    | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | NT1NF- <i>NcoI</i>    | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>BD-NT2</b>       | 1-32 HMGR2          | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | NT2F- <i>NcoI</i>     | NT2R- <i>BamHI</i>    |
| <b>AD-NT2</b>       | 1-32 HMGR2          | pACT2    | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | NT2F- <i>NcoI</i>     | NT2R- <i>BamHI</i>    |
| <b>MC2-NT1S</b>     |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | SR2.1SF- <i>NcoI</i>  | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>MC1S-NT2</b>     |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | SR1.2F- <i>NcoI</i>   | NT2R- <i>BamHI</i>    |
| <b>ΔMC-NT1S</b>     |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | SRdel1SF- <i>NcoI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>ΔRRR-NT1S</b>    |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | Rdel1SF- <i>NcoI</i>  | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>ΔDL-NT1S</b>     |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | Hfdel1SF- <i>NcoI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>ΔPro-NT1S</b>    |                     | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | PRdel1SF- <i>NcoI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(7-50)NT1S</b>   | HMGR1S 7-50         | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | delNT1SF- <i>NcoI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(20-50)NT1S</b>  | HMGR1S 20-50        | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | d1NT1SF- <i>NcoI</i>  | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(7-100)NT1L</b>  | HMGR1L 7-100        | pAS2-1   | <i>NcoI</i> i <i>BamHI</i>  | delNT1LF- <i>NcoI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(25-100)NT1L</b> | HMGR1L 25-100       | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | d1NT1LF- <i>EcoRI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(37-100)NT1L</b> | HMGR1L 37-100       | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | d2NT1LF- <i>EcoRI</i> | NT1NR- <i>BamHI</i>   |
| <b>(1-90)NT1L</b>   | HMGR1L 1-90         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | d1NT1SR- <i>BamHI</i> |
| <b>(1-79)NT1L</b>   | HMGR1L 1-79         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | d2NT1SR- <i>BamHI</i> |
| <b>(1-64)NT1L</b>   | HMGR1L 1-64         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | d7NT1LR- <i>BamHI</i> |
| <b>(1-60)NT1L</b>   | HMGR1L 1-60         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | d8NT1LR- <i>BamHI</i> |
| <b>(1-56)NT1L</b>   | HMGR1L 1-56         | pAS2-1   | <i>EcoRI</i> i <i>StuI</i>  | NT1LF- <i>EcoRI</i>   | d2NT1SR- <i>BamHI</i> |

## 2.3.1.3 Fusions amb les proteïnes PR2A, KLC1 i PR65

A partir del crivellatge de la genoteca de cDNA d'Arabidopsis, es van rescatar els següents clons fusionats al domini d'activació (AD) del factor de transcripció Gal4 en el **vector pACT** (Clontech):

**AD-PR2A1 (1-538):** correspon als aminoàcids 1 a 538 de la PR2A1

**AD-PR2A2 (88-536):** correspon als aminoàcids 88 a 536 de la PR2A2

**AD-KLC1 (36-663):** correspon als aminoàcids 36 a 663 de la KLC1

Un cop es van identificar i aïllar els cDNAs complets corresponents a PR2A1, PR2A2 i KLC1, es van realitzar noves fusions amb diferents regions de les proteïnes en el vector **pACT2**:

**AD-PR2A1:** pACT2-PR2A1

El fragment d'extrems *Bgl*II obtingut de l'AD-PR2A1 (1-538) va ser clonat en el vector pACT2 prèviament digerit amb *Bam*HI.

**AD-PR2A1(1-361):** pACT2-PR2A1(1-361)

El fragment d'extrems *Bgl*II i *Sal*I obtingut de l'AD-PR2A1 (1-538) va ser clonat en el vector pACT2 prèviament digerit amb *Bam*HI i *Xho*I.

**AD-PR2A1(150-538):** pACT2-PR2A1(150-538)

El fragment d'extrems *Nco*I i *Bgl*II obtingut de l'AD-PR2A1 (1-538) va ser clonat en el vector pACT2 prèviament digerit amb *Nco*I i *Bam*HI.

**AD-PR2A1(210-538):** pACT2-PR2A1(210-538)

El fragment d'extrems *Nde*I i *Bgl*II obtingut de l'AD-PR2A1 (1-538) va ser clonat en el vector pACT2 prèviament digerit amb *Nde*I (digestió parcial) i *Bam*HI.

**AD-PR2A2:** pACT2-PR2A2

El fragment obtingut per PCR amb els oligonucleòtids 25F-*Xho*I i 25R-*Xho*I sobre pGEM-Teasy-PR2A2 (vegeu l'apartat 2.3.6) i digerit amb *Xho*I va ser clonat en el plasmidi pACT2 digerit amb el mateix enzim.

**AD-KLC1:** pACT2-KLC1

El fragment obtingut per digestió amb *Nco*I i *Bam*HI del pSK-KLC1 (vegeu l'apartat 2.3.6) va ser clonat en el pACT2 digerit amb els mateixos enzims.

**AD-KLC1 (172-663):** pACT2-KLC1(172-663)

El fragment obtingut per digestió amb *Dra*I i *Bgl*II de l'AD-KLC1 (36-663) va ser clonat en el pACT2 digerit amb els enzims *Sma*I i *Bam*HI.

**AD-KLC1 (523-663):** pACT2-KLC1(523-663)

El fragment obtingut per digestió amb *Eco*RV i *Bgl*II de l'AD-KLC1 (36-663) va ser clonat en el pACT2 digerit amb els enzims *Sma*I i *Bam*HI.

**AD-KLC1 (1-239):** pACT2-KLC1(1-239)

El fragment obtingut per digestió amb *Mlu*I (el qual es va fer rom en una reacció de *filling* amb Klenow) i *Nco*I de l'AD-KLC1 va ser clonat en el pACT2 digerit amb els enzims *Nco*I i *Sma*I.

**AD-KLC1 (1-522):** pACT2-KLC1(1-522)

El fragment obtingut per digestió amb *Nco*I i *Eco*RV de l'AD-KLC1 va ser clonat en el pACT2 digerit amb els enzims *Nco*I i *Sma*I.

**BD-PR65** (pAS2.1-PR65): El fragment obtingut per digestió amb *EcoRV* del clon AT65KPDF1 va ser clonat en el vector pAS2.1 digerit amb *SmaI*.

## 2.3.2 Localització subcel·lular

### 2.3.2.1 Vectors d'expressió transitòria en fulles

El plasmidi pGFPAU va ser construït per a realitzar les diferents fusions de l'HMGR amb la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Aquest plasmidi deriva del plasmidi pGFP (Chiu *et al.*, 1996).

**pGFPAU:** El plasmidi pGFP va ser digerit amb l'enzim *NcoI* per lligar-hi un insert obtingut de l'anellament dels dos oligonucleòtids: pGFPMCSF i pGFPMCSR. Aquest insert conté diverses dianes de restricció que serveixen de polilinker (vegeu apartat 3.2.1).

Per facilitar la obtenció d'algunes de les construccions finals, es van generar els següents constructes:

#### **BD-NT1S/LK:** pAS2-1-HMGR1S (1-178)

El fragment obtingut per PCR sobre l'HMGR1S amb els oligonucleòtids NT1NF-*NcoI* i LK178R-*BamHI*, va ser digerit amb els enzims *NcoI* i *BamHI*, i es va lligar en un pAS2-1 digerit amb els mateixos enzims.

#### **BD-NT1L(M51A)/LK:** pAS2-1-(M51A)HMGR1L (1-228)

El fragment obtingut per PCR sobre (M51A)HMGR1L (González, 2002) amb els oligonucleòtids NT1LF-*EcoRI* i LK178R-*BamHI*, va ser digerit amb els enzims *EcoRI* i *BamHI*, i es va lligar en un pAS2-1 digerit amb els mateixos enzims.

| CONSTRUCCIÓ     | REGIÓ<br>(aminoàcids) | PLASMIDI | DIANES                          | ESTRATÈGIA  |
|-----------------|-----------------------|----------|---------------------------------|---|
| <b>1S:GFP</b>   | HMGR1S aa 1-178       | pGFPAU   | <i>NcoI/SaI</i>                 | Fragment <i>NcoI/BamHI</i> de BD-NT1S/LK                    |
| <b>2:GFP</b>    | HMGR2 aa 1-153        | pGFPAU   | <i>NcoI/SaI</i>                 | PCR sobre HMGR2 amb NT2F- <i>NcoI</i> i LK2153R- <i>SaI</i> |
| <b>1L:GFP</b>   | HMGR1L aa 1-228       | pGFPAU   | <i>NcoI</i> fet rom/ <i>SaI</i> | PCR sobre BD-NT1L(M51A)/LK amb romo1LF i pASR               |
| <b>ΔR1S:GFP</b> | HMGR1S                | pGFPAU   | <i>NcoI/SaI</i>                 | PCR sobre 1S:GFP amb Rdel1SF- <i>NcoI</i> i pGFP5R          |

**pKar6-GFP:** expressa una proteïna quimèrica control de localització en el reticle endoplasmàtic. Aquest plasmidi va ser amablement cedit per la Dra. Margarita Torrent.

### 2.3.2.2 Vectors per l'expressió mediada per *Agrobacterium* en la línia cel·lular T87

Les construccions que es detallen a continuació van ser realitzades mitjançant el clonatge d'un fragment *Hind*III obtingut del plasmidi d'expressió transtòria corresponent, en el plasmidi pPCV002 (Ferrando *et al.*, 2001) digerit amb el mateix enzim. El plasmidi pPCV002 va ser amablement cedit pel Dr Alejandro Ferrando.

**GFP:** pPCV002-GFP

**1S:GFP:** pPCV002-1S:GFP

**1L:GFP:** pPCV002-1L:GFP

**2:GFP:** pPCV002-2:GFP

**ΔR1S:GFP:** pPCV002-ΔR1S:GFP

**pGFPHDEL:** Control de localització en el reticle endoplasmàtic (Batoko *et al.*, 2000). Aquest plasmidi va ser amablement cedit pel Dr. Ian Moore

### 2.3.3 Vectors per l'expressió de proteïnes en plantes transgèniques

Aquestes construccions van ser realitzades en el plasmidi Menchu-812 (Ferrando *et al.*, 2000), amablement cedit pel Dr. Alejandro Ferrando.

**HA:KLC1:** Menchu-812-HA:KLC1

El fragment obtingut per PCR amb els oligonucleòtids 12F-BamHI i T3 sobre el plasmidi pSK-KLC1 (vegeu l'apartat 2.3.6), va ser digerit amb *Bam*HI i clonat en el plasmidi Menchu-812 digerit amb aquest mateix enzim.

**HA:TPR:** Menchu-812-HA:TPR

El fragment obtingut per digestió amb *Bg*/II del plasmidi AD-KLC1 (172-663) (vegeu l'apartat 2.3.1.3.) va ser clonat en el plasmidi Menchu-812 digerit amb *Bam*HI.

### 2.3.4 Expressió en *E.coli*

#### 2.3.4.1 Fusions a C-terminal de la GST

Les fusions en posició C-terminal de la GST (Glutatió-S-transferasa) van ser realitzades en els plasmidis pGEX4T-1 i pGEX5X-2 (Amersham Pharmacia).

| CONSTRUCCIÓ      | PLASMIDI | DIANES                      | ESTRATÈGIA  |
|------------------|----------|-----------------------------|---|
| <b>GST-NT1L</b>  | pGEX4T-1 | <i>Eco</i> RI i <i>Sa</i> I | Fragment <i>Eco</i> RI i <i>Sa</i> I obtingut de BD-NT1L  |
| <b>GST-PR2A1</b> | pGEX5X-2 | <i>Bam</i> HI               | Fragment <i>Bg</i> /II obtingut de AD-PR2A1 (1-538)   |
| <b>GST-KLC1</b>  | pGEX5X-2 | <i>Bam</i> HI               | Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids 12F- <i>Bam</i> HI i T3 sobre pSK-KLC1 digerit amb <i>Bam</i> HI |

### 2.3.4.2 Fusions a N-terminal de GST

Les fusions a N-terminal de la GST es van obtenir utilitzant una estratègia de clonatge en dos passos. Primerament, es van introduir les seqüències corresponents a l'HMGR en el plasmidi d'expressió en *E. coli* pET23d (Novagen) que, a continuació, va ser digerit per introduir, a C-terminal de l'HMGR, la seqüència que codifica per la GST.

**NT1L-pET23d:** el fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids NT1LF-EcoRI i pASR sobre el plasmidi BD-NT1L, va ser digerit amb els enzims *EcoRI*, que es va fer rom amb l'enzim Mung Bean, i *SaI*. Aquest fragment es va clonar en el plasmidi pET23d digerit amb els enzims *NcoI*, fet rom amb Mung Bean, i *SaI*.

**NT1S-pET23d i NT2-pET23d:** El fragment *NcoI* i *SaI* obtingut dels plasmidis BD-NT1S i BD-NT2, respectivament, va ser clonat en el plasmidi pET23d digerit amb els mateixos enzims.

**NT1L-GST, NT1S-GST i NT2-GST** (en el vector pET23d): Un fragment de PCR corresponent a la GST obtingut amb els oligonucleòtids NTGSTF-HindIII i pGEX3'R sobre el vector pGEX4T-1, va ser digerit amb els enzims *HindIII* i *XhoI* i va ser clonat en els plasmidis anteriors (NT1L-pET23d, NT1S-pET23d i NT2-pET23d) digerits amb els mateixos enzims.

**1Lextra-pET23d:** El fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids T7 i NT1LR-BamHI sobre el plasmidi NT1L-GST (en pET23d) i digerit amb *XbaI* i *BamHI*, va ser clonat en el mateix plasmidi digerit amb els mateixos enzims.

**1Lextra-GST** (en pET23d): Per digestió del plasmidi NT1S-GST es va obtenir un fragment d'extrems *BamHI* corresponent a la GST, que es va clonar en el plasmidi 1Lextra-pET23d digerit amb el mateix enzim.

### 2.3.5 Transcripció-traducció *in vitro*

| CONSTRUCCIÓ              | PLASMIDI | DIANES                     | ESTRATÈGIA  |
|--------------------------|----------|----------------------------|---|
| <b>HisKLC1 (36-663)</b>  | pRSETC   | <i>XhoI</i>                | Digestió <i>XhoI</i> sobre AD-KLC1 (36-663)   |
| <b>HisPR2A1 (1-538)</b>  | pRSETA   | <i>BglII</i>               | Digestió <i>BglII</i> sobre AD-PR2A1 (1-538)  |
| <b>HisPR2A2 (88-536)</b> | pRSETC   | <i>XhoI</i>                | Digestió <i>XhoI</i> sobre AD-PR2A2 (88-536)  |
| <b>HisKLC1</b>           | pET28a+  | <i>NdeI</i> i <i>BamHI</i> | Digestió <i>NdeI/BamHI</i> sobre AD-KLC1  |
| <b>HisPR2A1</b>          | pET28a+  | <i>NheI</i> i <i>BamHI</i> | Digestió <i>NheI/BglII</i> sobre AD-PR2A1   |
| <b>HisPR2A2</b>          | pET28a+  | <i>XhoI</i>                | Fragment obtingut per PCR amb els oligonucleòtids 25F- <i>XhoI</i> i 25R- <i>XhoI</i> sobre pGEM-Teasy-PR2A2, i digerit amb <i>XhoI</i> |

### 2.3.6 Clonatge dels cDNAs complets corresponents a PR2A1, PR2A2 i KLC1

#### **PR2A1:** pGEM-T-PR2A1

Per comparació amb d'altres cDNAs presents en bases de dades (Hendershot *et al.*, 1999) es van dissenyar dos oligonucleòtids, 2totF i 2totR, que van permetre l'amplificació per PCR d'un cDNA complet corresponent a PR2A1. Aquest cDNA, que presentava part de les regions 5' i 3' transcrites no traduïdes (5' i 3' UTR), va ser amplificat a partir de la genoteca d'expressió pACT, i es va clonar en el plasmidi pGEM-T (Promega).

#### **PR2A2:** pGEM-Teasy-PR2A2

Per tal d'identificar cDNAs estesos per 5' del clon parcial aïllat en el crivellatge, mitjançant PCR es va realitzar una primera reacció d'amplificació lineal sobre la genoteca d'expressió pACT, utilitzant l'oligonucleòtid 25GSP1 —el qual s'anella en antisentit a la regió 5' del clon parcial inicialment aïllat—. A continuació, es va realitzar una amplificació exponencial utilitzant els oligonucleòtids 25GSP2 (que s'anella en antisentit encara més a 5' que 25GSP1) i pACTBF (que s'anella en sentit en el plasmidi pACT). D'aquesta manera, es van aïllar una sèrie de productes de PCR que es van clonar en un pBluescript SK(+) per a la seva seqüenciació. Tots ells estenien la regió 5' del clon aïllat inicialment en el crivellatge, més enllà del triplet ATG que codifica per la primera metionina. A partir d'aquí, es van dissenyar els oligonucleòtids 25totF (regió 5'UTR) i 25totR (regió 3'UTR), que es van utilitzar per amplificar sobre la genoteca pACT un cDNA complet corresponent a PR2A2, el qual es va clonar en el vector pGEMT-easy (Promega).

#### **KLC1:** pSK-KLC1

Per tal d'identificar cDNAs estesos per 5' del clon parcial aïllat en el crivellatge, mitjançant PCR es va realitzar una primera reacció d'amplificació lineal sobre la genoteca d'expressió pACT, utilitzant l'oligonucleòtid 12GSP1 —el qual s'anella en antisentit a la regió 5' del clon parcial inicialment aïllat—. A continuació, es va realitzar una amplificació exponencial utilitzant els oligonucleòtids 12GSP2 (que s'anella en antisentit encara més a 5' que 12GSP1) i pACTBF (que s'anella en sentit en el plasmidi pACT). D'aquesta manera, es van aïllar una sèrie de productes de PCR que es van clonar en un pBluescript SK(+) per a la seva seqüenciació. Tots ells estenien la regió 5' del clon aïllat inicialment en el crivellatge, més enllà del triplet ATG que codifica per la primera metionina. A partir d'aquí, es van dissenyar els oligonucleòtids 12totF.2 (regió 5'UTR) i 12totR (regió 3'UTR), que es van utilitzar per amplificar sobre la genoteca pACT un cDNA complet corresponent a KLC1, el qual es va clonar en el vector pBluescript-SK+ digerit amb SmaI.

## 2.4 ELS OLIGONUCLEÒTIDS

| Nom           | Seqüència 5'-3'                             |
|---------------|---|
| pGFPMCSF      | catgggcaattggtaccgcccggctagcggccgcagtcgacgg |
| pGFPMCSR      | catgccgtcgactgcccggctagccggcgggtaccaattgcc  |
| PGFPAUF       | gcattctacttctattgcagc                       |
| GFP5R         | tcagcttgccgtaggtgg                          |
| TermR         | caacacatgagcgaacc                           |
| pASF          | tcatcggaagagagtag                           |
| pASR          | taaaacctaagagtcac                           |
| pACTBF        | ataccactacaatggatgatg                       |
| pACTF         | gataccccaccaaacc                            |
| pACTR         | gtgaacttgccggggtt                           |
| NT1NF-NcoI    | gacatgccatggatctccgctcggaggcc               |
| LK178R-BamHI  | gtgcggtatcccgatcttcacaatctcctcgtcttc        |
| NT1LF-EcoRI   | ggaattcatgaagaaaaagcaagctggtcc              |
| romo1LF       | ccatgaagaaaaagcaagctgg                      |
| NT2F-NcoI     | gacatgccatggaggatctccgctcgtagatttc          |
| LK2153R-SalI  | cgacgtcgactaatttaacgatttcttcatcttc          |
| MKF-EcoRI     | ggaattcatggaagtgaagctagagctcc               |
| MKR-SalI      | gcgctgacatagcaaactctgagctccggtacc           |
| NT1NR-BamHI   | gtgcggtatcccgcgctcggatgctttcgggtg           |
| NT1LR-BamHI   | gtgcggtatcctggagggaatgaataatctctcc          |
| NT2R-BamHI    | gtgcggtatcccgcgctcagaggctttacgaagag         |
| SR2.1SF-NcoI  | gacatgccatggaggatctccgctcggaggcc            |
| SR1.2F-NcoI   | gacatgccatggatctccgctcgtagatttcc            |
| SRdel1SF-NcoI | ctgccatggctgcctctgggcctcctaaaccacc          |
| Rdel1SF-NcoI  | gccatggatctcgtcggcgcctcctaaaccac            |
| Hfdel1SF-NcoI | catgccatggctgcccgctcggaggcctccta            |
| PRdel1SF-NcoI | gccatggatctccgctcggaggcctccaacggatctttccgt  |
| delNT1SF-NcoI | gacatgccatggggcctcctaaaccaccgg              |
| d1NT1SF-NcoI  | gacatgccatgggatctttcgttcttatcagcc           |
| delNT1LF-NcoI | gacatgccatgggtccccaacagacatgcg              |
| d1NT1LF-EcoRI | cggaattctcacacttatcagccacctc                |

|                |   |
|----------------|---|
| d2NT1LF-EcoRI  | cggaattctctcctctctctccccct                          |
| d1NT1SR-BamHI  | gtgcggatcctggttagcccggcgacgatg                      |
| d2NT1SR-BamHI  | gtgcggatccagtgcgaggctgataagaac                      |
| d7NT1LR-BamHI  | gtgcggatccggttgtaaccgggtggttag                      |
| d8NT1LR-BamHI  | gtgcggatcctgggttaggaggcctccg                        |
| 12totF.2       | tctcttacacaaccacactaag                              |
| 12totR         | aactagaaaacataaagcctcttc                            |
| 12F-BamHI      | cgcggatccccatggacgtaggagagagc                       |
| 12GSP1         | tccaaccaaatgcctcaac                                 |
| 12GSP2         | tcctagattcagctccatagc                               |
| 12GSP3         | gacggagactgatcatcagaac                              |
| 12.4R          | caccaagctcaggactctc                                 |
| 2totF          | tccgatattgggggtttgttag                              |
| 2totR          | aaccggtgtgtggttccac                                 |
| 25totF         | gaagactagattcgatgtggtg                              |
| 25totR         | ttcttttgttgacttgctacctc                             |
| 25F-XhoI       | ccgctcgagccatggtggatacggttattccc                    |
| 25R-XhoI       | ccgctcgagttcttttgttgacttgctacctc                    |
| 25GSP1         | aggctcggtgactactttg                                 |
| 25GSP2         | ttagaaggggctctctggttg                               |
| T7             | gtaatacgactcactataggg                               |
| T3             | attaaccctcactaaaggaa                                |
| NTGSTF-HindIII | taccaagcttatgtcccctatactagggtattg                   |
| pGEX3'R        | Primer antisentit situat a 3' de la GST del PGEX4T1 |



## 2.5 MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC

### 2.5.1 Mètodes de treball en *Saccharomyces cerevisiae*

El manteniment i manipulació de les soques de llevat es va fer seguint les instruccions proporcionades per Clontech, en el llibre de protocols de treball amb llevats anomenat *Yeast Protocols Handbook* (YPH) (PT3024-1).

### 2.5.2 Condicions de cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens*

Aquesta espècie bacteriana es va créixer en medi YEB, a 28°C de temperatura i en una agitació de 180-200 rpm.

|                  |  |              |
|------------------|--|--------------|
| <b>Medi YEB:</b> | - Extracte de llevat                   | .....1 g/l   |
|                  | - Extracte de bou                      | .....5 g/l   |
|                  | - Peptona                              | .....5 g/l   |
|                  | - Sacarosa                             | .....5 g/l   |
|                  | - MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | .....0.5 g/l |

Afegiu una lletia de NaOH per litre per assolir un pH entorn a 7.0

Esterilitzeu en una autoclau a 121°C durant 20 min

Si es prepara medi sòlid, afegiu agar 15 g/l

#### 2.5.2.1 Preparació de cèl·lules d'*Agrobacterium* competents

- 1) A partir d'una colònia de la soca *A. tumefaciens* GV3101 pMP90RK, inoculeu un precultiu de 10 ml de medi YEB amb rifampicina (50 µg/ml) —resistència cromosòmica de la soca GV3101— i kanamicina (100 µg/ml) —resistència codificada pel plasmidi Helper pMP90RK—, i incubeu en agitació (180 rpm) a 28°C durant 24 h.
- 2) Inoculeu una dilució 1/200 del precultiu en medi YEB amb rifampicina i kanamicina, i incubeu en agitació a 28°C fins a una DO<sub>600</sub>=0.5. Normalment el cultiu triga 18-20 h a assolir aquesta DO.
- 3) Sedimenteu les cèl·lules a 6.000 rpm (rotor JA-17, Beckman) durant 5 min a 4°C. A partir d'aquest punt, cal realitzar totes les manipulacions a 4°C.
- 4) Descarteu el sobrenedant i ressuspeueu les cèl·lules suaument en 10 ml de solució 0.15M NaCl a 4°C.
- 5) Centrifugueu de nou 5 min a 6.000 rpm (rotor JA-20, Beckman) a 4°C.
- 6) Descarteu el sobrenedant i ressuspeueu les cèl·lules en 1 ml de solució CaCl<sub>2</sub> 200 mM a 4°C.
- 7) Repartiu el volum en alíquotes de 100 µl i congeleu en nitrogen líquid. Guardeu-les a -80°C.

#### 2.5.2.2 Transformació d'*Agrobacterium*

- 1) Afegiu 0.5 µg del DNA plasmídic que es vol introduir dins la cèl·lula a una alíquota de 100 µl de cèl·lules competents d'*A. tumefaciens* descongelada en gel. Incubeu 30 min en gel.
- 2) Incubeu durant 1 min en nitrògen líquid.

- 3) Atempereu les cèl·lules incubant-les a 37°C durant 1 min.
- 4) Afegiu 1 ml de medi YEB, i incubeu 3 h a 28°C en agitació suau (120 rpm).
- 5) Sembreu les cèl·lules en una placa de petri que contingui medi YEB sòlid amb rifampicina (50 µg/ml), kanamicina (100 µg/ml) i carbenicilina (100 µg/ml), a la qual confereixen resistència els plasmidis Menchu-812 i pPCV002.

Confirmació de les colònies:

De les colònies d'*A. tumefaciens* transformades se'n pot obtenir el DNA plasmídic utilitzant el kit comercial "QIAPREP spin miniprep kit" (QIAGEN) amb un pas previ d'incubació del sediment bacterià amb lisozim (20 mg/ml) a 37°C durant 15 min. Aquest DNA plasmídic es pot analitzar, posteriorment, per restricció o per PCR.

### 2.5.3 Manteniment de la línia cel·lular T87

El manteniment de la suspensió cel·lular de la línia d'*Arabidopsis* T87 es va realitzar traspasant una alíquota d'uns 5-8 ml d'un cultiu en fase estacionària primerenca a 120 ml de medi de cultiu MS fresc (Murashige i Skoog, 1962) suplementat amb àcid  $\alpha$ -naftalenacètic (NAA) 2.5 µM. Les cèl·lules es van créixer a 22°C de temperatura, 140 rpm d'oscil·lació i llum contínua (de 40 a 100 µE/s.m<sup>2</sup>).

**Medi de cultiu de cèl·lules:**

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| - Murashige & Skoog (MS) | ...4.41 g/l  |
| - Tampó MES              | .....0.5 g/l |
| - Sacarosa               | .....30 g/l  |

Ajusteu a pH 5.7 amb KOH  
Esterilitzeu el medi en autoclau 20 min a 121°C  
Un cop refredat, afegiu l'NAA a una concentració de 2.5 µM

**NAA:** Per preparar un "stock" 5 mM dissoleu 9.3 mg de NAA en 10 ml de DMSO. Feu-ne alíquotes i gardeu-les a -20°C.

### 2.5.4 Condicions de cultiu de les plantes d'*Arabidopsis*

Les plantes d'*Arabidopsis* es van cultivar en medi MS sòlid o en terra, en càmares de cultiu especials a una temperatura de 22-24°C i seguint, essencialment, tres programes de desenvolupament:

- fotoperíode de 8h de llum i 16 hores de foscor (dia curt). La planta roman en fase vegetativa més temps i retarda la seva floració de manera que s'incrementa la biomassa vegetal corresponent a les fulles de la roseta basal.
- fotoperíode de 16h de llum i 8 h de foscor (dia llarg). En aquestes condicions s'accelera l'entrada de la planta en la fase reproductiva.
- Creixement en absència de llum (foscor), on es fomenta el desenvolupament de plantes etiolades.

**Medi MS sòlid:** - Murashige & Skoog (MS) ....4.41 g/l  
 - Tampó MES .....0.5 g/l  
 Ajusteu a pH 5.7 amb KOH  
 Afegiu agar (8 g/l) i esterilitzeu en autoclau 20 min a 121°C  
 Repartiu el medi en plaques de petri

#### 2.5.4.1 Esterilització de llavors d'Arabidopsis

- 1) Submergiu les llavors (50-100 mg en tubs de microcentrífuga) en solució d'esterilització durant 8 min en agitació orbital
- 2) Renteu 1-2 min amb etanol absolut; manteniu l'agitació orbital
- 3) Repetiu aquest rentat
- 4) Deixeu assecar l'etanol a la campana de fluxe laminar
- 5) Guardeu les llavors estèrils a 4°C

#### Solució d'esterilització:

- Bayrol GmbH 1.5 g en 40 ml d'aigua mil·li Q estèril
- Diluir al 10% en etanol al 99%

#### 2.5.4.2 Germinació de les llavors

Les llavors es van sembrar en medi MS sòlid o en terra, i es van vernalitzar durant 2-4 dies a 4°C i a les fosques. A continuació, es van transferir a les càmeres de cultiu per induir-ne la germinació i creixement.

## 2.6 IDENTIFICACIÓ DE L'HMGR EN TEIXITS VEGETALS

Es van seguir diferents protocols d'extracció de mostres de proteïna a partir de teixits vegetals, amb l'objectiu d'identificar les isoformes d'HMGR en aquests teixits. També es van realitzar estudis de fraccionament subcel·lular per tal d'analitzar la distribució de les isoformes d'HMGR en les fraccions. En aquest apartat, es detallen cadascun dels protocols utilitzats així com les condicions d'immunodetecció de l'HMGR en transferències de tipus western.

### 2.6.1 Preparació de teixits d'Arabidopsis

Mitjançant el procediment que es detalla a continuació, es va obtenir un extracte proteic total d'Arabidopsis apte pel seu anàlisi en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE).

#### Procediment:

- 1) Tritureu en un tub de microcentrífuga 100-200 mg de teixit d'Arabidopsis congelat en nitrogen líquid, utilitzant una espaseta de tipus Dounce, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 200 µl de *tricine buffer* per cada 100 mg de teixit
- 3) Centrifugueu a 4°C durant 10 min a 200xg
- 4) Recupereu el sobrenedant en un nou tub (S<sub>0.2</sub>)

- 5) Quantifiqueu la concentració de proteïna de l'extracte. En aquest treball s'ha utilitzat l'assaig *Biorad Protein assay* (Bio-Rad), seguint les instruccions del proveïdor
- 6) Congeleu les mostres en nitrogen líquid

**Tricine buffer:**

- Tricina pH 7.5.....100 mM
- KCl .....10 mM
- MgCl<sub>2</sub> .....1 mM
- EDTA .....1 mM
- Sacarosa .....20% (p/v)
- DTT .....1 mM
- Inhibidors de proteases: PMSF (1 mM), Aprotinina (10 µg/ml), Leupeptina (0.5 µg/ml), E-64 (3 µg/ml), *plant inhibitor cocktail de Sigma* (20 µl/ml).

### 2.6.2 Immunodetecció de l'HMGR en extractes de teixits

Les mostres, corresponents a 2.5 µg de l'extracte proteic i diluïdes en tampó de càrrega, es van escalfar 5 min a 100°C i es van sotmetre a una electroforesi en gels de poliacrilamida (9%) en presència de SDS (SDS-PAGE). A continuació, es van transferir les proteïnes mitjançant transferència de western a una membrana de PVDF i es va immunodetectar l'HMGR seguint el següent protocol.

#### Procediment:

- 1) Incubeu la membrana durant 1 hora a temperatura ambient (RT) en solució de bloqueig
- 2) Incubeu amb els anticossos anti-CD1 (dilució 1:10.000) en la mateixa solució de bloqueig tota la nit a 4°C.
- 3) Renteu 3 vegades en TBS-Tween, 5 min en agitació
- 4) Incubeu amb l'anticòs secundari *anti-rabbit HRP* (dilució 1:10.000) en solució de bloqueig, 30 min a RT
- 5) Renteu 4 vegades en TBS-Tween
- 6) Renteu amb TBS
- 7) Realitzeu la reacció quimioluminiscent amb ECL plus (Amersham Pharmacia) seguint les instruccions del proveïdor.

Solucions emprades:

**TBS (*tris buffer saline*):** Tris pH7.6 .....20 mM  
NaCl .....136 mM

**TBS-tween:** Tween-20 al 0.05% (v/v) en TBS

**Solució de bloqueig:** llet descremada en pols al 5% (p/v) en TBS-tween

### 2.6.3 Fraccionament subcel·lular de l'HMGR per centrifugació diferencial

- 1) Tritureu el teixit congelat amb un morter i nitrogen líquid, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 2 ml de *tricine buffer* (apartat 2.6.1) per cada 1 g de teixit. Descongeleu en gel.
- 3) Centrifugueu a 210 xg 10 min a 4°C
- 4) Passeu el sobrenedant a un nou tub i repetiu la centrifugació.

- 5) Passeu el sobrenedant ( $S_{0.2}$ ) a un nou tub. Reserveu-ne 60  $\mu$ l per al seu anàlisi.
- 6) Centrifugueu el sobrenedant  $S_{0.2}$  a 16.000 xg durant 25 min a 4°C
- 7) Separeu el sobrenedant ( $S_{16}$ ) i ressuspeueu el sediment ( $P_{16}$ ) en 0.2 volums de *tricine buffer*. Reserveu 60  $\mu$ l del  $S_{16}$  per al seu anàlisi.
- 8) Centrifugueu el sobrenedant  $S_{16}$  a 105.000 xg 1 h a 4°C.
- 9) Reserveu el sobrenedant ( $S_{105}$ ) i ressuspeueu el  $P_{105}$  en 0.1 volums de *tricine buffer*.
- 10) Quantifiqueu les mostres i carregueu-ne 2.5  $\mu$ g de cadascuna d'elles ( $S_{0.2}$ ,  $P_{16}$ ,  $S_{16}$ ,  $S_{105}$  i  $P_{105}$ ) per la seva anàlisi d'electroforesi SDS-PAGE.
- 11) Per immunodetectar l'HMGR, procediu seguint l'apartat 2.6.2.

#### 2.6.4 Solubilització de les diferents isoformes de l'HMGR amb detergents

- 1) Tritureu el teixit congelat (cèl·lules de la línia T87) amb un morter i nitrogen líquid, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 2 ml de *tricine-buffer* (apartat 2.6.1) per cada 1 g de teixit. Descongeleu en gel.
- 3) Centrifugueu a 210 xg 10 min a 4°C
- 4) Passeu el sobrenedant a un nou tub i repetiu la centrifugació.
- 5) Passeu el sobrenedant ( $S_{0.2}$ ) a un nou tub. Reserveu-ne 60  $\mu$ l per al seu anàlisi.
- 6) Centrifugueu el sobrenedant  $S_{0.2}$  a 105.000 xg 1h a 4°C
- 7) Reserveu el sobrenedant ( $S_{105}$ ) i ressuspeueu el sediment ( $P_{105}$ ) en 0.4 volums de *tricine buffer*
- 8) Separeu una alíquota de 50  $\mu$ l del sediment  $P_{105}$  i dividiu la resta en 3 alíquotes de 990  $\mu$ l, a les quals afegireu 110  $\mu$ l de *tricine buffer* amb 10% de NP-40 o 10% de tritó X-100 o 400 mM d'octilglucòsid. Incubeu 30 min en gel.
- 9) Centrifugueu a 105.000 xg 1 h a 4°C
- 10) Reserveu el sobrenedant solubilitzat i ressuspeueu cadascun dels sediments insolubles als detergents en 1.1 ml de *tricine buffer* amb el detergent corresponent
- 11) Quantifiqueu les mostres i prepareu-ne 2.5  $\mu$ g de cadascuna d'elles ( $S_{0.2}$ ,  $S_{105}$ ,  $P_{105}$ ) per la seva anàlisi d'electroforesi SDS-PAGE. Pel que fa a la fracció solubilitzada i insoluble al detergent, carregueu-ne el mateix volum que de  $P_{105}$
- 12) Per immunodetectar l'HMGR, procediu seguint l'apartat 2.6.2

## 2.7 LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR

### 2.7.1 Microbombardeig de fulles d'Arabidopsis

Mitjançant aquesta tècnica de biolística, es van transformar transitòriament fulles d'Arabidopsis amb les diferents construccions d'expressió de les fusions a la GFP (vegeu l'apartat 2.3.2.1.). La determinació de la localització subcel·lular es va realitzar per microscopia làser confocal.

#### 2.7.1.1 Preparació de les micropartícules

En aquest cas es van utilitzar partícules de tungstè (M10, d'1  $\mu\text{m}$  de diàmetre).

##### Procediment:

- 1) Peseu 60 mg de micropartícules de tungstè en un microtub d'1.5 ml i afegiu 1 ml d'etanol al 70%. Agiteu amb vòrtex durant 5 min.
- 2) Deixeu sedimentar les partícules durant 15 min a temperatura ambient.
- 3) Centrifugueu 5 segons en una microcentrífuga i descarteu el sobrenedant.
- 4) Addicioneu 1 ml d'aigua estèril i agiteu amb vòrtex durant 5 min.
- 5) Deixeu sedimentar les partícules 1 min.
- 6) Centrifugueu 5 segons en una microcentrífuga i descarteu el sobrenedant.
- 7) Repetiu dos cops més els passos 4,5 i 6.
- 8) Afegiu 1 ml de glicerol al 50% i estèril i agiteu amb vòrtex durant 1 min.
- 9) La suspensió de micropartícules (60 mg/ml) es pot guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.7.1.2 Precipitació del DNA sobre les micropartícules

Per a cada bombardeig:

- 1) Manteniu la suspensió de micropartícules en agitació durant 5 min per tal que es ressuspenguin.
- 2) Transferiu 10  $\mu\text{l}$  de micropartícules (600  $\mu\text{g}$ ) a un microtub d'1.5 ml.
- 3) Mantinent l'agitació del microtub, afegiu:
  - 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídic
  - 14  $\mu\text{l}$  de solució de precipitació (10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M i 4  $\mu\text{l}$  d'espermidina 0.1 M)
- 4) Seguiu agitant durant 5 min més.
- 5) Deixeu sedimentar les partícules durant 1 min.
- 6) Centrifugueu 5 segons en una microcentrífuga i descarteu el sobrenedant.
- 7) Renteu el sediment amb 100  $\mu\text{l}$  d'etanol al 70%, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. Retireu el sobrenedant.
- 8) Renteu el sediment amb 100  $\mu\text{l}$  d'etanol absolut, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. Elimineu el sobrenedant.
- 9) Ressuspeneu amb 8  $\mu\text{l}$  d'etanol absolut amb l'ajut d'una micropipeta.

### 2.7.1.3 Bombardeig de les micropartícules

Es va utilitzar el sistema "PDS-1000/He" de BioRad per dur a terme el microbombardeig. Aquest sistema utilitza la pressió d'He per accelerar les micropartícules recobertes de DNA que han d'incidir sobre el teixit vegetal. El teixit vegetal utilitzat van ser fulles d'Arabidopsis de 3-6 setmanes crescudes en condicions de dia curt.

#### Procediment:

- 1) Esterilitzeu les membranes portadores, els discs de ruptura i les reixetes d'aturada amb etanol absolut, i deixeu assecar
- 2) Dipositeu els 8  $\mu$ l de micropartícules recobertes de la mostra de DNA (apartat 2.7.1.2) que es vol transformar sobre una membrana portadora esterilitzada
- 3) Mentre s'evapora l'etanol de la mostra, ajusteu el regulador de la bombona d'He a una pressió 1300 psi
- 4) Situeu la reixeta d'aturada en el seu suport
- 5) Ajusteu la membrana portadora (amb el DNA orientat cap a la reixeta d'aturada) en el suport metàl·lic
- 6) Ajusteu el disc de ruptura de 1100 psi, prèviament esterilitzat amb isopropanol, a la finalització del tub d'acceleració d'He
- 7) Situeu el muntatge que inclou la membrana portadora i la reixeta d'aturada en el nivell 5 (el més proper al disc de ruptura)
- 8) Situeu la mostra a bombardejar en el nivell 2. Les fulles d'Arabidopsis es dipositen al damunt d'una placa d'agar al 0.8%. El revers de les fulles, que rebrà l'impacte de les micropartícules, ha de quedar de cara cap amunt.
- 9) Tanqueu la cambra de bombardeig i activeu el buit fins que la pressió arribi a 0.06 atm (27-29 mm Hg)
- 10) Mantenint les condicions de buit, accioneu el disparador fins que el disc de ruptura es trenqui (1100 psi)
- 11) Desactiveu el buit, retireu la mostra i incubeu 24 h sota llum contínua a una temperatura de 22-23°C
- 12) Per tal d'augmentar l'eficiència de transfecció, el procés de bombardeig amb les micropartícules recobertes de DNA es pot realitzar dues vegades sobre una mateixa mostra de fulles

### 2.7.2 Transformació de les cèl·lules de la línia T87 mediada per *Agrobacterium*

Les cèl·lules d'*Agrobacterium* pretransformades amb les construccions d'expressió de les diferents fusions a la GFP (vegeu l'apartat 2.3.2.2) van ser utilitzades per a infectar la línia cel·lular T87, segons el protocol descrit a (Ferrando *et al.*, 2001). La determinació de la localització subcel·lular es va realitzar per microscopia làser confocal.

Procediment:

- 1) Creixeu un precultiu de 5 ml a partir d'una colònia aïllada de la soca d'*Agrobacterium* pretransformada. Deixeu créixer a 28°C fins a la saturació (1.5-2 dies)
- 2) Inoculeu 40 ml de medi YEB amb una dilució 1/50 del precultiu. Creixeu els cultius 16-18 h a una temperatura de 28°C fins a una DO<sub>600</sub> de 0.5-1. Determineu la DO<sub>600</sub> exacte de cadascun del cultius.
- 3) Sedimenteu les cèl·lules d'*Agrobacterium* centrifugant-les durant 5 min a 6000 rpm.
- 4) Ressuspeneu-les en medi MS a una concentració final de 10 unitats de DO<sub>600</sub>/ml.
- 5) Barregeu en un erlenmeyer:
  - 15 ml d'una suspensió de cèl·lules de la línia T87 de 7 dies
  - 35 ml de medi MS
  - NAA (àcid  $\alpha$ -naftalanacètic) a una concentració de 2.5  $\mu$ M
  - 1-10 unitats de DO<sub>600</sub> d'*Agrobacterium* , depenent de l'eficiència de transformació
- 6) Creixeu les infeccions durant 3-4 dies a 22 °C en agitació, en condicions de llum continua. El tercer dia, afegiu cefotaxima (500  $\mu$ g/ml) per tal d'inhibir el creixement de l'*Agrobacterium*
- 7) Recolliu 10 ml del cultiu infectat i deixeu-lo sedimentar. Renteu amb MS i prepareu-lo per a la seva observació al microscopi confocal.

### **2.7.3 Immunolocalització de l'HMGR en cèl·lules de la línia T87**

- 1) Recolliu 1 ml de les cèl·lules de la línia T87 que provenen de la transformació
- 2) Deixeu sedimentar les cèl·lules i renteu-les amb 1 ml de medi MS
- 3) Fixeu-les 1 h a 20°C amb 1 ml de solució de fixació i en agitació orbital
- 4) Renteu-les 3 cops amb 1 ml de PBS
- 5) Afegiu 1 ml de solució enzimàtica i incubeu 15 min en agitació orbital a 20°C
- 6) Centrifugueu les cèl·lules, preferiblement sense fre. Descarteu la solució enzimàtica.
- 7) Afegiu 1 ml de solució de bloqueig i incubeu durant 15 min a 20°C en agitació orbital
- 8) Centrifugueu les cèl·lules i descarteu la solució de bloqueig
- 9) Afegiu 1 ml de solució d'anticòs primari (anti-CD1, dilució 1:500) i incubeu 2 h a 20°C en agitació orbital. Alternativament, com a control negatiu es van incubar les cèl·lules amb la mateixa solució però sense anticòs primari.
- 10) Centrifugueu les cèl·lules i descarteu la solució d'anticòs primari
- 11) Renteu les cèl·lules 2 cops amb PBS
- 12) Afegiu 0.5 ml de la solució d'anticòs secundari (anti-rabbit Alexa Fluor 350, dilució 1:300) i incubeu 1 h a 20°C en agitació orbital
- 13) Renteu 2 cops amb PBS
- 14) Transferiu el sediment cel·lular final ressuspès amb el mínim de PBS possible a un porta objectes i munteu-lo en 20  $\mu$ l de MOWIOL (Calbiochem).
- 15) Deixeu solidificar el MOWIOL 2 dies a 4°C i a la foscor, i procediu a l'observació de les mostres al microscopi confocal.



Solucions emprades:

**Solució de fixació:**

- phosphate buffer saline (PBS).....50 mM
- manitol .....0.25 M
- paraformaldehyd .....4% (v/v)

**Solució PEM:**

- KPipes pH 7.5.....50 mM
- EGTA .....1 mM
- MgSO<sub>4</sub> .....1 mM

**Solució enzimàtica (en PEM):**

- manitol .....0.25 M
- tritó X-100 .....0.5 % (v/v)
- cel·lulasa .....0.5 % (p/v)
- pecto-liasa .....0.05% (p/v)

**Solució de bloqueig:** 3% (p/v) de BSA en PEM

**Solució d'anticòs primari:** anti-CD1 (dilució 1/500) en PEM amb 1% (p/v) de BSA

**Solució d'anticòs secundari:** anti-rabbit Alexa Fluor 350 (dilució 1/300) en PEM amb 1% (p/v) de BSA

### 2.7.4 Microscopia làser confocal

La localització subcel·lular de les proteïnes de fusió a GFP es va examinar en un microscopi làser confocal (*Leica TCS 4D Confocal Laser Scanning Microscope*, CSLM), al Servei de Microscopia Confocal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La fluorescència verda corresponent a la GFP es va detectar utilitzant un filtre BP515-525 després d'excitar la mostra amb llum blava de  $\lambda=488$  nm. L'autofluorescència vermella deguda a la clorofil·la es va detectar utilitzant un filtre LP590 després d'excitar amb llum verda a una  $\lambda=568$  nm. Pels assaig de co-localització es va utilitzar el microscopi *Leica SP2 confocal microscope*. En aquests estudis, es van realitzar excitacions seqüencials del fluorocrom Alexa Fluor 350 (351nm line d'un laser Ar) i de la GFP.

## 2.8 ANÀLISI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID

L'anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna es va realitzar mitjançant el sistema MATCHMAKER de Clontech, seguint les instruccions del llibre de protocols *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid system II* (PT1030-1). En aquest llibre, s'especifiquen les condicions de cultiu dels llevats, les fórmules dels diferents tipus de medis (ric i selectiu), així com els protocols de transformació dels llevats i de l'assaig X-Gal en placa que es van utilitzar per a realitzar aquest treball.

## 2.9 CRIVELLATGE D'UNA GENOTECA DE cDNA D'ARABIDOPSIS MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID

La cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (NT1L) es va realitzar mitjançant el crivellatge d'una genoteca d'expressió obtinguda a partir de plàntules etiolades d'*Arabidopsis* de 3 dies. A partir de la genoteca fagèmica  $\lambda$ ACT subministrada (Kim *et al.*, 1997) es va obtenir la corresponent genoteca plasmídica pACT. El crivellatge de la genoteca mitjançant doble-híbrid es va realitzar per transformació seqüencial de la soca CG-1945 amb el protocol a gran escala, especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual*

(PT3061-1). Primerament, es van transformar els llevats amb el plasmidi BD-NT1L i, a continuació, aquests llevats pretransformats es van transformar amb la genoteca.

Producte de la transformació, es van obtenir 1.2-1.6 milions de clons de la genoteca. Es van seleccionar els llevats amb fenotip His<sup>+</sup> i se'n van fer diverses reestries seqüencials per tal de verificar-ne el fenotip. En total, es van aïllar 30 clons amb fenotip His<sup>+</sup> en la soca CG-1945 dels quals, 4 també van resultar ser lacZ<sup>+</sup> (positius en l'assaig X-gal en placa). A continuació, es van aïllar els plasmidis pACT de cadascun dels 30 clons, els quals es van transformar en *E.coli* per la seva anàlisi de restricció i seqüenciació (seguint el protocol de *plasmid rescue* especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual*). Per tal de confirmar els positius i descartar els possibles falsos positius, es va co-transformar la soca Y190 amb cadascun dels 30 plasmidis aïllats juntament amb el plasmidi BD-NT1L (confirmació de la interacció) o el plasmidi pAS-2.1 (control negatiu). En aquesta soca es va analitzar tant la capacitat de créixer en absència d'histidina com l'activació del gen reporter lacZ. Dels 30 clons aïllats, només els 4 clons que havien estat His<sup>+</sup> i lacZ<sup>+</sup> en la soca CG-1945 van presentar també un fenotip His<sup>+</sup> i lacZ<sup>+</sup> en la soca Y190. Els 26 clons restants es van descartar, doncs es van comportar com a típics falsos positius (o bé no van reproduir la interacció amb la regió NT1L en la soca Y190, o bé van produir interaccions inespecífiques).

Finalment, es van seqüenciar els 4 clons positius veritables. Dos d'ells eren clons independents d'un mateix cDNA que corresponia a la PR2A1, mentre que els altres van correspondre a la PR2A2 i la KLC-1.

## 2.10 GST PULL-DOWN

Aquest assaig d'interacció *in vitro* requereix, en primer lloc, obtenir i purificar la proteïna de fusió a la glutatí-S-transferasa (GST), que actuarà com a *bait* o asquer. D'altra banda, la proteïna o pèptid que ha d'interaccionar amb la proteïna de fusió (proteïna test), es pot produir per transcripció-traducció *in vitro* marcada amb metionina amb l'isòtop <sup>35</sup>S (Met <sup>35</sup>S). A continuació, es detallen cadascun dels protocols que es van seguir per tal de realitzar els experiments d'interacció de tipus GST *pull-down*. Bàsicament, s'ha utilitzat el protocol prèviament descrit (Ausubel *et al.*, 1989).

### 2.10.1 Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST a partir d'*E.coli*

Es van seguir dos protocols lleugerament diferents per purificar les proteïnes produïdes a partir del plasmidi pGEX4T-1 i pGEX5X-2 en la soca d'*E.coli* BL21 o a partir del plasmidi pET23d en la soca BL21 DE3 plysS. A continuació, s'especifica un procediment per als plasmidis pGEX i, entre parèntesi, s'indiquen les condicions pel plasmidi pET23d.

Procediment:

- 1) Creixeu una colònia d'*E.coli* portadora del plasmidi d'interès en 50 ml (25 ml) de medi 2xTY amb ampicil·lina (ampicil·lina i cloramfenicol) tota la nit, en agitació i a 37°C
- 2) Feu una dilució del cultiu 1:11 (1:50) en 500 ml de medi 2xTY fresc suplementat amb els corresponents antibiòtics i incubeu 1 h (o fins una  $DO_{600}=0.4-0.6$  en el cas del plasmidi pET23d) a 37°C i en agitació.
- 3) Indueu els cultius amb 0.4 mM d'IPTG durant 4h a 22°C en agitació
- 4) Recolliu les cèl·lules centrifugant-les a 6000 rpm 10'. A partir d'aquí es treballa en fred (en gel o a 4°C).
- 5) Ressuspeneu el sediment corresponent en 10 ml de PBS complet
- 6) Soniqueu 5 min en gel (espaiats de 1 min en 1 min perquè no s'escalfi la mostra). El ressuspès ha de quedar clarificat.
- 7) Afegiu 1.1 ml de PBS suplementat amb 10% (v/v) de tritóX-100 (la concentració final de tritóX-100 és de l'1%)
- 8) Centrifugueu 5 min a 9500 rpm i a 4°C
- 9) Recupereu el sobrenedant i afegiu 500 µl de matriu de glutatíó-agarosa (Sigma) ressuspesa al 50% (rentada i preparada segons les instruccions del proveïdor)
- 10) Incubeu 30 min a 4°C en agitació orbital
- 11) Sedimenteu la matriu i renteu-la 1 cop amb 15 ml de PBS 1% tritó, i 3 cops més amb 1.25 ml d'aquesta mateixa solució
- 12) Ressuspeneu el sediment final en 250 µl de PBS complet, i recolliu-ne 1 µl per a la seva quantificació mitjançant electroforesi SDS-PAGE i posterior tinció amb Blau de Comassie

**PBS (*phosphate buffer saline*) complet:** PBSx1 (Sigma) suplementat amb els inhibidors de proteases PMSF, aprotinina, leupeptina, E-64 (vegeu concentracions a l'apartat 2.6.1) i *bacterial inhibitor cocktail* (Sigma) 20 µl/ml.

### 2.10.2 Transcripció-traducció *in vitro*

La traducció *in vitro* de PR2A1, PR2A2 i KLC1 es va realitzar mitjançant el "kit" comercial TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System comercialitzat per Promega. Per realitzar aquesta tècnica es va seguir estrictament el protocol descrit pel fabricant, i es va utilitzar Met <sup>35</sup>S pel marcatge de les proteïnes produïdes.

### 2.10.3 Assaig d'interacció de tipus GST pull-down

#### I) Preparació de la proteïna test:

- 1) Diluïu 1-5 µl del producte de la transcripció-traducció *in vitro* en 200 µl de BBB (*Bead Binding Buffer*)
- 2) Incubeu 15 min en gel
- 3) Centrifugueu a 14.000 rpm en una microcentrífuga a 4°C durant 15 min
- 4) Recupereu els 200 µl de sobrenedant

II) Preparació de la proteïna asquer:

- 1) Diluïu 2-5 µg de la proteïna de fusió a GST en un volum final de 20µl de matriu de glutatió-agarosa, i equilibreu-la amb BBB
- 2) Barregeu els 20 µl amb 200 µl de BBB

III) Assaig d'unió:

- 1) Barregeu els 200 µl de proteïna test i asquer en un tub de 1.5 ml, en gel
- 2) Incubeu 1 h a 4°C en agitació orbital
- 3) Centrifugueu a 1.000 rpm 1 min
- 4) Renteu el sediment afegint 1 ml de BBB
- 5) Repetiu aquest rentat dues vegades més
- 6) Afegiu 25 µl de Tampó de càrrega 2x i bulliu 5 min, i carregueu les mostres en un SDS-PAGE

**Bead Binding Buffer:**

|  |                 |
|--|-----------------|
| - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.5 | .....50 mM      |
| - KCl                                    | .....150 mM     |
| - MgCl <sub>2</sub>                      | .....1 mM       |
| - glicerol                               | .....10 % (v/v) |
| - tritó X-100                            | .....1 % (v/v)  |

inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

#### 2.10.4 Fluorografia

La detecció de les proteïnes marcades amb <sup>35</sup>S a partir de gels d'SDS-PAGE, es va realitzar mitjançant fluorografia.

Procediment:

- 1) Fixeu els gels 30 min a temperatura ambient en una solució al 25% (v/v) d'isopropanol i 10% (v/v) d'àcid acètic
- 2) Incubeu els gels 15-30 min en solució *Amplify* (Amersham Pharmacia)
- 3) Assequeu els gels i exposeu-los amb un film fotogràfic en un cassette d'autoradiografia a -80°C. Realitzeu els temps d'exposició que estimeu convenients i revel·leu.

#### 2.11 PURIFICACIÓ DEPENDENT DE CALCI DE L'HMGR EN UNA MATRIU D'AFINITAT AMB GST-PR2A1

I) Preparació dels extractes d'Arabidopsis:

- 1) Tritureu el teixit congelat (cèl·lules de la línia T87) amb un morter i nitrogen líquid, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 1 ml de tampó d'extracció suplementat amb CaCl<sub>2</sub> 5 mM o amb EGTA 5 mM per cada gram de teixit. Descongeleu en gel.
- 3) Centrifugueu a 15.000 x g 10 min a 4°C
- 4) Recupereu el sobrenedant i repetiu la centrifugació en les mateixes condicions
- 5) Recupereu el sobrenedant (S<sub>15</sub>)

- 6) Congeleu en alíquotes de treball en nitrogen líquid i guardeu a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Descongeleu en gel per iniciar l'assaig d'unió.

## II) Assaig d'unió:

- 1) Barregeu, en un tub de 1.5 ml:
- 10  $\mu\text{g}$  de la proteïna de fusió a GST (GST-PR2A1) diluïda en un volum final de 20  $\mu\text{l}$  de la matriu de glutatió-agarosa (vegeu apartat 2.10.1)
  - 300  $\mu\text{l}$  de l'extracte vegetal S<sub>15</sub>
  - 700  $\mu\text{l}$  de tampó d'unió

Aquesta barreja es va suplementar amb  $\text{CaCl}_2$  o amb EGTA, per realitzar la unió en quatre condicions (a-d):

| <u>Condicions d'Extracció</u> | <u>Condicions d'Unió</u> (concentració final)                    |
|-------------------------------|--|
| a) 5 mM $\text{CaCl}_2$ ..... | 5 mM $\text{CaCl}_2$   |
| b) 5 mM $\text{CaCl}_2$ ..... | 13.5 mM EGTA (+1.5 mM $\text{CaCl}_2$ arrossegat de l'extracció) |
| c) 5 mM EGTA .....            | 5 mM EGTA  |
| d) 5 mM EGTA .....            | 13.5 mM $\text{CaCl}_2$ (+1.5 mM EGTA arrossegat de l'extracció) |

- 2) Incubeu 7 h a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitació orbital
- 3) Recupereu la matriu per centrifugació i renteu amb 1 ml del tampó de rentat corresponent (amb 5mM  $\text{CaCl}_2$  o amb 5mM EGTA)
- 4) Repetiu el rentat dos cops més
- 5) Ressuspeneu el sediment final en 25  $\mu\text{l}$  de tampó de càrrega 2x i escalfeu-lo 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ , i procediu al seu anàlisi mitjançant transferència de western
- 6) Immunodetecteu l'HMGR amb els anticossos anti-CD1 clarificats (apartat 2.6.2).

Solucions emprades:

### Tampó d'extracció:

- Tris HCl pH 7.5.....50 mM
  - sacarosa .....8.6 % (p/v)
  - NaCl .....100 mM
  - Tritó-X100 .....1% (v/v)
  - DTT .....1 mM
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

### Tampó d'unió:

- Tris HCl pH 7.5.....50 mM
  - DTT .....1 mM
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

### Tampó de rentat:

- Tris HCl pH 7.5 ...50 mM
- NaCl .....100 mM
- tritó X-100 .....0.1 % (v/v)

## 2.12 PURIFICACIÓ DE L'HMGR1L EN UNA MATRIU D'AFINITAT AMB GST-KLC1

### I) Preparació d'una fracció enriquida en HMGR1L a partir de cèl·lules de la línia T87:

- 1) Tritureu el teixit congelat (cèl·lules de la línia T87) amb un morter i nitrogen líquid, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 1 ml de tampó d'extracció per cada gram de teixit. Descongeleu en gel.
- 3) Centrifugueu a 200 xg 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- 4) Recupereu el sobrenedant S<sub>0.2</sub> i centrifugueu-lo a 105.000 xg 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$

- 5) Descarteu el sobrenedant S<sub>105</sub> i ressuspeueu el sediment P<sub>105</sub> en 0.1 volums de tampó de ressuspenió. Incubeu-lo 15 min en gel
- 6) Centrifugueu de nou el P<sub>105</sub> ressuspeu a 105.000 xg 1 h a 4°C.
- 7) Reserveu el sobrenedant, que correspon a la fracció del sediment P<sub>105</sub> solubilitzada amb el detergent (i enriquida en HMGR1L), i descarteu-ne la fracció insoluble
- 8) Aliquoteu la fracció de sediment P<sub>105</sub> solubilitzada i congeleu-la en nitrogen líquid i a -80°C. Descongeleu en gel per iniciar l'assaig d'unió.

## II) Assaig d'unió:

- 1) Barregeu, en un tub de 1.5 ml:
  - 10 µg de la proteïna de fusió a GST (GST-KLC1) diluïda en un volum final de 20µl de la matriu de glutatió-agarosa (vegeu apartat 2.10.1)
  - 120 µl de la fracció del P<sub>105</sub> solubilitzada amb detergents
  - 480 µl de tampó d'unió
- 2) Incubeu 6 h a 4°C en agitació orbital
- 3) Recupereu la matriu per centrifugació i renteu-la tres cops amb 1 ml del tampó de rentat
- 4) Ressuspeueu el sediment final en 25 µl de tampó de càrrega 2x i escalfeu-lo 5 min a 100°C, i procediu al seu anàlisi mitjançant transferència de western
- 5) Immunodetecteu l'HMGR amb els anticossos anti-CD1 clarificats (apartat 2.6.2).

## Solucions emprades:

### Tampó d'extracció:

- tricina pH 7.5 .....100 mM
  - KCl .....10 mM
  - MgCl<sub>2</sub> .....3 mM
  - EDTA .....1 mM
  - CaCl<sub>2</sub> .....1 mM
  - DTT .....1 mM
  - sacarosa .....20 % (p/v)
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

### Tampó de ressuspenió:

- tricina pH7.5 .....100 mM
  - KCl .....10 mM
  - MgCl<sub>2</sub> .....3 mM
  - EDTA .....1 mM
  - NaCl .....450 mM
  - tritó X-100 .....1 % (p/v)
  - CaCl<sub>2</sub> .....1 mM
  - DTT .....1 mM
  - sacarosa .....8.6 % (p/v)
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

### Tampó d'unió:

- Tris HCl pH 7.5.....50 mM
  - MgCl<sub>2</sub> .....1 mM
  - CaCl<sub>2</sub> .....5 mM
  - DTT .....1 mM
  - protamina .....66 µg/ml
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

### Tampó de rentat:

- Tris HCl pH 7.5.....50 mM
- MgCl<sub>2</sub> .....1 mM
- NaCl .....100 mM
- tritó-X100 .....0.1% (v/v)
- CaCl<sub>2</sub> .....5 mM
- protamina .....66 µg/ml

En l'assaig d'unió, s'arrossequen components del tampó d'extracció que queden presents en el tampó d'unió en la següent concentració: 20 mM tricina; 2 mM KCl; 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM EDTA; 90 mM NaCl; 0.2 % tritó-X100; 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.2 mM DTT; 1.72 % (p/v) sacarosa

## 2.13 OBTENCIÓ DE LES PLANTES TRANSGÈNIQUES D'ARABIDOPSIS HA:KLC1 I HA:TPR

### 2.13.1 Preparació de les plantes d'Arabidopsis per a la seva transformació

- 1) Sembreu en terra llavors d'*Arabidopsis thaliana* d'ecotip Columbia 3
- 2) Creixeu-les en condicions de dia curt, i acabeu deixant 5 plàntules per test
- 3) Després de 2-3 setmanes, creixeu-les en condicions de dia llarg per afavorir la floració
- 4) En el moment que les plantes han desenvolupat un nombre suficientment elevat d'influorescències i de brots florals però un baix nombre de fruits, les plantes estan en el moment òptim per a ser transformades

### 2.13.2 Transformació pel mètode floral simplificat *floral dip*

- 1) Creixeu un precultiu de 5 ml a partir d'una colònia aïllada de la soca d'*Agrobacterium* pretransformada. Deixeu créixer a 28°C fins a la saturació (1.5-2 dies).
- 2) Inoculeu 500 ml de medi YEB amb una dilució 1/100 del precultiu. Creixeu els cultius 16-24 h a una temperatura de 28°C fins a una DO<sub>600</sub> de 0.5-1.
- 3) Sedimenteu les cèl·lules a 6000 rpm durant 10 min amb el rotor JA-10.
- 4) Ressuspeneu les cèl·lules en 300 ml d'una solució de sacarosa al 5%
- 5) Submergiu durant 10 seg les plantes en la ressuspensió cel·lular, a la qual se li hauran afegit 90 µl d'agent surfactant *Silwett* L-77.
- 6) Tombeu les plantes sobre paper de filtre en una safata i tapeu-la amb film transparent amb foradets perquè les plantes transpirin. Deixeu les safates en algun lloc on no rebin llum directa fins que es recuperin (2-3 dies després), moment en el qual es deixen completant el seu cicle normal de desenvolupament (a dia llarg). Obtingueu les llavors de la generació T1.

Normalment, per cada construcció, es transformen tres testos amb 5 plantes cadascun.

### 2.13.3 Selecció de les plantes transformants

Un cop obtingudes les llavors de les plantes infectades, cal seleccionar aquelles que siguin portadores del transgen d'entre totes les llavors obtingudes. El vector Menchu-812 codifica per un gen que confereix resistència a l'antibiòtic higromicina. Per tant, les plàntules portadores del transgen es seleccionen de la resta creixent-les en un medi amb higromicina.

#### Procediment:

- 1) Esterilitzeu les llavors T<sub>1</sub> provinents de les plantes infectades parentals (generació T<sub>0</sub>)
- 2) Sembreu les llavors en medi MS que contingui 40 µg/ml d'higromicina. Deixeu-les vernalitzant durant 3 dies per sincronitzar la germinació i poseu-les a créixer en condicions de dia curt.
- 3) Al cap de 2-3 setmanes s'observa clarament que les plàntules no portadores del transgen, malgrat que puguin germinar, no es desenvolupen més enllà dels dos

cotilèdons. Per contra, les plàntules transgèniques es desenvolupen amb normalitat (generen fulles verdaderes).

- 4) Quan les plàntules resistents a la higromicina tinguin al voltant de 3 setmanes, poseu-les a créixer en terra, i acabeu recuperant-ne les llavors que produeixi. Aquestes plantes resistents pertanyen a la generació  $T_1$  i són hemizigòtiques.
- 5) La progènie producte de l'autofecundació de plantes de la generació  $T_1$  constitueix la generació  $T_2$ , la qual correspon a una generació és segregant.
- 6) Sembreu les llavors de la generació  $T_2$  i seleccioneu individus aïllats resistents a higromicina. Creixeu-los i analitzeu la seva progènie, fet que permetrà la identificació dels individus homozigots de la generació  $T_3$ , en els quals s'analitzarà l'expressió del transgèn.

#### 2.13.4 Immunodetecció i fraccionament subcel·lular d'HA:KLC1 i d'HA:TPR

A continuació, es descriu el protocol d'immunodetecció dels productes dels transgens HA:KLC1 i HA:TPR de les diferents línies homozigotes obtingudes. També es detalla el protocol de fraccionament subcel·lular d'HA:KLC1 i HA:TPR utilitzat.

##### Procediment:

- 1) Tritureu en un tub de microcentrífuga 100-200 mg de teixit d'Arabidopsis congelat en nitrogen líquid (plàntules de 10-13 dies crescudes a dia curt), utilitzant una espaseta de tipus Dounce, fins a obtenir una pols fina
- 2) Afegiu 200  $\mu$ l d'*E-buffer* per 100 mg de teixit. Descongeleu en gel.
- 3) Centrifugueu a 4°C durant 10 min a 200 xg
- 4) Recupereu el sobrenedant en un nou tub, i repetiu el pas 3. Recupereu el sobrenedant  $S_{0.2}$ .

Quantifiqueu la concentració de proteïna de l'extracte, tal com consta a l'apartat 2.6.1. Per immunodetectar els productes dels transgens mitjançant transferència de western, procediu com en l'apartat 2.6.2, però carregant 40  $\mu$ g de proteïna dels extractes obtinguts. Utilitzeu els anticossos anti-HA diluït 1/1.000 i anti-rat HRP diluït 1/3.000.

En l'assaig de fraccionament subcel·lular, es procedeix de la següent manera a partir del pas 4:

- 5) Centrifugeu el sobrenedant  $S_{0.2}$  a 105.000 xg durant 1 h a 4°C
- 6) Reserveu el sobrenedant ( $S_{105}$ ) i ressuspeueu el sediment ( $P_{105}$ ) en 0.2 volums d'*E-buffer* suplementat amb 1% NP-40
- 7) Quantifiqueu la concentració de proteïna de les fraccions ( $S_{0.2}$ ,  $S_{105}$  i  $P_{105}$ ).
- 8) Immunodetecteu els productes dels transgens HA:KLC1 i HA:TPR a partir de 40  $\mu$ g de proteïna de les diferents fraccions tal com s'ha especificat en aquest mateix apartat



**E-buffer:**

- Tris HCl pH 7.6           ...50 mM
  - Glicerol                   .....10%
  - EDTA                      .....1 mM
  - DTT                        .....1 mM
- inhibidors de proteases com en l'apartat 2.6.1

## **2.14 BIOINFORMÀTICA**

Per tal de determinar la identitat de cadascun dels clons aïllats es van realitzar cerques d'homologia amb l'algoritme BLAST en les bases de dades presents a les pàgines webs TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) i NCBI ([www.nlm.nih.ncbi.gov](http://www.nlm.nih.ncbi.gov)). La identificació dels dominis proteics de cadascun dels clons es va realitzar utilitzant paquets informàtics disponibles a la web, com per exemple els disponibles a la pàgina web de l'expasy ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)), entre el quals es troba el PROSITE.



### 3.1 IDENTIFICACIÓ DE LES ISOFORMES D'HMGR EN DIFERENTS TEIXITS I FRACCIONS SUBCEL·LULARS D'ARABIDOPSIS

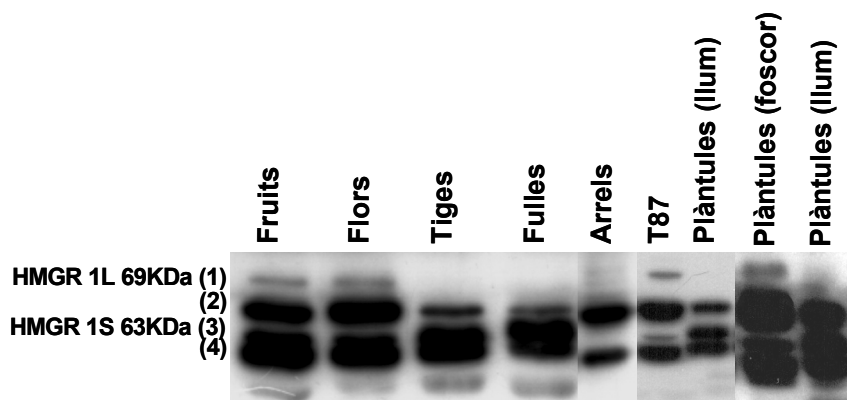
La identificació i caracterització dels gens que codifiquen per l'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR) ha estat objecte central d'estudi en el camp de la biosíntesi d'isoprenoides vegetals. Tal com s'ha descrit a l'apartat 1.2.2, *Arabidopsis* conté dos gens, *HMG1* i *HMG2*, que s'expressen de manera diferencial. El gen *HMG1* codifica per les isoformes HMGR1 curta (HMGR1S) i HMGR1 llarga (HMGR1L). L'HMGR1L és idèntica a l'HMGR1S però presenta una extensió de 50 aminoàcids en posició N-terminal. D'altra banda, el gen *HMG2* codifica per la isoforma HMGR2.

La gran quantitat de dades que s'han publicat a nivell de l'expressió dels gens *HMG* en plantes contrasta amb les poques dades que existeixen sobre l'HMGR a nivell de proteïna. Així doncs, en aquest treball s'ha considerat prioritari avançar en el terreny de la identificació, caracterització i regulació de la proteïna HMGR en teixits vegetals. L'eina utilitzada inicialment ha estat uns anticossos policlonals obtinguts contra el domini catalític de l'HMGR1 (CD1, figura 6) expressat i purificat a partir d'*E.coli* (anticossos anti-CD1). Aquests anticossos van ser generats per la Dra. Montse Arró al laboratori del Dr. Albert Ferrer en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, i s'han utilitzat en treballs anteriors per identificar l'HMGR d'*Arabidopsis* mitjançant anàlisi de transferència de western, havent-se obtingut diferents patrons de bandes en funció de la mostra vegetal de partida (González, 2002). Donat que els anticossos han estat generats contra una regió altament conservada en totes les HMGRs (el domini catalític), s'ha justificat la complexitat del patró de bandes per la presència de les diferents isoformes de l'HMGR. Tot i així, no s'ha pogut assignar amb claredat la identitat de cadascuna de les bandes del patró.

Així doncs, un primer objectiu d'aquest treball ha estat identificar i caracteritzar les bandes d'HMGR reconegudes pels anticossos anti-CD1 en diferents teixits d'*Arabidopsis*.

#### 3.1.1 Immunodetecció de l'HMGR en teixits d'Arabidopsis

Extractes proteics totals derivats de diferents teixits d'*Arabidopsis* es van separar per electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE). Posteriorment es van transferir a una membrana de PVDF mitjançant transferència de western (*western blot*), per la posterior immunodetecció de l'HMGR amb els anticossos anti-CD1. A la figura 19 s'observa que en tots els teixits analitzats el patró està format per 2, 3 o 4 bandes. Aquesta complexitat probablement reflecteix la presència de les diferents isoformes d'HMGR. D'altra banda, s'ha pogut constatar que el patró de bandes és altament repetitiu i específic de cada teixit, fet que es correspon amb l'expressió diferencial dels gens *HMG* en aquests teixits. A més, bandes addicionals poden ser degudes a modificacions posttraduccionals d'algunes de les isoformes (Dale *et al.*, 1995; Denbow *et al.*, 1996) o bé a formes processades de l'enzim.



**Figura 19.** Identificació de les isoformes d'HMGR en diferents teixits d'Arabidopsis. Es va analitzar la presència d'HMGR en extractes de proteïna total (2.5 µg) dels diferents teixits analitzats. L'HMGR es va immunodetectar utilitzant els anticossos anti-CD1.

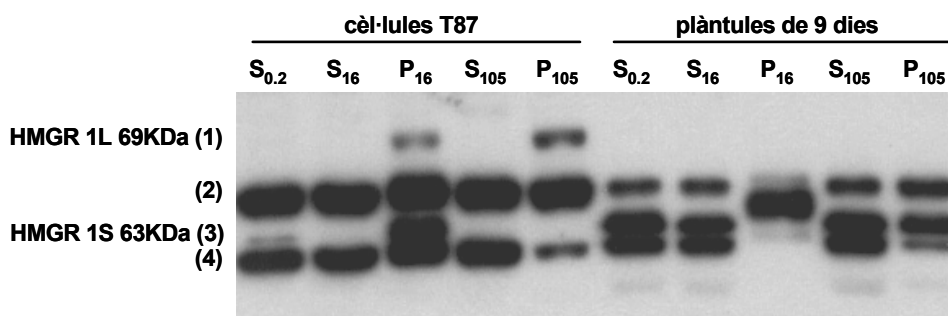
Ja que no es pot assignar amb certesa la identitat de cadascuna de les bandes del patró, s'han numerat de l'1 al 4. Tal com es comenta posteriorment (apartat 4.1.1), es tenen evidències que les bandes 1 i 3 corresponen a les isoformes HMGR1L (69KDa) i HMGR1S (63 KDa), respectivament. A partir d'aquí es pot afirmar que la isoforma HMGR1L es detecta bàsicament en fruits, en flors, en plàntules crescudes en fosc i en la línia cel·lular T87, fet que coincideix amb el patró d'expressió del transcrit *HMG1L*, excepte en el cas de fruits (Lumbreras *et al.*, 1995). D'altra banda, l'HMGR1S s'observa en tots els teixits (fruits, flors, tiges, fulles, plàntules crescudes en llum i fosc, i cèl·lules de la línia T87) excepte en les arrels, i això es correspon amb l'expressió del transcrit *HMG1S*, de nou amb l'excepció dels fruits (Lumbreras *et al.*, 1995). Al marge de la correlació que existeix entre el patró d'expressió dels transcrits *HMG1L* i *HMG1S* i la distribució tissular de les isoformes HMGR1L i HMGR1S, queda pendent assignar la identitat de les bandes 2 i 4. És destacable que en la línia cel·lular T87 es detecten les 4 bandes d'HMGR, cosa que li dona un interès particular en ser un material vegetal fàcil de créixer i manipular.

### 3.1.2 Fraccionament de l'HMGR per centrifugació diferencial

L'enzim HMGR és una proteïna de membrana amb dos segments transmembrana (figura 6), i s'insereix primàriament en el reticle endoplasmàtic (RE) (Campos i Boronat, 1995). Tot i així, en treballs anteriors (González, 2002) s'ha posat de manifest que una fracció que sedimenta a 16.000xg (fracció organelar) conté quantitats considerables de proteïna i d'activitat HMGR (entre un 60 i un 80% d'activitat). Aquest fet, que s'havia constatat prèviament en altres mostres vegetals (Bach, 1987), ha estat atribuït a la possible presència de l'HMGR en algun organel com peroxisomes, mitocondris o plastidis.

Ja que s'havia pogut assignar un patró de bandes d'HMGR característic per a cada teixit, semblava interessant estudiar quines bandes s'identificaven en la fracció organelar. Amb aquest propòsit, extractes de cèl·lules de la línia T87 i de plàntules d'Arabidopsis de 9 dies ( $S_{0.2}$ ) —prèviament centrifugats a 200xg per la eliminació restes cel·lulars— van ser centrifugats a 16.000xg. D'aquesta manera es va obtenir una sediment ( $P_{16}$ ) i un sobrenedant ( $S_{16}$ ). El  $S_{16}$  es va centrifugar, posteriorment, a 105.000xg per obtenir dues noves fraccions: el sobrenedant

S<sub>105</sub> i el sediment P<sub>105</sub>. La fracció P<sub>105</sub> és la fracció microsomal, que està enriquida en membranes cel·lulars derivades del RE, Golgi i membrana plasmàtica. En aquestes fraccions es va immunodetectar l'HMGR utilitzant els anticossos anti-CD1. Els resultats indiquen que cada isoforma d'HMGR té un patró de fraccionament característic (figura 20): mentre que l'HMGR1S (banda 3) de les cèl·lules de la línia T87 sedimenta exclusivament a 16.000xg (P<sub>16</sub>), l'HMGR1L (banda 1) s'enriqueix especialment en la fracció que sedimenta a 105.000xg (P<sub>105</sub>). Aquests resultats suggereixen amb força que l'HMGR1S i l'HMGR1L tenen una distribució subcel·lular diferent en cèl·lules de la línia T87.



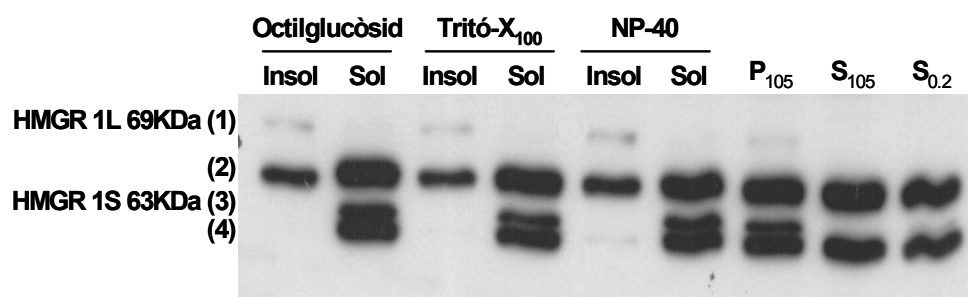
**Figura 20.** Identificació de l'HMGR en fraccions obtingudes per centrifugació diferencial a partir de cèl·lules T87 i plàntules d'Arabidopsis de 9 dies crescudes a dia llarg. Extractes totals (S<sub>0.2</sub>) es van centrifugar a 16.000xg per obtenir les fraccions S<sub>16</sub> i P<sub>16</sub>. El S<sub>16</sub> es va centrifugar a 105.000xg per obtenir les fraccions S<sub>105</sub> i P<sub>105</sub>. En aquestes fraccions es va immunodetectar l'HMGR utilitzant els anticossos anti-CD1. Es va carregar 2.5µg de proteïna per carril.

En contrast amb les cèl·lules de la línia T87, els resultats obtinguts del fraccionament dels extractes de plàntules són més difícils d'interpretar. En aquest cas, l'HMGR1S (banda 3) s'identifica en totes les fraccions analitzades (S<sub>16</sub>, P<sub>16</sub>, S<sub>105</sub> i P<sub>105</sub>). Aquest resultat suggereix que mentre que en cèl·lules de la línia T87 l'HMGR1S està present exclusivament en la fracció que sedimenta a 16.000xg (P<sub>16</sub>), en plàntules es reparteix entre aquesta fracció i la fracció de membranes microsomals (P<sub>105</sub>). A part d'això, en la fracció P<sub>16</sub> derivada de les plàntules, l'HMGR1S mostra una mobilitat alterada (migra més lentament). Curiosament, aquest fet també es constata en una fracció total de fulles d'Arabidopsis (vegeu figura 19), teixit on l'HMGR1S és majoritària. En conjunt, sembla que sota una única banda aparent corresponent a l'HMGR1S (banda 3), existeixen dues entitats moleculars que es comporten de manera diferent tant a nivell de mobilitat electroforètica com de fraccionament per centrifugació diferencial. A més, aquest comportament de la isoforma HMGR1S és dependent de teixit.

### 3.1.3 Solubilitat de les diferents variants electroforètiques de l'HMGR

En l'apartat anterior, s'ha determinat que les isoformes d'HMGR sedimenten per centrifugació a 16.000xg i/o a 105.000xg, probablement degut a la seva associació a les membranes cel·lulars. Va semblar interessant confirmar aquest fet mitjançant la solubilització de les mateixes amb detergents. Així doncs, es van utilitzar cèl·lules de la línia T87 (on es detecten les 4 bandes d'HMGR) per preparar un extracte proteic total lliure de restes cel·lulars (S<sub>0.2</sub>). Aquest extracte es va centrifugar a 105.000xg i es va obtenir un sobrenedant S<sub>105</sub> i un

sediment  $P_{105}$  enriquit en organel·ls i microsomes. La fracció  $P_{105}$  es va ressuspèndre en tampó d'extracció, i posteriorment es va dividir i suplementar amb un o altre detergent (octilglucòsid, tritó- $X_{100}$  o nonidet- $P_{40}$ ). Després d'incubar 30 minuts en gel, es va centrifugar de nou a  $105.000\times g$  per separar la fracció solubilitzada i la fracció insoluble als detergents. La immunodetecció de l'HMGR en aquestes fraccions va revelar tres tipus de comportaments (figura 21): si bé les isoformes d'HMGR corresponents a les bandes 3 (HMGR1S) i 4 eren solubilitzades completament amb els detergents, la isoforma corresponent a la banda 2 ho era només de forma parcial. Per contra, l'HMGR1L (banda 1) es va retenir, bàsicament, en la fracció insoluble als detergents, tot i que en exposicions superiors del film també s'observà a la fracció solubilitzada (resultat no mostrat). Aquests resultats suggereixen que les diferents isoformes d'HMGR es presenten en entorns subcel·lulars particulars, ja sigui en entorns de membrana diferents o bé formant part de complexos multiproteics específics.



**Figura 21.** Fraccionament subcel·lular i solubilització en diferents detergents de l'HMGR derivada de cèl·lules de la línia T87.  $2.5\mu g$  de proteïna de les fraccions  $S_{0.2}$ ,  $S_{105}$  i  $P_{105}$  van ser utilitzats per immunodetectar l'HMGR amb els anticossos anti-CD1. La fracció  $P_{105}$  es va tractar addicionalment amb tres detergents diferents (Octilglucòsid 40mM, Tritó- $X_{100}$  1% i NP-40 1%) i es va centrifugar de nou per obtenir dues noves fraccions: solubilitzada (Sol) i insoluble als detergents (Insol). D'aquestes dues fraccions es van carregar volums equivalents.

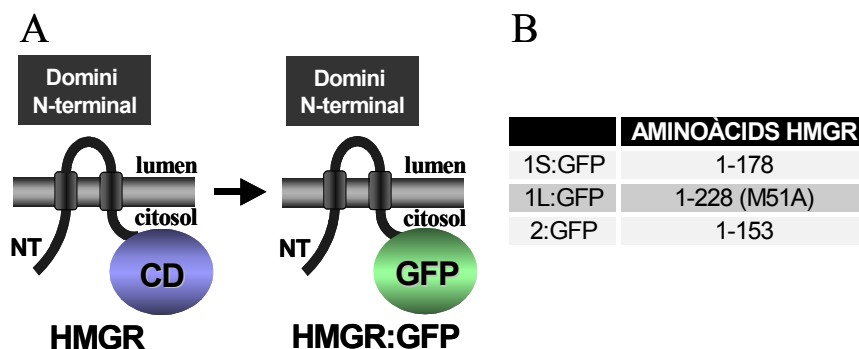
En aquest capítol s'ha descrit que el patró de bandes d'HMGR reconegudes pels anticossos anti-CD1 és característic de cada teixit. També s'han pogut assignar propietats bioquímiques específiques a algunes de les isoformes d'HMGR identificades. En concret, s'ha establert que l'HMGR1L (banda 1) i l'HMGR1S (banda 3) tenen propietats diferents (expressió en teixits, fraccionament per centrifugació diferencial i solubilització per detergents). A més, les dades obtingudes suggereixen que les isoformes HMGR1S i HMGR1L es troben en entorns bioquímics ben diferenciats.

## 3.2 PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'ENZIM

Diferents treballs suggerien que el reticle endoplasmàtic (RE) era la principal localització subcel·lular de l'HMGR de plantes (vegeu apartat 1.3.3). Tot i així, la presència d'activitat i de proteïna HMGR en la fracció que sedimenta a 16.000xg havia suscitat una gran controvèrsia sobre la possible presència de l'HMGR en algun organel. D'altra banda, les dades presentades als apartats 3.1.2 i 3.1.3 suggereixen que l'HMGR1L i l'HMGR1S tenen una distribució subcel·lular diferent. Amb aquests antecedents semblava interessant iniciar un estudi detallat de la localització subcel·lular de les diferents isoformes de l'HMGR.

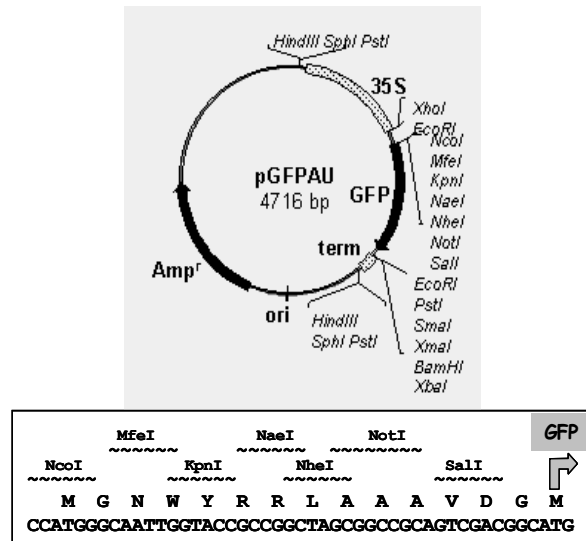
### 3.2.1 Substitució del domini catalític de les isoformes de l'HMGR per la GFP

Com a primera aproximació a l'estudi de la localització subcel·lular de l'HMGR, es va iniciar una estratègia d'etiquetatge de la mateixa amb la proteïna verda fluorescent (GFP). Prèviament s'havia demostrat que el domini N-terminal de l'HMGR (format per la regió N-terminal citosòlica, el domini de membrana i la regió *linker*) conté tota la informació necessària per la inserció de l'enzim en membranes derivades de RE (Campos i Boronat, 1995). A més, la regió N-terminal citosòlica (NT) presenta un motiu conservat ric en arginines que té homologia amb senyals de retenció en RE en cèl·lules animals (vegeu apartat 1.3.3). Així doncs, tot semblava indicar que el domini N-terminal de l'HMGR contenia la informació necessària per la localització subcel·lular de l'enzim. Per tal de testar aquesta opció, es va substituir el domini catalític de les isoformes HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 per la proteïna GFP. D'aquesta manera es van obtenir les corresponents quimeres 1L:GFP, 1S:GFP i 2:GFP (figura 22). En el cas de l'HMGR1L, es va utilitzar una variant on la metionina 51 s'havia substituït per una alanina (M51A). D'aquesta manera es pretenia evitar el possible ús del codó AUG distal (que codifica per la metionina 51) com a inici alternatiu de traducció, fet que resultaria en la producció de la quimera 1S:GFP.



**Figura 22.** Estratègia emprada per l'estudi de la localització subcel·lular de les diferents isoformes de l'HMGR d'Arabidopsis. A) El domini catalític de l'HMGR es va substituir per la proteïna verda fluorescent (GFP). B) Regions de cada isoforma d'HMGR fusionades a la GFP. Per la isoforma HMGR1L es va utilitzar una versió on la metionina 51 s'havia substituït per una alanina (M51A).

Les seqüències codificants per les quimeres HMGR:GFP es van clonar en el vector d'expressió transitòria pGFPau (figura 23). Per tant, l'expressió de les quimeres en teixits vegetals ha estat dirigida pel promotor del virus del mosaic de la coliflor 35S.



**Figura 23.** Vector d'expressió transitòria emprat per expressar les proteïnes de fusió a GFP en fulles d'Arabidopsis. El vector pGFPau deriva del vector pGFP (Chiu *et al.*, 1996), on s'ha introduït un *polilinker* a la regió 5' de l'AUG inici de traducció de la GFP per facilitar-ne la fusió de proteïnes en posició N-terminal.

### 3.2.2 Localització subcel·lular de les quimeres 1L:GFP, 1S:GFP i 2:GFP en fulles d'Arabidopsis

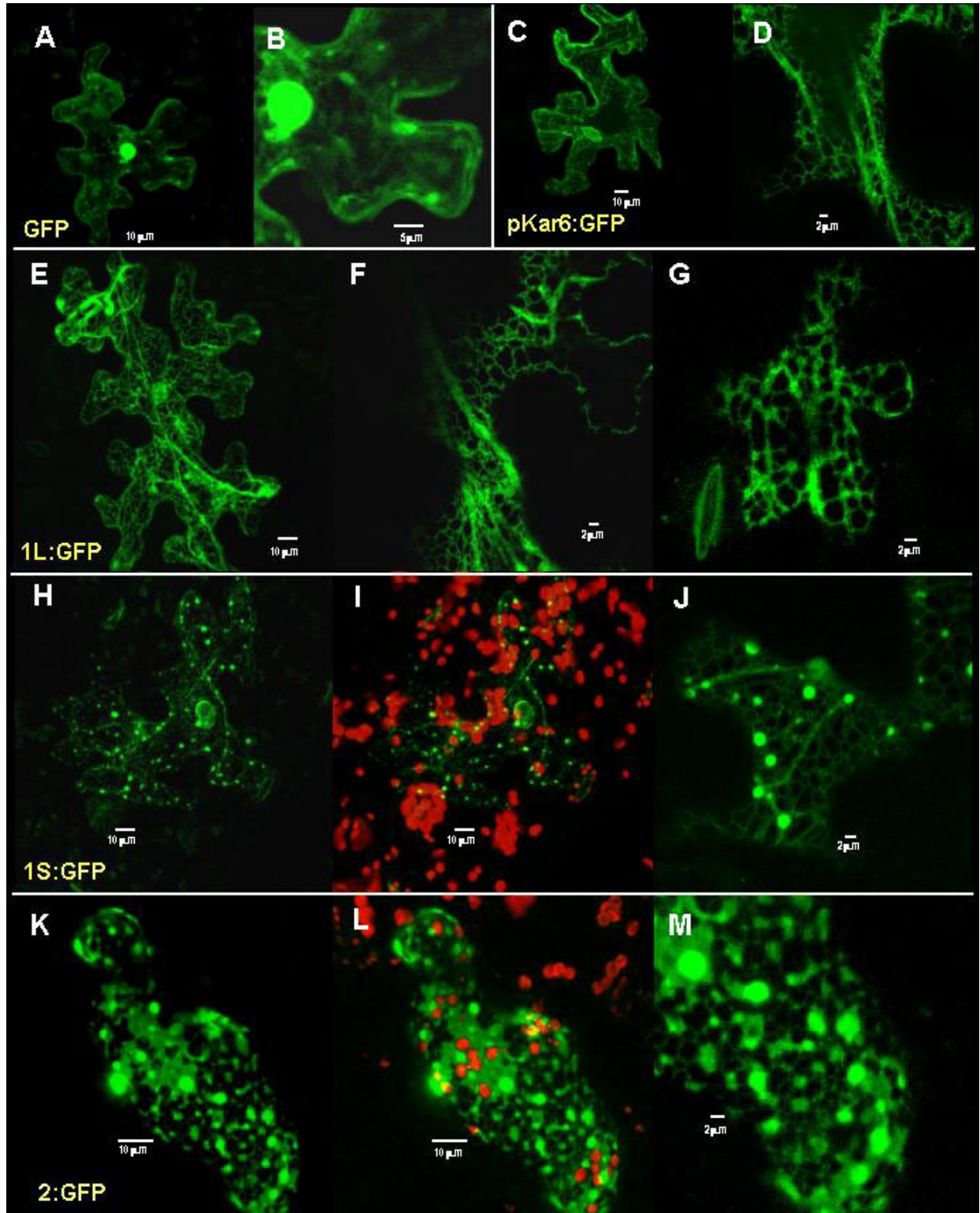
Es va procedir a l'expressió transitòria de les quimeres HMGR:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulles d'Arabidopsis. Amb aquesta intenció, es van microbombardejar fulles de plantes de 4-6 setmanes amb les construccions corresponents. El patró de localització subcel·lular es va determinar per microscopia làser confocal.

En les figures 24A i 24B, es mostra el típic patró citosòlic i nuclear observat amb la proteïna GFP control. De manera interessant, la fusió del domini N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR2 a la GFP va ser suficient per dirigir les corresponents quimeres a estructures vesiculars de naturalesa desconeguda i de tamany heterogeni d'entre 0,5 i 2 µm (figures 24H i 24K). Aquestes estructures vesiculars no colocalitzaven amb els cloroplastes (figures 24I i 24L). Quan es van analitzar aquests patrons en més detall (figures 24J i 24M), es va comprovar que les estructures vesiculars estaven connectades amb una trama de reticle endoplasmàtic (RE), el qual s'observà de manera especial entorn al nucli. D'acord amb la inserció co-traduccional de l'HMGR en el RE (Campos i Boronat, 1995), els resultats apunten a que aquest seria el seu destí subcel·lular primari. Posteriorment, l'enzim seria dirigit a les estructures vesiculars. Tot i que encara no es coneix la naturalesa de les estructures vesiculars, aquestes podrien ser les responsables de la presència de l'HMGR1S en la fracció que sedimenta a 16.000xg (figura 20).

En contrast amb aquests patrons vesiculars, la quimera 1L:GFP es localitza exclusivament al RE (figures 24E, 24F i 24G). Aquest patró és equivalent al de pKar6:GFP, una proteïna quimèrica control de RE (figures 24C i 24D). Aquests resultats suggereixen que la sola



presència de la regió extra de 50 aminoàcids (regió 1Lextra) en la isoforma HMGR1L (única diferència amb l'HMGR1S) és suficient per evitar el seu transport a les estructures vesiculars. Per tant, la regió 1Lextra de la isoforma HMGR1L constitueix un domini que determina una localització diferencial respecte l'HMGR1S.

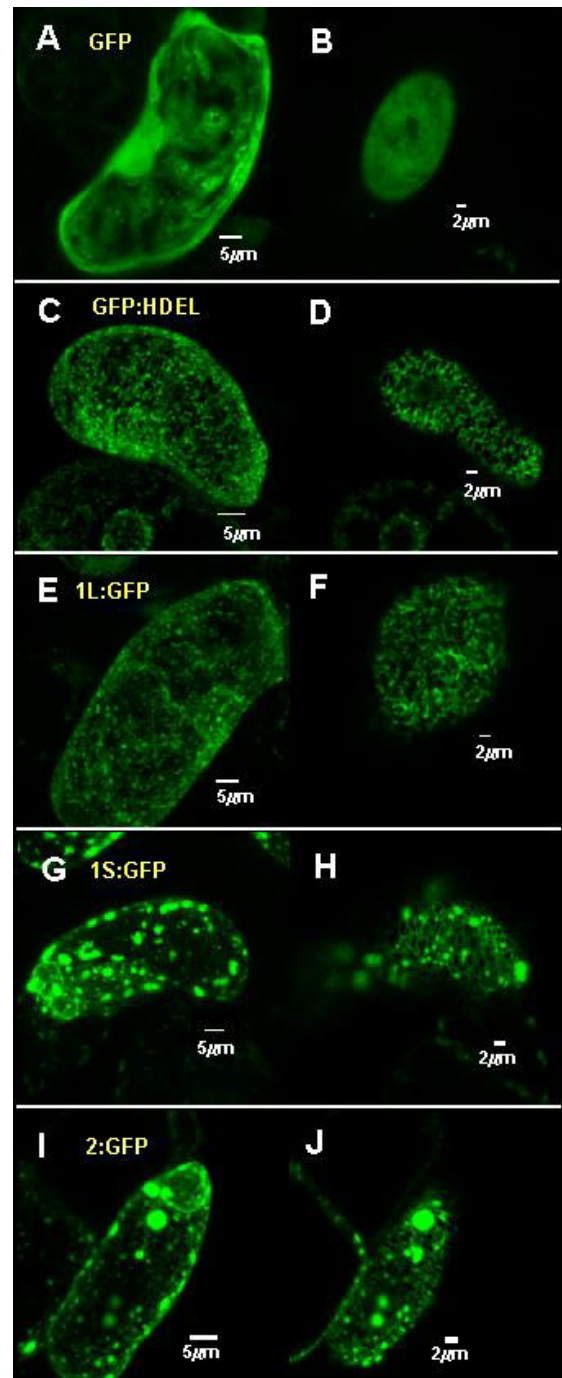


**Figura 24.** Localització subcel·lular de les quimeres HMGR:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'Arabidopsis. Els patrons de localització subcel·lular es van determinar per microscopia làser confocal, després de microbombardejar fulles d'Arabidopsis amb les construccions corresponents. Les barres mostren l'escala de les imatges. **(A,B)** GFP sola; **(C,D)** control de RE (pKar6:GFP); **(E,F,G)** 1L:GFP; **(H,I,J)** 1S:GFP; **(K,L,M)** 2:GFP. **B,D,F,G,J** i **M**: visió ampliada d'una part de la cèl·lula. La fluorescència verda d'**H** i **K** s'ha superposat amb la fluorescència vermella emesa per la clorofil·la present als cloroplastes (**I** i **L** respectivament).

### 3.2.3 Localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP, 1L:GFP i 2:GFP en cèl·lules de la línia T87

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en cèl·lules de fulla, es va analitzar la localització subcel·lular de les quimeres HMGR:GFP en cèl·lules de la línia T87. Tanmateix, donat que la isoforma HMGR1L pràcticament no s'expressa en les fulles (figura 19), semblava interessant confirmar la localització de la proteïna quimèrica 1L:GFP en un sistema on aquesta isoforma s'expressi a un bon nivell, com ara les cèl·lules de la línia T87.

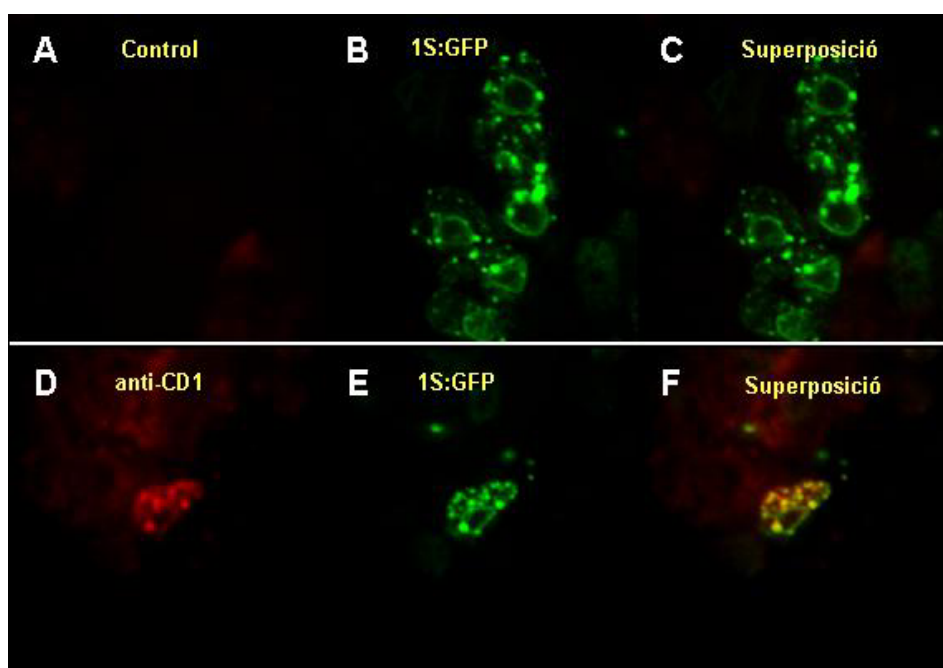
Així doncs, les fusions a la proteïna GFP es van expressar en cèl·lules de la línia T87 mitjançant transformació mediada per *Agrobacterium* (Ferrando *et al.*, 2001). De nou, es va observar que les quimeres 1S:GFP i 2:GFP es localitzen, principalment, en les estructures vesiculars d'entre 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  (figures 25G i 25I), encara que, en imatges ampliades, també es van detectar en el RE (figures 25H i 25J). Respecte la quimera 1L:GFP, de nou es va localitzar exclusivament en el RE (figures 25E i 25F), patró equivalent a l'obtingut per al control GFP:HDEL, una proteïna quimèrica utilitzada com a marcador d'aquest compartiment (figures 25C i 25D).



**Figura 25.** Localització subcel·lular de les quimeres HMGR:GFP en cèl·lules de la línia T87. Les fusions a GFP es van expressar en cèl·lules de la línia T87 per transformació mediada per *Agrobacterium*. Els patrons de localització subcel·lular es van determinar per microscopia làser confocal. Les barres mostren l'escala de les imatges. **(A,B)** GFP sola; **(C,D)** control de RE (GFP:HDEL); **(E,F)** 1L:GFP; **(G,H)** 1S:GFP; **(I,J)** 2:GFP. **B,D,F,H** i **J**: visió ampliada d'una part de la cèl·lula.

Mitjançant immunofluorescència utilitzant els anticossos anti-CD1 sobre cèl·lules de la línia T87, es va determinar que les estructures vesiculars on s'acumula la quimera 1S:GFP també contenen l'HMGR endògena (marcada en vermell), com es comprova en la superposició de les dues imatges (figures 26D, 26E i 26F). La co-localització entre la quimera 1S:GFP i l'HMGR endògena suggereix que el domini catalític de l'HMGR (absent en l'1S:GFP) no juga un paper important per la localització de l'enzim. Aquesta sembla venir determinada pel seu domini N-terminal, que inclou la regió N-terminal citosòlica, el domini de membrana i la regió *linker*.

En conjunt, els resultats obtinguts en les cèl·lules de la línia T87 són consistents amb els obtinguts en fulles, i validen l'estratègia de l'etiquetatge de l'HMGR amb la GFP per l'estudi de la seva localització subcel·lular.



**Figura 26.** Co-localització de l'HMGR endògena i de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de la línia T87. **(D)** Immunofluorescència de l'HMGR endògena emprant els anticossos anti-CD1 i un anti-conill AlexaFluor350 com anticòs secundari, **(E)** 1S:GFP i **(F)** superposició de **D** i **E**. **(A, B, C)** Control de **D**, **E** i **F** on no s'ha posat els anticossos anti-CD1.

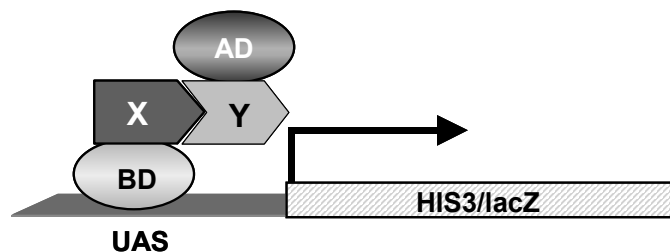
### 3.3 IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES QUE INTERACCIONIN AMB LA REGIÓ N-TERMINAL CITOSÒLICA DE L'HMGR

Els resultats obtinguts en l'apartat 3.2 indiquen que l'enzim HMGR es localitza en el RE i en estructures vesiculars que estan en connexió amb el RE. La localització subcel·lular de l'HMGR és mediada pel seu domini N-terminal, en el qual, la regió N-terminal citosòlica (NT) sembla jugar un paper fonamental. De fet, és en aquesta regió on s'ha identificat un motiu ric en arginines molt conservat entre les HMGR vegetals (figura 9). Aquest motiu presenta homologia amb senyals de retenció en el RE de proteïnes de membrana de tipus II en cèl·lules animals (Schutze *et al.*, 1994). A més a més, la regió N-terminal citosòlica és una regió divergent entre isoformes, i, per tant, és candidata a conferir propietats específiques a cada isoforma. Aquest fet és constatat clarament en el cas de les isoformes HMGR1S i HMGR1L: són isoformes idèntiques entre sí, excepte en la regió N-terminal citosòlica, on l'HMGR1L presenta un extensió de 50 aminoàcids (regió 1Lextra). La sola presència d'aquesta regió determina una localització subcel·lular diferencial entre ambdues isoformes, que queda reflectida tant en experiments de fraccionament subcel·lular (apartat 3.1) com en experiments de microscopia confocal (apartat 3.2). Aquestes diferències en la localització subcel·lular de les isoformes HMGR1L i l'HMGR1S són probablement mediades per proteïnes que interaccionin específicament amb aquesta regió. Amb aquests antecedents, es va considerar interessant engegar un crivellatge de doble híbrid per la cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (regió NT1L).

D'altra banda, una de les hipòtesis que s'havien considerat en treballs anteriors consistia en que la biosíntesis dels isoprenoides citosòlics estava organitzada en agrupacions enzimàtiques o metabolons (Chappell, 1995b). Així, també es va considerar interessant estudiar si aquestes possibles associacions enzimàtiques en les primeres etapes de la via del mevalonat podien ser detectades per doble híbrid.

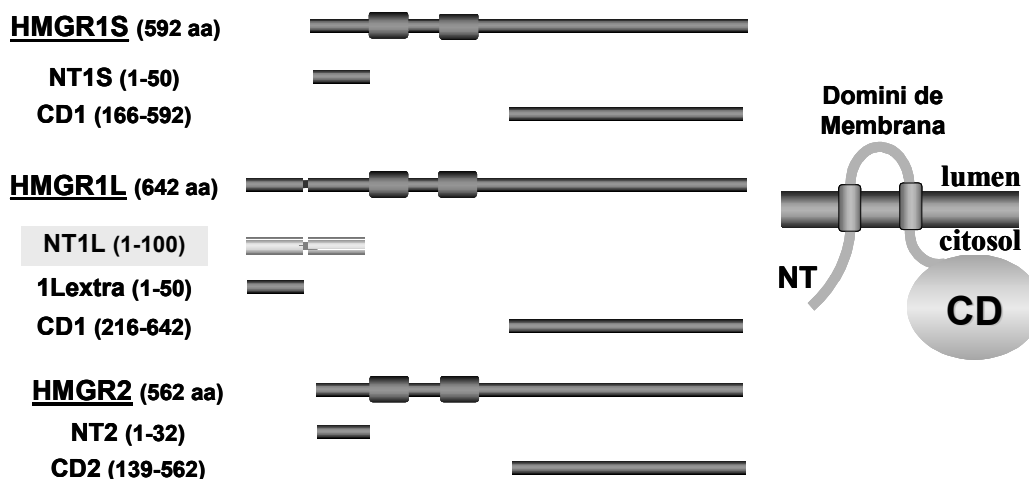
#### 3.3.1 El doble híbrid com a eina per l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna

La tècnica del doble híbrid de llevat representa una de les eines més potents per detectar interaccions entre proteïnes. El seu principal avantatge és que és un sistema *in vivo* on les interaccions es monitoritzen genèticament a través del sistema GAL4 de llevat (figura 27). En el present treball es va utilitzar el sistema de doble híbrid comercialitzat per Clontech (*Matchmaker two-hybrid system 2*).



**Figura 27.** Fonaments de la tècnica del doble híbrid. Les proteïnes problema (X i Y) s'expressen en els llevats com a fusions amb els dominis d'activació (AD) o d'unió al DNA (BD) del factor de transcripció de llevat GAL4. La interacció entre les proteïnes X i Y en les cèl·lules del llevat determina l'expressió dels gens marcadors *HIS3* i *LacZ*.

Com s'ha explicat anteriorment, la tècnica del doble híbrid es va utilitzar per cercar proteïnes que interaccionin amb la regió NT1L de l'HMGR1L (figura 28) mitjançant el crivellatge de genoteques d'expressió. Aquesta tècnica també es va utilitzar per testar possibles interaccions entre els primers enzims de la ruta del mevalonat: l'acetoacetil-CoA tiolasa (que presenta dues isoformes en Arabidopsis, l'AACT1 i l'AACT2), l'HMG-CoA sintasa (HMGS), l'HMG-CoA reductasa (HMGR) i la mevalonat quinasa (MVK). Ja que l'HMGR presenta diferents dominis funcionals, es va dissecionar cadascuna de les isoformes en diferents regions (figura 28). Per l'anàlisi de doble híbrid, totes aquestes seqüències peptídiques es van fusionar als dominis d'unió a DNA (BD) i d'activació (AD) del factor de transcripció de llevat GAL4 en els vector pAS2.1 i pACT2, respectivament. Cadascuna de les combinacions es va analitzar en les soques de llevat CG-1945 i/o Y190, on es monitoritza l'expressió dels gens marcadors *HIS3* (creixement en medi selectiu sense histidina) i *lacZ* (determinació de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa mitjançant l'assaig X-GAL sobre filtre).



**Figura 28.** Esquema de les regions de les isoformes d'HMGR utilitzades pels assaigs de doble híbrid. Entre parèntesi es mostra els aminoàcids corresponents per a cada regió. Noteu que la presència de la regió 1Lextra en la isoforma HMGR1L constitueix la única diferència respecte l'HMGR1S. La regió NT1L de l'HMGR1L va ser emprada per cercar proteïnes que interaccionin amb aquesta regió mitjançant el crivellatge per doble híbrid d'una genoteca d'expressió. A la dreta es mostra la topologia de l'HMGR de plantes.

### 3.3.2 Cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (NT1L)

Per tal d'identificar proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de la isoforma HMGR1L (NT1L), es va utilitzar la fusió BD-NT1L (en el vector pAS2.1) pel crivellatge mitjançant doble híbrid de 1,2-1,6 milions de clons de la genoteca d'expressió d'Arabidopsis ACT (Kim *et al.*, 1997) en la soca de llevat CG-1945. Aquesta genoteca ha estat generada a partir de plàntules d'Arabidopsis de tres dies crescudes en fosc, cosa que és especialment interessant doncs representa unes condicions de creixement on s'expressa la isoforma HMGR1L (figura 19).

Com a resultat del crivellatge, es van obtenir una sèrie de clons positius pels marcadors *HIS3* i *lacZ* en la soca CG-1945 (vegeu Materials i Mètodes per més detall). D'aquests clons es van aïllar els corresponents plasmidis per sotmetre'ls als controls d'interacció pertinents en la soca Y190. La majoria d'ells es van comportar com a falsos positius i, per tant, es van

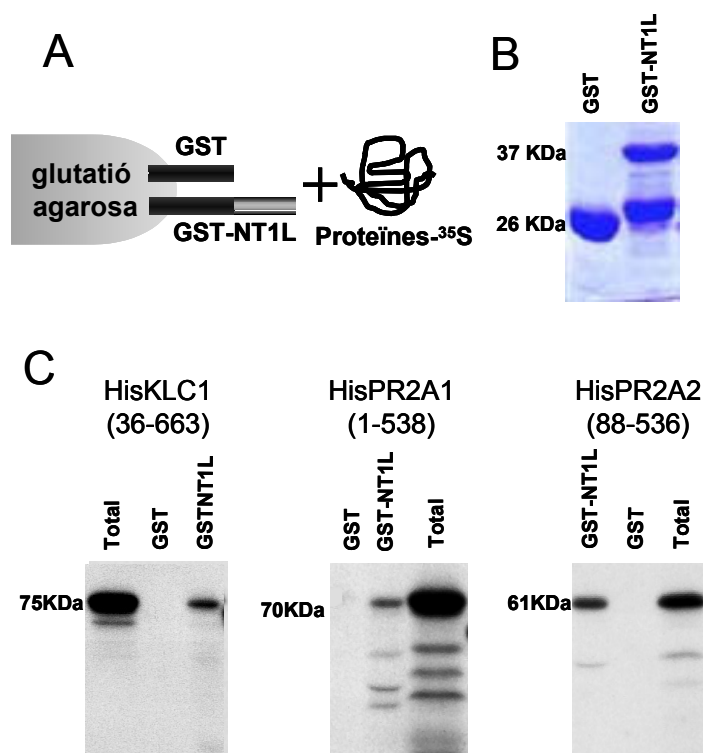
descartar. Finalment, només tres candidats van mostrar una interacció forta i reproduïble amb la regió NT1L (taula 2), i es va procedir a la seva seqüenciació. Dos d'ells codificaven per proteïnes amb similitud amb les subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) i es van anomenar PR2A1 i PR2A2. El tercer clon codificava per una proteïna que presentava certa similitud amb les cadenes lleugeres de quinesina, i es va anomenar KLC1. Les interaccions de PR2A1, PR2A2 i KLC1 amb la regió NT1L eren específiques, ja que quan es van combinar amb els controls negatius (Gal4BD, P53 i laminina) no es va detectar ni creixement en absència d'histidina ni activitat  $\beta$ -galactosidasa. A més, es va comprovar que PR2A1, PR2A2 i KLC1 no interaccionen amb el domini catalític de l'HMGR1 (CD1), per tant, es tracta d'interaccions que es restringeixen a la regió N-terminal citosòlica NT1L. També es va comprovar que no interaccionaven amb altres enzims de la via del mevalonat com l'HMGS o la MVK (taula 2).

**Taula 2.** Interaccions de PR2A1, PR2A2 i KLC1 mitjançant la tècnica del doble híbrid en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). BD, P53 i laminina: controls negatius d'interacció proporcionats per Clontech.

| GAL AD (pACT) | GAL4 BD (PAS2.1) |     |          |      |     |      |     |
|---------------|------------------|-----|----------|------|-----|------|-----|
|               | BD               | P53 | laminina | NT1L | CD1 | HMGS | MVK |
| KLC1          | -                | -   | -        | ++   | -   | -    | -   |
| PR2A1         | -                | -   | -        | ++   | -   | -    | -   |
| PR2A2         | -                | -   | -        | ++   | -   | -    | -   |

Per tal de confirmar aquestes noves interaccions mitjançant una aproximació independent, es van realitzar assaigs de tipus *GST pull-down* (figura 29A). La regió NT1L es va expressar en *E.coli* com a proteïna de fusió a la glutatió-S-transferasa o GST (GST-NT1L), i es va purificar en una matriu de glutatió agarosa (figura 29B). D'altra banda, els cDNAs corresponents a PR2A1, PR2A2 i KLC1 es van transferir al vector PRSET, per obtenir les respectives fusions a C-terminal de l'epítoc d'histidines (vegeu Materials i Mètodes). Mitjançant l'assaig de *GST pull-down*, es va comprovar que PR2A1, PR2A2 i KLC1 sintetitzades *in vitro* i marcades amb  $^{35}\text{S}$  quedaven específicament retingudes en la matriu amb GST-NT1L, però no en la matriu de GST sola (figura 29C). D'aquesta manera es va determinar *in vitro* que PR2A1, PR2A2 i KLC1 interaccionen directa i específicament amb la regió NT1L.

A partir d'aquí, es va considerar oportú procedir a l'estudi de la caracterització de les noves interaccions de l'HMGR amb PR2A1 i PR2A2 (apartat 3.4) i amb KLC1 (apartat 3.5).



**Figura 29.** Confirmació de les interaccions de la regió NT1L amb PR2A1, PR2A2 i KLC1 mitjançant assaig de tipus *GST pull-down*. (A) Esquema de l'assaig *GST pull-down*. (B) Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST (GST i GST-NT1L) utilitzades en els assaigs de *GST pull-down*. (C) Fluorografies on es mostra la unió específica de PR2A1, PR2A2 i KLC1 a la matriu de GST-NT1L però no a la matriu amb GST sola. En la posterior caracterització de PR2A1 i PR2A2 (apartat 3.4) i de KLC1 (apartat 3.5), es va determinar que en aquest assaig s'havia utilitzat, de fet, una versió truncada de KLC1 (aminoàcids de 36-663), una versió truncada de PR2A2 (aminoàcids 88-536) i la versió completa de PR2A1 (aminoàcids 1-538).

### 3.3.3 Capacitat d'homo i heterodimerització dels enzims que catalitzen les primeres etapes de la via del mevalonat

Tal com s'ha descrit a l'apartat 3.3.1, la tècnica del doble híbrid també es va utilitzar amb el propòsit d'estudiar possibles interaccions entre els primers enzims de la via del mevalonat. Primerament, es va analitzar la seva capacitat de formació d'homo i heterodímers. A excepció de l'AACT1, no es va detectar que cap dels enzims formessin homodímers (taula 3). En el cas de l'AACT1, tot i que la interacció era clara (expressat com ++ a la taula 3), la fusió BD-AACT1 en combinació amb l'AD (control negatiu) era capaç de determinar una expressió feble però significativa del gen marcador *lacZ* (marcat com + a la taula 3). Aquest fet ens fa interpretar amb certa precaució qualsevol combinació on s'impliqui la fusió BD-AACT1. Tot i així, el fet que en altres organismes s'hagi determinat que l'AACT actua com a tetràmer (Modis i Wierenga, 1999), dona un cert crèdit a la interacció AACT1-AACT1 trobada.

**Taula 3.** Anàlisi de la capacitat d'homo i heterodimeritzar dels primers enzims de la via del mevalonat mitjançant la tècnica del doble híbrid. El creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) es va analitzar en la soca de llevat CG-1945. L'assaig d'activitat B-galactosidasa (*lacZ*) es va analitzar en la soca Y190. (++) Interacció forta; (+) Interacció feble; (-) No interacció.

| Fusió a BD | Fusió a AD | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|
| AACT1      | AACT1      | ++          | ++          |
| AACT1      | AD         | -           | +           |
| BD         | AACT1      | -           | -           |
| AACT1      | AACT2      | -           | +           |
| AACT2      | AACT1      | -           | -           |
| AACT2      | AACT2      | -           | -           |
| HMGS       | HMGS       | -           | -           |
| HMGR1S     | HMGR1S     | -           | -           |
| MVK        | MVK        | -           | -           |

Inicialment, va resultar sorprenent que l'HMGR1S no homodimeritzés, doncs ha estat descrit que el domini catalític oligomeritza en altres espècies. Es va creure que el domini de membrana present en l'HMGR1S podria estar interferint en l'assaig, ja que el doble híbrid requereix que les proteïnes de fusió s'expressin de manera soluble en el llevat. Així, es van repetir els assaigs utilitzant les regions citosòliques de les diferents isoformes de l'HMGR (figura 28). En efecte, d'aquesta manera es va poder detectar la dimerització dels dominis catalítics CD1-CD1 i CD2-CD2 (taules 4 i 5, respectivament). Tanmateix, es va determinar que les regions N-terminal citosòliques (NT) no estaven implicades en cap d'aquestes interaccions.

**Taula 4.** Anàlisi de les interaccions entre les diferents regions de l'HMGR1 per doble híbrid. El creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) es va analitzar en la soca de llevat CG-1945. L'assaig d'activitat B-galactosidasa (*lacZ*) es va analitzar en la soca Y190. nr: no realitzat.

| Fusió a BD | Fusió a AD | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|
| NT1L       | NT1L       | -           | -           |
| NT1S       | NT1S       | -           | -           |
| CD1        | CD1        | ++          | ++          |
| CD1        | AD         | -           | -           |
| BD         | CD1        | -           | -           |
| NT1L       | CD1        | nr          | -           |
| CD1        | NT1L       | nr          | -           |
| NT1S       | CD1        | nr          | -           |
| CD1        | NT1S       | nr          | -           |

**Taula 5.** Anàlisi de les interaccions entre les diferents regions de l'HMGR2 per doble híbrid. El creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) es va analitzar en la soca de llevat CG-1945. L'assaig d'activitat B-galactosidasa (*lacZ*) es va analitzar en la soca Y190.

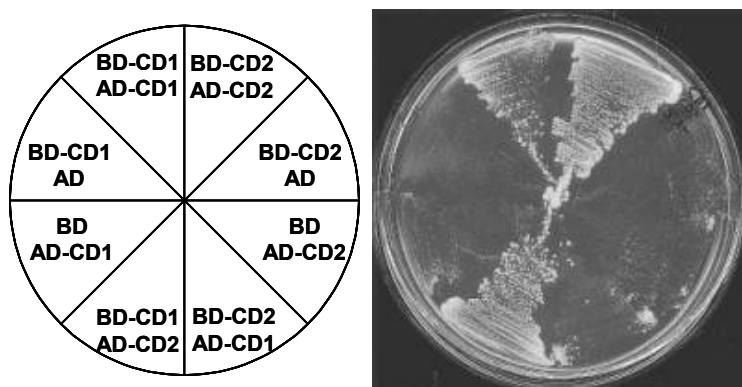
| Fusió a BD | Fusió a AD | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|
| NT2        | NT2        | -           | -           |
| CD2        | CD2        | ++          | ++          |
| CD2        | AD         | -           | -           |
| BD         | CD2        | -           | -           |



També es va testar si les diferents regions de l'HMGR1 i de l'HMGR2 eren capaces d'heterodimeritzar (taula 6). D'especial interès va resultar el fet que els dominis catalítics CD1 i CD2 fossin capaços d'interaccionar en aquest tipus d'assaig. Aquesta interacció, però, s'observà molt feblement en el cas de la combinació BD-CD2 i AD-CD1 en la soca CG-1945 (taula 6 i figura 30). De nou, els resultats obtinguts indicaven que les regions NT no estaven implicades en aquesta interacció.

**Taula 6.** Anàlisi de la interacció entre diferents regions de l'HMGR1 i l'HMGR2 per doble híbrid. El creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) es va analitzar en la soca de llevat CG-1945. L'assaig d'activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) es va analitzar en la soca Y190. (++) Interacció forta; (+) Interacció feble; (-) No interacció; (nr) No realitzat.

| Fusió a BD | Fusió a AD | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|
| CD1        | CD2        | ++          | ++          |
| CD2        | CD1        | +           | ++          |
| NT1L       | NT1S       | nr          | -           |
| NT1S       | NT1L       | nr          | -           |
| NT1L       | NT2        | nr          | -           |
| NT2        | NT1L       | nr          | -           |
| NT1S       | NT2        | nr          | -           |
| NT2        | NT1S       | nr          | -           |



**Figura 30.** Anàlisi de la capacitat d'home i heterodimerització entre els dominis catalítics de l'HMGR1 i l'HMGR2 (CD1 i CD2) en la soca de llevat CG-1945. Es mostra la capacitat de créixer en medi selectiu sense histidina i amb 5mM de 3-aminotriazole.

### 3.3.4 Interacció proteïna-proteïna entre els enzims que catalitzen les primeres etapes de la via del mevalonat

Tal com s'ha comentat a l'inici del present apartat, es va considerar interessant explorar possibles associacions entre els enzims que catalitzen les primeres etapes de la via del mevalonat. Per això, es va testar la capacitat d'interacció proteïna-proteïna entre els enzims AACT, HMGS, HMGR i MVK mitjançant la tècnica del doble híbrid.

Primerament, no es va detectar interacció entre les isoformes AACT1 i AACT2 i l'HMGS (taula 7). Només es va detectar una lleugera expressió del marcador *lacZ* quan es va utilitzar la fusió BD-AACT1. Aquesta activació no es garantia d'interacció, doncs com s'ha comentat

anteriorment, aquesta fusió per si mateixa activa l'expressió del gen *lacZ* en la soca Y190 (taula 3).

**Taula 7.** Anàlisi de la interacció AACT-HMGS per doble híbrid. El creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) es va analitzar en la soca de llevat CG-1945. L'assaig d'activitat B-galactosidasa (*lacZ*) es va analitzar en la soca Y190. (+) Interacció feble; (-) No Interacció.

| Fusió a BD | Fusió a AD | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|
| AACT1      | HMGS       | -           | +           |
| HMGS       | AACT1      | -           | -           |
| AACT2      | HMGS       | -           | -           |
| HMGS       | AACT2      | -           | -           |

Tampoc es va detectar cap interacció entre les diferents regions de les isoformes HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 amb l'HMGS ni amb la MVK (taula 8). Els resultats suggereixen que aquestes interaccions o bé no es produeixen o bé no són detectades mitjançant els assaigs de doble híbrid. Aquesta opció és plausible, ja que en el sistema de llevat pot mancar algun component necessari per produir les interaccions (modificacions posttraduccionals, altres proteïnes del complex, etc.). D'altra banda, en la tècnica del doble híbrid es detecten interaccions solubles produïdes en el nucli del llevat, i, per tant, no sembla l'entorn més adequat per detectar interaccions amb una proteïna de membrana com l'HMGR.

**Taula 8.** Anàlisi mitjançant doble híbrid de la interacció de les diferents regions de les isoformes HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 amb l'HMGS i la MVK en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*). A més, cada combinació es va analitzar de les dues maneres possibles (intercanviant BD i AD).

|      | NT1L | NT1S | CD1 | NT2 | CD2 |
|------|------|------|-----|-----|-----|
| HMGS | -    | -    | -   | -   | -   |
| MVK  | -    | -    | -   | -   | -   |

### 3.4 CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE L'HMGR AMB LES SUBUNITATS REGULADORES PR2A1 I PR2A2 DE LA PP2A

#### 3.4.1 PR2A1 i PR2A2 formen part d'una família multigènica a Arabidopsis

A partir de les seqüències obtingudes dels clons PR2A1 i PR2A2 es van fer, inicialment, cerques d'homologia en el genoma d'Arabidopsis (base de dades de TAIR). Pel que fa a PR2A1, es va poder identificar una pauta de lectura oberta (ORF) de 1614 parells de bases (pb) que codifica per un polipèptid de 538 aminoàcids, el qual era idèntic al predit a partir de la seqüència genòmica corresponent (AT5g44090). La massa molecular estimada de la proteïna era de 62 KDa. També es va comprovar que PR2A1 no presentava regió 5'UTR (seqüència 5' transcrita no traduïda). A partir de la seqüència d'altres cDNAs corresponents a PR2A1 que prèviament s'havien identificat (Hendershot *et al.*, 1999), es va dissenyar una estratègia de PCR per amplificar i clonar (vegeu apartat 2.3.6) un cDNA que també inclogués la regió 5'UTR (figura 31).

Estudis equivalents a partir del clon PR2A2 van permetre comprovar que es tractava d'una seqüència parcial. La proteïna predita a partir de la seqüència genòmica (AT5g28850) s'estenia 87 aminoàcids en N-terminal, completant una seqüència polipeptídica de 536 aminoàcids. Per tant, PR2A2 presentava una pauta de lectura oberta (ORF) truncada que codificava per un polipèptid que contenia els aminoàcids de 88 a 536. Utilitzant cebadors antisentit en la regió 5' de PR2A2 en combinació amb cebadors del vector pACT (on està clonada la llibreria ACT), per PCR es van identificar cDNAs extesos per 5' (vegeu apartat 2.3.6). A partir d'aquí es va poder amplificar per PCR un cDNA complet, que presentava una ORF de 1608 pb que codificava per un polipèptid de 536 aminoàcids, amb una massa molecular estimada de 62 KDa (figura 32).

De l'anàlisi comparatiu dels cDNAs amb les corresponents seqüències genòmiques es va deduir l'estructura dels gens. El gen *PR2A1* presentaria 13 exons, amb els codons d'inici i parada de traducció situats als exons 1 i 12, respectivament. El gen *PR2A2* presentaria 12 exons, amb els codons d'inici i stop de traducció situats als exons 1 i 12, respectivament.



|      |   |
|------|---|
| 1    | AAG ACT AGA TTC GAT GTG TTG GTG AAG AAG ATC TCG ACT TTG TTC AAA ATT CCA ATT TCG |
|      | M V   |
| 61   | TTC GCC TCA AAG ATC ATT CTC TCA TCT TCT CGA CTT TGA TGC GAT TGA TTA AAT ATG GTG |
|      | D T V I P G D M A C L D A D L L Q L Q E   |
| 121  | GAT ACG GTT ATT CCC GGA GAT ATG GCT TGT TTG GAT GCA GAT TTG TTG CAG CTT CAG GAA |
|      | M S S F V L N S K P G F T Q K L F D Q W   |
| 181  | ATG TCT TCC TTT GTT CTC AAT TCT AAA CCT GGA TTC ACT CAG AAG CTC TTC GAC CAG TGG |
|      | L S L P E A Q R Q V G S L L K D A V A G   |
| 241  | CTT TCT CTT CCC GAA GCT CAG CGA CAG GTT GGA TCA TTG CTT AAG GAT GCT GTA GCT GGA |
|      | A P I N V T G S A S G S N S A T I P S M   |
| 301  | GCT CCT ATC AAT GTT ACT GGA AGT GCA TCG GGT TCT AAT TCT GCC ACT ATA CCA TCT ATG |
|      | F P A G S A P P L S P R S C G S P R T T   |
| 361  | TTT CCT GCG GGA AGC GCT CCT CCT CTT TCA CCA AGA AGT TGT GGT TCA CCC CGT ACA ACC |
|      | K Q R A P S N L G S T L K V V N E P V K   |
| 421  | AAA CAG AGA GCC CCT TCT AAC TTA GGT TCT ACT CTC AAA GTA GTC AAC GAG CCT GTT AAA |
|      | E P I P Q F Y F R P P P P S E I K E   |
| 481  | GAG CCT ATA CCT CAG TTT TAT TTC CAA AAT GGT CGC CCT CCA CCA AGC GAG ATT AAA GAG |
|      | Q C M F R I N H F F Y G H M D G L Q I Q   |
| 541  | CAA TGT ATG TTT AGA ATC AAT CAC TTC TTT TAT GGT CAC ATG GAT GGC TTG CAG ATA CAA |
|      | E L V T R E I C K L P S F S T S L   |
| 601  | GAA TTC AAG TTA GTC ACC AGA GAA ATC TGC AAG CTC CCA TCT TTC TTC TCC ACT TCC CTT |
|      | F R K I D L N N T G F V T R D A F I D F   |
| 661  | TTC CGG AAG ATC GAT CTC AAC AAT ACA GGT TTT GTT ACT AGA GAT GCA TTT ATT GAT TTT |
|      | W V N G N M L I M D T T T Q I F K I L K   |
| 721  | TGG GTA AAC GGG AAC ATG TTG ATA ATG GAT ACA ACG ACC CAA ATC TTC AAG ATC CTA AAG |
|      | Q K D Q S F I V K D D F K P L L K E L L   |
| 781  | CAG AAA GAT CAG AGT TTC ATT GTT AAG GAT GAT TTC AAA CCA CTA CTT AAA GAA CTG TTG |
|      | A T H P G L E F L Q S T P E F Q E R Y A   |
| 841  | GCG AGC CAT CCT GGC CTA GAG TTC CTG CAA TCC ACA CCT GAA TTC CAA GAA AGA TAT GCT |
|      | E T V T Y R I F Y Y I N R S G N G R I T   |
| 901  | GAA ACT GTC ACC TAC AGA ATA TTT TAC TAC ATA AAT AGA TCT GGC AAT GGT CGA ATT ACA |
|      | F R E L K R G N L I D A M L H A D E E E   |
| 961  | TTT AGG GAG CTT AAA CGG GGA AAC TTA ATT GAT GCT ATG CTA CAT GCT GAT GAA GAA GAA |
|      | D I N K V L R Y F S Y E H F Y V I Y C K   |
| 1021 | GAT ATT AAC AAA GTG TTG AGA TAC TTC TCA TAT GAG CAT TTC TAT GTC ATA TAC TGC AAG |
|      | F W E L D T D H D F L I D K E N L M R Y   |
| 1081 | TTC TGG GAG CTG GAT ACG GAT CAC GAT TTC CTG ATT GAC AAA GAA AAT CTT ATG AGA TAT |
|      | G N H A L T Y R I V D R I F S Q V A R K   |
| 1141 | GGA AAC CAT GCT CTT ACC TAC CGG ATT GTC GAC AGA ATA TTC TCC CAG GTT GCT AGG AAG |
|      | F T S K V E G K M G Y E D F V Y F I L A   |
| 1201 | TTC ACT AGC AAA GTT GAA GAG AAC ATG GGG TAT GAA GAC TTT GTC TAT TTC ATT CTT GCG |
|      | E E D K S S V P S L E Y W F K C I D L D   |
| 1261 | GAA GAA GAT AAA TCG TCA GTG CCT AGC CTA GAA TAT TGG TTT AAG TGC ATA GAC TTG GAT |
|      | A N G I I T R N E M Q F F Y E E Q L H R   |
| 1321 | GCA AAT GGG ATT ATA ACG CGA AAT GAG ATG CAA TTC TTT TAT GAA GAG CAG TTG CAT AGA |
|      | M E C M A Q E A V L F E D I L C Q M I D   |
| 1381 | ATG GAG TGC ATG GCG CAA GAG GCT GTT CTT TTC GAG GAT ATC TTA TGT CAG ATG ATT GAT |
|      | M I G P E N E S H I T L H D L K G S K L   |
| 1441 | ATG ATC GGA CCT GAG AAC GAA AGC CAT ATA ACG CTG CAT GAC CTG AAA GGC TCA AAG CTC |
|      | S G N V F N I L F N L N K F M A F E T R   |
| 1501 | TCT GGA AAC GTC TTC AAC ATC CTT TTT AAT CTA AAC AAA TTT ATG GCA TTT GAA ACC CGG |
|      | D P F L I R Q E R E N P T L T D W D R F   |
| 1561 | GAT CCG TTC CTC ATT CGT CAG GAG CGC GAG AAC CCG ACA TTG ACA GAC TGG GAC CGT TTT |
|      | A H R E Y I R L S M E E D V E D A S N G   |
| 1621 | GCA CAT AGA GAG TAT ATT CGG CTA TCA ATG GAA GAA GAT GTT GAA GAT GCA TCC AAT GGA |
|      | S A E V W D D S S L E A P F *   |
| 1681 | AGT GCT GAG GTT TGG GAT GAC TCG TCA CTG GAG GCT CCC TTC TGA GTT CAA AGA GGT AGC |
| 1741 | AAG TCA ACA AAA GAA   |

**Figura 32.** Seqüència nucleotídica i peptídica de PR2A2. Els dominis d'unió a la subunitat A de la PP2A ASBD1 (aminoàcids 234-339) i ASBD2 (aminoàcids 378-435) han estat subratllats. En gris s'ha sombreat els motius d'unió a calci *EF-Hand1* (aminoàcids 327-339) i *EF-Hand2* (aminoàcids 400-412) identificats amb el programa *PROSITE*.

Un cop es disposava de les seqüències completes de PR2A1 i PR2A2, es va procedir a cercar seqüències peptídiques homòlogues en el genoma d'Arabidopsis. Amb l'algoritme BLASTP es va comprovar que PR2A1 i PR2A2 eren, de fet, seqüències homòlogues entre si, i que formaven part d'una família multigènica de cinc membres en Arabidopsis. Les seqüències polipeptídiques corresponents presentaven elevats percentatges de similitud i identitat (taula 9), les quals s'estenien al llarg de tota la proteïna tal com es mostra en l'alineament múltiple (figura 33).

**Taula 9.** Percentatges d'identitat i de similitud (entre parèntesi) entre les seqüències polipeptídiques corresponents a PR2A1 i PR2A2 i els altres membres de la família.

|           | PR2A1     | PR2A2     |
|-----------|-----------|-----------|
| AT1g03960 | 80 (87)   | 65 (78)   |
| PR2A1     | 100 (100) | 67 (80)   |
| PR2A2     | 67 (80)   | 100 (100) |
| AT5g28900 | 67 (80)   | 99 (100)  |
| AT1g54450 | 67 (79)   | 74 (84)   |

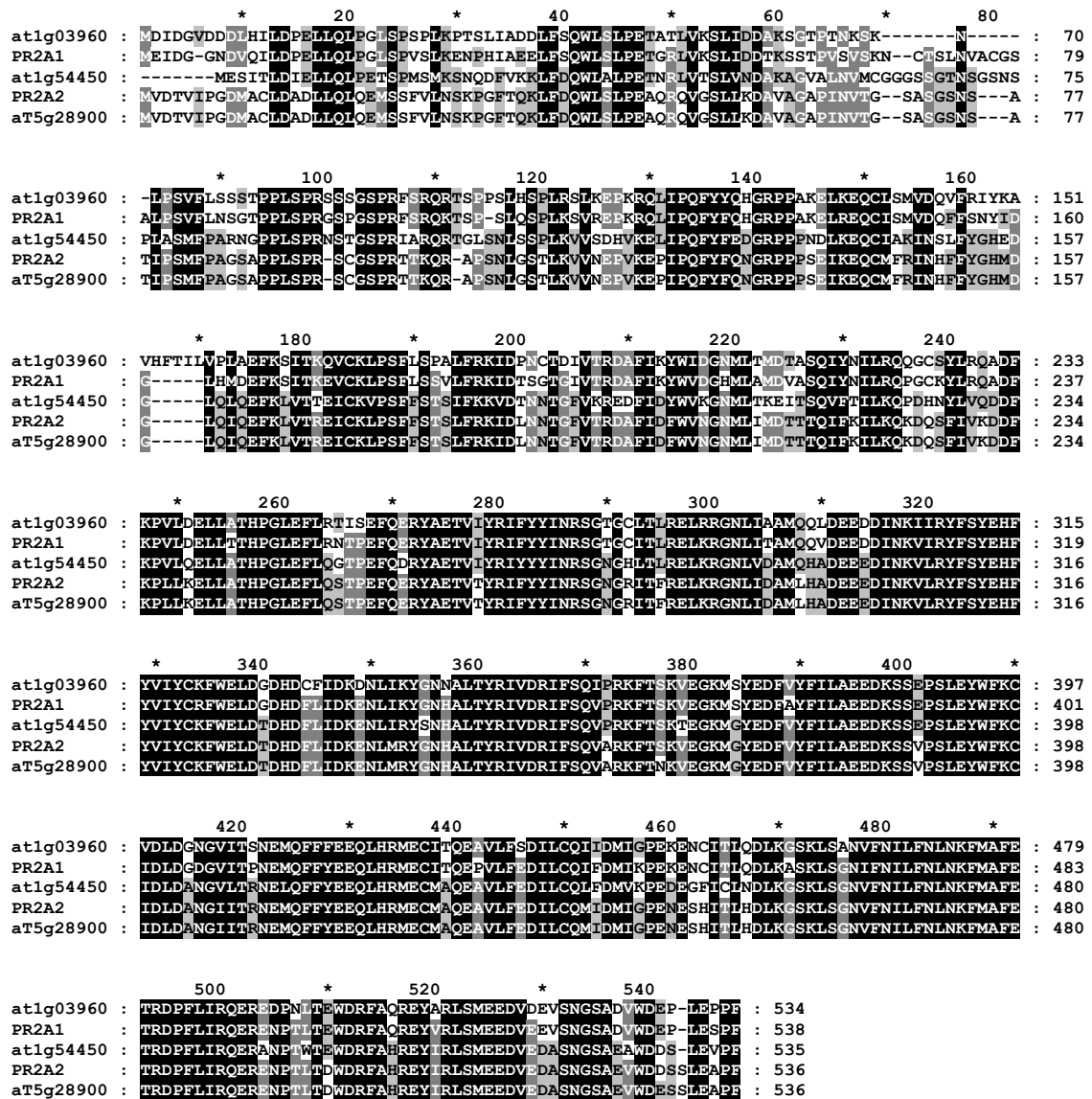
### 3.4.2 PR2A1 i PR2A2 són membres de la família B'' de subunitats reguladores de la PP2A

La cerca de seqüències homòlogues es va estendre a la resta d'organismes, i, mitjançant l'algoritme BLASTP (base de dades NCBI), es va poder identificar que PR2A1 i PR2A2 eren membres de la família B'' de subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A). Aquesta fosfatasa és un trímer format una subunitat catalítica o C, una subunitat reguladora o B, que determina l'especificitat de substrat i la localització subcel·lular del complex PP2A, i una subunitat A estructural o PR65, responsable de l'ensamblatge de les subunitats B i C (vegeu apartat 1.5.1).

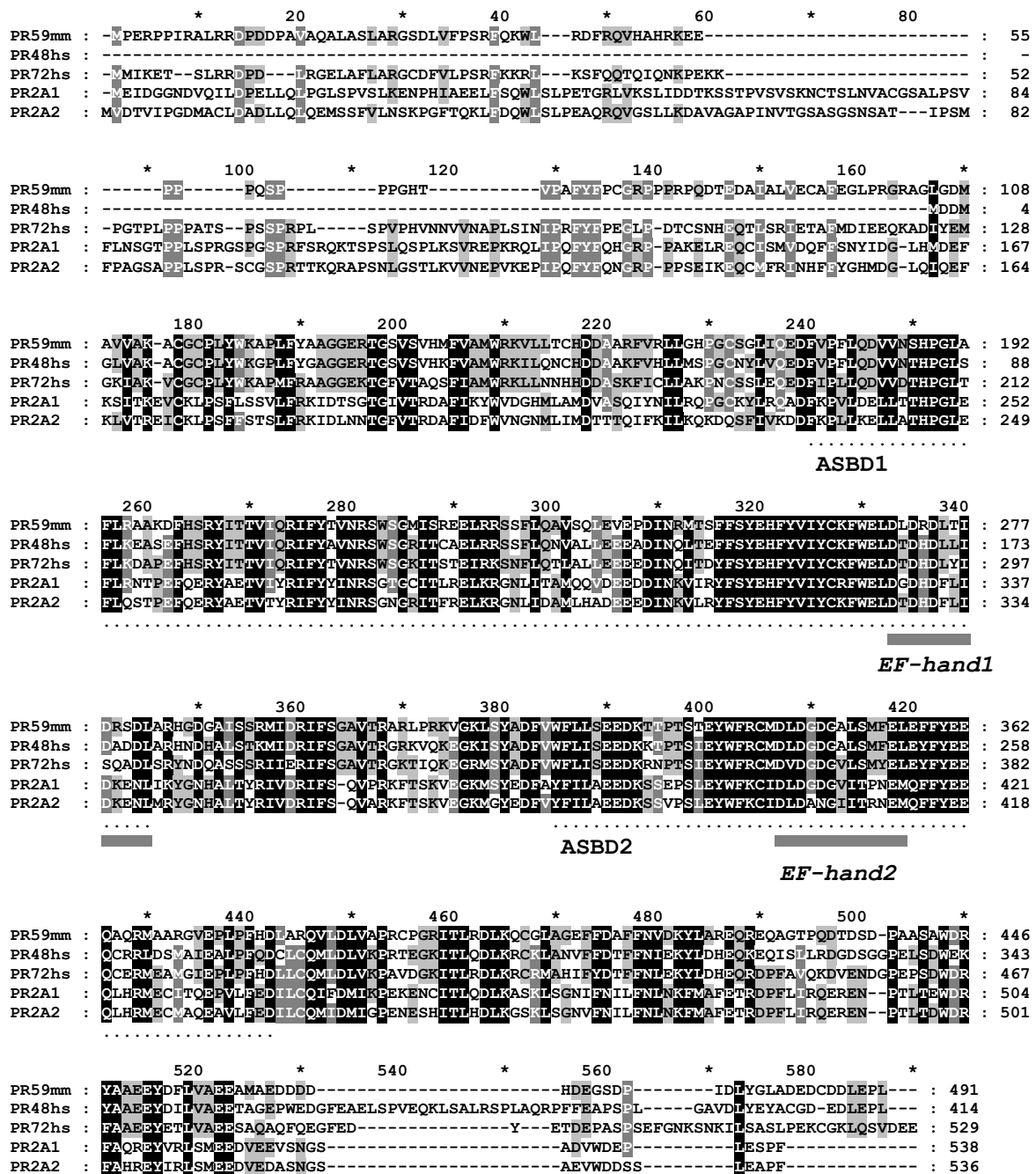
Existeixen tres membres ben caracteritzats de la família B'' de subunitats reguladores de la PP2A (vegeu apartat 1.5.2): la PR72 i la PR48 humanes i la PR59 de ratolí. PR2A1 i PR2A2 mostren un 34% d'identitat amb PR72, i una similitud entorn al 50%. L'alineament múltiple d'aquestes seqüències (figura 34), ens mostra que presenten una elevada similitud, sobretot en la regió central de la proteïna. Aquesta regió conservada conté el dos dominis d'unió a la subunitat A o PR65 —ASBD1 i ASBD2 (Li i Virshup, 2002)— els quals inclouen els dos motius d'unió a calci de tipus *EF-hand*. Els motius *EF-hand* de la PR72 humana uneixen calci, i s'ha proposat que aquest fet determina la seva capacitat d'interacció amb la PR65 (Janssens *et al.*, 2003).

Un estudi filogenètic amb les seqüències peptídiques homòlogues a les subunitats reguladores B'' de la PP2A, ens indica que totes elles agrupen en una mateixa branca (figura

18), la qual es diferencia de la branca de la família d'homòlegs a *tonneau2* (Camilleri *et al.*, 2002). Aquest fet clarament suggereix que PR2A1 i PR2A2 són subunitats reguladores de tipus B'' de la PP2A. D'altra banda, de l'arbre filogenètic també s'extreu que la família de subunitats B'' d'*Arabidopsis* es divideix en dos subgrups, la qual cosa està d'acord amb els percentatges d'identitat i de similitud trobats entre les seqüències (taula 9). Cal constatar que PR2A1 i PR2A2 representen a cadascun dels subgrups, i això planteja la possibilitat que tots els membres de la família tinguin, de fet, la capacitat d'interaccionar amb l'HMGR.

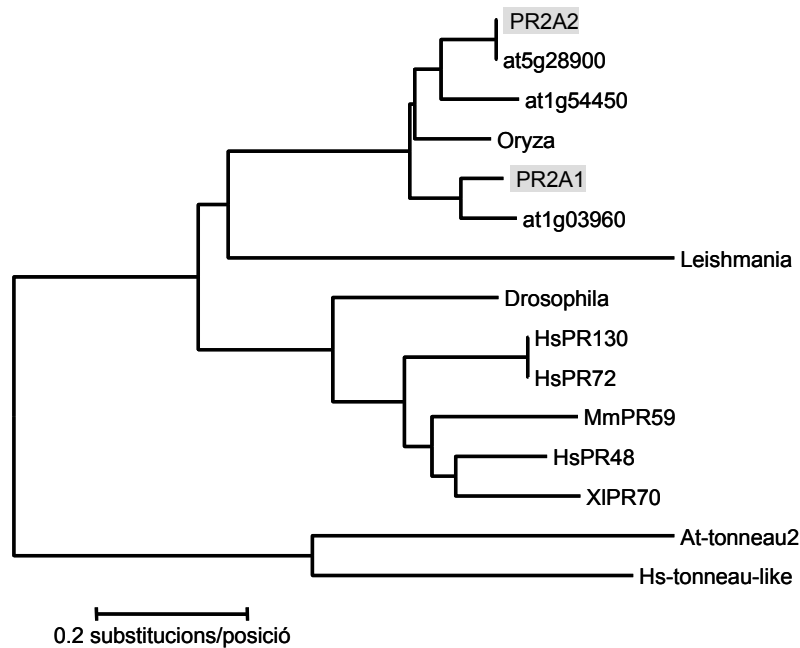


**Figura 33.** Alineament múltiple de les seqüències d'*Arabidopsis* homòlegs a PR2A1 i PR2A2. PR2A1 correspon a la seqüència polipeptídica predita a partir de la seqüència genòmica AT5g44090. PR2A2 correspon a la seqüència polipeptídica predita a partir de la seqüència genòmica AT5g28850.



**Figura 34.** Alineament múltiple de les proteïnes de la família B' de subunitats reguladores de la PP2A. Els motius d'unió a calci *EF-hand1* i *EF-hand2* s'han marcat amb rectangles grisos. Els dominis d'unió a la subunitat A o PR65 (ASBD1 i ASBD2) s'han marcat amb línies de punts. mm: *Mus musculus*; hs: *Homo sapiens*.

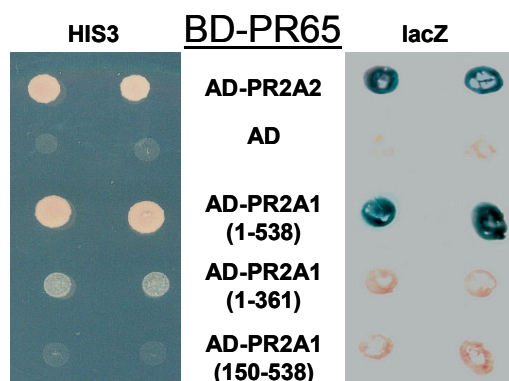




**Figura 35.** Anàlisi filogenètic de les subunitats reguladores B'' de la PP2A. L'arbre filogenètic es va fer amb el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versió 2b2 (MEGA 2b2), utilitzant l'algoritme *Neighbor-Joining*. La longitud dels braços reflecteix el nombre de substitucions aminoacídiques per posició entre les seqüències, excloent aquelles posicions en les que almenys una de les seqüències presenta una deleció. L'algoritme assumeix que la freqüència d'aparició dels aminoàcids és la mateixa per tots ells. Seqüències emprades: *Arabidopsis thaliana* (PR2A1 i PR2A2, AT5G28900, AT1G54450 i AT1G03960); *Oryza sativa* (AC078829\_14); *Leishmania major* (AC019154\_6); *Drosophila melanogaster* (AAG22156.1); *Homo sapiens* PR130 (AAB02613.1); *Homo sapiens* PR72 (AAB02614.1); *Homo sapiens* PR48 (AF135016\_1); *Mus musculus* PR59 (AAC98973.1); *Xenopus laevis* PR70 (AAK98642); *Arabidopsis thaliana* tonneau 2 (AAG35778); *Homo sapiens* tonneau-like (XP\_007238.1).

Per tal de comprovar si PR2A1 i PR2A2 formen part del complex PP2A, es va analitzar la seva capacitat d'interaccionar amb la subunitat PR65 mitjançant la tècnica del doble híbrid. Es va determinar que la soca Y190 portadora de les fusions AD-PR2A1 o AD-PR2A2 en combinació amb la fusió BD-PR65 creixia en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i produïa activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). Això indica que, efectivament, PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb PR65 (figura 36). També es va intentar definir la regió de PR2A1 responsable de la interacció amb PR65. Per això, es van fer versions truncades de PR2A1, incloent les regions 1-361 i 150-538. En cap de les dues deleccions es va detectar interacció amb PR65. Aquest resultat és relativament sorprenent, doncs la regió 150-538 conté els dos dominis —ASBD1 i ASBD2— proposats com a lloc d'unió a la subunitat PR65 (figures 31 i 34). La funció dels dominis ASBD1 i ASBD2 de la PR72 humana ha estat demostrada per assaig d'interacció *in vitro* (Li i Virshup, 2002). Per tant, es podria pensar que l'anàlisi de deleccions de PR2A1 no sigui possible per alguna restricció imposada per la tècnica del doble híbrid (expressió en llevat, plegament incorrecte de les fusions als dominis AD i BD de GAL4, etc.).

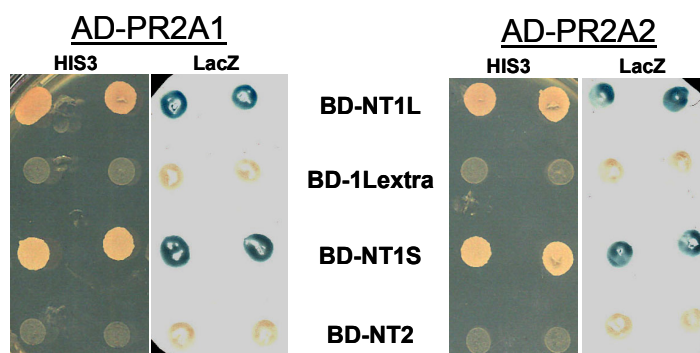
El conjunt de resultats permeten concloure que PR2A1 i PR2A2 són subunitats reguladores B'' de la PP2A i formen part del complex de PP2A a través de la interacció amb la subunitat PR65.



**Figura 36.** Anàlisi mitjançant doble híbrid de la interacció de PR2A1 i PR2A2 amb la subunitat PR65 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*). També es van analitzar les regions aminoacídiques de PR2A1: 1-361 i 150-538.

### 3.4.3 PR2A1 i PR2A2 interaccionen específicament amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR1L, però no amb la de l'HMGR2

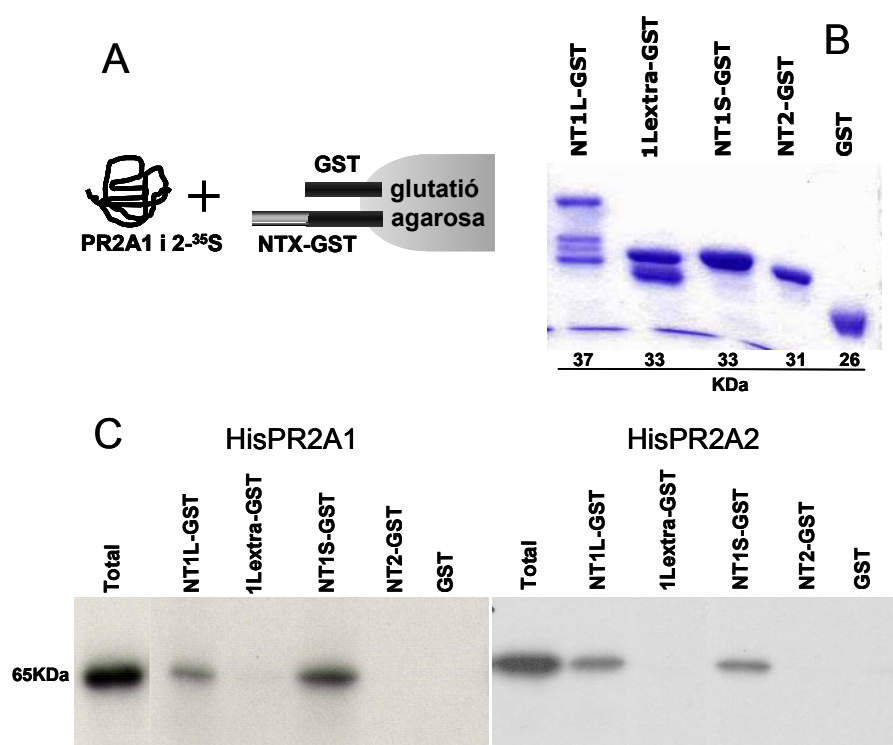
Fins ara, s'ha determinat que PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (regió NT1L). Ja que un dels objectius d'aquest treball era cercar mecanismes específics d'isoforma, es va considerar interessant testar si aquesta interacció també es produïa amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR2. Per tal d'abordar aquest aspecte, es va analitzar mitjançant la tècnica del doble híbrid la capacitat d'interacció de PR2A1 i PR2A2 amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR2 (NT1S i NT2, respectivament) i amb la regió 1Lextra —la extensió N-terminal exclusiva de l'HMGR1L— (figura 28). D'aquesta manera, es va determinar que la interacció de PR2A1 i PR2A2 es donava específicament amb les regions NT1L i NT1S (figura 37), però no amb les regions NT2 ni 1Lextra. D'aquests resultats es pot deduir que la interacció es produeix a través de la regió NT1S, que és una regió comuna entre les isoformes HMGR1L i HMGR1S.



**Figura 37.** Anàlisi per doble híbrid de la interacció de PR2A1 i de PR2A2 amb les regions N-terminal citosòliques NT1L, 1Lextra, NT1S i NT2 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*).

En el sistema del doble híbrid, les fusions es realitzen a C-terminal dels dominis BD i AD de GAL4. D'aquesta manera, les regions N-terminal citosòliques de l'HMGR queden en posició C-

terminal de les fusions, fet que podria dificultar el correcte plegament de les mateixes i donar resultats inconsistents. Per tal de verificar els resultats de doble híbrid, es van realitzar assaigs de *GST pull-down*, on les regions NT1S, NT1L, NT2 i 1Lextra es van fusionar a N-terminal de la GST (figura 38A). Aquestes fusions es van expressar en *E.coli* i es van purificar en una matriu de glutatió-agarosa (figura 38B). D'altra banda, PR2A1 i PR2A2 amb un epítip d'histidines en posició N-terminal (HisPR2A1 i HisPR2A2), es van marcar amb  $^{35}\text{S}$  per traducció *in vitro* a partir del vector pET28 (vegeu Materials i Mètodes). Mitjançant l'assaig de *GST pull-down* es va comprovar que PR2A1 i PR2A2 quedaven específicament retingudes en les matrius de NT1L-GST i NT1S-GST, però no en la resta de matrius (1Lextra-GST, NT2-GST i GST), tal com s'observa en la figura 38C. Així doncs, els resultats *in vitro* confirmen que PR2A1 i PR2A2 interaccionen específicament amb la regió comuna entre les regions N-terminal citosòliques NT1S i NT1L de les isoformes HMGR1S i HMGR1L, respectivament.



**Figura 38.** Anàlisi de les interaccions de PR2A1 i PR2A2 amb les regions NT1L, 1Lextra, NT1S i NT2 mitjançant assaig de tipus *GST pull-down*. (A) Esquema de l'assaig *GST pull-down*. (B) Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs de *GST pull-down*. (C) Fluorografies on es mostra la unió específica de PR2A1 i PR2A2 amb les matrius NT1L-GST i NT1S-GST.

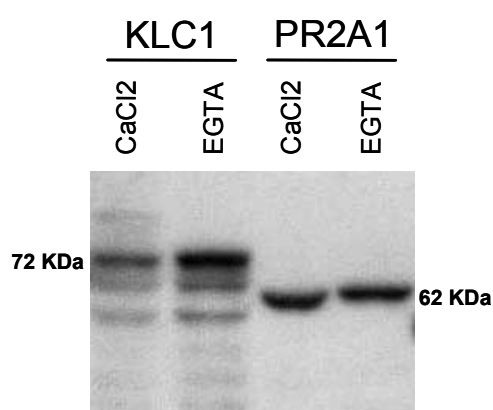
#### 3.4.4 Purificació dependent de calci de les isoformes HMGR1L i HMGR1S mitjançant una matriu d'afinitat amb PR2A1

Mitjançant assaigs de doble híbrid i de *GST pull-down* s'ha determinat que PR2A1 i PR2A2 s'uneixen a la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR1L. Per tal d'aprofundir en la caracterització d'aquestes interaccions, es va realitzar una purificació de l'HMGR a partir d'extractes d'*Arabidopsis* mitjançant una matriu d'afinitat que contenia la proteïna quimèrica GST-PR2A1. Primerament, es va procedir a l'expressió de GST-PR2A1 en

*E. coli* i posterior purificació en una matriu de glutatió-agarosa (figura 40B). Per la purificació per afinitat de l'HMGR, es va preparar un extracte proteic total a partir de cèl·lules de la línia T87, que, posteriorment, es va incubar amb les matrius de GST-PR2A1 i de GST sola. Finalment, en la fracció retinguda en les matrius d'afinitat es va immunodetectar l'HMGR utilitzant els anticossos anti-CD1 clarificats (vegeu Materials i Mètodes). En experiments previs, es va observar que la retenció de les isoformes HMGR1S i HMGR1L en la matriu de GST-PR2A1 era poc eficient, encara que detectable (resultats no mostrats).

Tal com s'ha comentat anteriorment, la PR72 humana conté 2 motius d'unió a calci de tipus *EF-hand* (Janssens *et al.*, 2003). Aquests motius estan en una regió molt conservada en la família de subunitats reguladores B'' de la PP2A (figura 34), i els programes de cerca de motius com PROSITE els identifiquen en PR2A1 i PR2A2 (figures 31 i 32). Atés que en el cas de PR72 el calci modula la seva interacció amb la subunitat PR65, es podria postular que el calci exercís també un efecte modulador de la unió de l'HMGR dels extractes vegetals amb la matriu amb GST-PR2A1.

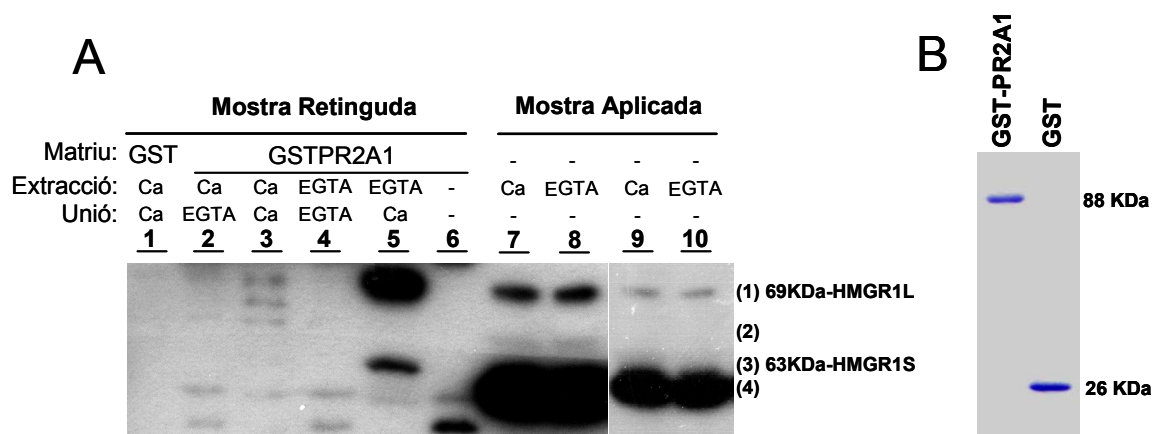
Amb aquestes premisses, primerament es va voler provar si PR2A1 era capaç d'unir calci mitjançant un assaig indirecte. L'assaig es basa en el canvi de mobilitat electroforètica que experimenten les proteïnes amb motius *EF-hand* quan uneixen calci. Aquesta alteració és deguda a un canvi conformacional de les mateixes en presència del catió. Així doncs, es va procedir al marcatge de PR2A1 amb <sup>35</sup>S mitjançant traducció *in vitro* i, posteriorment, es va incubar amb 10 mM de calci o d'EGTA, un quelant del calci. Després d'analitzar les mostres mitjançant SDS-PAGE i fluorografia, es va observar de manera reproduïble que, en presència de calci, PR2A1 mostrava una mobilitat major (figura 39). Per contra, aquest efecte no es va donar en una proteïna control com és la KLC1. Aquests resultats suggereixen que, de la mateixa manera que l'homòleg PR72, PR2A1 uneix calci.



**Figura 39.** Canvi de mobilitat electroforètica de PR2A1 induïda per calci.

Considerant els resultats presentats en aquest apartat, semblava interessant testar si el calci era capaç de millorar l'eficiència de retenció de l'HMGR en la matriu d'afinitat amb GST-PR2A1. A partir d'extractes derivats de cèl·lules de la línia T87, es van provar 4 condicions

d'unió diferents. Inicialment, es van preparar 2 extractes proteics totals utilitzant 2 tampons d'extracció (vegeu materials i mètodes): un amb 5mM  $\text{CaCl}_2$  i l'altre amb 5mM EGTA. Amb l'extracte amb calci es van preparar dues condicions d'unió a la matriu: una mantenint el  $\text{CaCl}_2$  a 5mM i l'altra suplementant-lo amb un excés d'EGTA (13,5mM). Amb l'extracte amb EGTA també es van preparar dues condicions d'unió a la matriu: una mantenint l'EGTA a 5mM i l'altra suplementant-lo amb un excés de  $\text{CaCl}_2$  (13,5mM). Les mostres resultants (que representen les 4 condicions d'unió) es van incubar amb la matriu d'afinitat amb GST-PR2A1, i les fraccions retengudes es van analitzar mitjançant transferència de western i immunodetecció de l'HMGR utilitzant els anticossos anti-CD1 clarificats (vegeu Materials i Mètodes). Els resultats indiquen que, efectivament, les isoformes HMGR1L i HMGR1S (bandes 1 i 3, respectivament) s'uneixen a GST-PR2A1 de manera depenent de calci (figura 40A, carrils 2-5). Aquesta unió és específica, doncs no es produeix en la matriu amb GST sola (carril 1). És destacable el fet que la unió d'HMGR1S i HMGR1L a GST-PR2A1 en presència de calci és molt potenciada si l'extracte proteic de partida es realitza amb EGTA (comparar carrils 2 i 3 amb els carrils 4 i 5). Aquest comportament podria ser explicat per un efecte de disgregació de possibles complexes on està present l'HMGR quan s'utilitza EGTA en el tampó d'extracció, de manera que l'enzim quedaria més accessible a la PR2A1 de la matriu.



**Figura 40.** Purificació de les isoformes HMGR1S i HMGR1L d'extractes de cèl·lules de la línia T87 mitjançant una columna d'afinitat amb GST-PR2A1. **(A)** Immunodetecció de l'HMGR en les fraccions retingudes en les columnes d'afinitat. *Carril 1*: fraccions retingudes en la matriu amb GST sola; *Carrils 2-5*: fraccions retingudes en la matriu d'afinitat amb GST-PR2A1; *Carril 6*: control on només s'ha carregat la matriu de GST-PR2A1; *Carrils 7 i 8*: extractes proteics totals (amb calci o EGTA) utilitzats pels assaigs d'unió; *Carril 9 i 10*: corresponen a exposicions menors dels carrils 7 i 8, respectivament; *Matriu*: matriu utilitzada per la purificació d'afinitat; *Extracció*: condicions en les que s'han preparat els extractes proteics totals (carregats als carrils 7 i 8); *Unió*: Condicions en les que s'han realitzat la unió de l'HMGR a les matrius d'afinitat. **(B)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en les matrius d'afinitat.

En conjunt, s'ha confirmat que les isoformes HMGR1L i HMGR1S, però no pas l'HMGR2, interaccionen amb la PR2A1. Per tant, es tracta d'una interacció que es dona de manera depenent d'isoforma. D'altra banda, es suggereix que el calci podria modular aquesta interacció, efecte probablement mediat per la unió del catió amb la proteïna PR2A1.

### 3.4.5 La interacció de PR2A1 amb l'HMGR1 s'acota a una seqüència peptídica d'onze aminoàcids que inclou els residus d'arginina del motiu conservat i una regió adjacent rica en prolina

Per tal d'acotar de manera més precisa la regió d'interacció de l'HMGR1 amb la PR2A1, es van realitzar deleccions successives partint de les regions NT1S i NT1L (figura 28), i es va analitzar la seva capacitat d'interacció amb la PR2A1 mitjançant la tècnica del doble híbrid. L'anàlisi de deleccions a partir de la regió NT1S (figura 41A), mostra que els sis primers aminoàcids són necessaris per la unió (compareu NT1S amb (7-50)NT1S). Resulta interessant destacar que aquests sis aminoàcids inclouen el motiu N-terminal conservat ric en arginines present en les HMGRs de plantes (vegeu apartat 1.3.3). D'altra banda, l'anàlisi de deleccions a partir de la regió NT1L (figura 41B) mostra que el motiu N-terminal conservat no és suficient per la interacció (vegeu que ni (1-56)NT1L ni (1-60)NT1L interaccionen). Per contra, la interacció es recupera en la construcció (1-64)NT1L, fet que suggereix que el lloc d'unió es situa entre els aminoàcids 50-64 de la regió NT1L (o aminoàcids 1-14 de la regió NT1S). Aquest pèptid inclou el motiu N-terminal conservat ric en arginines (MDLRRR) i una seqüència adjacent rica en prolina (PPKPPVTN).

#### A

|  |             |  |
|--|-------------|--|
| <u>MDLRRRPPKPPVTN</u> NNNSNGSF <u>FRSYQ</u> PRTSDDDHRRRATTIAPPPKASDA . . . . . | <b>NT1S</b> |  |
| MDLRRRPPKPPVTN   | NNNSNGSF    | FRSYQPRTSDDDHRRRATTIAPPPKASDA NT1S ++        |
| 7-PPKPPVTN   | NNNSNGSF    | FRSYQPRTSDDDHRRRATTIAPPPKASDA (7-50)NT1S -   |
|  | 20-G        | SFRSYQPRTSDDDHRRRATTIAPPPKASDA (20-50)NT1S - |

#### B

|  |             |                                      |
|--|-------------|--------------------------------------|
| MKKK/.. / <u>MDLRRRPPKPPVTN</u> NNNSNGSF <u>FRSYQ</u> PRTSDDDHRRRATTIAPPPKASDA . . . | <b>NT1L</b> |                                      |
| MKKK/.. /MDLRRRPPKPPVTN  | NNNSNGSF    | FRSYQPRTSDDDHRRRATT-90 (1-90)NT1L ++ |
| MKKK/.. /MDLRRRPPKPPVTN  | NNNSNGSF    | FRSYQPRT-79 (1-79)NT1L ++            |
| MKKK/.. / <u>MDLRRRPPKPPVTN</u> -64  |             | (1-64)NT1L ++                        |
| MKKK/.. / <u>MDLRRRPPKP</u> -60  |             | (1-60)NT1L -                         |
| MKKK/.. / <u>MDLRRR</u> -56  |             | (1-56)NT1L -                         |
| MKKK/.. /-50   |             | 1Lextra -                            |

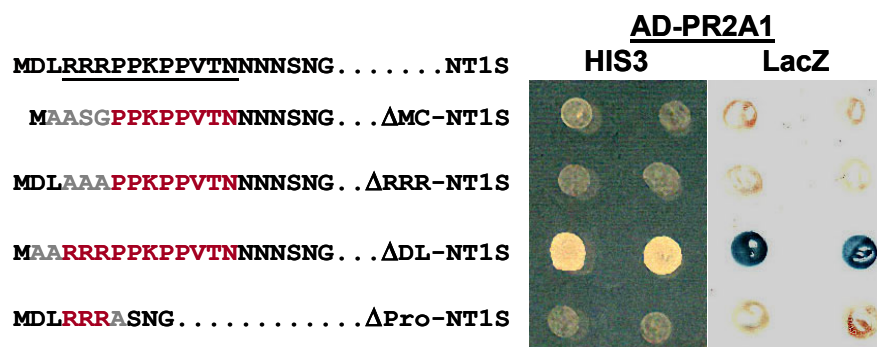
#### C

|          |                               |    |
|----------|-------------------------------|----|
| NT1S     | <u>MDLRRRPPKPPVTN</u> . . .   | ++ |
| NT2      | MEDLRRRFPTKKNGE . . .         | -  |
| MC2-NT1S | MEDLRRR <u>PPKPPVTN</u> . . . | ++ |
| MC1S-NT2 | <u>MDLRRR</u> FPTKKNGE . . .  | -  |

**Figura 41.** Anàlisi del lloc d'unió de l'HMGR1 a PR2A1 mitjançant doble híbrid. Deleccions successives de les regions NT1S i NT1L de l'HMGR1 fusionades a BD es van combinar amb la fusió AD-PR2A1 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*). (++) interacció forta; (-) no interacció; (A) Deleccions successives de la regió NT1S. (B) Deleccions successives de la regió NT1L. (C) Intercanvi dels motius N-terminal conservats (MC1S i MC2) entre les regions NT1S i NT2 de l'HMGR1S i l'HMGR2, respectivament.

Tot sembla indicar que el motiu N-terminal conservat (MDLRRR) seria necessari però no suficient per la interacció amb PR2A1. Això és consistent amb l'absència d'interacció de PR2A1 amb l'HMGR2, isoforma que conté un motiu N-terminal conservat molt proper al consens — MEDLRRR— (figures 37 i 38). Aquestes dades suggereixen que, de fet, l'especificitat de la interacció amb PR2A1 vindria determinada pel motiu adjacent ric en prolina present en les isoformes HMGR1S i HMGR1L. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, es van construir quimeres on els motius N-terminal conservats (MC) es van intercanviar entre les regions NT1S i NT2 de

les isoformes HMGR1S i HMGR2, respectivament (figura 41C, quimeres MC2-NT1S i MC1S-NT2). Mitjançant doble híbrid, es va comprovar que, al contrari que MC1S-NT2, la quimera MC2-NT1S va conservar la capacitat d'interacció amb PR2A1. Aquests resultats són de nou consistents amb el fet que el motiu N-terminal conservat és necessari però no suficient per la interacció, i que l'especificitat de la mateixa ve determinada per la regió adjacent rica en prolina.



**Figura 42.** El lloc d'unió a PR2A1 es restringeix a 10 aminoàcids de la regió NT1S (subratllats i en granate). Es van realitzar diferents substitucions (en gris) dins els 14 aminoàcids de la regió NT1S implicats en la interacció amb PR2A1. Es van fusionar al domini BD de GAL 4 i es van combinar amb AD-PR2A1 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*).

Per tal de definir de manera més precisa el lloc d'unió a PR2A1, es va completar l'anàlisi realitzant substitucions aminoàcídiques dins el pèptid de 14 aminoàcids identificat anteriorment (MDLRRRPPKPPVTN). En el context de la regió NT1S, aquest pèptid es va desglossar en 4 grups de substitucions, i es van analitzar per la seva capacitat d'interaccionar amb PR2A1 mitjançant la tècnica del doble híbrid (figura 42). De nou, tant la substitució del motiu N-terminal conservat (ΔMC-NT1S), com la substitució dels tres residus d'arginina (ΔRRR-NT1S), com la substitució de la regió adjacent rica en prolina (ΔPro-NT1S), resulten en una pèrdua de la interacció. En canvi, la interacció es manté quan es substitueixen els residus DL (ΔDL-NT1S). Aquestes resultats indiquen que els residus DL no intervien en la interacció, i, per tant, el lloc d'unió es restringeix a un pèptid d'onze aminoàcids que conté els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat i la regió adjacent rica en prolina (RRRPPKPPVTN).

D'altra banda, també es va intentar dissecionar la proteïna PR2A1 per tal d'acotar la regió responsable de la unió a la regió NT1S. Mitjançant assaigs de doble híbrid, es va analitzar la capacitat d'interacció de la regió NT1S amb diferents regions de PR2A1 (taula 10). De la mateixa manera que per la interacció amb PR65 (figura 36), no es va detectar que cap de les regions de PR2A1 testades interaccionés amb la regió NT1S. Aquestes dades reforcen la idea que la PR2A1 és una proteïna que no es pot dividir en dominis d'interacció, com a mínim pels assaigs de doble híbrid.

**Taula 10.** Anàlisi per doble híbrid de la interacció de la regió NT1S amb diferents regions de PR2A1 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*).

| fusió a BD | fusió a AD       | <i>HIS3</i> | <i>lacZ</i> |
|------------|------------------|-------------|-------------|
| NT1S       | PR2A-1 (1-538)   | ++          | ++          |
| NT1S       | PR2A-1 (1-361)   | -           | -           |
| NT1S       | PR2A-1 (150-538) | -           | -           |
| NT1S       | PR2A-1 (210-538) | -           | -           |

### 3.4.6 Paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP

Tot sembla indicar que els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat de l'HMGR1S són indispensables per la interacció amb la PR2A1. Per tant, la possible funció de la PR2A en algun aspecte de regulació de l'HMGR probablement vindrà determinada per aquest motiu conservat. D'altra banda, el motiu N-terminal conservat en les HMGRs vegetals presenta homologia amb senyals de retenció en reticle endoplasmàtic (RE) de proteïnes de membrana de tipus II en cèl·lules animals (apartat 1.3.3). Així doncs, es va considerar interessant testar el paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat sobre la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP. L'estratègia va ser substituir les 3 arginines per 3 alanines en la quimera 1S:GFP, i així generar la versió  $\Delta$ R1S:GFP. Segons els resultats presentats a la figura 42, aquest mutant no hauria d'interaccionar amb la PR2A1.

La localització de les quimeres es va analitzar per microscopia làser confocal en fulles d'*Arabidopsis* després de ser microbombardejades amb les construccions corresponents (figura 43). De manera interessant, es va observar que el mutant  $\Delta$ R1S:GFP presentava un patró exclusiu de reticle endoplasmàtic (figures 43C i 43D) que contrastava amb la localització dual (estructures vesiculars/RE) típica de la quimera 1S:GFP (figures 43A i 43B). Aquest resultat suggereix que els residus d'arginina tindrien, de fet, un paper en el transport de la isoforma HMGR1S a les estructures vesiculars o bé, en la formació de les mateixes.

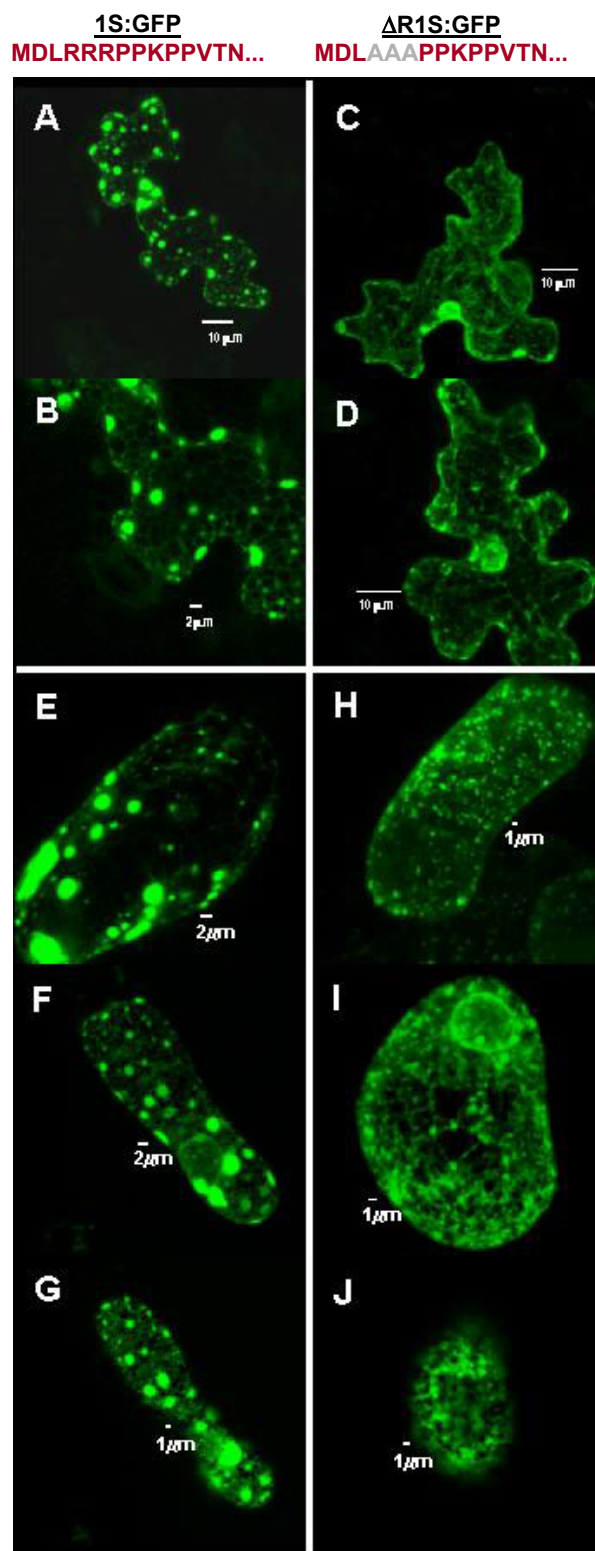
Aquest anàlisi també es va realitzar en les cèl·lules de la línia T87, les quals van ser transformades mitjançant *Agrobacterium* portadors de les construccions corresponents. En aquest cas, el mutant  $\Delta$ R1S:GFP va generar de nou un patró reticulat intens, tot i que també apareixien unes estructures vesiculars de tamany inferior a 0.5  $\mu$ m (figures 43H, 43I i 43J). El patró era aparentment diferent a l'obtingut per la quimera 1S:GFP (figures 43E, 43F i 43G), doncs aquesta s'acumula en estructures vesiculars que són clarament més grans (0.5-2 $\mu$ m) i menys abundants. Això fa que les cèl·lules 1S:GFP ofereixin un aspecte molt més vesiculat. Caldria esbrinar, en un futur, si la diferència entre el patró de la quimera 1S:GFP i del mutant  $\Delta$ R1S:GFP és quantitativa (número i tamany de les vesícules) o bé qualitativa (si corresponen a vesícules de naturalesa i origen diferents).

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que, a diferència de les proteïnes de membrana de tipus II de cèl·lules animals (Schutze *et al.*, 1994), el paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat no seria el de retenir l'HMGR1S en el RE. Els resultats



apunten a que aquest motiu tindria un paper en el tràfic de l'HMGR1S a les estructures vesiculars o bé, en la formació de les mateixes. Donat que PR2A1 interacciona amb els residus d'arginina del motiu, seria factible que la PP2A fos d'alguna manera reguladora d'aquests processos. Els resultats, per tant, serveixen de punt de partida per aprofundir en una matèria tant novedosa com el paper de la fosforilació en el tràfic de proteïnes de membrana.

**Figura 43.** Efecte de la substitució dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat per alanines sobre la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de fulla d'*Arabidopsis* (**A-D**) i en cèl·lules de la línia T87 (**E-J**). Els patrons de localització subcel·lular es van determinar per microscopia làser confocal. Les barres mostren l'escala de les imatges. (**A,B,E,F,G**) 1S:GFP; (**C,D,H,I,J**)  $\Delta$ R1S:GFP. **G** i **J** són detalls de **F** i **I** respectivament.



## **3.5 CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE L'HMGR AMB LA KLC1, UNA PROTEÏNA AMB SIMILITUD A LA CADENA LLEUGERA DE QUINESINA DE TIPUS I O CONVENCIONAL**

### **3.5.1 KLC1 forma part d'una família multigènica en Arabidopsis**

A partir de la seqüència obtinguda del clon KLC1 es van fer, primerament, cerques d'homologia en el genoma d'Arabidopsis (base de dades TAIR). Aquesta anàlisi va revelar que KLC1 es tractava d'una seqüència parcial, ja que la proteïna predita a partir de la seqüència genòmica (At3g27960) s'estenia 35 aminoàcids en la regió N-terminal i completava una seqüència polipeptídica de 663 aminoàcids. Per tant, KLC1 presentava una pauta de lectura oberta (ORF) truncada que codificava per un polipèptid que contenia els aminoàcids de 36 a 663. Utilitzant cebadors antisentit en la regió 5' de KLC1 en combinació amb cebadors del vector pACT (on està clonada la llibreria ACT) i mitjançant PCR, es van identificar cDNAs més llargs per 5' (vegeu apartat 2.3.6). A partir d'aquí es va amplificar per PCR un cDNA complet, que presentava una ORF de 1989 pb que codificava per un polipèptid de 663 aminoàcids, amb una massa molecular estimada de 72.5 KDa (figura 44). Una anàlisi de cerca motius en la seqüència polipeptídica de KLC1 amb el programa *PROSITE* va identificar una extensió central alfa-helicoidal (aminoàcids 200-612) amb 10 repeticions de tetratricopèptid (repeticions TPR). Aquestes repeticions formen un domini típic d'interacció proteïna-proteïna (Gindhart i Goldstein, 1996). De l'anàlisi comparativa del cDNA amb la corresponent seqüència genòmica es va deduir l'estructura del gen. El gen *KLC1* s'estructura en 3 exons separats per 2 introns, on els codons d'inici i parada de traducció es situen als exons 2 i 3, respectivament.

Un cop es va disposar de la seqüència completa de KLC1, es va procedir a cercar seqüències peptídiques homòlogues en el genoma d'Arabidopsis. Mitjançant l'algoritme BLASTP (base de dades TAIR) es va comprovar que KLC1 forma part d'una família multigènica de tres membres en Arabidopsis (figura 45). Es pot observar que la similitud entre les seqüències s'estén per tota la regió central que inclou les repeticions TPR, essent les regions N i C-terminals les més divergents.

```

1   TTC TCA TAA CAT TAG CTA TGA GAT TAT GAA AGT GAA GAT ATA AAA CAA ACA CCT AAA AGT GAA AAG TAC
70  AAG ACA CCA AAT CCT TCA TTT TCA TCT CTT ACA CAA CCA CAC TAA GTT ACC AAA AAA CAG AAT CTG TTC
139 TTT TTT TGC CTT CTT GCA GAT TTC TTC AGA GTC AAA GAC ACA TAA AGA TTT ATA ATT GAG TTG TGA GTT
      M D V G E S N E R V K D D S A L Q A S P
208 TTG GAG GCC ATG GAC GTA GGA GAG AGC AAT GAG AGG GTA AAA GAC GAT TCT GCC CTT CAA GCT TCA CCG
      R S P L S S I D L A I D G A M N A S I E Q L Y
277 AGG AGT CCT CTG AGT TCT ATA GAT CTT GCA ATT GAT GGA GCT ATG AAT GCT TCT ATT GAG CAG TTG TAT
      H N V C E M E S S D D Q S P S R A S F I S Y G
346 CAT AAC GTT TGT GAA ATG GAG AGT TCT GAT GAT CAG TCT CCG TCC AGG GCG AGT TTT ATT TCG TAT GGA
      A E S R I D L E L R H L V G D V G E E G E S K
415 GCT GAA TCT AGG ATT GAT TTG GAG TTG AGG CAT TTG GTT GGA GAT GTA GGA GAA GAA GGA GAG AGC AAG
      K E I I L E K K E E S N G E G S L S Q K K P L
484 AAA GAG ATT ATC TTG GAG AAG AAG GAA GAA AGT AAT GGA GAA GGT AGC TTG AGT CAG AAG AAA CCT CTT
      S N G K K V A K T S P N N P K M P G S R I S S
553 TCG AAT GGT AAG AAG GTT GCG AAA ACG AGT CCT AAT AAT CCG AAG ATG CCG GGT TCG AGG ATC TCT TCG
      R K S P D L G K V S V D E E S P V E L L
622 AGG AAA TCA CCG GAT TTG GGG AAG GTT TCT GTT GAT GAG GAG AGT CCT GAG CTT GGT GTG GTG TTG TTG
      K Q A R E L V S S G E N L N K A L D L A L R A
691 AAG CAA GCC AGA GAG TTG GTT TCT TCA GGT GAG AAT TTA AAC AAG GCT CTT GAT TTA GCG TTG AGA GCG
      V K V F E K C G E G E K Q L G L N L V M S L H
760 GTG AAA GTG TTT GAG AAA TGT GGG GAA GGA GAG AAA CAA CTT GGG TTG AAT TTG GTG ATG TCT TTG CAT
      I L A A I Y A G L G R Y N D A V P V L E R S I
829 ATC TTG GCA GCG ATA TAT GCA GGG TTA GGG AGA TAC AAT GAC GCT GTG CCT GTT CTT GAA CGT TCT ATC
      E I P M I E D G E D H A L A K F A G C M Q L G
898 GAG ATA CCG ATG ATT GAA GAT GGT GAG GAT CAC GCG TTG GCG AAA TTT GCA GGG TGT ATG CAG CTT GGT
      D M Y G L M G Q V E N S I M L Y T A G L E I Q
967 GAC ATG TAT GGT TTG ATG GGT CAA GTT GAA AAT TCG ATT ATG CTA TAC ACC GCG GGT TTG GAG ATT CAA
      R Q V L G E S D A R V G E T C R Y L A E A H V
1036 AGA CAA GTT CTT GGA GAA TCG GAT GCA CGA GTT GGC GAA ACT TGT AGG TAC TTA GCG GAA GCT CAT GTT
      Q A M Q F E E A S R L C Q M A L D I H K E N G
1105 CAA GCA ATG CAG TTT GAA GAA GCC TCA AGG CTT TGT CAA ATG GCA TTG GAC ATT CAC AAA GAA AAC GGT
      A A A T A S I E E A A D R K L M G L I C D A K
1174 GCT GCC GCT ACA GCT TCT ATT GAA GAA GCT GCG GAT AGA AAA CTG ATG GGA CTT ATC TGC GAT GCG AAA
      G D Y E V A L E H Y V L A S M A M S S Q N H R
1243 GGT GAT TAT GAA GTT GCG CTT GAG CAT TAT GTT TTA GCG AGC ATG GCA ATG TCA TCT CAG AAC CAT AGA
      E D V A A V D C S I I G D A Y M S L A R F D E A
1312 GAA GAT GTT GCT GCT GTA GAT TGC AGT ATT GGT GAT GCT TAC ATG TCG CTA GCT AGG TTT GAT GAA GCG
      I F A Y Q K A L A V F K Q G K G E T H S S V A
1381 ATA TTC GCA TAC CAG AAG GCT TTA GCT GTG TTT AAG CAA GGA AAA GGT GAG ACT CAT TCC TCT GTT GCT
      L V Y V R L A D L Y N N K I G K T R D S K S Y C
1450 TTG GTT TAC GTT AGG CTT GCT GAC TTG TAC AAC AAG ATT GGG AAA ACA CGC GAT FCC AAA TCG TAC TGC
      E N A L K I Y L K P T P G T P M E E V A T G F
1519 GAA AAC GCT CTC GCT ATT TAC CTA AAA CCG ACT CCA GGA ACT CCT ATG GAA GAG GTT GCG ACT GGT TTT
      I E G I S A I Y Q S M N E L D Q A L K L L R R A
1588 ATA GAG ATT TCT GCG ATA TAT CAG TCA ATG AAT GAA CTT GAT CAA GCT CTT AAG TTG AGA CCG GCG
      L K I Y A N A P G Q Q N T I A G I E A Q M G V
1657 TTG AAG ATA TAT GCA AAC GCT CCA GGT CAA CAG AAC ACG ATT GCA GGT ATT GAA GCT CAA ATG GGT GTG
      V T Y M M G N Y S E S Y D I F K S A I S K F R
1726 GTT ACT TAT ATG ATG GGA AAT TAC TCC GAT TCC TAC GAC ATA TTC AAG AGC GCG ATA TCA AAG TTC CGC
      N S G G E K K T A L F G I A L N Q M G L A C V Q
1795 AAT AGC GGA GAG AAA AAA ACC GCT CTT TTC GGG ATT GCT TTG AAT CAG ATG GGA CTA GCT TGC GTT CAG
      R Y A I N E A A D L F E E A K T I L E K E C G
1864 CGT TAC GCG ATC AAT GAA GCT GCA GAT TTG TTT GAA GAA GCG AAA ACT ATT CTT GAG AAA GAG TGT GGA
      P Y H P D T L A V Y S N L A G T Y D A M G R L
1933 CCG TAC CAT CCC GAT ACA TTA GCG GTT TAC AGT AAC CTT GCT GGA ACG TAC GAC GCA ATG GGA AGG TTA
      D D A I E I L E Y V G T R E E K L G T A N P
2002 GAT GAT GCT ATA GAG ATA TTG GAG TAT GTT GTT GGG ACA AGA GAA GAG AAG CTC GGG ACG GCA AAT CCC
      E V E D E K Q R L A A L L K E A G R G R S K R
2071 GAG GTT GAG GAC GAG AAG CAG AGG CTT GCT GCG TTG TTG AAA GAA GCT GGA AGA GGA AGG AGT AAA AGA
      N R A L T L D N N P E I A N G Q R P V Y *
2140 AAC AGA GCA CTT CTT ACC CTT TTG GAC AAC AAC CCT GAA ATT GCA AAT GGA CAG AGA CCG GTT TAT TGA
2209 TTA ACC GGA TTA TTG TCC GGT CTA AAA TGT ATA TAT ATA CAA AAT ACA AGT TCG AAT ACG GTA CTT ACA
2278 CCG TCG AGG GAG AAG GAA AAA AAT GAA GAG GCT TTA TGT TTT CTA GTT TTA TAA AAA GTG AAG GAA A

```

**Figura 44.** Seqüència nucleotídica i peptídica de KLC1. Les 10 repeticions de tetratricopèptid (TPR) predites per *PROSITE* s'han sombrejat en gris (regions 200-233, 243-276, 285-318, 329-363, 369-402, 411-444, 454-487, 495-528, 537-570, 579-612). També s'ha subratllat el domini que podria formar una estructura de tipus *Heptad Repeat* (aminoàcids 154-188).

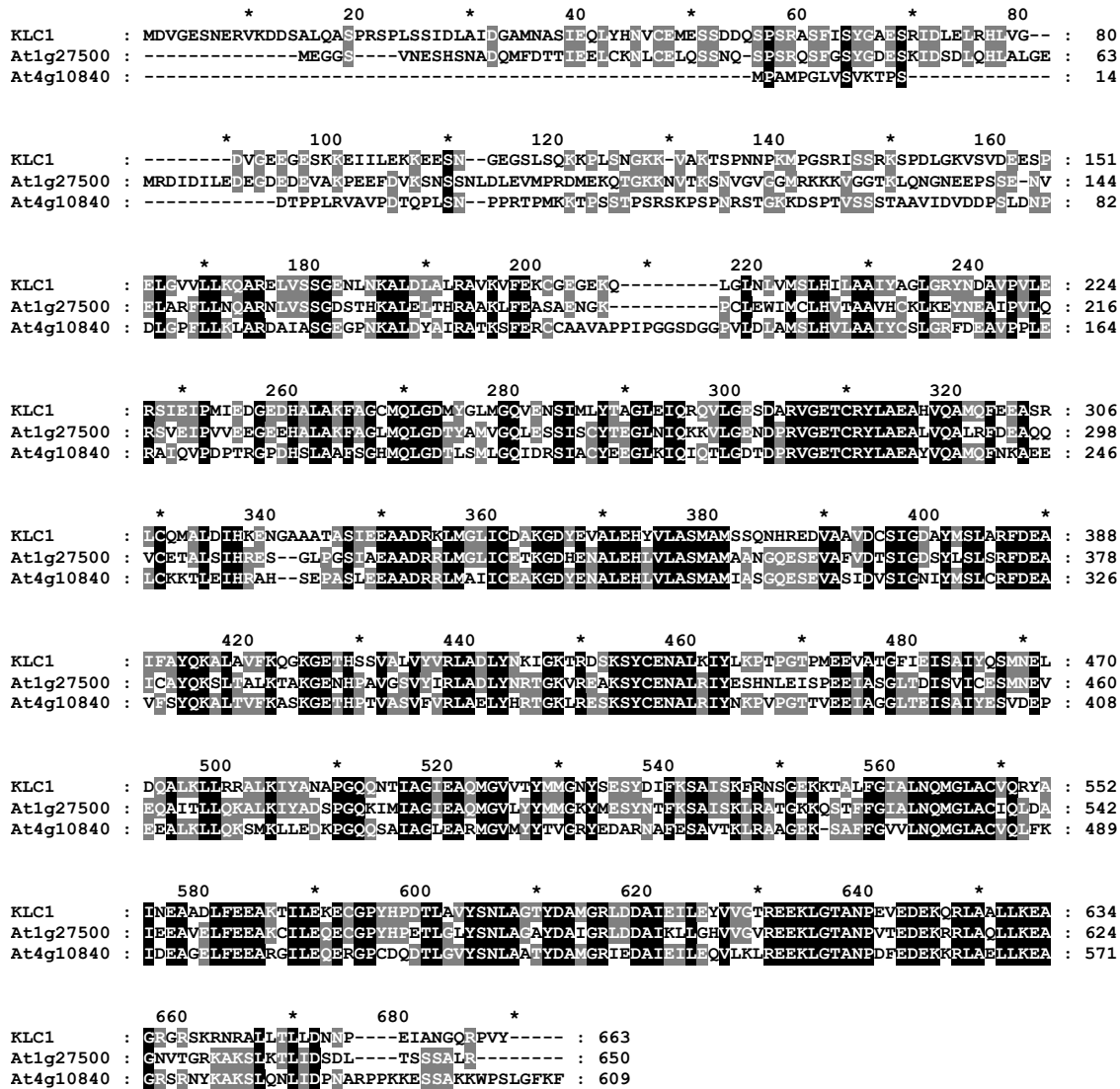


Figura 45. Alineament múltiple de les proteïnes d'Arabidopsis homòlogues a KLC1.

### 3.5.2 KLC1 té similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I

La cerca de seqüències homòlogues es va estendre a la resta d'organismes, i, mitjançant l'algoritme BLASTP (base de dades NCBI), es va identificar que KLC1 mostrava certa similitud amb les cadenes lleugeres de quinesina (KLCs). Les KLCs formen part del complex de quinesina de tipus I o convencional, una família de proteïnes motores que transporten orgànells i vesícules mitjançant els microtúbuls (vegeu apartat 1.6.1 i 1.6.2). El complex de quinesina de tipus I està format per un heterotetràmer amb dues cadenes pesades o KHCs (que contenen els dominis motor i d'unió a microtúbuls) i dues cadenes lleugeres o KLCs (que s'uneixen a les dianes cel·lulars a través de les repeticions TPR). En el genoma d'Arabidopsis s'han identificat gens amb certa similitud amb les KHCs i amb les KLCs (vegeu apartat 1.6.3), però fins el moment no han estat caracteritzats a nivell experimental.

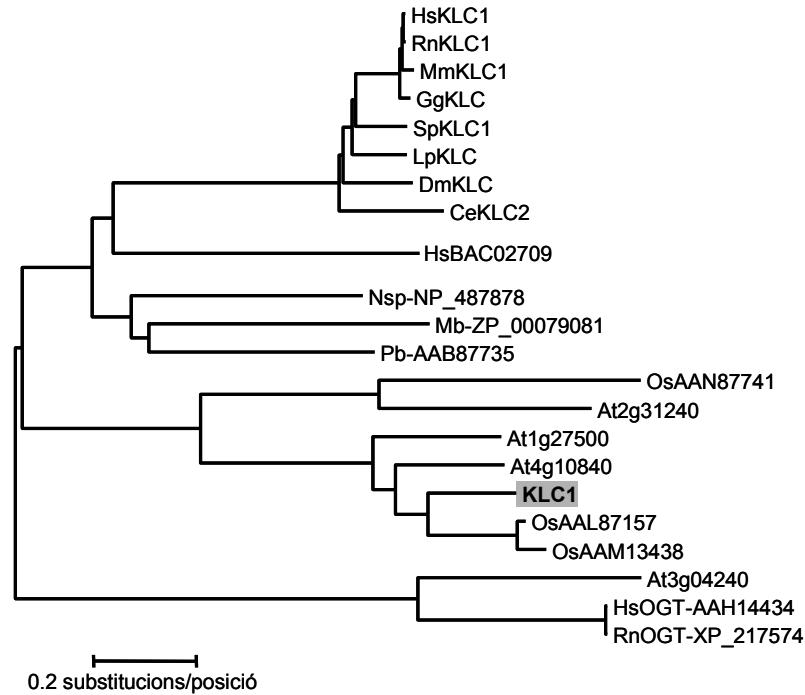
KLC1 presenta una baixa similitud amb les KLCs de mamífers (24.7% de similitud i 14.1% d'identitat respecte la KLC1 humana-AAA16576), i aquesta es concentra bàsicament en la regió de les repeticions TPR. Efectivament, les repeticions TPR de KLC1 estan estructuralment relacionades amb les de les KLCs, doncs són repeticions imperfectes de 34 aminoàcids que s'enllacen amb un pèptid espaciador, que sol ser de 8 aminoàcids (figura 44). Tot i així, mentre que les KLCs de mamífers contenen 6 repeticions TPR, en la KLC1 se'n prediuen 10. D'altra banda, a la regió N-terminal de KLC1 (aminoàcids 154-188) s'identifica una regió que podria contenir repeticions de tipus *Heptad* (figures 45 i 46). Aquest tipus de repeticions solen formar dominis de tipus *coiled-coil*, i s'han identificat en les KLCs com a lloc d'unió a les KHCs.

**Figura 46.** Possibles repeticions de tipus *Heptad* presents en la regió aminoacídica 154-188 de KLC1. Aquestes repeticions de 7 aminoàcids (a-g) formen estructures d'alfa-hèlix amfipàtiques. La presència de 4-5 repeticions *Heptad* generalment s'estructura per formar un domini de tipus *coiled-coil*. Per les proteïnes fibroses, s'han extrapolat les característiques que han de tenir les posicions a-g de la repeticions *Heptad* (Cohen i Parry, 1986). Posicions **a** i **d**: aminoàcid hidrofòbic, normalment L, I, V, M, F, Y. Posició **a**: rarament E o D. Posició **d**: mai K o R. Posicions **e** i **g**: freqüentment Q. El 50% de les posicions en **b**, **c**, **e**, **f**, **g** solen ser aminoàcids carregats. En negreta s'ha marcat les posicions que compleixen aquest consens. Les posicions que no serien incompatibles amb la formació d'una repetició *Heptad* s'han marcat amb un asterisc (Lupas *et al.*, 1991).

| a        | b | c | d        | e          | f | g |
|----------|---|---|----------|------------|---|---|
| G        | V | V | <b>L</b> | L          | K | Q |
| A        | R | E | <b>L</b> | V          | S | S |
| G        | E | N | <b>L</b> | N          | K | A |
| <b>L</b> | D | L | A        | <b>*</b> L | R | A |
| <b>V</b> | K | V | <b>F</b> | E          | K | C |

Així doncs, tot i que la KLC1 podria tenir els elements estructurals típics de les KLCs, la baixa similitud entre elles fa que no es pugui assegurar que siguin autèntics homòlegs funcionals. Això queda reflectit en un estudi filogenètic amb seqüències homòlogues a aquestes proteïnes (figura 47). Es pot observar que tant la KLC1 com les KLCs agrupen en una mateixa branca que és diferent a la branca de les O-glicosil transferases o OGTs (proteïnes que també contenen repeticions TPR). Aquest fet suggereix que la KLC1 i les KLCs són proteïnes relacionades. Ara bé, la gran distància entre les branques corresponents de nou fa que no es pugui postular que siguin autèntics homòlegs funcionals.

Aquest conjunt de dades i el fet que, fins el moment, no s'hagin identificat cadenes pesades de quinesina (KHCs) de tipus convencional en plantes, fa que no es pugui concloure que la KLC1 sigui un homòleg vegetal de les cadenes lleugeres de quinesina. En cas afirmatiu, serà imprescindible identificar la parella motora corresponent.

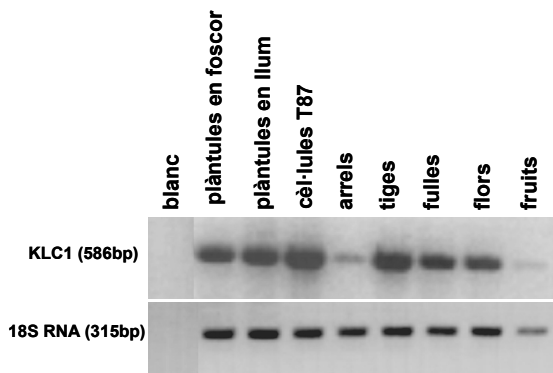


**Figura 47.** Anàlisi filogenètic de les seqüències homòlogues a KLC1 (sombrejada en gris) i a les cadenes lleugeres de quinesina. L'arbre filogenètic es va fer amb el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versió 2b2 (MEGA 2b2), utilitzant l'algoritme *Neighbor-Joining*. La longitud dels braços reflecteix el nombre de substitucions aminoacídiques per posició entre les seqüències, excloent aquelles posicions en les que almenys una de les seqüències presenta una deleció. L'algoritme assumeix que la freqüència d'aparició dels aminoàcids és la mateixa per tots ells. Seqüències emprades:

- Cadenes lleugeres de quinesina: *Caenorhabditis elegans* KLC2 (CAA82753); *Drosophila melanogaster* KLC (AAA02481); *Gallus gallus* KLC (AAA90972); *Homo sapiens* KLC1 (AAA16576); *Loligo pealei* KLC (AAA16578); *Strongylocentrotus purpuratus* KLC1 (AAA03057); *Mus musculus* KLC1 (O88447); *Rattus norvegicus* KLC1 (P37285).
- Seqüències homòlogues a les KLCs: *Arabidopsis thaliana* (KLC1, AT1G27500, AT4G10840, AT2G31240); *Oryza sativa* (AAL87157, AAM13438, AAN87741); *Methanosarcina barkeri* (ZP\_00079081); *Nostoc sp. PCC 7120* (NP\_487878); *Plectonema boryanum* (AAB87735); *Homo sapiens* (BAC02709).
- O-glicosil transferases (OGTs): *Homo sapiens* OGT (AAH14434); *Rattus norvegicus* OGT (XP\_217574); *Arabidopsis thaliana* (AT3G04240).

### 3.5.3 Detecció del transcrit KLC1 en teixits d'Arabidopsis

L'expressió de KLC1 en diferents teixits d'Arabidopsis es va analitzar mitjançant RT-PCR. Es va amplificar un fragment de 586 pb que contenia part de la regió 5' transcrita no traduïda de KLC1, i un fragment de 315 pb de la subunitat 18S del RNA ribosomal com a control. Es va comprovar que el transcrit KLC1 està present en la majoria de teixits analitzats, inclòs en aquells on també hi ha la isoforma HMGR1L, com flors, plàntules crescudes en fosc i cèl·lules de la línia T87 (figura 48).

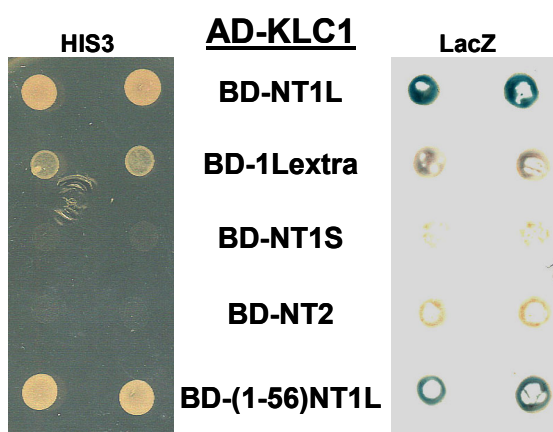


**Figura 48.** Detecció del transcrit de KLC1 en teixits d'Arabidopsis mitjançant RT-PCR.

L'extracció de l'RNA dels diferents teixits es va realitzar amb el kit *RNAeasy plant mini kit* (Qiagen) a excepció dels fruits (Carretero-Paulet, 2003). La reacció de RT-PCR es va realitzar seguint el protocol descrit a (Oh *et al.*, 2000) però utilitzant els oligonucleòtids 12totF.2 i 12.4R, que amplifiquen específicament un producte de 586 pb de la regió 5' de KLC1. Per tal de normalitzar les quantitats de RNA de cadascuna de les mostres, es va amplificar l'RNA ribosomal 18S amb oligonucleòtids comercials (Ambion).

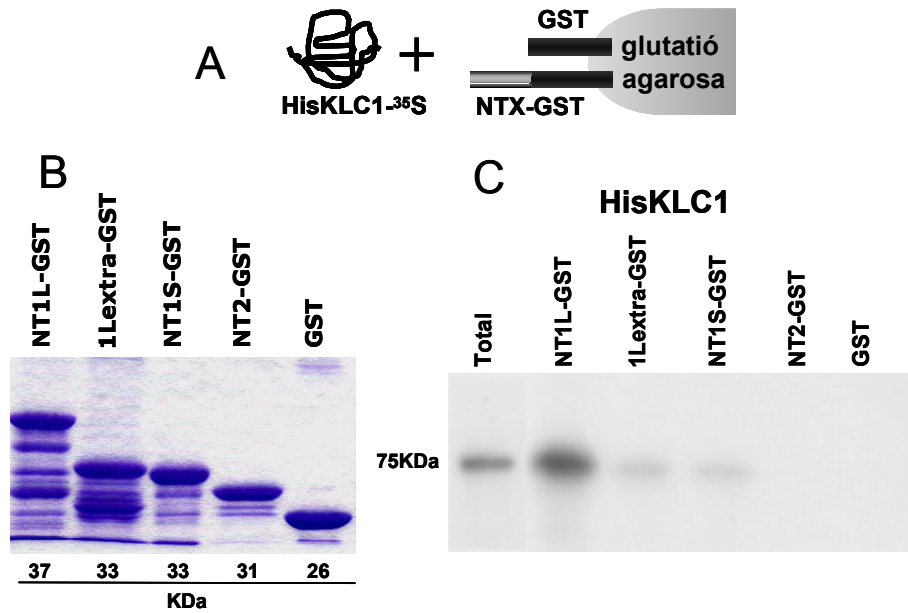
### 3.5.4 La regió 1Lextra de l'HMGR1L està implicada en la interacció amb KLC1

Fins ara, s'ha determinat que KLC1 interacciona amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (regió NT1L). De la mateixa manera que per PR2A1 i PR2A2, semblava interessant esbrinar si la unió a KLC1 era específica d'isoforma d'HMGR. Per tal determinar-ho, mitjançant la tècnica del doble híbrid es va testar la capacitat d'interacció de KLC1 amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 (NT1L, NT1S i NT2, respectivament) i amb la regió 1Lextra exclusiva de l'HMGR1L (figura 28). A diferència de PR2A1 i PR2A2, es va determinar que la interacció de KLC1 només es produïa amb la regió NT1L, però no amb les regions NT1S ni NT2 (figura 49). Aquestes dades indiquen que, en la regió NT1L, la interacció es produeix a través de la regió 1Lextra. Tot i així, quan es va analitzar la regió 1Lextra de manera aïllada es va observar un dramàtic descens en la capacitat d'interacció respecte la regió NT1L, la qual cosa suggereix que, a part de la regió 1Lextra, algun altre element de la regió NT1L influeix en la seva capacitat d'unió a la KLC1.



**Figura 49.** Anàlisi per doble híbrid de la capacitat d'interacció de KLC1 amb les regions N-terminal citosòliques NT1L, 1Lextra, NT1S, NT2 i (1-56)NT1L en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat B-galactosidasa (*lacZ*).

De la mateixa manera que en el cas de PR2A1 i PR2A2, els resultats de doble híbrid es van verificar *in vitro* per assaig de *GST pull-down*. En aquest assaig i a diferència del doble híbrid, la regió N-terminal citosòlica de les diferents isoformes d'HMGR (NT1S, NT1L, NT2 i 1Lextra) es van fusionar en posició N-terminal de la GST per així mantenir el seu extrem N-terminal lliure, que es com es troben en l'HMGR (figura 50A). Les fusions a GST es van expressar en *E.coli* i es van purificar en una matriu de glutatió-agarosa (figura 50B). D'altra banda, KLC1 amb un epítip d'histidines en posició N-terminal (HisKLC1) es va marcar amb  $^{35}\text{S}$  per traducció *in vitro* a partir del vector pET28. Mitjançant l'assaig de *GST pull-down* es va comprovar que KLC1 quedava retinguda eficientment en la matriu de NT1L-GST (figura 50C). Tot i així, es va detectar una mínima unió a les matrius 1Lextra-GST i NT1S-GST.



**Figura 50.** Anàlisi de la interacció de KLC1 amb les regions NT1L, 1Lextra, NT1S i NT2 mitjançant assaig de tipus *GST pull-down*. (A) Esquema de l'assaig *GST pull-down*. (B) Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs de *GST pull-down*. (C) Fluorografies on es mostra la unió de KLC1 a la matriu amb NT1L-GST.

Aquests resultats reforcen l'observació prèvia i indiquen que la regió 1Lextra és necessària però no suficient per mediar una interacció forta amb KLC1. Amb l'objectiu de determinar de manera precisa el lloc d'unió a KLC1, es van realitzar deleccions successives a partir de la regió NT1L. Mitjançant assaigs de doble híbrid es van identificar dues regions importants per mantenir una conferir forta amb KLC1 (figura 51): una d'elles contenia els aminoàcids 7-25 de la regió NT1L (compareu les deleccions (7-100)NT1L *versus* (25-100)NT1L); l'altra contenia els aminoàcids 51-56, doncs la simple addició d'aquests aminoàcids a la regió 1Lextra recuperava la força de la interacció (compareu 1Lextra *versus* (1-56)NT1L en les figures 49 i 51). Resulta interessant destacar que aquesta regió inclou els residus d'arginina del motiu conservat, que, d'altra banda, també estan implicats en la interacció amb PR2A1 (figures 41 i 42).

En conjunt, els resultats obtinguts clarament suggereixen que KLC1 interacciona específicament amb la regió NT1L de l'HMGR1L. Aquesta interacció és mediada per la regió 1Lextra, tot i que els residus adjacents 51-56 són requerits per conferir una interacció forta.

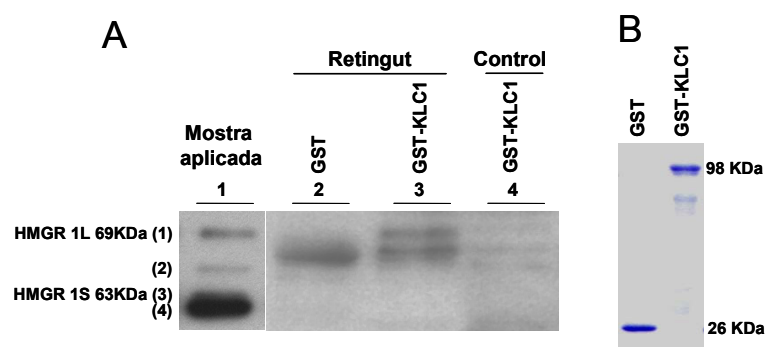
|   |              |    |
|---|--------------|----|
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA..... | HMGR1L       |    |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA      | NT1L         | ++ |
| 7-GPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA          | (7-100)NT1L  | ++ |
| 25-SHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA                             | (25-100)NT1L | +  |
| 37-SPLSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA                                       | (37-100)NT1L | +  |
| MDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRTSDDHRRRATTIAPPPKASDA   | NT1S         | -  |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPM-51   | 1Lextra      | +  |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRR-56  | (1-56)NT1L   | ++ |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPP-60   | (1-60)NT1L   | ++ |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTN-64                                      | (1-64)NT1L   | ++ |
| MKKKQAGPQQTCEFVSYKTLTLLISPSHLSRHLTSSLSPSPWRDYSFPPMDLRRRPPKPPVTNNNNSNGSFRSYQPRT-79                       | (1-79)NT1L   | ++ |

**Figura 51.** Determinació del lloc d'unió a KLC1 mitjançant doble híbrid. Deleccions successives de la regió NT1L fusionades a BD es van combinar amb la fusió AD-KLC1 en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). (++) interacció forta; (+) interacció feble; (-) no interacció.



### 3.5.5 Purificació de l'HMGR1L mitjançant una matriu d'afinitat que conté KLC1

Mitjançant assaigs de doble híbrid i de *GST pull-down* s'ha determinat que KLC1 interacciona específicament amb la regió NT1L de la isoforma HMGR1L. Per tal d'aprofundir en la caracterització d'aquesta interacció, es va realitzar una purificació de l'HMGR derivada d'un extracte d'*Arabidopsis* en una matriu que contenia la fusió GST-KLC1. Primerament, es va procedir a l'expressió de GST-KLC1 en *E.coli* i a la seva posterior purificació en una matriu de glutatió-agarosa (figura 52B). D'altra banda, es va centrifugar a 105.000xg un extracte proteic total derivat de cèl·lules de la línia T87 per tal d'obtenir una fracció P<sub>105</sub> enriquida en HMGR1L (vegeu materials i mètodes). Per la purificació per afinitat de l'HMGR, aquesta fracció es va incubar amb les matrius de GST-KLC1 i de GST no fusionada (control). Finalment, mitjançant anàlisi de SDS-PAGE i transferència de western, es va immunodetectar l'HMGR en les fraccions retingudes en les matrius d'afinitat utilitzant els anticossos anti-CD1 clarificats (vegeu Materials i Mètodes). Es va comprovar que la isoforma HMGR1L era específicament retinguda en la matriu de GST-KLC1 però no en la de GST control (figura 52A, carrils 2 i 3). Qualsevol altra banda d'HMGR present a l'extracte proteic total (carril 1) no va ser purificada en la matriu d'afinitat, fet que confirma que la interacció amb la KLC1 és específica de la isoforma HMGR1L.



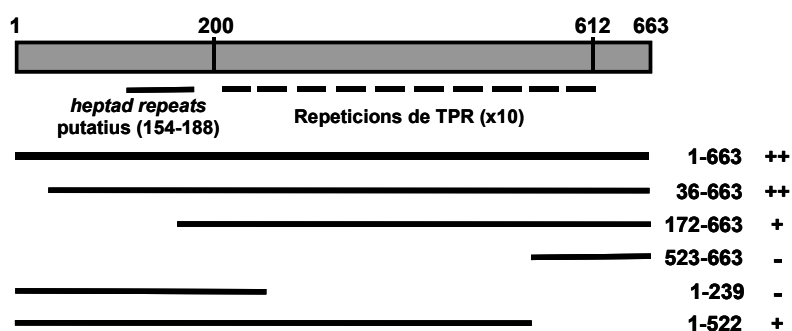
**Figura 52.** La isoforma HMGR1L de la fracció P<sub>105</sub> derivada de cèl·lules de la línia T87 és purificada en una matriu d'afinitat amb GST-KLC1. **(A)** Immunodetecció de l'HMGR utilitzant els anticossos anti-CD1 clarificats. *Carrils 2 i 3*: fraccions retingudes a les matrius de GST-KLC1 i de GST sola; *Carril 1*: mostra aplicada en les matrius; *Carril 4*: control on només s'ha carregat la matriu de GST-KLC1. **(B)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en les columnes d'afinitat.

### 3.5.6 Identificació de dos dominis funcionals en la KLC1

En les KLCs caracteritzades es poden distingir dos dominis estructurals que es corresponen en dominis funcionals de la proteïna (vegeu apartat 1.6.2). Per tal de verificar si els dominis estructurals deduïts de l'anàlisi de la seqüència primària de KLC1 (apartat 3.5.2) es corresponen en dominis funcionals de la proteïna, es van iniciar dues estratègies.

D'una banda, es van fer deleccions successives de KLC1 i es va analitzar la seva capacitat d'unir-se a la regió NT1L mitjançant la tècnica del doble híbrid. Es va comprovar que només

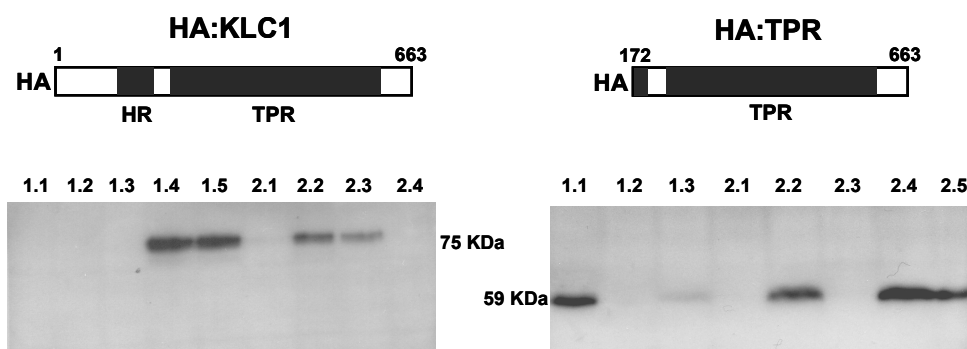
aquelles deletions que contenen les repeticions TPR (regions 36-663, 172-663 i 1-522) conservaven la capacitat d'interacció (figura 53). Tot i així, les deletions 1-522 i 172-663 van mostrar una interacció disminuïda respecte la KLC1 completa (1-663), fet que suggereix que les seqüències externes al domini TPR també afecten en la interacció. Per contra, les deletions que contenen regions N i C-terminal de KLC1 més curtes (1-239 i 523-663, respectivament) no van interaccionar amb la regió NT1L. En conjunt, aquests resultats suggereixen que el domini de repeticions TPR de KLC1 és responsable de la interacció amb l'HMGR1L. Això és consistent amb la implicació dels dominis TPR de les KLCs en el reconeixement de les dianes cel·lulars que han de ser transportades per la quinesina.



**Figura 53.** Determinació del domini d'interacció de KLC1 a la regió NT1L mitjançant doble híbrid. Deletions successives de la proteïna KLC1 fusionades al domini AD de GAL4 es van combinar amb la fusió BD-NT1L en la soca Y190. Per a cada combinació es va analitzar el creixement en medi selectiu sense histidina (*HIS3*) i l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). (++) interacció forta; (+) interacció feble; (-) no interacció.

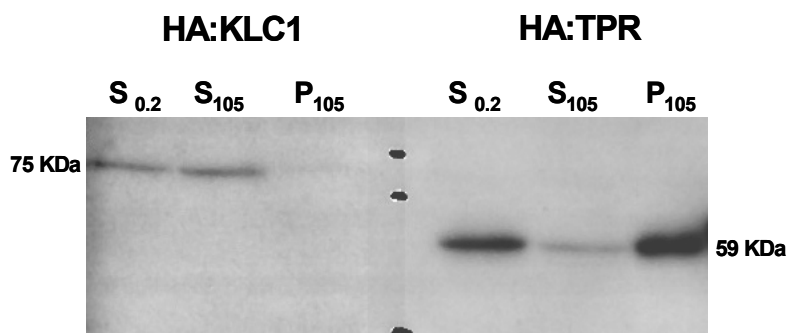
Una segona estratègia per establir dominis funcionals en la KLC1 es va basar en la generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressin diferents variants de la proteïna. Una de les variants sobreexpressada va ser la KLC1 completa marcada amb l'epítip hemaglutinina (HA) en posició N-terminal (HA:KLC1). La introducció de l'epítip permet la detecció de la quimera emprant anticossos monoclonals anti-HA. D'altra banda, es va sobreexpressar una versió truncada de KLC1 que només contenia la regió aminoacídica 172-663 amb l'epítip HA fusionat en N-terminal, i que es va anomenar HA:TPR (figura 54). Aquesta versió truncada manté el domini de repeticions TPR (i per tant s'espera que s'uneixi a l'HMGR1L), però s'han eliminat les possibles repeticions de tipus *Heptad* (que suposadament servirien de lloc d'unió a la KHC). En HA:TPR s'esperava haver eliminat alguna regió important per la funció de KLC1. Les construccions quimèriques es van clonar sota el control del promotor CaMV35S.

Un cop es van obtenir diferents línies homocigotes independents es van analitzar els nivells d'expressió dels transgens. Per aquest propòsit, es van preparar extractes proteics en els quals es va immunodetectar les proteïnes codificades pels transgens utilitzant els anticossos anti-HA. Només algunes de les línies van mostrar nivells detectables de les proteïnes HA:KLC1 i HA:TPR (figura 54). D'altra banda, no es va identificar cap tipus de fenotip associat a la sobreexpressió dels transgens durant el cicle vital de les plantes (resultats no mostrats).



**Figura 54.** Sobreexpressió d'HA:KLC1 i HA:TPR en plantes transgèniques d'Arabidopsis. A la part superior s'esquematitza les proteïnes sobreexpressades. HA: epítip d'hemaglutinina; HR: Regió possible d'*Heptad Repeats*; TPR: Regió de repeticions TPR. A la part inferior es mostra la immunodetecció d'HA:KLC1 i d'HA:TPR en les línies transgèniques homocigotes. En cada carril es va carregar quantitats equivalents de proteïna. Per la immunodetecció es va utilitzar els anticossos anti-HA.

Tal com s'ha presentat en capítols anteriors, la isoforma HMGR1L està enriquida en el sediment obtingut per centrifugació a 105.000xg (figures 20 i 21). Amb aquests antecedents i amb les eines generades, es va considerar interessant testar el comportament de les variants HA:KLC1 i HA:TPR en un assaig de fraccionament subcel·lular. Així doncs, es van créixer plantes HA:KLC1 i HA:TPR durant 13 dies en règim de dia curt. Es van preparar extractes proteics totals ( $S_{0.2}$ ) que es van centrifugar a 105.000xg per obtenir el sobrenedant  $S_{105}$  i el sediment  $P_{105}$ . En aquestes fraccions es va immunodetectar les variants HA:KLC1 i HA:TPR emprant els anticossos anti-HA. Es va observar que, mentre que l'HA:KLC1 es concentrava bàsicament en la fracció  $S_{105}$  (figura 55), l'HA:TPR ho feia en la fracció  $P_{105}$ . Ja que el comportament d'una proteïna en front un fraccionament subcel·lular sovint reflecteix la seva distribució subcel·lular, les dades indiquen que HA:KLC1 i HA:TPR mantenen una distribució subcel·lular diferent. Aquest resultat suggereix que la regió N-terminal de KLC1, incloent els aminoàcids 1-171 (absents en HA:TPR), constitueixen un domini implicat en la modulació de la distribució subcel·lular de KLC1.



**Figura 55.** Immunodetecció d'HA:KLC1 i HA:TPR en diferents fraccions subcel·lulars utilitzant els anticossos anti-HA.



## 4.1 IDENTIFICACIÓ DE LES ISOFORMES DE L'HMGR EN DIFERENTS TEIXITS I FRACCIONS SUBCEL·LULARS D'ARABIDOPSIS

La significació biològica de l'existència de famílies multigèniques que codifiquen per molts dels enzims de la via de biosíntesi d'isoprenoides citosòlics en plantes ha estat objecte de gran debat (vegeu apartat 1.2). L'expressió diferencial dels gens que codifiquen per l'HMGR-CoA reductasa (HMGR) durant el desenvolupament i en resposta a diferents estímuls, ha estat interpretada com un reflex de l'especialització funcional de les diferents isoformes codificades pels gens corresponents (revisat a Stermer *et al.*, 1994; Chappell, 1995b). En particular, s'ha proposat que cada isoforma d'HMGR estaria involucrada en la biosíntesi exclusiva d'un grup d'isoprenoides.

En el cas d'Arabidopsis, s'han identificat dos gens (*HMG1* i *HMG2*) que s'expressen diferencialment i codifiquen per tres isoformes: l'HMGR1L, l'HMGR1S i l'HMGR2 (figura 5). Un dels objectius d'aquest treball ha estat estudiar la distribució de les isoformes d'HMGR en diferents teixits i fraccions subcel·lulars d'Arabidopsis mitjançant la utilització dels anticossos anti-CD1 generats contra el domini catalític de l'HMGR1. Aquests anticossos, però, reconeixen totes les isoformes de l'HMGR.

### 4.1.1 Les isoformes HMGR1S i HMGR1L es distribueixen diferencialment en Arabidopsis

Per tal d'analitzar la distribució tissular de les diferents isoformes de l'HMGR d'Arabidopsis, es van realitzar experiments de *western blot* a partir d'extractes proteics obtinguts de diferents teixits. Els anticossos anti-CD1 van detectar de 2 a 4 bandes d'HMGR en funció del teixit analitzat (figura 19). La manca de coincidència entre el nombre d'isoformes d'HMGR descrites a Arabidopsis i el nombre de bandes detectat es podria explicar, en un principi, pel fet que alguna de les espècies moleculars reconegudes pels anticossos no correspongui a l'HMGR, sino a alguna altra proteïna present en l'extracte. Cal destacar, però, que els anticossos anti-CD1 immunopurificats (en base a la seva capacitat d'unir-se al domini catalític de l'HMGR1 expressat a *E.coli*) reconeixen les mateixes bandes que l'anti-sèrum no purificat (Fernández-Busquets, X., comunicació personal). Aquest fet suggereix que les 4 bandes detectades corresponen, de fet, a diferents formes d'HMGR.

La detecció d'un nombre d'espècies moleculars més elevat a l'esperable es podria explicar per l'existència de formes d'HMGR modificades posttraduccionalment, que presentarien una mobilitat electroforètica alterada. En aquest sentit, s'ha descrit que l'HMGR pot ser modificada posttraduccionalment mitjançant glicosilació (Denbow *et al.*, 1996) i fosforilació (Mackintosh *et al.*, 1992; Dale *et al.*, 1995). Tampoc es pot descartar que alguna de les bandes correspongui a formes degradades de l'enzim produïdes per l'acció de proteases durant el processament de les mostres. D'altra banda, el fet que cada teixit mostri un patró de bandes específic reflecteix una distribució tissular diferencial de les formes d'HMGR (ja siguin isoformes o formes modificades posttraduccionalment).

Si bé no s'ha pogut determinar de forma conclouent la identitat de les 4 bandes d'HMGR identificades, sí que es tenen evidències que indiquen que les bandes 1 i 3 corresponen a les isoformes HMGR1L i HMGR1S, respectivament. Les evidències que es tenen són en base a tres criteris independents: 1) mobilitat electroforètica; 2) correlació entre la distribució tissular de les dues isoformes i el patró d'expressió dels transcrits *HMG1L* i *HMG1S*; i, 3) interacció d'aquestes isoformes amb les matrius que contenen les proteïnes GST-KLC1 (figura 52) i GST-PR2A1 (figura 40).

A partir de la identificació de les isoformes HMGR1L i HMGR1S, es pot concloure que aquestes presenten una distribució tissular diferent (figura 19). La banda 1, que correspon a l'HMGR1L, es detecta en fruits, flors, cèl·lules de la línia T87 i plàntules crescudes en foscor. Aquest patró coincideix amb els teixits on més s'expressa el transcrit *HMG1L*, excepte en el cas dels fruits, on, malgrat no es detecta expressió dels gens *HMG1* i *HMG2*, els anticossos anti-CD1 reconeixen les 4 bandes d'HMGR (compareu figures 5 i 19). En la resta de teixits, la banda identificada com a HMGR1L és minoritària, fet que sí coincideix amb els nivells d'expressió del transcrit *HMG1L*. Pel que fa a la banda 3 (que correspon a l'HMGR1S) es detecta en tots els teixits analitzats excepte en les arrels, i s'acumula majoritàriament en tiges i fulles. Aquesta distribució de la proteïna coincideix amb el patró i els nivells d'expressió del transcrit *HMG1S* (compareu figures 5 i 19). Així doncs, l'expressió diferencial dels transcrits *HMG1L* i *HMG1S* es correspon globalment —exceptuant els fruits— amb la distribució tissular de les isoformes HMGR1L i HMGR1S. En base als patrons d'expressió s'havia suggerit que els diferents gens d'*HMG* tindrien funcions especialitzades durant el desenvolupament d'Arabidopsis (vegeu apartat 1.2.3). Les dades de distribució tissular de les isoformes d'HMGR obtingudes en aquest treball aporten un nou argument en favor d'aquesta hipòtesi.

Al marge de l'esforç de caracterització dels anticossos anti-CD1, el desenvolupament de noves eines com anticossos específics d'isoforma ben segur contribuiran a l'assignació d'una identitat molecular a les bandes 2 i 4. És notable destacar el fet que en les cèl·lules de la línia T87 coexisteixen les 4 formes d'HMGR, la qual cosa és consistent amb la idea que diferents activitats d'HMGR estarien implicades en la biosíntesi d'isoprenoides particulars (revisat a Chappell, 1995b). Aquest treball, però, s'ha centrat bàsicament en la caracterització i la distribució tissular i subcel·lular de les isoformes HMGR1L i HMGR1S.

#### **4.1.2 Les isoformes HMGR1S i HMGR1L es troben en fraccions subcel·lulars diferents**

Per tal d'analitzar la distribució subcel·lular de les diferents isoformes d'HMGR es van realitzar experiments de fraccionament subcel·lular per centrifugació diferencial (figura 20). Primerament, cal destacar que l'abundància relativa de les diferents bandes d'HMGR detectades en les diferents fraccions obtingudes és coherent amb l'activitat HMGR que prèviament s'havia associat a les fraccions P<sub>16</sub> (un 60-80%) i S<sub>16</sub> (un 20-40%) (González, 2002).

A més, s'ha pogut determinar que les diferents bandes d'HMGR es distribueixen de manera diferencial en aquestes fraccions. Aquest fet queda molt ben exemplificat en el cas de

les isoformes HMGR1S i HMGR1L de les cèl·lules de la línia T87: si bé la isoforma HMGR1S es troba majoritàriament en la fracció que sedimenta a 16.000xg (fracció organelar), l'HMGR1L s'enriqueix en la fracció que sedimenta a 105.000xg (fracció microsomal). Aquestes dades suggereixen que les isoformes HMGR1L i HMGR1S es troben en compartiments subcel·lulars diferents.

Tot sembla indicar, doncs, que l'activitat HMGR associada a les diferents fraccions seria conseqüència de la distribució diferencial de les isoformes d'HMGR en aquestes fraccions. Aquesta possibilitat s'havia suggerit prèviament en patata, on en resposta a ferida es produeixen tres fenòmens coordinats: 1) inducció de l'expressió del gen *HMG1*; 2) increment de l'activitat HMGR en les fraccions organelar i microsomal; i 3) biosíntesi d'esterols. Per contra, quan les ferides es tractaven amb l'elicitor fúngic àcid araquidònic es va observar: 1) inducció dels gens *HMG2* i *HMG3* i bloqueig del gen *HMG1*; 2) disminució de l'activitat HMGR associada a la fracció organelar i increment de la mateixa en la fracció microsomal; i 3) acumulació de fitoalexines sesquiterpèniques (Stermer i Bostock, 1987; Choi *et al.*, 1992). Aquests resultats clarament suggereixen que les isoformes HMGR2 i HMGR3 són les responsables que l'activitat HMGR associada a la fracció microsomal induïda per àcid araquidònic, mentre que l'HMGR1 està associada a l'activitat HMGR detectada a les fraccions organelar i microsomal en resposta a ferida.

Els resultats de fraccionament per centrifugació diferencial obtinguts en plàntules d'*Arabidopsis* de 9 dies aporten una complexitat addicional als obtinguts en les cèl·lules de la línia T87. Si bé la isoforma HMGR1L no es detecta en aquest sistema (figura 20), l'HMGR1S (banda 3) es detecta en totes les fraccions analitzades ( $S_{16}$ ,  $P_{16}$ ,  $S_{105}$  i  $P_{105}$ ). De la mateixa manera que en les cèl·lules de la línia T87, l'HMGR1S s'enriqueix en la fracció que sedimenta a 16.000xg (fracció organelar). Tot i així, en aquesta fracció l'HMGR1S presenta una mobilitat electroforètica retardada, fet que també s'havia observat en extractes de fulles (figura 19). Aquesta alteració podria ser conseqüència d'una interferència en la mobilitat electroforètica de les proteïnes causada per la presència de pigments com la clorofil·la. Aquest fenomen s'accentuaria en mostres especialment riques en clorofil·la, com són les fulles o la fracció organelar obtinguda a partir de plàntules (fracció enriquida en cloroplastes). D'altra banda, i a diferència de les cèl·lules de la línia T87, en plàntules d'*Arabidopsis* l'HMGR1S també es detecta en la fracció  $P_{105}$ , cosa que suggereix que, en aquest sistema, part d'aquesta isoforma es troba a la fracció microsomal. Finalment, la presència de la isoforma HMGR1S en la fracció  $S_{105}$  resulta més difícil d'explicar, doncs aquest no és el comportament esperable per una proteïna de membrana. Una possible explicació seria que l'HMGR1S estigués associada a alguna estructura membranosa o lipídica de baixa densitat que no sedimentés a 105.000xg.

Pel que fa a la forma d'HMGR corresponent a la banda 2, tant en cèl·lules de la línia T87 com en plàntules d'*Arabidopsis*, es detecta en totes les fraccions analitzades, excepte en la fracció  $P_{16}$  de plàntules. Per contra, la banda 4 d'HMGR s'enriqueix majoritàriament en el sobrenedant de 105.000xg. Aquest fet suggereix que aquesta és una forma d'HMGR no unida a la membrana, que es podria haver produït per un processament posttraduccional que eliminés el corresponent domini de membrana. Això seria compatible amb el baix pes molecular

d'aquesta forma (aproximadament 57 kDa). En qualsevol cas, mentre no es conegui la identitat de les bandes 2 i 4, tot intent d'interpretació dels resultats és completament especulatiu.

#### **4.1.3 Solubilització de les isoformes HMGR1S i HMGR1L amb detergents**

Tal com s'ha discutit anteriorment, els experiments de fraccionament per centrifugació diferencial suggereixen que les isoformes HMGR1L i HMGR1S es troben en compartiments subcel·lulars diferents. En aquest sentit, la solubilització amb detergents de les isoformes HMGR1L i HMGR1S de la fracció P<sub>105</sub> obtinguda a partir de cèl·lules de la línia T87 indica, de nou, que aquestes isoformes estan en entorns de membrana diferents (figura 21). Si bé la isoforma HMGR1S (associada a la fracció organelar) es solubilitza completament amb tots els detergents assajats, l'HMGR1L (preferencialment associada a la fracció microsomal) només ho fa de manera parcial. La insolubilitat de la isoforma HMGR1L podria venir determinada per una associació de la mateixa a algun tipus de complex que no es disgregui amb detergents. El conjunt de resultats de fraccionament subcel·lular i solubilització amb detergents apunten a que les isoformes HMGR1S i HMGR1L es troben en compartiments subcel·lulars diferents.



## 4.2 EL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR DETERMINA LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'ENZIM

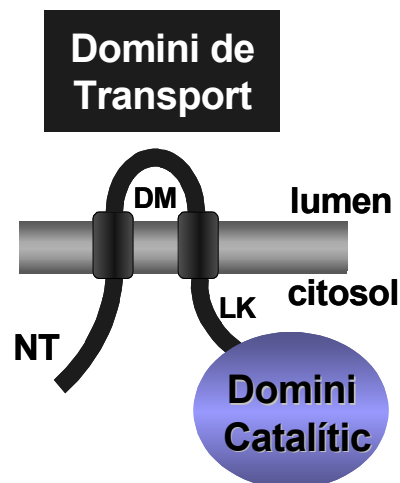
### 4.2.1 Les isoformes HMGR1S i HMGR2 es localitzen en el reticle endoplasmàtic i en estructures vesiculars

L'etiquetatge de proteïnes amb la proteïna verda fluorescent (GFP) ha servit per determinar la localització subcel·lular de múltiples proteïnes. En el present treball, s'ha aplicat aquesta estratègia per determinar el paper del domini N-terminal de l'HMGR d'Arabidopsis en la localització subcel·lular de l'enzim. Mitjançant una estratègia equivalent, ja s'havia determinat que les dues isoformes d'HMGR de llevat es localitzaven en diferents subdominis del reticle endoplasmàtic (Hampton *et al.*, 1996). En el cas d'Arabidopsis, la fusió del domini N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR2 a la GFP (figura 22) ha servit per determinar que aquest domini és suficient per dirigir les corresponents proteïnes quimèriques a estructures vesiculars heterogènies d'entre 0.5 i 2  $\mu\text{m}$  i, de forma minoritària, al reticle endoplasmàtic (RE). Aquests patrons s'han observat en dos sistemes independents com són les cèl·lules de fulla i de la línia T87 (figures 24 i 25). D'altra banda, s'ha pogut determinar que, en cèl·lules de la línia T87, les estructures vesiculars que contenen la quimera 1S:GFP també contenen l'HMGR endògena (figura 26). Aquests resultats suggereixen que el domini N-terminal conté els senyals necessaris i suficients per dirigir les proteïnes quimèriques a les estructures vesiculars on es localitza l'HMGR endògena.

Recentment, s'han realitzat estudis d'immunolocalització de l'HMGR sobre plàntules d'Arabidopsis utilitzant els anticossos anti-CD1 (Fernàndez-Busquets, X., comunicació personal). De manera consistent amb els resultats obtinguts amb l'estratègia de fusions a la GFP, en cotilèdons de plàntules de 6 dies, l'HMGR endògena es localitza en estructures vesiculars similars d'un tamany entre 0.4 i 1.3  $\mu\text{m}$ . En aquest cas, el tamany de les estructures vesiculars és inferior a l'observat amb les quimeres 1S:GFP i 2:GFP en cèl·lules de fulla i de la línia T87. Això es podria explicar per diferències en el tamany de les estructures vesiculars entre els diferents sistemes vegetals utilitzats o bé, que en els sistemes de sobreexpressió el tamany de l'estructura s'acomoda a les quantitats creixents de proteïna sintetitzada. D'altra banda, també s'han realitzat estudis d'immunolocalització de l'HMGR sobre plantes transgèniques d'Arabidopsis que sobreexpressen el domini catalític de l'HMGR1 (plantes CD1), una forma truncada que no conté el domini N-terminal (vegeu l'apartat 1.3.3). De manera consistent amb els resultats obtinguts amb les fusions a la GFP, s'ha determinat que, en absència del domini N-terminal, el CD1 es localitza preferentment al citosol. Per tant, es conclou que el domini N-terminal de l'HMGR és necessari per la localització de l'HMGR a les estructures vesiculars (Fernàndez-Busquets, X., comunicació personal). El conjunt de resultats de fusions a la GFP i d'immunofluorescència indiquen que el domini N-terminal és necessari i suficient pel transport de l'HMGR a les estructures vesiculars.

En base a aquests resultats, l'HMGR es pot dividir en dos dominis funcionals: el domini catalític i el domini N-terminal. Aquest últim estaria implicat en el transport i en la localització subcel·lular de l'enzim. En base a la funció del domini N-terminal, es proposa anomenar-lo

domini de transport (figura 56). El domini de transport està format pel domini de membrana —necessari i suficient per la inserció de l'HMGR en la membrana del RE (Campos i Boronat, 1995)—, la regió N-terminal citosòlica —que conté el motiu N-terminal conservat amb homologia amb senyals de retenció en RE en cèl·lules animals, (vegeu l'apartat 1.3.3)— i la regió *linker* —que serveix d'espaiador entre el domini catalític i el domini de membrana—. La divisió de l'HMGR en dos dominis funcionals també s'ha proposat en les HMGRs de mamífers i de llevat, on el domini N-terminal (que inclou els segments transmembrana) està implicat en la regulació i transport de l'enzim (Olender i Simon, 1992; Hampton *et al.*, 1996; Hampton, 2002).



**Figura 56.** L'HMGR de plantes està formada per dos dominis funcionals: el domini catalític i el domini de transport. El domini de transport determina el transport i la localització subcel·lular de l'enzim, i està format per la regió N-terminal citosòlica (NT), el domini de membrana (DM) i la regió *linker* (LK).

En conjunt, es pot afirmar que l'HMGR es localitza preferentment en estructures vesiculars d'identitat desconeguda. Els resultats mostrats clarament indiquen que les estructures vesiculars que contenen les quimeres 1S:GFP i 2:GFP no són cloroplastes (figura 24). A més a més, en els cotilèdons de plàntules d'*Arabidopsis*, les estructures vesiculars que contenen l'HMGR endògena tampoc es corresponen amb cloroplastes ni amb peroxisomes (Fernàndez-Busquets, X., comunicació personal). Si bé no es coneix la possible naturalesa ni la identitat d'aquestes estructures vesiculars, sí que es tenen dades sobre el possible transport de l'HMGR a les mateixes. S'ha pogut observar que les estructures vesiculars estan en íntima associació amb el RE (vegeu les imatges ampliades en les figures 24 i 25). Aquests resultats, junt amb el fet que les isoformes HMGR1S i HMGR2 s'insereixen co-traduccionalment en membranes derivades del RE (Campos i Boronat, 1995), suggereixen que aquestes isoformes es transporten a les estructures vesiculars a partir del RE, el qual seria el seu destí subcel·lular primari. Un comportament similar s'ha descrit per l'ascorbat peroxidasa, una proteïna de la membrana del peroxisoma que inicialment s'insereix en el RE. Un cop incorporada al RE, la proteïna es concentra en un subdomini vesicular del mateix (el RE peroxisomal), a partir del qual es transporta cap a les membranes del peroxisoma (Mullen, 1999). D'altra banda, tampoc es pot descartar que les estructures vesiculars que contenen l'HMGR siguin, de fet, un subdomini especialitzat del RE. Això seria compatible amb la concepció del RE com un sistema dinàmic i format per múltiples subdominis especialitzats en diferents funcions (Staehelein, 1997).

El tamany de les estructures vesiculars que contenen l'HMGR no seria incompatible amb aquesta possibilitat, ja que hi ha altres exemples de subdominis del RE de tamany equivalent. És el cas dels *ER bodies*, unes estructures derivades del RE d'un tamany de 5  $\mu\text{m}$  de llarg i 0.5  $\mu\text{m}$  d'ample que s'acumulen en diferents teixits d'*Arabidopsis* en resposta a l'estrès (Matsushima *et al.*, 2002). En aquestes estructures —que sedimenten per centrifugació a 1000xg— recentment s'hi ha identificat la  $\beta$ -glucosidasa, un enzim que conté un senyal de retenció en el RE (Matsushima *et al.*, 2003).

En el context del model de subcompartimentació de les diferents isoformes d'HMGR en subdominis del RE (McCaskill, 1998), un dels reptes de futur consisteix en esbrinar si les estructures vesiculars que contenen la proteïna quimèrica 1S:GFP són idèntiques a les que contenen la quimera 2:GFP. Això es podria comprovar utilitzant dobles marcatges, ja sigui combinant la GFP amb altres variants fluorescents, o bé generant anticossos que siguin específics d'isoforma.

Tot sembla indicar, doncs, que les estructures vesiculars descrites representen un nou compartiment subcel·lular que conté l'enzim HMGR, ja sigui un subdomini del RE o algun altre organel. Molt probablement, l'HMGR s'insereix inicialment en el RE per, posteriorment, accedir a les estructures vesiculars. Es podria especular que aquestes estructures siguin les responsables de l'activitat HMGR que sedimenta a 16.000xg (fracció organelar), mentre que l'HMGR present en el RE podria explicar la presència d'activitat HMGR en el sediment de 105.000xg (fracció microsomal).

#### **4.2.2 El domini 1Lextra determina l'acumulació de la isoforma HMGR1L en el RE**

Tal com s'ha remarcat anteriorment, la isoforma HMGR1L és idèntica a l'HMGR1S però presenta una extensió addicional de 50 aminoàcids en l'extrem N-terminal (regió 1Lextra). La sola presència d'aquesta regió determina que les isoformes HMGR1L i HMGR1S tinguin propietats diferents en assaigs de fraccionament subcel·lular i de solubilització amb detergents (apartats 4.1.2 i 4.1.3). Aquestes diferències són consistents amb els experiments de localització subcel·lular de la quimera 1L:GFP. A diferència de la localització vesicular preferencial de la quimera 1S:GFP, l'1L:GFP es localitza exclusivament en el RE, tant en cèl·lules epidèrmiques de fulla com en cèl·lules de la línia T87 (figures 24 i 25). Els resultats permeten concloure que la regió 1Lextra de l'HMGR1L és un domini que determina una localització subcel·lular diferencial entre les isoformes HMGR1L i HMGR1S. La funció de la regió 1Lextra pot venir determinada per dos mecanismes. D'una banda, es pot pensar que aquesta regió actuaria passivament mitjançant el bloqueig del senyal de transport de la proteïna a les estructures vesiculars, de manera que la isoforma HMGR1L no tindria accés a aquestes estructures. Una segona opció suposaria que la regió 1Lextra promogué de manera activa el retorn de la proteïna al RE desde les estructures vesiculars, la qual cosa implicaria que la isoforma HMGR1L transitaria per defecte a aquestes estructures.

Les diferències en la localització subcel·lular de les proteïnes 1L:GFP i 1S:GFP recolzen les dades de fraccionament subcel·lular de les isoformes HMGR1L i HMGR1S (figura 20). Efectivament, en les cèl·lules de la línia T87 la isoforma HMGR1L s'enriqueix en la fracció microsomal ( $P_{105}$ ), fet que és consistent amb la localització en el RE de la quimera 1L:GFP. Per contra, en aquestes cèl·lules, la isoforma HMGR1S es concentra en la fracció organelar ( $P_{16}$ ), fet que també és consistent amb la localització preferent de la quimera 1S:GFP en les estructures vesiculars. Per tant, existeix una correlació entre la presència d'una isoforma en una determinada fracció i la seva localització subcel·lular.

El canvi en la localització subcel·lular promogut per l'addició d'un domini extra succeeix en altres enzims de la via de biosíntesi d'isoprenoides, com és el cas de la farnesildifosfat sintasa 1 (FPS1) d'*Arabidopsis*. Aquest enzim presenta dues isoformes (FPS1L i FPS1S) que només es diferencien per la presència d'un domini extra en posició N-terminal de la isoforma FPS1L que actua de pèptid de trànsit a mitocondris (Cunillera *et al.*, 1997). La presència d'aquest domini determina una localització subcel·lular diferencial entre les isoformes FPS1L (mitocondrial) i FPS1S (citosòlica).

El conjunt de resultats obtinguts encaixarien, amb alguns matisos, en el model de subcompartimentació de les isoformes d'HMGR en diferents subdominis del RE (Campos i Boronat, 1995; McCaskill, 1998). La isoforma HMGR1L es localitzaria en el RE, mentre que l'HMGR1S ho faria, principalment, en les estructures vesiculars (siguin o no subdominis del RE). En el context del model, la distribució en diferents subcompartiments permetria la implicació de cada isoforma en la biosíntesi de determinats grups d'isoprenoides. Tot i així, serien necessàries altres aproximacions per demostrar l'especialització funcional de les isoformes HMGR1S i HMGR1L.

#### **4.2.3 Paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en el transport de la isoforma HMGR1S a les estructures vesiculars**

La majoria de les HMGRs de plantes presenten un motiu N-terminal conservat ric en residus d'arginina (figura 9). En l'apartat 3.4.5, s'ha pogut determinar que els residus d'arginina estan implicats en la interacció específica de les isoformes HMGR1S i HMGR1L amb la proteïna PR2A1. D'altra banda, motius N-terminal amb dues arginines estan implicats en la retenció en el RE de proteïnes de membrana de tipus II en cèl·lules animals (Schutze *et al.*, 1994). Els autors mostren que variants en les que s'ha eliminat el motiu de dues-arginines no són retingudes en el RE.

En el present treball, s'ha volgut determinar el paper dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en la localització subcel·lular de l'HMGR1S. L'estratègia emprada ha estat la substitució dels residus d'arginina per alanines sobre la base de la quimera 1S:GFP, i així s'ha generat la nova quimera  $\Delta R1S:GFP$ . La distribució subcel·lular de les fusions a la GFP es va analitzar, inicialment, en cèl·lules epidèrmiques de fulla. A diferència de la localització vesicular de la quimera 1S:GFP, la variant  $\Delta R1S:GFP$  es troba únicament en el RE (figura 43). Aquest resultat suggereix que els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat mediarien el

transport de la isoforma HMGR1S a les estructures vesiculars. Per tant, i a diferència de la funció del motiu de dues-arginines en cèl·lules animals, els residus d'arginina del motiu conservat en les HMGRs de plantes no participarien en la retenció de l'enzim en el RE.

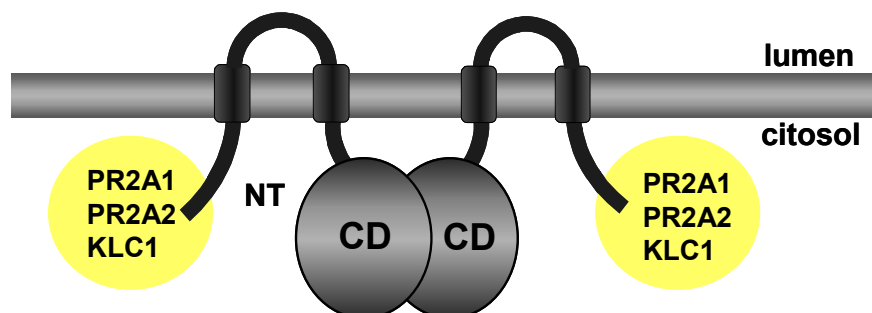
D'altra banda, els estudis de localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP i  $\Delta$ R1S:GFP en cèl·lules de la línia T87 han aportat una complexitat addicional. En aquest sistema, la variant  $\Delta$ R1S:GFP es localitza principalment en el RE, tot i que també s'observa en estructures vesiculars de tamany manifestament inferior ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) a les observades amb la proteïna 1S:GFP. Aquest resultat planteja la incògnita de si les estructures vesiculars que contenen la variant  $\Delta$ R1S:GFP són diferents a les observades amb la quimera 1S:GFP. Una possibilitat seria que les estructures vesiculars que contenen la variant  $\Delta$ R1S:GFP corresponguin a formes immadures de les que contenen la quimera 1S:GFP. Aquesta interpretació implicaria un requeriment dels residus d'arginina del motiu conservat en la transició de les vesícules immadures (de tamany  $<0.5 \mu\text{m}$ ) cap a les estructures vesiculars madures de  $0.5\text{-}2\mu\text{m}$ .

El conjunt de resultats obtinguts suggereixen que, a diferència de la funció del motiu de dues-arginines en la retenció de proteïnes de membrana en el RE en cèl·lules animals, els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat de la isoforma HMGR1S tindrien un paper en el transport de l'enzim a les estructures vesiculars o bé, en la formació de les mateixes. Un cop més, la utilització de dobles marcatges amb variants de la GFP seria una eina fonamental per determinar amb exactitud el paper del motiu N-terminal conservat en el transport de l'HMGR a les estructures vesiculars.

## 4.3 INTERACCIONS DE L'HMGR AMB ALTRES PROTEÏNES

### 4.3.1 La regió N-terminal citosòlica i el domini catalític de l'HMGR estan implicats en interaccions proteïna-proteïna

Del conjunt de resultats obtinguts mitjançant la tècnica del doble híbrid es conclou que les parts citosòliques de l'HMGR estan implicades en interaccions proteïna-proteïna (figura 57). D'una banda, la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR1L (regions NT1S i NT1L, respectivament) està implicada en la interacció amb PR2A1, PR2A2 i KLC1 (taula 2). De l'altra, el domini catalític està implicat en l'oligomerització de l'enzim (taules 4 i 5). També es pot afirmar que aquests dominis de l'HMGR constitueixen dominis d'interacció independents, doncs el domini catalític no interacciona amb les proteïnes PR2A1, PR2A2 i KLC1 (taula 2) ni les regions N-terminal citosòliques estan implicades en els processos d'oligomerització (taules 4 i 5).



**Figura 57.** Model d'interaccions proteïna-proteïna en les parts citosòliques de l'HMGR d'Arabidopsis. La regió N-terminal citosòlica (NT) estaria implicada en la interacció de l'HMGR amb les proteïnes PR2A1, PR2A2 i KLC1. El domini catalític estaria implicat en l'oligomerització de l'enzim.

Tal com s'ha esmentat en diferents punts d'aquesta memòria (vegeu apartat 1.4.3), la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR conté una sèrie de característiques que han justificat l'inici d'una estratègia per cercar proteïnes que hi interaccionin específicament. Aquesta regió sembla prou divergent entre isoformes com per conferir propietats específiques a les mateixes. A més a més, aquesta regió conté el motiu N-terminal conservat que està implicat en el transport subcel·lular de l'enzim, com a mínim en el cas de l'HMGR1S (figura 43). En el cas de la isoforma HMGR1L, la regió 1Lextra (present en la regió N-terminal citosòlica) és determinant per la seva localització en el RE (figures 24 i 25).

El crivellatge d'una genoteca d'expressió mitjançant doble híbrid ha permès la identificació de tres proteïnes que interaccionen específicament amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (figura 57). La utilització d'una genoteca d'expressió generada a partir de plàntules d'Arabidopsis crescudes 3 dies en foscor ben segur ha contribuït a l'èxit de l'estratègia, doncs en aquestes condicions tots els gens *HMG* assoleixen el màxim nivell d'expressió (Enjuto *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995; Learned, 1996). Tot i així, no es pot

descartar que la utilització de genoteques d'expressió derivades d'altres teixits permetin la identificació de noves proteïnes que interaccionin amb l'HMGR.

Pel que fa al domini catalític de les isoformes HMGR1 i HMGR2 (CD1 i CD2), les dades de doble híbrid confirmen que aquest domini pot formar homodímers. Aquest tipus d'anàlisi suggereix que *in vivo* l'HMGR formaria homodímers o bé, altres tipus d'estructures multimèriques. Aquestes dades són consistents amb el que s'havia proposat anteriorment en altres sistemes vegetals a partir d'evidències indirectes. En concret, s'havia suggerit que l'HMGR d'Hevea i rave formaria tetràmers, mentre que l'HMGR de patata formaria dímers (Kondo i Oba, 1986; Bach, 1987). L'estructura oligomèrica del domini catalític de l'HMGR és fonamental per estructurar els centres catalítics de l'enzim. Això queda reflectit en l'HMGR humana, on el domini catalític forma un tetràmer on les quatre subunitats donen lloc a quatre centres catalítics, cadascun d'ells format a la interfase de dos monòmers (Istvan *et al.*, 2000).

A més, l'oligomerització de l'HMGR pot tenir conseqüències més enllà de les funcions catalítiques. En el cas de l'HMGR humana s'ha vist que l'estat d'oligomerització de l'enzim determina la seva velocitat de degradació (Cheng *et al.*, 1999). Els autors discuteixen que a concentracions baixes de l'enzim, aquest es mostraria en forma de monòmers i seria més sensible a la degradació proteolítica. Per contra, en les conformacions oligomèriques, l'enzim seria més estable. D'altra banda, la multimerització de proteïnes de membrana també pot tenir conseqüències en el tràfic de les mateixes a través del sistema d'endomembranes. En concret, s'ha vist que en proteïnes de membrana retingudes en el RE a través del senyal de dues-arginines, la multimerització pot tenir dos tipus d'efecte: en la proteïna lip35 provoca una retenció en el RE més eficient (Schutze *et al.*, 1994), mentre que en la proteïna Kir6.2 en provoca la seva sortida (Yuan *et al.*, 2003). En aquest últim cas, el procés implicaria la participació de les proteïnes 14-3-3.

En el cas d'Arabidopsis, l'oligomerització de l'HMGR també podria tenir conseqüències rellevants per la funció de l'enzim. En aquest treball, s'ha pogut determinar mitjançant la tècnica del doble híbrid que els dominis catalítics de les isoformes HMGR1 i HMGR2 són capaços de formar heterodímers CD1-CD2 (figura 30 i taula 6). Aquest resultat planteja la possibilitat que *in vivo* també es formin heterodímers HMGR1-HMGR2, fet que podria venir facilitat per la coexistència de les isoformes en el RE (figures 24 i 25). En aquest cas, el complex d'HMGR podria estar format per diferents combinacions d'isoformes, fet que determinaria les propietats finals del complex. Si bé no es té cap evidència de que això es produeixi *in vivo*, *a priori* tampoc es pot descartar la concepció de l'HMGR com a multímer format per diferents isoformes.

#### **4.3.2 Els enzims AACT, HMGS, HMGR I MVK no interaccionen en el sistema del doble-híbrid**

En els assaigs de doble híbrid realitzats en el present treball (taules 7 i 8), no s'ha detectat interacció entre els enzims acetoacetyl-CoA tiolasa (AACT), HMG-CoA sintasa (HMGS), HMG-CoA reductasa (les regions citosòliques de les diferents isoformes d'HMGR presentades en la figura 28) i mevalonat quinasa (MVK). L'associació d'aquests enzims en complexos

multienzimàtics havia estat suggerida en el context del model d'organització de la via en metabolons (Chappell, 1995b). Tot i així, tal com es discuteix a continuació, les dades de doble-híbrid aportades en aquest treball no són prou concloents com per invalidar el model proposat per Chappel.

Tot i ser un sistema molt potent per detectar interaccions proteïna-proteïna, la tècnica del doble híbrid presenta algunes limitacions. Les proteïnes analitzades es produeixen com a proteïnes de fusió al domini d'unió (BD) i/o activació (AD) del factor de transcripció de llevat GAL4. Aquesta fusió ja pot representar un primer impediment per algunes interaccions. A més, les interaccions s'han de produir en el nucli de llevat per poder ser monitoritzades, fet que s'aconsegueix pel senyal de localització nuclear present als dominis BD i AD. Tot i així, la localització nuclear de les proteïnes de fusió pot quedar compromesa en proteïnes que tinguin senyals de transport a algun altre compartiment. Aquest és el cas de l'HMGR1S, una proteïna de membrana que forma homodímers que no són detectats mitjançant doble híbrid (taula 3). Probablement això és degut a que l'HMGR1S s'insereix eficientment en el RE del llevat a través del seu domini de membrana (Re *et al.*, 1997), fet que impediria el transport nuclear de la proteïna de fusió. De manera consistent, quan s'utilitza el domini catalític de l'HMGR1S (una versió que no conté el domini de membrana) l'homodimerització és fàcilment detectable (taula 4). Un altre exemple podria ser l'AACT, un enzim que forma tetràmers en altres organismes (Modis i Wierenga, 1999). Tanmateix, la isoforma AACT1 d'Arabidopsis és capaç de formar homodímers en l'assaig de doble híbrid (taula 3). Per contra, aquesta capacitat no és detectada en el cas de la isoforma AACT2, fet que es podria explicar per la presència d'un senyal de localització en peroxisomes situat en posició C-terminal d'aquesta isoforma (Ahumada, 2001).

En conjunt, existeixen diferents motius per pensar que el sistema de llevat no seria el més adequat per l'estudi d'aquestes interaccions. Primerament, alguns components necessaris per produir les interaccions —com altres proteïnes del complex o possibles modificacions posttraduccionals específiques— podrien estar absents en el llevat. D'altra banda, donat que l'HMGR és una proteïna de membrana, és fàcil pensar que l'entorn de membrana sigui un requisit per la formació dels possibles complexos multienzimàtics. Aquest requisit no es compleix en el sistema del doble híbrid, on les interaccions entre proteïnes només es detecten si es produeixen en forma soluble i en el nucli del llevat. Així doncs, per testar la possible formació dels complexos multienzimàtics semblaria més convenient la utilització d'eines *in vivo*, com per exemple estudis de co-localització o de co-immunoprecipitació dels diferents enzims a partir dels propis teixits vegetals.



## 4.4 LES ISOFORMES HMGR1L I HMGR1S INTERACCIONEN AMB LA SUBUNITAT REGULADORA B'' DE LA PP2A

### 4.4.1 Les proteïnes PR2A1 i PR2A2 formen part de la família de subunitats reguladores B'' de la PP2A

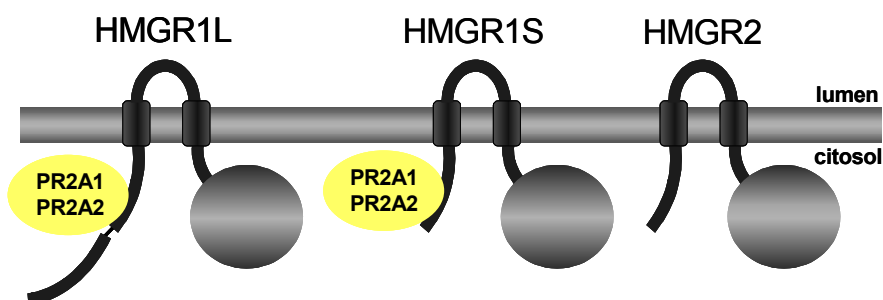
Tal com s'ha discutit en l'apartat anterior, a partir del crivellatge d'una genoteca d'expressió per la cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió NT1L de la isoforma HMGR1L es van identificar les proteïnes PR2A1 i PR2A2. Els estudis d'homologia (figura 34) i filogenètics (figura 35) clarament suggereixen que PR2A1 i PR2A2 són subunitats reguladores B'' de la PP2A. Mitjançant assaigs de doble híbrid s'ha pogut determinar que PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la subunitat PR65 de la PP2A (figura 36), la qual cosa indica que, efectivament, formen part del complex de PP2A. Si s'analitza l'alineament de PR2A1 i PR2A2 amb altres subunitats reguladores B'' de mamífers (figura 34), es pot observar que en tota la regió central d'aquestes proteïnes existeix una elevada conservació de seqüència. La regió conservada inclou els dominis d'unió a la subunitat PR65 ASBD1 i ASBD2 (Li i Virshup, 2002), que a la vegada inclouen els motius d'unió a calci *EF-hand1* i *2* (Janssens *et al.*, 2003). En aquest treball, però, els assaigs de doble híbrid no han permès determinar les regions de PR2A1 involucrades en la interacció amb la PR65 (figura 36). D'altra banda, les regions N-terminal i C-terminal de PR2A1 i PR2A2 mostren divergència respecte els homòlegs de mamífer.

La cerca de seqüències homòlogues a PR2A1 i PR2A2 en el genoma d'*Arabidopsis* ha permès identificar cinc membres pertanyents a la família de subunitats reguladores B'' de la PP2A. Un sisè membre, *TONNEAU2*, quedaria fora d'aquesta família, tot i que hi estaria molt relacionat (Camilleri *et al.*, 2002). A excepció de la regió N-terminal, els cinc membres de la família mostren una gran conservació de seqüència (figura 33). Tot i així, l'anàlisi filogenètic estableix dos subgrups en la família (figura 35): un subgrup de 2 membres que conté la PR2A1 i l'at1g03960, i un subgrup de 3 membres que conté la PR2A2, l'at5g28900 i l'at1g54450. Cal destacar que la seqüència peptídica corresponent a at5g28900 és 99% idèntica a PR2A2 (taula 9), fet que suggereix que ambdues són derivades d'un episodi de duplicació gènica recent. En aquest treball s'ha determinat que tant PR2A1 com PR2A2 interaccionen amb l'HMGR. El fet que PR2A1 i PR2A2 siguin molt similars però a la vegada pertanyin a dos subgrups diferents de subunitats reguladores B'', suggereix que, de fet, tots membres de la família podrien interaccionar amb l'HMGR. Aquesta suposició, però, quedaria pendent de ser confirmada.

### 4.4.2 Les proteïnes PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la regió N-terminal citosòlica comuna entre les isoformes HMGR1L i HMGR1S

Els estudis de doble híbrid (figura 37) i de GST *pull-down* (figura 38) han permès concloure que la interacció de PR2A1 i PR2A2 es produeix de manera directa amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1L i HMGR1S, però no amb la de l'HMGR2. La interacció és mediada, doncs, per la regió de 50 aminoàcids comuna entre les regions NT1L i NT1S (figura 28). De manera consistent amb aquests resultats, s'ha pogut determinar que les

isoformes HMGR1L i HMGR1S d'extractes d'Arabidopsis són purificades per afinitat en una matriu que conté la PR2A1 (figura 40). El conjunt de resultats indiquen que PR2A1 i PR2A2 són capaces d'interaccionar amb les isoformes HMGR1S i HMGR1L, però no amb l'HMGR2 (figura 58). D'altra banda, els resultats també suggereixen que, a través de la interacció diferencial amb les proteïnes PR2A1 i PR2A2, la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR podria estar implicada en l'especialització funcional de les isoformes.



**Figura 58.** Model d'interaccions de l'HMGR amb les subunitats reguladores B'' de la PP2A. Les proteïnes PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la regió comuna entre NT1L i NT1S de les isoformes HMGR1L i HMGR1S.

#### 4.4.3 Paper del calci en la interacció de PR2A1 amb l'HMGR

Ja s'ha comentat anteriorment que una característica de les subunitats reguladores B'' de la PP2A és la presència de dos motius conservats de tipus *EF-hand*. En la PR72 humana els motius *EF-hand* uneixen calci, i s'ha proposat que aquest fet en determina la seva interacció amb la subunitat estructural PR65 de la PP2A (Janssens *et al.*, 2003). En el cas d'Arabidopsis, totes les subunitats B'' presenten dos motius *EF-hand* (figura 59) que respecten la corresponent seqüència consens (Lewit-Bentley i Rety, 2000).

| Posició          | <i>EF-hand 1</i> |     |       |     |                    |     | <i>EF-hand 2</i> |     |       |     |                    |     |     |   |
|------------------|------------------|-----|-------|-----|--------------------|-----|------------------|-----|-------|-----|--------------------|-----|-----|---|
|                  | X                | Y   | Z     | -Y  | -X                 | -Z  | X                | Y   | Z     | -Y  | -X                 | -Z  |     |   |
| <b>Consens</b>   | D                | D N | D N S | G # | I H <sub>2</sub> O | D E | D                | D N | D N S | G # | I H <sub>2</sub> O | D E |     |   |
| <i>HsPR72</i>    | D                | T D | H D   | L Y | I S                | Q A | D                | D   | V D   | G D | G V                | L S | M Y | E |
| <i>HsPR48</i>    | D                | T D | H D   | L L | I D                | A D | D                | D   | L D   | G D | G A                | L S | M F | E |
| <i>MmPR59</i>    | D                | L D | R D   | L T | I D                | R S | D                | D   | L D   | G D | G A                | L S | M F | E |
| <i>At1g03690</i> | D                | G D | H D   | C F | I D                | K D | N                | D   | L D   | G N | G V                | I T | S N | E |
| <i>PR2A1</i>     | D                | G D | H D   | F L | I D                | K E | N                | D   | L D   | G D | G V                | I T | P N | E |
| <i>PR2A2</i>     | D                | T D | H D   | F L | I D                | K E | N                | D   | L D   | A N | G I                | I T | R N | E |
| <i>At5g28900</i> | D                | T D | H D   | F L | I D                | K E | N                | D   | L D   | A N | G I                | I T | R N | E |
| <i>At1g54450</i> | D                | T D | H D   | F L | I D                | K E | N                | D   | L D   | A N | G V                | L T | R N | E |

**Figura 59.** Alineament dels motius *EF-hand* de les subunitats reguladores B'' de la PP2A. Les posicions implicades en coordinar el calci (X, Y, Z; -X, -Y, -Z) s'han sombrejat en blau. El consens d'un motiu *EF-hand* canònic està indicat en vermell a la part superior. La posició -Z de l'*EF-hand1* dels representants d'Arabidopsis és una asparragina (N), fet que s'ha associat amb motius que presenten una baixa afinitat pel calci. Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*.

En el present treball, s'ha testat la capacitat d'unió a calci de la proteïna PR2A1 mitjançant un assaig indirecte. En presència de calci, PR2A1 mostra una mobilitat electroforètica alterada (figura 39). Aquest comportament és típic de les proteïnes que uneixen calci a través

dels motius *EF-hand*, i també s'ha observat en altres fosfatases d'Arabidopsis com la calcineurina (Kudla *et al.*, 1999). El canvi de mobilitat electroforètica es basa en un canvi conformacional de la proteïna induït per la presència del catió. Tot i que les dades suggereixen que PR2A1 és capaç d'unir calci, la utilització de formes de PR2A1 mutades en els *EF-hand* en combinació amb assaigs d'unió a calci radioactiu ben segur que serviran per determinar amb exactitud la funcionalitat d'aquests motius conservats.

Amb aquests antecedents, es va voler estudiar si el calci modulava la interacció de PR2A1 amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1S (NT1S) en assaigs *in vitro* de tipus GST *pull-down* (resultats no mostrats). D'aquesta manera, es va analitzar si la proteïna PR2A1 sintetitzada *in vitro* i marcada amb <sup>35</sup>S era retinguda en una matriu amb la fusió NT1S-GST en presència de calci o d'EGTA. En aquest tipus d'assaig, els resultats obtinguts van oferir una elevada variabilitat, per la qual cosa no es van poder extreure conclusions clares. Tot i així es va observar una lleugera tendència a una major retenció de PR2A1 en la matriu en presència de calci.

A diferència dels assaigs *in vitro* de tipus GST *pull-down*, la purificació de l'HMGR de teixits d'Arabidopsis en una matriu d'afinitat que conté la fusió GST-PR2A1 va resultar ser absolutament dependent de calci (figura 40). Aquests resultats suggereixen que el calci podria modular la interacció de PR2A1 amb les isoformes HMGR1L i HMGR1S natives. D'altra banda, en aquest tipus d'assaig es va determinar que la unió de l'HMGR a la matriu s'optimitzava quan l'extracte vegetal inicial es preparava amb EGTA (condicions d'extracció), i posteriorment es suplementava amb un excés de calci per permetre la unió (condicions d'unió). Tot i que de moment no es té una explicació definitiva per aquest fet, es podria argumentar que en les condicions d'extracció amb EGTA s'estarien disgregant possibles complexos en els quals es troba l'HMGR. Això permetria que, en presència del suplement de calci afegit posteriorment, l'HMGR fos més accessible a la matriu de GST-PR2A1, on hi quedaria retinguda de manera més eficient.

En conjunt, els resultats de purificació de l'HMGR en la matriu d'afinitat amb PR2A1 apunten a que el calci, efectivament, modula aquesta interacció. Per contra, l'ambigüitat dels resultats obtinguts en els assaigs *in vitro* de tipus GST *pull-down* fa que no es pugui determinar el mecanisme a través del qual el calci modularia aquesta interacció. Les diferències obtingudes en les dues aproximacions podrien ser degudes a que, en un cas, es parteix d'un extracte vegetal mentre que, en l'altre, es tracta d'una proteïna sintetitzada *in vitro*. En l'extracte vegetal es troben moltes altres proteïnes, com per exemple els altres components del complex PP2A, que podrien tenir efectes cooperatius en la interacció dependent de calci de la PR2A1 amb l'HMGR. Tampoc es pot descartar que en els extractes vegetals l'HMGR nativa presenti alguna modificació posttraduccional que faci que la seva interacció amb PR2A1 sigui absolutament dependent de calci. Per tal d'obtenir una visió global de totes les interaccions que es produeixen, seria de gran interès esbrinar de quina manera el calci afecta la interacció de PR2A1 amb la subunitat estructural PR65.

#### 4.4.4 Els residus d'arginina del motiu conservat i una regió adjacent rica en prolina estan implicats en la interacció de l'HMGR1 amb la PR2A1

L'anàlisi de variants proteiques amb deleccions i substitucions puntuals ha permès determinar que la interacció de PR2A1 es restringeix a una seqüència peptídica d'onze residus [RRRPPKPPVTN] present en les isoformes HMGR1S i HMGR1L (figures 41 i 42). Aquest pèptid es podria dividir en dues regions: d'una banda, el motiu [RRR] (conservat en moltes HMGRs de plantes) és necessària però no suficient per la interacció. D'altra banda, la seqüència [PPKPPVTN] rica en prolina és necessària i confereix especificitat a la interacció. Això és consistent amb l'absència d'interacció de PR2A1 amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR2 (NT2), ja que aquesta regió conté el motiu [RRR] (que no és suficient per la interacció) però no conté la regió adjacent [PPKPPVTN] (que és necessària per la interacció). En conjunt, es pot concloure que la interacció de l'HMGR1 amb PR2A1 està mediada pels residus d'arginina conservats i la regió adjacent rica en prolina.

De manera interessant, s'ha pogut constatar que determinades regions riques en prolina constitueixen un motiu d'interacció proteïna-proteïna (revisat a Kay *et al.*, 2000). Aquest tipus de motiu sol ser un pèptid curt (sovint inferior a deu aminoàcids), on els residus de prolina tendeixen a adoptar una estructura d'hèlix levògira de tipus poliprolina II. Aquest tipus d'hèlix és una estructura estesa (3 residus per volta), que presenta una superfície hidrofòbica accessible i diferents punts per formar ponts d'hidrogen. Aquestes característiques fan dels motius de poliprolina regions accessibles per la interacció amb altres proteïnes, cosa que s'afavoreix pel fet que, normalment, estan situats a les regions N i C-terminal de les proteïnes. Una altra característica d'aquests motius és que sovint estan implicats en interaccions transitòries i/o modulades, atès que participen en processos on es requereix una resposta ràpida d'interaccions proteïna-proteïna, com és l'inici de cascades de senyalització o bé, reorganitzacions del citoesquelet. A més a més, petits canvis en la conformació de l'hèlix poden comportar grans canvis en l'afinitat de la interacció. En aquest sentit, s'ha constatat que, en alguns casos, la fosforilació de residus adjacents al motiu de poliprolina determinen la seva capacitat d'interacció a altres proteïnes.

Moltes de les característiques de les interaccions mediades pels motius de poliprolina tenen equivalent en el cas de la interacció HMGR1S-PR2A1. Primerament, aquesta interacció es restringeix a un pèptid curt d'onze aminoàcids ric en prolina situat en posició N-terminal en l'HMGR1S. D'altra banda, s'ha vist que el calci modula la unió de les isoformes HMGR1L i HMGR1S a una matriu d'afinitat amb PR2A1 (figura 40). Això suggereix que es tracta d'una interacció regulada i probablement transitòria. Finalment, en la regió adjacent al motiu ric en prolina de l'HMGR1S s'identifiquen serines i treonines possiblement fosforilables, i que podrien modular aquesta interacció (figura 60). Aquest fet és encara més interessant si es considera que la proteïna PR2A1 forma part del complex de PP2A, i que, per tant, podria modular l'estat de fosforilació d'aquests residus.

Considerada la importància de la regió rica en prolina per la interacció de l'HMGR1S amb la proteïna PR2A1, s'ha inspeccionat si altres HMGRs de plantes contenen seqüències similars

(figura 60). Efectivament, en algunes d'elles s'hi poden identificar regions riques en prolina adjacents als residus d'arginina, fet que suggereix que aquestes seqüències jugarien alguna funció conservada. Per tant, es podria pensar que aquelles isoformes d'HMGR que presentin la regió rica en prolina adjacent al residus d'arginina conservats serien capaces d'interaccionar amb PR2A1. Aquest seria el cas de la isoforma HMGR1S d'Arabidopsis. Per contra, aquelles isoformes que no presentin aquesta regió, com l'HMGR2 d'Arabidopsis, no interaccionarien amb PR2A1.

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>Arabidopsis1S</b> | MDL RRR <b>PPKPP</b> VTNNNNSNG <b>S</b> FRSYQPR <b>TS</b> DDDHRRRAT <b>T</b> TIAPPPKASDA |
| <b>Arabidopsis2</b>  | MEDL RRRFP <b>T</b> KKNGEIISNVAVDPPLRKAS <b>DA</b>                                       |
| <b>Hevea1</b>        | MDT <b>T</b> GRLHHRKH <b>A</b> T PVEDRSPT <b>T</b> PKASDA                                |
| <b>Hevea3</b>        | MDEV RRR <b>PPK</b> H IVRKDHDGEVLNSFSHGHHLPPLKPSDYS                                      |
| <b>Patata1</b>       | MDV RRR <b>PVKP</b> LY <b>TS</b> KDASAGEPLKQQEV <b>SS</b> PKASDA                         |
| <b>Patata2.2</b>     | MDV RRR <b>SEK</b> <b>PVYP</b> SKVFGADEKPLKPHNNQQQEDNNTLLIDASDA                          |
| <b>Patata3.3</b>     | MDV RRR <b>PVKPLYP</b> SEH <b>ISS</b> GEPLKPHNQD <b>SS</b> VKASDA                        |
| <b>Rave1</b>         | MDI RRR <b>PPKPP</b> VNSNRFLDNR <b>S</b> DDDDRRK <b>T</b> LTSPPKASDA                     |
| <b>Rave2</b>         | MDI RRR <b>PPKPP</b> VNNPNRFSNDNDDQPRTKASDA  |
| <b>Arròs1</b>        | MEV RRR <b>APLPPP</b> GRVQAGD  |
| <b>Arròs2</b>        | MAVEG RRR <b>VPLPLPPP</b> TRRGKQQQQGGERARRVQAGD  |
| <b>TabacNs</b>       | MDV RRR <b>SEK</b> <b>PAYP</b> TKEFAAGEKPLKPHKQQEQDNSLLIASDA                             |
| <b>TabacNt</b>       | MDV RRR <b>PVKPFYP</b> SKDDV <b>S</b> AGE <b>SL</b> KPHKQTQQV <b>SS</b> PKASDA           |
| <b>Tomàquet1</b>     | MDV RRR <b>PVKP</b> LCT <b>SK</b> DA <b>S</b> AGEPLKQQQV <b>SS</b> AKASDA                |
| <b>Tomàquet2</b>     | MDV RRR <b>SEE</b> <b>PVYP</b> SKVFAADEKPLKPHKKQQQQQEDKNTLLIDASDA                        |
| <b>Tomàquet3</b>     | MDV RRR <b>AVKPL</b> DASKHISPENLSDP <b>II</b> KIPL <b>LL</b> KLSDA                       |

**Figura 60.** Regió N-terminal citosòlica d'algunes HMGRs de plantes. Els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat s'han destacat en gris. Les regions adjacents riques en prolina s'han marcat en blau. Tal com es discuteix en l'apartat 4.4.5, en vermell s'han marcat els residus de serina i treonina que compleixen el consens de fosforilació per les quinases PK-A (proteïna quinasa depenent de cAMP), PK-C (proteïna quinasa C) i CK-2 (caseïna quinasa 2). Les prediccions s'han fet utilitzant l'algoritme ProSite. En el cas de l'HMGR1S d'Arabidopsis s'han especificat els motius i les quinases possiblement implicades.

En conjunt, tot sembla indicar que estem davant d'una interacció que podria estar modulada per diferents factors com el calci, la fosforilació i la conformació de la regió rica en prolina. La complexitat d'aquesta interacció podria justificar les diferències en la modulació per calci observades en els assaigs d'interacció *in vitro* i de purificació per afinitat a partir d'extractes d'Arabidopsis (discutit en l'apartat anterior). Tant la possible conformació del motiu ric en prolina en hèlix de tipus poliprolina II, com la possible fosforilació de la regió NT1S, són qüestions que caldria resoldre en un futur per comprendre la modulació d'aquesta interacció.

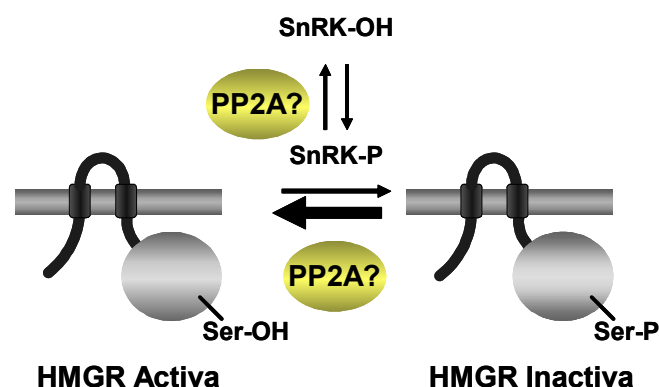
#### 4.4.5 Implicacions funcionals de la interacció de PR2A1 i PR2A2 amb les isoformes HMGR1L i HMGR1S

Utilitzant diferents aproximacions, en aquest treball s'ha pogut determinar que les subunitats reguladores PR2A1 i PR2A2 de la PP2A interaccionen amb les isoformes HMGR1S i

HMGR1L. També s'ha observat que el calci modula aquesta interacció, probablement a través de la implicació dels motius *EF-hand* presents en PR2A1 i PR2A2. El conjunt de resultats clarament apunten a que les isoformes HMGR1S i HMGR1L són dianes de la PP2A. Per tal de comprovar-ho, és prioritari analitzar si aquestes interaccions també es produeixen *in vivo*, així com si determinen un canvi en l'estat de fosforilació de l'HMGR.

Més enllà del paper de les proteïnes PR2A1 i PR2A2 en la defosforilació de l'HMGR, els esforços s'hauran de centrar en determinar les implicacions funcionals d'aquestes noves interaccions. Existeix un antecedent de modulació de l'activitat HMGR per calci, calmodulina i fosfatasa (Wititsuwannakul *et al.*, 1990). Els autors observen que si es tracta una fracció derivada del làtex d'*Hevea* amb una calmodulina purificada i calci, s'estimula l'activitat HMGR. Aquest efecte es bloqueja si s'afegeix un inhibidor general de fosfatases. Els autors suggereixen que l'efecte estimulador del calci-calmodulina és via una fosfatasa que no identifiquen.

Posteriorment al treball de Wititsuwannakul i col·laboradors, es van identificar les primeres quinases de la família SnRK1 (*Snf1-related kinases*) en plantes (revisat a Halford *et al.*, 2003), implicades en la inactivació de l'HMGR per fosforilació d'una serina conservada present al domini catalític de l'enzim (Mackintosh *et al.*, 1992; Dale *et al.*, 1995; Sugden *et al.*, 1999). En aquest sentit, es pot pensar que la PP2A podria estar implicada en la defosforilació i, per tant, en l'activació del domini catalític de l'HMGR (figura 61). De manera consistent, la inactivació de l'enzim per fosforilació pot ser revertida, *in vitro*, per addició de PP2A bovina (Dale *et al.*, 1995). Així doncs, una primera hipòtesi que es podria considerar és que PR2A1 i PR2A2 interaccionessin amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1L i HMGR1S, fet que serviria per reclutar el complex de PP2A, i, posteriorment, defosforilar i activar l'HMGR. D'altra banda, donada la implicació de la PP2A en la defosforilació i inactivació de les SnRKs (Mackintosh *et al.*, 1992), *a priori* no s'hauria de descartar la possibilitat que les proteïnes PR2A1 i PR2A2 poguessin participar en aquest procés.



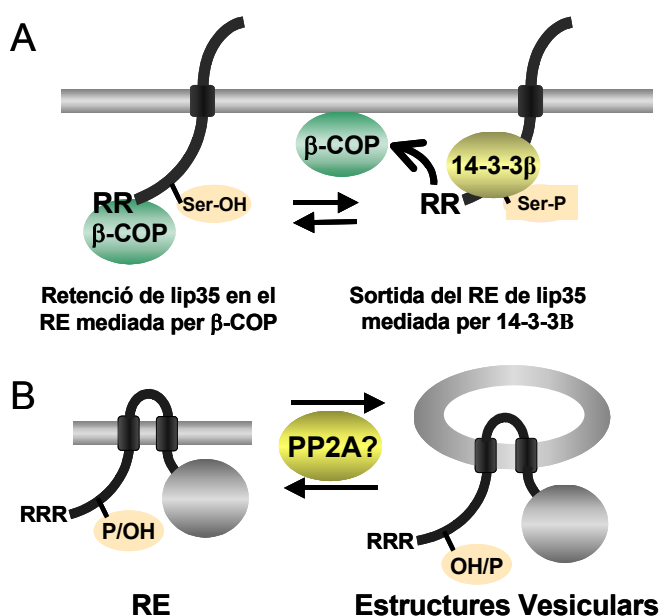
**Figura 61.** Possible implicació de la PP2A en la defosforilació i activació del domini catalític de l'HMGR. El procés vindria mediat per la interacció específica de PR2A1 i PR2A2 amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1L i HMGR1S.

Al marge de la possible defosforilació del domini catalític de l'HMGR promoguda per la PP2A, es poden considerar altres opcions. En aquest treball s'ha determinat que els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat de les isoformes HMGR1S i HMGR1L estan implicats en la interacció amb la PR2A1. A més a més, aquests residus d'arginina tenen un paper en el

transport de la proteïna quimèrica 1S:GFP a les estructures vesiculars o bé, en la formació de les mateixes (figura 43). Tot plegat, es podria postular que la PP2A té un paper en el procés de transport de l'HMGR1S mediat pels residus d'arginina conservats.

D'altra banda, actualment hi ha un gran interès en identificar els mecanismes a través dels quals els senyals formats per residus bàsics (motius di-bàsics) fomenten la retenció de proteïnes de membrana en el RE. A partir de l'anàlisi en cèl·lules animals, inicialment es va definir que aquest tipus de senyal actuava com a motiu de retenció de tipus *retrieval* (Nilsson i Warren, 1994). Posteriorment, s'ha determinat que la funció dels senyals di-bàsics sovint és modulada per altres mecanismes com fosforilació. Recentment, s'ha determinat que la proteïna  $\beta$ -COP (del complexe COP I o coatomer) està implicada en la retenció de lip35 en el RE mitjançant la seva interacció directa amb un motiu de dues-arginines (O'Kelly *et al.*, 2002). De manera molt interessant, s'ha observat que després de la fosforilació d'una serina adjacent al motiu de dues-arginines, la proteïna 14-3-3 $\beta$  desplaça a  $\beta$ -COP i determina que lip35 surti del RE (figura 62A). Aquest és un exemple excel·lent de com es pot regular el tràfic d'una proteïna, tot associant maquinàries de transport vesicular (COP I) i processos de fosforilació. Tot i així, no es coneix quines són les fosfatases i quinases implicades en el control de l'estat de fosforilació de lip35.

Per analogia amb el model proposat per a la proteïna lip35, es podria postular que el tràfic de l'HMGR1S entre el RE i les estructures vesiculars fos un procés governat per mecanismes equivalents (figura 62B). En el context d'aquesta hipòtesi, la proteïna PR2A1 regularia el tràfic de l'HMGR1S controlant l'estat de fosforilació d'una serina o treonina adjacent als residus d'arginina del motiu N-terminal conservat. Tampoc es podria descartar, però, que PR2A1 competís amb algun altre factor de la maquinària de transport per la unió als residus d'arginina. Per tal d'avançar en aquesta direcció, un bon punt de partida seria la identificació dels possibles residus fosforilats en la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR (figura 60).



**Figura 62.** Paper de la fosforilació en el transport de proteïnes de membrana. A) Control del transport subcel·lular de lip35 per fosforilació. B) Possible implicació de la PP2A en el tràfic de l'HMGR1S entre el RE i les estructures vesiculars.

Una altra possibilitat a explorar seria la implicació de PR2A1 i PR2A2 en el cicle cel·lular. En cèl·lules animals, s'ha constatat que la sobreexpressió dels corresponents homòlegs (hsPR72, hsPR48 i mmPR59) comporten una aturada del cicle cel·lular en la fase G1 (Voorhoeve *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000; Janssens *et al.*, 2003). D'altra banda, en cèl·lules de tabac BY-2 s'ha constatat que un tractament amb mevinolina (un inhibidor específic de l'activitat HMGR) també provoca una aturada del cicle cel·lular en la fase G1 (Hemmerlin i Bach, 1998), fet que ha estat atribuït a la manca d'algun derivat isoprenoide crític per la progressió del cicle cel·lular en aquesta fase (com per exemple els substrats per la prenilació de proteïnes). Aquesta coincidència fa pensar que podria existir un vincle entre les proteïnes PR2A1 i PR2A2, l'activitat HMGR i el cicle cel·lular.

#### **4.4.6 Diversitat d'isoformes de la subunitat reguladora B'' de la PP2A d'Arabidopsis**

Tal com s'ha comentat en l'apartat 1.5.3, un dels reptes en el camp de les PP2As consisteix en la identificació de dianes cel·lulars per les múltiples subunitats reguladores B existents. En aquest treball, s'ha determinat que les isoformes HMGR1S i HMGR1L interaccionen amb les proteïnes PR2A1 i PR2A2, dos dels cinc membres de la família de subunitats reguladores B'' de la PP2A d'Arabidopsis. Els estudis d'homologia suggereixen, però, que probablement les cinc subunitats B'' conservarien la capacitat d'unir l'HMGR1 (vegeu l'apartat 4.4.1). Quin és el sentit de presentar múltiples subunitats reguladores de la PP2A que interaccionin amb l'HMGR? La resposta no és trivial. Un primer aspecte que es pot plantejar és el de si l'HMGR seria una diana exclusiva d'aquestes subunitats de la PP2A o bé una diana compartida. La importància d'això recau en conèixer si aquestes proteïnes regulen processos específics de l'HMGR o bé coordinen processos més generals, en els quals l'HMGR seria una peça més. En aquest cas, una manera de cercar noves dianes de les subunitats B'' seria l'anàlisi de la presència del pèptid responsable de la interacció amb PR2A1 (RRRPPKPPVTN) en altres proteïnes d'Arabidopsis. En aquesta aproximació, un punt de partida consistiria en establir, amb més exactitud, un motiu consens per la interacció.

D'altra banda, la presència de múltiples subunitats B'' amb capacitat d'interaccionar amb l'HMGR podria reflectir la necessitat, per part de la planta, de regular finament aquesta activitat enzimàtica. La regulació fina de l'HMGR mediada per les diferents subunitats B'' es podria manifestar a diferents nivells, com per exemple que aquestes s'expressin de manera diferencial o bé, que mostrin diferents afinitats per calci o per les isoformes HMGR1L i HMGR1S. Tot i així, qualsevol consideració en aquest sentit passa pel coneixement previ de la implicació funcional la interacció de PR2A1 i PR2A2 amb l'HMGR.



## 4.5 LA ISOFORMA HMGR1L INTERACCIONA AMB KLC1

### 4.5.1 KLC1 presenta similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I

Tal com s'ha discutit en l'apartat 4.3, a partir del crivellatge d'una genoteca d'expressió per la cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal citosòlica de la isoforma HMGR1L (NT1L) es va identificar la proteïna KLC1. Els estudis d'homologia van identificar la KLC1 com una proteïna amb similitud amb la cadena lleugera de quinesina convencional o de tipus I. Aquest tipus de quinesina ha estat àmpliament estudiada en sistemes animals (vegeu apartat 1.6.2), però fins el moment no ha estat identificada en plantes. La quinesina de tipus I és una proteïna motora implicada en el transport intracel·lular d'òrgans i vesícules (referits globalment com MBOs, de l'anglès *membrane-bounded organelles*) mitjançat per microtúbuls. Aquesta quinesina és un heterotetràmer format per dues cadenes pesades o KHCs (que contenen els dominis motors) i dues cadenes lleugeres (KLCs). Les KLCs interaccionen amb la KHC a través d'un domini *coiled coil* format per diverses repeticions de tipus *Heptad* (Gauger i Goldstein, 1993). A més a més, la KLC conté un domini amb 6 repeticions de tetratricopeptid (TPR) que està implicat en el reconeixement del receptor pel transport present als MBOs.

Els estudis d'homologia, però, no permeten concloure que la proteïna KLC1 sigui un homòleg funcional de les KLCs animals. D'una banda, KLC1 només presenta una identitat del 14.1% i una similitud del 24.7% respecte les KLCs animals. De l'altra, l'anàlisi filogenètic d'aquestes seqüències (figura 47) mostra que, si bé tots els homòlegs vegetals a KLC1 s'agrupen en una mateixa branca relacionada amb les KLCs animals, existeix una gran divergència entre aquests dos grups de seqüències, fet que es dedueix de la gran distància existent entre les corresponents branques.

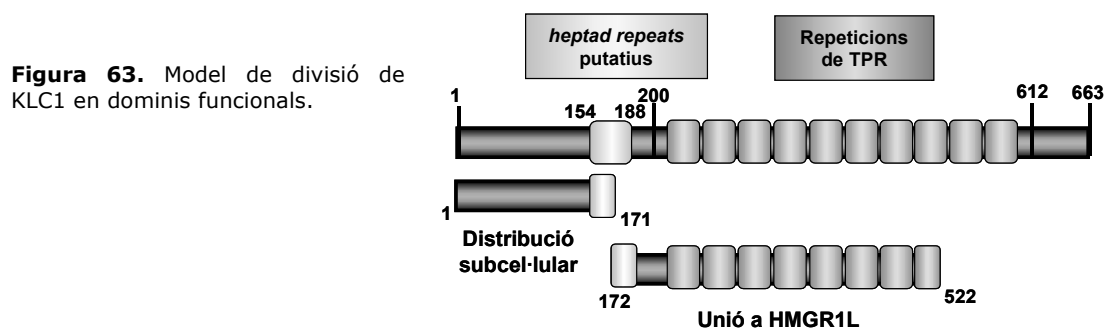
Al marge dels estudis d'homologia, l'anàlisi de la seqüència primària de KLC1 ha permès la identificació dels elements estructurals característics de les KLCs. Primerament, en la regió 200-612 es prediuen 10 repeticions TPR, separades entre elles per petits pèptids de longituds variables (figura 44). Això constitueix, de fet, una diferència respecte les KLCs d'animals, doncs aquestes només contenen 6 repeticions TPR. D'altra banda, en la KLC1 s'ha pogut identificar una regió amb una certa probabilitat de formar repeticions de tipus *Heptad*. Inicialment, es va utilitzar un programa de predicció d'estructures *coiled-coil* (*Coils version 2.1*). Si bé aquest programa no va identificar en KLC1 cap estructura clara de tipus *coiled-coil*, sí va detectar una regió amb certa probabilitat de formar aquest tipus d'estructura. A partir d'aquí, es va poder identificar una regió (aminoàcids 154-188) que gairebé compleix les característiques per la formació de 4 o 5 repeticions *Heptad*. (figura 46). L'únic aminoàcid discrepant seria la glicina que ocupa la posició *a* de la tercera repetició, un aminoàcid que rarament està present en aquest lloc (Lupas *et al.*, 1991). Si bé no es pot afirmar amb seguretat que aquesta regió formi un autèntic domini de tipus *coiled-coil*, no és menys cert que està conservada en la família d'homòlegs de KLC1 d'*Arabidopsis* (figura 45). Aquest fet suggereix que la funció d'aquesta regió també podria estar conservada.

El conjunt de dades no permeten predir la funció de la KLC1 d'Arabidopsis. Una forma de determinar si KLC1 és realment una cadena lleugera de quinesina, seria la identificació de la cadena pesada (KHC) corresponent. En aquest sentit, la identificació i aïllament d'un EST corresponent al gen AtMAA21.110 —únic gen homòleg a KHC identificat en el genoma d'Arabidopsis (Reddy i Day, 2001)— permetrà avançar en l'estudi i caracterització de la quinesina de tipus I de plantes.

Finalment, no es pot descartar que KLC1 participi en algun procés que sigui independent de la funció quinesina. En aquest sentit, recentment, s'ha identificat una KLC humana (hsKLC3) que s'uneix, a través de les repeticions *Heptad*, a les fibres denses externes, un component estructural de les cues dels espermatozous (Bhullar *et al.*, 2003). La rellevància d'aquest treball és que, per primer cop, es suggereix que les KLCs participen en un procés de manera independent de la KHC i de microtúbuls. D'altra banda, l'anàlisi filogenètic revela la presència d'un grup de seqüències que, tot i que agrupen en la mateixa branca que les KLCs, se'n desconeix la seva funció. Aquestes seqüències corresponen a diferents organismes procariotes com *Methanosarcina barkeri* (una arqueobacteria), *Nostoc sp.* (una cianobacteria) i *Plectonema boryanum* (una cianobacteria). Es podria pensar que aquestes proteïnes tindrien alguna funció relacionada però diferent a la de les KLCs descrites. Els experiments realitzats en *Plectonema* apuntarien en aquesta mateixa direcció (Celerin *et al.*, 1997). En aquest sistema, la KLC conté, al marge dels elements estructurals típics, un 33% d'identitat i un 38% de similitud respecte les KLCs animals. Per tant, es podria pensar que aquesta KLC tindria alguna funció relacionada amb les quinesines. Tot i així, aquesta funció no seria del tot equivalent, doncs en *Plectonema* no s'han identificat KHCs. Els autors suggereixen que la KLC de *Plectonema* podria tenir alguna funció de transport basada en el citoesquelet bacterià, però que actuaria de manera independent de la KHC.

#### 4.5.2 Identificació de dominis funcionals en KLC1

En aquest treball s'ha pogut establir que els dominis estructurals de KLC1 podrien correspondre a dominis funcionals. Els resultats suggereixen que la regió 172-522 de KLC1 (que inclou les repeticions TPR d'1 a 7) està implicada en la interacció amb la regió NT1L de la isoforma HMGR1L (figura 53), mentre que la regió N-terminal 1-171 modularia la distribució subcel·lular de KLC1 (figura 55). A la figura 63 s'esquematitza la divisió de KLC1 en dominis funcionals.



La implicació de la regió 172-522 de KLC1 en la interacció amb la regió NT1L de l'HMGR1L ha estat determinada mitjançant la tècnica del doble híbrid. Aquests resultats suggereixen que el domini de repeticions TPR de KLC1 està implicat en el reconeixement de la isoforma HMGR1L. Per tant, tot sembla indicar que, de la mateixa manera que en les KLCs animals, el domini TPR de KLC1 està implicat en la interacció amb les possibles dianes cel·lulars.

D'altra banda, la sobreexpressió d'HA:KLC1 (una fusió de KLC1 a l'epítop HA) i d'HA:TPR (una fusió la regió 172-663 de KLC1 a l'epítop HA) en plantes transgèniques d'*Arabidopsis*, ha permès determinar que ambdues proteïnes es comporten diferencialment en experiments de fraccionament subcel·lular. D'una banda, la proteïna HA:KLC1 es detecta, principalment, al sobrenedant de 105.000xg, cosa que és consistent amb el comportament de les KLCs de ratolí (Rahman *et al.*, 1998). De fet, es coneix que gran part de la quinesina de tipus I en sistemes animals roman inactiva i soluble al citosol —no unida als orgànels o vesícules que han de ser transportats— (vegeu apartat 1.6.2). D'aquesta manera s'eviten despeses d'energia innecessàries mentre no hi ha requeriments de transport. Per contra, la versió truncada HA:TPR s'enriqueix especialment en la fracció que sedimenta a 105.000xg ( $P_{105}$ ). Aquest fet es podria explicar en el context del model de quinesina de tipus I d'animals. En la versió HA:TPR queda truncada la regió proposada com a repeticions de tipus *Heptad* (aminoàcids 154-188), però manté tot el domini TPR de KLC1. Per tant, la proteïna HA:TPR conservaria la capacitat d'unió a les dianes cel·lulars (a través de la regió TPR), i per això sedimentaria en la fracció  $P_{105}$ . Aquest fet es veuria facilitat per la suposada incapacitat de la proteïna HA:TPR per incorporar-se al complex de quinesina (doncs s'hauria eliminat part de la regió de repeticions de tipus *Heptad*), i, per tant, en comportaria la pèrdua del seu dinamisme, és a dir, dels cicles d'unió a la càrrega, transport i reciclatge.

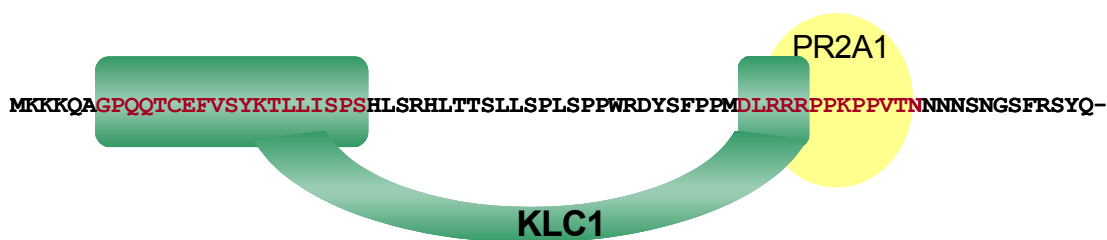
En conjunt, es pot afirmar que les característiques de KLC1 són compatibles amb el model de les KLCs animals. El domini TPR estaria implicat en la unió a les dianes cel·lulars —com l'HMGR1L—, mentre que la regió N-terminal (aminoàcids 1-171) estaria implicada d'una manera o altra en la modulació de la distribució subcel·lular de KLC1.

La identificació de diferents dominis funcionals en la KLC animal ha permès la generació de mutants dominants negatius. La idea consisteix en sobreexpressar, de manera aïllada, el domini TPR de la KLC, el qual s'unirà a les dianes cel·lulars però no les podrà transportar en no formar part del complex de quinesina. D'aquesta manera, el domini TPR sobreexpressat competeix amb la quinesina endògena per la unió a les dianes cel·lulars, fet que provoca un bloqueig en el correcte transport de la càrrega a transportar (Verhey *et al.*, 2001). En aquest sentit, les plantes HA:TPR representen una eina de gran interès per l'estudi de la funció de KLC1. En particular, sembla interessant caracteritzar l'HMGR en aquestes plantes per testar si existeix alguna alteració en la seva activitat o en la seva localització subcel·lular. De manera preliminar, es tenen dades que indiquen que les plantes HA:TPR tenen nivells incrementats d'activitat HMGR, atès que són resistents a mevinolina, un inhibidor de l'activitat HMGR que provoca una aturada en el desenvolupament de la planta (resultats no mostrats).

### 4.5.3 La regió 1Lextra de la isoforma HMGR1L està implicada en la interacció amb la KLC1

Els estudis de doble híbrid (figura 49) i de GST *pull-down* (figura 50) han permès concloure que KLC1 interacciona de manera directa amb la regió N-terminal citosòlica de la isoforma HMGR1L (regió NT1L). Aquesta interacció és específica d'isoforma, doncs no es produeix amb la regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S (regió NT1S) ni HMGR2 (regió NT2). De manera addicional, s'ha pogut determinar que l'HMGR1L nadiua derivada d'un extracte de cèl·lules de la línia T87 s'uneix específicament a una matriu d'afinitat amb GST-KLC1 (figura 52). D'aquest conjunt de dades es dedueix que la interacció es produeix a través de la extensió N-terminal de 50 aminoàcids present a la isoforma HMGR1L (regió 1Lextra).

Tot i així, s'ha observat un dramàtic descens en la intensitat de la interacció quan la regió 1Lextra s'analitza de manera aïllada. Aquest fet suggereix que la regió 1Lextra és necessària per la interacció amb KLC1, però no és suficient per mediar una interacció forta. De manera consistent, l'anàlisi de doble híbrid utilitzant versions delecionades de la regió NT1L ha permès la identificació de dues regions importants per mediar una interacció forta amb la KLC1 (figura 51): la regió aminoacídica 7-25 (present a la regió 1Lextra) i la regió aminoacídica 50-56 (present a la regió adjacent corresponent a la NT1S). De manera interessant, la seqüència aminoacídica 50-56 conté el motiu conservat implicat en la interacció amb PR2A1 (apartat 3.4.5) i en la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP (apartat 3.4.6). Tot plegat, el conjunt d'interaccions trobades sobre la regió NT1L suggereix que, en aquesta regió, es concentren múltiples mecanismes reguladors que, a més, són específics d'isoforma. A la figura 64 es mostra el model d'interacció de KLC1 i PR2A1 amb la regió NT1L de la isoforma HMGR1L.



**Figura 64.** Model d'interacció de KLC1 i PR2A1 amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR1L (regió NT1L). Les regions aminoacídiques 7-25 i 50-56 de la regió NT1L estan implicades en la interacció amb KLC1.

El fet que PR2A1 i KLC1 puguin compartir lloc d'unió en la regió NT1L planteja la qüestió de si aquestes interaccions poden coexistir o bé s'exclouen mútuament. Aquestes possibilitats es podrien estudiar en assaigs de competició *in vitro*. Al marge de la possible implicació de KLC1 i PR2A1 en la regulació de l'HMGR, el model d'interaccions també ofereix la possibilitat que KLC1 i PR2A1 es regulin mútuament. Per exemple, una possibilitat seria que PR2A1 regulés l'estat de fosforilació de KLC1, i que això alterés la seva capacitat d'unió a la regió NT1L. En aquest sentit, recentment s'ha constatat que, en sistemes animals, l'estat de fosforilació de les cadenes lleugeres de quinesina regula la seva capacitat d'unió a les càrregues que han de ser transportades (Morfini *et al.*, 2002).

Els resultats d'interacció HMGR1L-KLC1 presentats en aquest treball suggereixen fortament que la isoforma HMGR1L seria una diana de la KLC1. Tot i així, queda un gran camí per recórrer en el sentit d'identificar i caracteritzar la formació dels corresponents complexos *in vivo*, així com determinar quines són les implicacions funcionals dels mateixos.

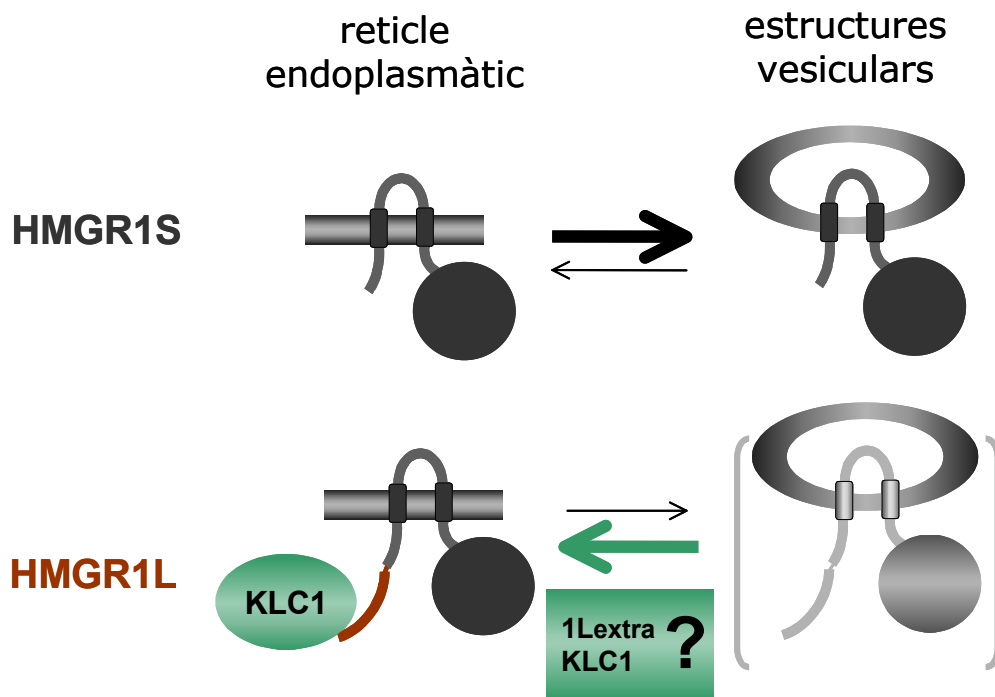
#### 4.5.4 Implicacions funcionals de la interacció de la KLC1 amb l'HMGR1L

Ja s'ha comentat en diferents punts d'aquesta memòria que l'única diferència entre les isoformes HMGR1S i HMGR1L és que aquesta presenta una extensió de 50 aminoàcids (regió 1Lextra) en posició N-terminal, (figura 28). En l'apartat 3.2 s'ha determinat que la sola presència d'aquesta regió determina un canvi en la localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP (que s'acumula principalment en estructures vesiculars) i 1L:GFP (exclusiva de RE). La conclusió és que la regió 1Lextra és un domini que determina una localització subcel·lular diferencial per les isoformes HMGR1L i HMGR1S. D'altra banda, la regió 1Lextra interacciona específicament amb la KLC1, una proteïna amb homologia amb la cadena lleugera de quinesina. Es podria hipotetitzar, doncs, que la KLC1 determina la localització de l'HMGR1L a través de la seva interacció amb la regió 1Lextra. Aquesta hipòtesi és encara més atractiva si es considera que les quinesines estan implicades en el transport intracel·lular de vesícules i organel·ls mitjançant per microtúbuls.

En el context d'aquesta hipòtesi, existrien diferents mecanismes a través dels quals la KLC1 determinaria la localització subcel·lular de l'HMGR1L. En una primera opció, la KLC1 determinaria el transport retrògrad de l'HMGR1L desde les estructures vesiculars cap al RE (figura 65). Aquesta opció implica que l'HMGR1L conservaria la capacitat de ser transportada a les estructures vesiculars on es localitza l'HMGR1S. En una segona opció, la regió 1Lextra de l'HMGR1L evitaria, ja d'entrada, que aquesta fos mobilitzada cap a les estructures vesiculars. En aquest cas, la KLC1 podria formar part de la maquinària de retenció en el RE responsable de retornar l'HMGR1L mitjançant un mecanisme de tipus *retrieval*. Finalment, no s'hauria de descartar la possibilitat que la KLC1 tingués, de fet, un paper en el transport regulat de l'HMGR1L cap algun altre tipus d'organel que encara no ha estat identificat. En aquest cas, la localització en el RE de l'HMGR1L vindria determinada per algun altre senyal present en la regió 1Lextra que fos independent de KLC1. Un candidat seria el motiu de triple lisina del motiu N-terminal conservat de l'HMGR1L (figura 9), doncs és un motiu bàsic (típic de proteïnes de membrana que es retenen en RE) no implicat en la interacció amb la KLC1 (figura 51).

Per tal de contrastar algunes d'aquestes hipòtesis, sembla prioritari identificar aquells processos i/o teixits on la KLC1 exerceixi una funció sobre l'HMGR1L. En aquest sentit, l'elongació del tub pol·línic és un procés en el qual s'han implicat tant a les quinesines com a l'HMGR. En aquest procés, les quinesines participen en el moviment d'organel·ls i vesícules mitjançant per microtúbuls (revisat per Romagnoli *et al.*, 2003). Tanmateix, s'ha observat que l'activitat HMGR és necessària per l'elongació del tub pol·línic, doncs plantes mutants en el gen *HMG1* (incapaces de produir les isoformes HMGR1S i HMGR1L) mostren esterilitat masculina causada per una manca d'aquest procés (Muranaka *et al.*, 2003). Per tant, les dades apunten a que l'elongació del tub pol·línic és un procés on es requereix tant de la funció de la quinesina

com de la funció de l'HMGR, fets que el converteixen en un bon candidat per estudiar-hi la funció de la interacció de KLC1 amb l'HMGR1L.

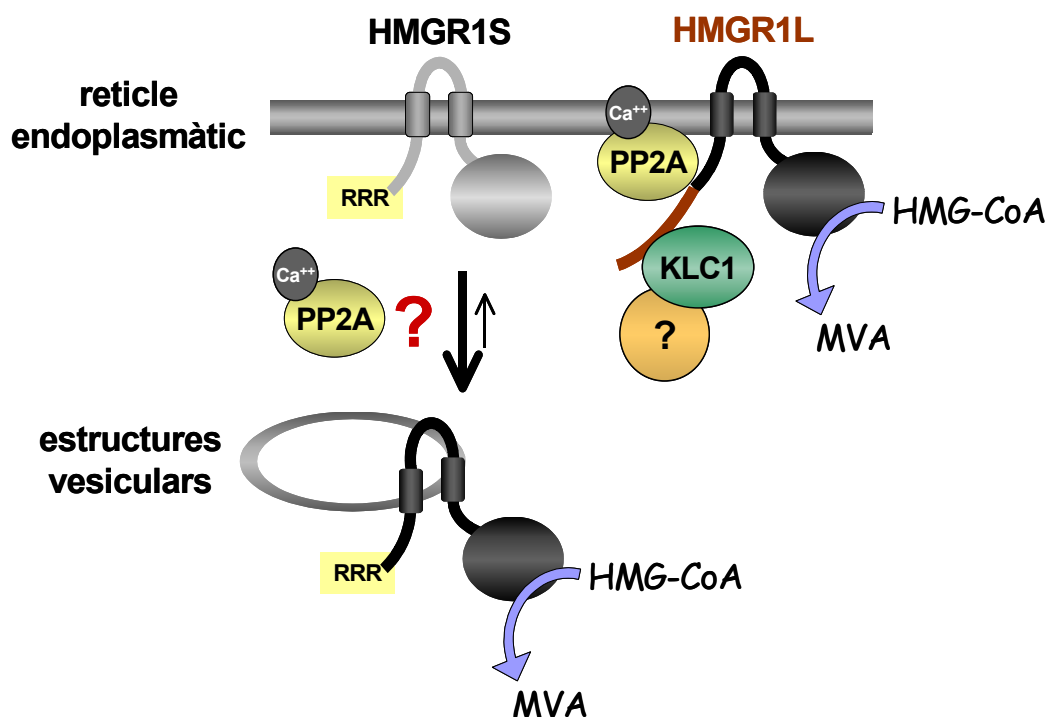


**Figura 65.** Hipòtesi de funció de la interacció HMGR1L-KLC1. La proteïna KLC1 determinaria el transport retrògrad de l'HMGR1L desde les estructures vesiculars on es troba l'HMGR1S cap al RE.

## 4.6 MODEL INTEGRAT DE SUBCOMPARTIMENTACIÓ DE LA BIOSÍNTESIS DE MEVALONAT

Un dels objectius del present treball ha estat determinar la localització subcel·lular de l'HMGR, així com identificar els possibles senyals i/o factors implicats en el seu transport. En base als resultats obtinguts es proposa el següent model de compartimentació subcel·lular de les diferents isoformes de l'HMGR (figura 66). D'una banda, la isoforma HMGR1S es localitzaria preferentment en les estructures vesiculars. El procés s'iniciaria amb la inserció de la proteïna en el RE i, posteriorment, es transportaria a aquestes vesícules. El transport vindria determinat pels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat. En contrast amb la isoforma HMGR1S, l'HMGR1L es localitzaria exclusivament en el RE, un procés determinat per la regió 1Lextra present en posició N-terminal de la proteïna.

Aquest model de localització de les isoformes d'HMGR implica que la biosíntesi de mevalonat estaria segregada en dos compartiments subcel·lulars: el RE i les estructures vesiculars. Per tant, aquest model seria consistent amb els models de subcompartimentació de la biosíntesi d'isoprenoides en subdominis del RE que havien estat proposats amb anterioritat (Chappell, 1995b; McCaskill, 1998). En el context d'aquests models, es podria pensar que la localització diferencial de les isoformes d'HMGR (en RE i estructures vesiculars) determinaria l'especialització funcional de les mateixes, és a dir, permetria la seva implicació en la biosíntesi d'isoprenoides particulars.



**Figura 66.** Integració de la PP2A i de la KLC1 en el model de subcompartimentació de la biosíntesi de mevalonat.

En aquest treball s'ha pogut constatar que la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR constitueix una regió important per l'enzim. D'una banda, s'ha determinat que aquesta regió juga un paper important per la localització subcel·lular de les isoformes HMGR1S i HMGR1L. A més, aquesta regió determina interaccions específiques d'isoforma amb les proteïnes PR2A1, PR2A2 i KLC1, fet que suggereix que aquestes interaccions estiguin, de fet, implicades en el transport intracel·lular de l'enzim. En concret, s'ha determinat que PR2A1 interacciona, de manera modulada per calci, amb els residus d'arginina del motiu N-terminal conservat de l'HMGR1S, fet que suggereix que la PP2A i/o el calci tenen un paper en el tràfic de l'enzim entre el RE i les estructures vesiculars (figura 65). D'altra banda, com que KLC1 interacciona amb la regió 1Lextra de la isoforma HMGR1L, es pot pensar que aquesta proteïna estaria implicada en la localització de l'HMGR1L en el RE. Tampoc es pot descartar que la PP2A i/o el calci tinguin un paper regulador addicional en el cas de la isoforma HMGR1L. Finalment, un dels reptes de futur consisteix en determinar si la KLC1 és un homòleg funcional de la cadena lleugera de quinesina i, en tot cas, identificar la parella motora corresponent.



## **CONCLUSIONS**

I. En experiments de transferència de western, anticossos policlonals dirigits contra el domini catalític d'HMGR1 reconeixen un patró de 2 a 4 bandes d'HMGR d'intensitat variable en funció del teixit d'Arabidopsis analitzat. En base a criteris de mobilitat electroforètica, patró d'expressió i interacció específica amb altres proteïnes, les isoformes HMGR1L i HMGR1S han pogut ser identificades de manera inequívoca. Aquestes isoformes presenten un patró de distribució diferencial: mentre que la isoforma HMGR1L es detecta principalment en fruits, flors, plàntules etiolades i cèl·lules de la línia T87, la isoforma HMGR1S està present en tots els teixits analitzats excepte en les arrels.

II. Les isoformes HMGR1L i HMGR1S es comporten de manera diferencial en experiments de fraccionament subcel·lular a partir d'extractes de cèl·lules de la línia T87. Mentre que l'HMGR1S es detecta principalment en la fracció que sedimenta a 16.000xg, l'HMGR1L s'enriqueix en la fracció que sedimenta a 105.000xg. D'altra banda, mentre que l'extracció amb detergents solubilitza totalment la isoforma HMGR1S, l'HMGR1L es manté majoritàriament insoluble. Aquests fets suggereixen que les isoformes HMGR1L i HMGR1S presenten localitzacions subcel·lulars diferents.

III. S'han generat fusions del domini N-terminal de les isoformes HMGR1L, HMGR1S i HMGR2 a la proteïna verda fluorescent (quimeres 1L:GFP, 1S:GFP i 2:GFP, respectivament). En experiments d'expressió transitòria en cèl·lules de fulla i de la línia T87 d'Arabidopsis, s'ha determinat que el domini N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR2 és suficient per transportar les quimeres 1S:GFP i 2:GFP a estructures vesiculars de 0.5-2 µm. Tanmateix, la fluorescència també s'observa en el reticle endoplasmàtic (RE), el qual està connectat a les estructures vesiculars. D'altra banda, el domini N-terminal de la isoforma HMGR1L determina una localització exclusiva en el RE de la quimera 1L:GFP. La localització subcel·lular diferencial de les proteïnes de fusió 1S:GFP i 1L:GFP són consistents amb les diferències de distribució subcel·lular de les isoformes HMGR1S i HMGR1L observades en els estudis de fraccionament. A més, la identificació d'HMGR endògena en les estructures vesiculars que contenen la quimera 1S:GFP ha permès concloure que el domini N-terminal de la isoforma HMGR1S, i probablement també el de l'HMGR1L i l'HMGR2, constitueix un domini necessari i suficient pel transport i localització subcel·lular de l'enzim.

IV. La regió N-terminal citosòlica de les isoformes HMGR1S i HMGR1L està implicada en la seva localització subcel·lular.

- La isoforma HMGR1L és idèntica a la isoforma HMGR1S, però presenta una extensió N-terminal de 50 aminoàcids (1Lextra) que determina que ambdues isoformes tinguin una localització subcel·lular diferent. Per tant, en el context del domini N-terminal de l'HMGR1, la regió 1Lextra constitueix un domini de localització en el RE.

- S'ha generat una variant de la quimera 1S:GFP en la qual els tres residus d'arginina presents a la regió N-terminal citosòlica —i que estan conservats a la majoria de les HMGRs de plantes— s'han substituït per tres alanines. Estudis de localització subcel·lular han permès determinar que aquests residus tenen un paper rellevant en el transport de la quimera 1S:GFP a les estructures vesiculars, o bé, en la formació de les mateixes.

V. L'anàlisi mitjançant la tècnica del doble híbrid ha permès determinar que els dominis catalítics de les isoformes HMGR1 i HMGR2 (CD1 i CD2, respectivament) són capaços de formar homodímers. D'aquest resultat es desprèn que, *in vivo*, l'HMGR podria formar homodímers o altres tipus d'estructures multimèriques. Tanmateix, CD1 i CD2 són capaços d'interaccionar en el sistema de llevat, fet que planteja la possibilitat de formació d'heterodímers HMGR1-HMGR2 *in vivo*.

VI. La regió N-terminal citosòlica de la isoforma HMGR1L està implicada en interaccions amb altres proteïnes. La cerca de proteïnes que interaccionin amb aquesta regió, mitjançant el crivellatge per doble híbrid d'una genoteca d'expressió obtinguda de plàntules etiolades, ha permès la identificació de les proteïnes PR2A1, PR2A2 i KLC1. PR2A1 i PR2A2 presenten homologia amb subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A), mentre que KLC1 presenta similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I.

VII. PR2A1 i PR2A2 interaccionen específicament amb les isoformes HMGR1L i HMGR1S, però no amb l'HMGR2. La seqüència peptídica RRRPPKPPVTN present a les isoformes HMGR1L i HMGR1S determina la seva interacció amb la PR2A1. La implicació dels residus d'arginina del motiu N-terminal conservat en aquesta interacció, suggereix que PR2A1 podria jugar un paper en el transport intracel·lular d'HMGR1. Aquesta interacció s'ha determinat en base a les següents evidències:

- Les anàlisis mitjançant doble híbrid i GST *pull-down* han permès identificar que PR2A1 i PR2A2 interaccionen amb la regió N-terminal citosòlica comuna en l'HMGR1S i l'HMGR1L, però no amb la de l'HMGR2. La seqüència peptídica implicada en la interacció s'ha pogut acotar mitjançant la tècnica del doble híbrid.
- A partir d'extractes d'Arabidopsis, s'ha pogut determinar que les isoformes HMGR1S i HMGR1L són retingudes específicament en una matriu que conté GST-PR2A1.

VIII. PR2A1 i PR2A2 són subunitats reguladores B'' de la PP2A que, d'acord amb els estudis filogenètics, formen part d'una família que té 5 membres en Arabidopsis. PR2A1 i PR2A2 s'uneixen al complex de proteïna PP2A a través de la seva interacció amb la subunitat estructural PR65. La interacció d'HMGR1L i HMGR1S amb PR2A1 és modulada per calci, fet que probablement ve determinat pels 2 motius d'unió a calci de tipus *EF-hand* presents en PR2A1.

IX. KLC1 presenta similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I, i en conserva una estructura modular equivalent. KLC1 es pot dividir en dos dominis funcionals: un domini que conté 7-8 repeticions de tetratricopèptid (aminoàcids 172-522) i que s'uneix a l'HMGR1L, i un domini que podria estar implicat en la modulació de la seva distribució subcel·lular (aminoàcids 1-171).

X. KLC1 interacciona amb la isoforma HMGR1L, però no amb l'HMGR1S ni amb l'HMGR2. Aquesta conclusió s'ha obtingut a partir dels experiments de doble híbrid, de GST *pull-down* i de purificació de l'HMGR1L mitjançant una matriu d'afinitat que conté GST-KLC1. La regió 1Lextra, que determina la localització de l'HMGR1L en el RE, és imprescindible per aquesta interacció. Aquest fet suggereix que KLC1 podria jugar un paper en la localització subcel·lular de la isoforma HMGR1L.



---

**BIBLIOGRAFIA****A**

Ahumada, I. (2001). Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular de la acetoacetil-coenzima A tiolasa de *Arabidopsis thaliana*. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*, pp 108.

Ariño, J., Pérez-Callejón, E., Cunillera, N., Camps, M., Posas, F. and Ferrer, A. (1993). Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **21**,(3): 475-85.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.

Awotunde, O. S., Lechward, K., Krajewska, K., Zolnierowicz, S. and Muszynska, G. (2003). Interaction of maize (*Zea mays*) protein phosphatase 2A with tubulin. *Acta Biochim Pol* **50**,(1): 131-8.

Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C. and Lescure, B. (1992). A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Physiol Biochem* **30**,(1): 123-8.

**B**

Bach, T. J. (1987). Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**,(2): 163-78.

Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C. and Moore, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**,(11): 2201-17.

Bhullar, B., Zhang, Y., Junco, A., Oko, R. and Van Der Hoorn, F. A. (2003). Association of kinesin light chain with outer dense fibers in a microtubule-independent fashion. *J Biol Chem* **278**,(18): 16159-68.

Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K. and Brady, S. T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* **27**,(9): 3409-16.

Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R. and Mundy, J. (2003). The *Arabidopsis* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J Cell Sci* **116**,(5): 791-801.

Breitling, R. and Krisans, S. K. (2002). A second gene for peroxisomal HMG-CoA reductase? A genomic reassessment. *J Lipid Res* **43**,(12): 2031-6.

## C

Caelles, C., Ferrer, A., Balcells, L., Hegardt, F. G. and Boronat, A. (1989). Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol* **13**,(6): 627-38.

Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O. and Bouchez, D. (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton. *Plant Cell* **14**,(4): 833-45.

Campos, N. and Boronat, A. (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**,(12): 2163-74.

Carretero-Paulet, L. (2003). Caracterización a nivel molecular de los genes 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa de *Arabidopsis thaliana*. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*, pp 270.

Casamayor, A., Pérez-Callejón, E., Pujol, G., Ariño, J. and Ferrer, A. (1994). Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **26**,(1): 523-8.

Celerin, M., Gilpin, A. A., Dossantos, G., Laudenbach, D. E., Clarke, M. W. and Beushausen, S. (1997). Kinesin light chain in a eubacterium. *DNA Cell Biol* **16**,(6): 787-95.

Chang, M., Wang, B., Chen, X. and Wu, R. (1999). Molecular characterization of catalytic-subunit cDNA sequences encoding protein phosphatases 1 and 2A and study of their roles in the gibberellin-dependent *Osamy-c* expression in rice. *Plant Mol Biol* **39**,(1): 105-15.

Chappell, J. (1995a). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* **107**,(1): 1-6.

Chappell, J. (1995b). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 521-47.

Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* **5**,(2): 151-7.

Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R. and Saunders, C. (1995). Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol* **109**,(4): 1337-43.

Cheng, H. H., Xu, L., Kumagai, H. and Simoni, R. D. (1999). Oligomerization state influences the degradation rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **274**,(24): 17171-8.

Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. and Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **6**,(3): 325-30.

Choi, D., Ward, B. L. and Bostock, R. M. (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4**,(10): 1333-44.

Cohen, C. and Parry, D. A. D. (1986).  $\alpha$ -helical coiled-coils- a widespread motif in proteins. *Trends Biochem Sci* **11**: 245-8.

- Cordier, H., Karst, F. and Berges, T. (1999). Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. *Plant Mol Biol* **39**,(5): 953-67.
- Corum, J. W., Hartung, A. J., Stamey, R. T. and Rundle, S. J. (1996). Characterization of DNA sequences encoding a novel isoform of the 55 kDa B regulatory subunit of the type 2A protein serine/threonine phosphatase 2A of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **31**: 419-27.
- Cowan, A. K., Moore-Gordon, C. S., Bertling, I. and Wolstenholme, B. N. (1997). Metabolic Control of Avocado Fruit Growth (Isoprenoid Growth Regulators and the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase). *Plant Physiol* **114**,(2): 511-8.
- Cunillera, N., Arró, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A. and Ferrer, A. (1996). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* **271**,(13): 7774-80.
- Cunillera, N., Boronat, A. and Ferrer, A. (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* **272**,(24): 15381-8.
- Cunillera, N., Boronat, A. and Ferrer, A. (2000). Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Mol Biol* **44**,(6): 747-58.

## D

- Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N. G., Boronat, A., Hardie, D. G. and Ferrer, A. (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* **233**,(2): 506-13.
- Day, I. S., Miller, C., Golovkin, M. and Reddy, A. S. (2000). Interaction of a kinesin-like calmodulin-binding protein with a protein kinase. *J Biol Chem* **275**,(18): 13737-45.
- Del Arco, A. (1999). Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular del gen SQS1 que codifica para la escualeno sintasa de *Arabidopsis thaliana*. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*, pp 282.
- Denbow, C. J., Lang, S. and Cramer, C. L. (1996). The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem* **271**,(16): 9710-5.
- Diefenbach, R. J., Mackay, J. P., Armati, P. J. and Cunningham, A. L. (1998). The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* **37**,(47): 16663-70.
- Dong, L., Ermolova, N. V. and Chollet, R. (2001). Partial purification and biochemical characterization of a heteromeric protein phosphatase 2A holoenzyme from maize (*Zea mays* L.) leaves that dephosphorylates C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* **213**,(3): 379-89.

## E

Endow, S. A. (2002). Processive and Nonprocessive Models of Kinesin Movement. *Annu Rev Physiol* **65**: 03.1-15.

Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arró, M. and Boronat, A. (1994). Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**,(3): 927-31.

Enjuto, M., Lumbreras, V., Marín, C. and Boronat, A. (1995). Expression of the Arabidopsis HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7**,(5): 517-27.

## F

Ferrando, A., Farràs, R., Jasik, J., Schell, J. and Koncz, C. (2000). Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells. *Plant J* **22**,(6): 553-60.

Ferrando, A., Koncz-Kalman, Z., Farràs, R., Tiburcio, A., Schell, J. and Koncz, C. (2001). Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res* **29**,(17): 3685-93.

Folkers, U., Kirik, V., Schobinger, U., Falk, S., Krishnakumar, S., Pollock, M. A., Oppenheimer, D. G., Day, I., Reddy, A. R., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (2002). The cell morphogenesis gene ANGUSTIFOLIA encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *Embo J* **21**,(6): 1280-8.

## G

Gauger, A. K. and Goldstein, L. S. (1993). The Drosophila kinesin light chain. Primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J Biol Chem* **268**,(18): 13657-66.

Gindhart, J. G., Jr. and Goldstein, L. S. (1996). Tetratricopeptide repeats are present in the kinesin light chain. *Trends Biochem Sci* **21**,(2): 52-3.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**,(6257): 425-30.

Goldstein, L. S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol* **11**,(12): 477-82.

González, V. (2002). Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilmetilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*.

Gray, J. C. (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Advances in botanical research* **14**: 25-91.

Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. and Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**,(1): 99-110.



## H

- Halford, N. G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M. and Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* **54**,(382): 467-75.
- Hampton, R. Y. (2002). Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 345-78.
- Hampton, R. Y., Koning, A., Wright, R. and Rine, J. (1996). In vivo examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**,(2): 828-33.
- Harris, D. M., Myrick, T. L. and Rundle, S. J. (1999). The Arabidopsis homolog of yeast TAP42 and mammalian alpha4 binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. *Plant Physiol* **121**,(2): 609-17.
- Haynes, J. G., Hartung, A. J., Hendershot, J. D., 3rd, Passingham, R. S. and Rundle, S. J. (1999). Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* **260**,(1): 127-36.
- Hemmerlin, A. and Bach, T. J. (1998). Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. *Plant J* **14**,(1): 65-74.
- Hendershot, J. D., Esmon, C. A., Lumb, J. E. and Rundle, S. J. (1999). Identification and characterization of sequences encoding a 62kD B'' regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* protein phosphatase 2A. *Plant Gene Register/Plant Physiol* **121**: 311.
- Hendrix, P., Mayer-Jackel, R. E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W. and Hemmings, B. A. (1993). Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J Biol Chem* **268**,(20): 15267-76.

## I

- Istvan, E. S., Palnitkar, M., Buchanan, S. K. and Deisenhofer, J. (2000). Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *Embo J* **19**,(5): 819-30.
- Itoh, R., Fujiwara, M. and Yoshida, S. (2001). Kinesin-related proteins with a mitochondrial targeting signal. *Plant Physiol* **127**,(3): 724-6.

## J

- Jackson, K. and Soll, D. (1999). Mutations in a new Arabidopsis cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol Gen Genet* **262**,(4-5): 830-8.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**: 417-39.

Janssens, V., Jordens, J., Stevens, I., Van Hoof, C., Martens, E., De Smedt, H., Engelborghs, Y., Waelkens, E. and Goris, J. (2003). Identification and functional analysis of two Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand motifs in the B<sup>1</sup>/PR72 subunit of Protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem* **278**,(12): 10697-706.

## K

Kamal, A. and Goldstein, L. S. (2002). Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**,(1): 63-8.

Karcher, R. L., Deacon, S. W. and Gelfand, V. I. (2002). Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* **12**,(1): 21-7.

Kasprzak, A. A. and Hajdo, L. (2002). Directionality of kinesin motors. *Acta Biochim Pol* **49**,(4): 813-21.

Kay, B. K., Williamson, M. P. and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**: 231-41.

Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., Veretnik, S. and Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**,(2): 908-25.

Kim, D. H., Kang, J. G., Yang, S. S., Chung, K. S., Song, P. S. and Park, C. M. (2002). A Phytochrome-Associated Protein Phosphatase 2A Modulates Light Signals in Flowering Time Control in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**,(12): 3043-56.

Kim, J., Harter, K. and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**,(22): 11786-91.

Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-96.

Kondo, K. and Oba, K. (1986). Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from potato tubers. *J Biochem* **100**,(4): 967-74.

Kong, L. J. and Hanley-Bowdoin, L. (2002). A Geminivirus Replication Protein Interacts with a Protein Kinase and a Motor Protein That Display Different Expression Patterns during Plant Development and Infection. *Plant Cell* **14**,(8): 1817-32.

Korth, K. L., Jaggard, D. A. and Dixon, R. A. (2000). Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J* **23**,(4): 507-16.

Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grisse, W. and Luan, S. (1999). Genes for cacineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4718-23.

Kuwabara, P. E. and Labouesse, M. (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* **18**,(4): 193-201.

Kwak, J. M., Moon, J. H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A. and Schroeder, J. I. (2002). Disruption of a Guard Cell-Expressed Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit, RCN1, Confers Abscisic Acid Insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**,(11): 2849-61.

## L

- Lange, B. M. and Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **51**,(6): 925-48.
- Larsen, P. B. and Cancel, J. D. (2003). Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis* *eer1* mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant J* **34**,(5): 709-18.
- Latorre, K. A., Harris, D. M. and Rundle, S. J. (1997). Differential expression of three *Arabidopsis* genes encoding the B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* **245**,(1): 156-63.
- Lawrence, C. J., Malmberg, R. L., Muszynski, M. G. and Dawe, R. K. (2002). Maximum likelihood methods reveal conservation of function among closely related Kinesin families. *J Mol Evol* **54**,(1): 42-53.
- Learned, R. M. (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**,(2): 645-55.
- Learned, R. M. and Connolly, E. L. (1997). Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**,(3): 499-511.
- Lewit-Bentley, A. and Rety, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struc Biol* **10**: 637-43.
- Li, X. and Virshup, D. M. (2002). Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* **269**,(2): 546-52.
- Liu, B., Lee, Y. R. and Pan, R. (2003). Identification of kinesin-related proteins in the phragmoplast. *Cell Biol Int* **27**,(3): 227-8.
- Lluch, M. A., Masferrer, A., Arró, M., Boronat, A., Ferrer, A. (2000). Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **42**,(2): 365-76.
- Lumbreras, V., Campos, N. and Boronat, A. (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J* **8**,(4): 541-9.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**,(5010): 1162-4.

## M

- Mackintosh, C. (1992). Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1137**,(1): 121-6.
- Mackintosh, R. W., Davies, S. P., Clarke, P. R., Weekes, J., Gillespie, J. G., Gibb, B. J. and Hardie, D. G. (1992). Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* **209**,(3): 923-31.

- Manning, B. D. and Snyder, M. (2000). Drivers and passengers wanted! the role of kinesin-associated proteins. *Trends Cell Biol* **10**,(7): 281-9.
- Marcus, A. I., Li, W., Ma, H. and Cyr, R. J. (2003). A Kinesin mutant with an atypical bipolar spindle undergoes normal mitosis. *Mol Biol Cell* **14**,(4): 1717-26.
- Marín, C. (2003). Regulació de l'expressió del gen HMG1 d'*Arabidopsis thaliana*: paper de la regió 5'-transcrita no traduïda. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*, pp 233.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2002). An Endoplasmic Reticulum-Derived Structure That Is Induced under Stress Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**,(4): 1807-14.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003). The ER Body, a Novel Endoplasmic Reticulum-Derived Structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **44**,(7): 661-6.
- McCaskill, D., Croteau, R. (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *TIBTECH* **16**: 349-55.
- McGarvey, D. J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015-26.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,(13): 7004-11.
- Millward, T. A., Zolnierowicz, S. and Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* **24**,(5): 186-91.
- Modis, Y. and Wierenga, R. K. (1999). A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure Fold Des* **7**,(10): 1279-90.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N. and Brady, S. T. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *Embo J* **21**,(3): 281-93.
- Mullen, R. T., Lisenbee, C.S., Miernyk, J.A., Trelease, R.N. (1999). Peroxisomal membrane ascorbate peroxidase is sorted to a membranous network that resembles a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **11**: 2167-85.
- Muranaka, T., Kamide, Y., Suzuki, M., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H. and Yoshida, S. (2003). Knockout of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes for analyzing mevalonate pathway and non-mevalonate pathway. *7th international congress of plant molecular biology. Barcelona*, pp. 171.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-97.

## N

Nilsson, T. and Warren, G. (1994). Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr Biol* **6**: 517-21.

Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y. and Machida, Y. (2002). Expansion of the Cell Plate in Plant Cytokinesis Requires a Kinesin-like Protein/MAPKKK Complex. *Cell* **109**,(1): 87-99.

## O

Oh, S. K., Han, K. H., Ryu, S. B. and Kang, H. (2000). Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Implications in rubber biosynthesis. *J Biol Chem* **275**,(24): 18482-8.

O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N. and Goldstein, S. A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**,(4): 577-88.

Olender, E. H. and Simon, R. D. (1992). The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **267**,(6): 4223-35.

## P

Pérez-Callejón, E., Casamayor, A., Pujol, G., Camps, M., Ferrer, A. and Ariño, J. (1998). Molecular cloning and characterization of two phosphatase 2A catalytic subunit genes from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**,(1-2): 105-12.

## R

Rahman, A., Friedman, D. S. and Goldstein, L. S. (1998). Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. *J Biol Chem* **273**,(25): 15395-403.

Rashotte, A. M., DeLong, A. and Muday, G. K. (2001). Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* **13**,(7): 1683-97.

Re, E. B., Brugger, S. and Learned, M. (1997). Genetic and biochemical analysis of the transmembrane domain of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Cell Biochem* **65**,(4): 443-59.

Reddy, A. S. and Day, I. S. (2001). Kinesins in the *Arabidopsis* genome: A comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* **2**,(1): 2.

Reddy, A. S., Narasimhulu, S. B., Safadi, F. and Golovkin, M. (1996). A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *Plant J* **10**,(1): 9-21.

Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiol* **130**,(3): 1079-89.

Rodríguez-Concepción, M. and Grisse, W. (1999). Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol* **119**,(1): 41-8.

Romagnoli, S., Cai, G. and Cresti, M. (2003). Kinesin-like proteins and transport of pollen tube organelles. *Cell Biol Int* **27**,(3): 255-6.

Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M. and Walter, G. (1994). Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol* **68**,(1): 123-9.

Rundle, S. J., Hartung, A. J., Corum, J. W., 3rd and O'Neill, M. (1995). Characterization of a cDNA encoding the 55 kDa B regulatory subunit of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Plant Mol Biol* **28**,(2): 257-66.

## S

Schnapp, B. J. (2003). Trafficking of signaling modules by kinesin motors. *J Cell Sci* **116**,(11): 2125-35.

Schonthal, A. H. (2001). Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* **170**,(1): 1-13.

Schutze, M. P., Peterson, P. A. and Jackson, M. R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **13**,(7): 1696-705.

Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G. and Schliwa, M. (2000). Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nat Cell Biol* **2**,(6): 333-8.

Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G. and Schliwa, M. (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *Embo J* **16**,(11): 3025-34.

Slabas, A. R., Fordham-Skelton, A. P., Fletcher, D., Martínez-Rivas, J. M., Swinhoe, R., Croy, R. R. and Evans, I. M. (1994). Characterisation of cDNA and genomic clones encoding homologues of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **26**,(4): 1125-38.

Staehelin, L. A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**,(6): 1151-65.

Stermer, B. A., Bianchini, G. M. and Korth, K. L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35**,(7): 1133-40.

Stermer, B. A. and Bostock, R. M. (1987). Involvement of HMGR in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol* **84**: 404-8.

Strack, S., Ruediger, R., Walter, G., Dagda, R. K., Barwacz, C. A. and Cribbs, J. T. (2002). Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly. Identification of contacts between B-family regulatory and scaffolding A subunits. *J Biol Chem* **277**,(23): 20750-5.

Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F. F., Jurgens, G. and Mayer, U. (2002). The *Arabidopsis* HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr Biol* **12**,(2): 153-8.

Sugden, C., Donaghy, P. G., Halford, N. G. and Hardie, D. G. (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* **120**,(1): 257-74.

## T

Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H. and Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* **274**,(24): 17267-74.

Terol, J., Bagues, M., Carrasco, P., Pérez-Alonso, M. and Paricio, N. (2002). Molecular Characterization and Evolution of the Protein Phosphatase 2A B' Regulatory Subunit Family in Plants. *Plant Physiol* **129**,(2): 808-22.

Thykjaer, T., Danielsen, D., She, Q. and Stougaard, J. (1997). Organization and expression of genes in the genomic region surrounding the glutamine synthetase gene Gln1 from *Lotus japonicus*. *Mol Gen Genet* **255**,(6): 628-36.

## V

Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**,(1): 39-50.

Verhey, K. J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B. J., Rapoport, T. A. and Margolis, B. (2001). Cargo of Kinesin Identified as JIP Scaffolding Proteins and Associated Signaling Molecules. *J Cell Biol* **152**,(5): 959-70.

Verhey, K. J. and Rapoport, T. A. (2001). Kinesin carries the signal. *Trends Biochem Sci* **26**,(9): 545-50.

Virshup, D. M. (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* **12**,(2): 180-5.

Voorhoeve, P. M., Hijmans, E. M. and Bernards, R. (1999). Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* **18**,(2): 515-24.

## W

Wentzinger, L. F., Bach, T. J. and Hartmann, M. A. (2002). Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Plant Physiol* **130**,(1): 334-46.

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Dumkong, S. (1990). Hevea calmodulin: regulation of the activity of latex 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Phytochemistry* **29**,(6): 1755-8.

## Y

Yan, Z., Fedorov, S. A., Mumby, M. C. and Williams, R. S. (2000). PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol* **20**,(3): 1021-9.

Yang, C. Y., Spielman, M., Coles, J. P., Li, Y., Ghelani, S., Bourdon, V., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Scott, R. J. and Dickinson, H. G. (2003). TETRASPORE encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *Plant J* **34**,(2): 229-40.

Yu, R. M., Zhou, Y., Xu, Z. F., Chye, M. L. and Kong, R. Y. (2003). Two genes encoding protein phosphatase 2A catalytic subunits are differentially expressed in rice. *Plant Mol Biol* **51**,(3): 295-311.

Yuan, H., Michelsen, K. and Schwappach, B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* **13**: 638-46.

## Z

Zhong, R., Burk, D. H., Morrison, W. H., 3rd and Ye, Z. H. (2002). A Kinesin-like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength. *Plant Cell* **14**,(12): 3101-17.

Zhou, J., Pham, H. T., Ruediger, R. and Walter, G. (2003a). Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *Biochem J* **369**,(2): 387-98.

Zhou, J., Pham, H. T. and Walter, G. (2003b). The Formation and Activity of PP2A Holoenzymes Do Not Depend on the Isoform of the Catalytic Subunit. *J Biol Chem* **278**,(10): 8617-22.



|                |   |
|----------------|---|
| IDI            | Isopentenildifosfat isomerasa                               |
| IPP            | Isopentenildifosfat   |
| IPTG           | Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranòsid                    |
| JIP            | <i>JNK interacting protein</i>                              |
| JNK            | <i>c-Jun N-terminal kinase (JNK)</i>                        |
| KHC            | Cadena pesada de quinesina de tipus I                       |
| KIFs           | Proteïnes de la superfamília de les quinesines              |
| KLC            | Cadena lleugera de quinesina de tipus I                     |
| LS             | Regió del lumen de l'HMGR                                   |
| MBOs           | <i>Membrane-bounded organelles</i>                          |
| MC             | Motiu N-terminal conservat de l'HMGR                        |
| MEP            | 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat                              |
| MPDC           | Mevalonat-5-difosfat descarboxilasa                         |
| MVA            | Àcid mevalònic o mevalonat                                  |
| MVK            | Mevalonat quinasa   |
| MVP            | Mevalonat 5-fosfat  |
| MVPP           | Mevalonat 5-difosfat  |
| NT             | Regió N-terminal citosòlica de l'HMGR                       |
| N-terminal     | Amino-terminal  |
| NAA            | Àcid $\alpha$ -naftalenacètic                               |
| NADPH          | Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat, forma reduïda        |
| OGT            | O-glicosil transferasa                                      |
| ORF            | Pauta de lectura oberta                                     |
| pb, kb         | Parells de bases, kilobases                                 |
| PCR            | Reacció en cadena de la polimerasa                          |
| PMD            | Mevalonat 5-difosfat descarboxilasa                         |
| PMK            | Fosfomevalonat quinasa                                      |
| PMSF           | Fluorur de fenilmetilsulfonil                               |
| PP2A           | Proteïna fosfatasa 2A                                       |
| PR65           | Subunitat A o estructural de la PP2A                        |
| RE             | Reticle endoplasmàtic                                       |
| RNA            | Àcid ribonucleic  |
| rpm            | revolucions per minut                                       |
| SDS-PAGE       | Electroforesi en gel de poliacrilamida-Dodecilsulfat sòdic  |
| SnRK           | <i>Snf-1 related kinase</i> (quinasa relacionada amb Snf-1) |
| SQS            | Esqualè sintasa   |
| SRP            | <i>Signal Recognition Particle</i>                          |
| TPR            | Repeticions de tetratricopèptid                             |
| 5'-UTR, 3'-UTR | Regions 5' i 3' transcrites no traduïdes                    |
| xg             | gravetats   |
| X-Gal          | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranòsid      |