



# Anàlisi de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis thaliana*: implicació en la morfogènesi del reticle endoplasmàtic

Sergio Ferrero Torrero

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





**Anàlisi de l'HMG-CoA reductasa  
d'*Arabidopsis thaliana*: implicació en la  
morfogènesi del reticle endoplasmàtic**

**Sergio Ferrero Torrero**

**Barcelona, 2010**



Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia  
Departament de Biologia i Bioquímica Molecular  
Programa de doctorat de Biotecnologia, Bienni 2001-2003



# **Anàlisi de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis thaliana*: implicació en la morfogènesi del reticle endoplasmàtic**

Memòria presentada per Sergio Ferrero Torrero llicenciat en Biologia per optar  
al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Aquest treball, realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia de la  
Universitat de Barcelona.

**El director de la tesi,**

**l'autor,**

**Dr. Narciso Campos Martínez**

**Sergio Ferrero Torrero**



**A la meva família**





तुम जो भी करो वोह तुच्छ हो जाएगा,  
लेकिन यह बहुत महत्वपूर्ण है की आप करें  
Qualsevol cosa que facis serà insignificant,  
però és molt important que la facis

**M.G.**



# ÍNDEX

## Introducció

<b>1.- OBJECTE D'ESTUDI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.- ELS ISOPRENOIDES</b> .....	<b>4</b>
2.1. – Varietat estructural, funcional i biosíntesi .....	4
2.2.- Distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides.....	6
2.2.1.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del mevalonat.....	7
2.2.2.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del MEP.....	9
2.2.3.- Bescanvi de precursors entre les dues vies de síntesi d'IPP .....	9
2.3.- Famílies multigèniques implicades en la síntesi d'isoprenoides en <i>A. thaliana</i> .....	10
<b>3.- L'HMG-CoA REDUCTASA</b> .....	<b>13</b>
3.1.- Importància de l'enzim en la via del MVA: .....	13
3.2.- Els gens <i>HMG</i> : una família multigènica en plantes .....	14
3.2.1.- La família multigènica <i>HMG</i> a <i>A. thaliana</i> .....	16
3.3.- L'HMGR de plantes .....	17
3.3.1.- Estructura de l'HMGR de plantes .....	17
3.3.2.- El domini N-terminal de l'HMGR de plantes .....	18
3.3.3.- Control de la localització subcel·lular .....	20
3.3.4.- La Proteïna Fosfatasa 2A .....	21
3.3.5.- El domini N-terminal de l'HMGR i la seva implicació en la morfogènesi del RE .....	22
3.4.- Regulació de l'activitat HMGR .....	25
<b>4.- EL RETICLE ENDOPLASMÀTIC</b> .....	<b>29</b>
4.1.- Vesícules derivades del RE .....	29
4.2.- Els <i>ER-bodies</i> .....	30
4.3.- Proteïnes implicades en la formació dels <i>ER-bodies</i> .....	33

## Objectius

<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>37</b>
------------------------	-----------

## Resultats

<b>1.- EFECTE DE L'EXPRESSIÓ D'1S:GFP EN LA MORFOLOGIA DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN CÈL·LULES D'A. THALIANA .....</b>	<b>41</b>
1.1.- Expressió transitòria d'1S:GFP .....	41
1.1.1.- L'1S:GFP indueix la formació de vesícules .....	41
1.1.2.- La formació de vesícules 1S:GFP no és deguda a GFP .....	41
1.1.3.- Desenvolupament d'un nou marcador fluorescent de RE .....	44
1.1.4.- Les vesícules 1S:GFP són part del RE .....	47
1.2.- Expressió d'1S:GFP a plantes transgèniques d' <i>A. thaliana</i> .....	49
1.2.1.- Expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament d' <i>A. thaliana</i> .....	49
1.2.2.- Distribució subcel·lular d'1S:GFP .....	52
1.2.3.- Extinció de la fluorescència d'1S:GFP .....	56
1.2.4.- Motilitat de les vesícules d'1S:GFP .....	58
<b>2.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'HMGR D'A. THALIANA .....</b>	<b>60</b>
2.1.- Assajos d'immunocitoquímica <i>in-situ</i> amb sèrum anti-CD1 .....	60
2.2.- Immunosostracció del sèrum anti-CD1-623 .....	62
2.3.- Colocalització de les vesícules d'HMGR i les vesícules d'1S:GFP .....	64
2.4.- Colocalització de les vesícules d'HMGR i els <i>ER-bodies</i> .....	66
2.4.1.- Anàlisi estadístic de colocalització .....	70
<b>3.- CONTROL DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'HMGR .....</b>	<b>75</b>
3.1.- Paper de PP2A .....	75
3.2.- Paper del gen <i>NAI1</i> .....	78
<b>4.- CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA D'HMGR .....</b>	<b>80</b>
4.1.- Efecte del temps de cultiu en la línia cel·lular MM1 .....	81
4.2.- Efecte de la font de carboni .....	82
4.3.- Efecte d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	84
4.4.- Efecte de xoc osmòtic i salí amb NaCl .....	85
<b>5.- CAPACITAT MORFOGENÈTICA DEL DOMINI DE MEMBRANA D'HMGR1S EN CÈL·LULES DE MAMÍFER .....</b>	<b>86</b>

## Discussió

<b>1.- CAPACITAT MORFOGENÈTICA D'1S:GFP EN A. THALIANA .....</b>	<b>91</b>
1.1.- Formació d'estructures vesiculars derivades de l'expressió d'1S:GFP .....	91
1.1.1.- La formació de vesícules 1S:GFP no és deguda a l'expressió de GFP .....	91
1.1.2.- Les vesícules 1S:GFP són part del RE .....	94
1.2.- Estudis en plantes transgèniques.....	94
1.2.1.- Expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament d' <i>A. thaliana</i> .....	95
1.2.2.- Diferències en la distribució d'1S:GFP a nivell subcel·lular durant el desenvolupament.....	96
1.2.3.- Influència del domini catalític d'HMGR en la localització subcel·lular .....	101
<b>2.- IDENTITAT I FUNCIO DE LES VESÍCULES HMGR .....</b>	<b>103</b>
2.1.- Detecció de vesícules d'HMGR a plantes d' <i>A. thaliana</i> .....	103
2.2.- HMGR localitza als <i>ER-bodies</i> .....	105
2.3.- Control de l'activitat enzimàtica HMGR en resposta a estrès.....	111
2.3.1.- Resposta de l'HMGR a estrès .....	112
2.2.3.- Implicacions de la modulació d'activitat HMGR per estrès .....	113
<b>3.- ESTUDI DE LA CAPACITAT MORFOGENÈTICA DEL DOMINI N-TERMINAL D'HMGR EN UN SISTEMA HETERÒLEG .....</b>	<b>115</b>
<b>4.- CONTROL DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'HMGR.....</b>	<b>117</b>
4.1.- Efecte del bloqueig de PP2A sobre la localització subcel·lular d'HMGR .....	117
4.2.- Localització subcel·lular d'HMGR en plantes mutants <i>nai1-2</i> .....	119

## Conclusions

<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>123</b>
-------------------------	------------

## Material i mètodes

<b>1. MATERIAL BIOLÒGIC.....</b>	<b>129</b>
1.1.- <i>Escherichia coli</i> .....	129
1.2.- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	129
1.3.- <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	129
1.4.- Cèl·lules MM1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	130
1.5.- Cèl·lules CHO d'ovari de hámster.....	130
<b>2.- PLASMIDIS.....</b>	<b>131</b>
2.1.- Expressió transitòria en ceba i fulles d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	131
<b>3.- OLIGONUCLEÒTIDS.....</b>	<b>132</b>
<b>4.- ANTICOSSOS.....</b>	<b>133</b>
4.1.- Obtenció del sèrum anti-CD1[26-8] .....	134
<b>5.- MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC .....</b>	<b>135</b>
5.1.- Mètodes de treball en <i>Escherichia coli</i> .....	135
5.2.- Medis de cultiu de bacteris.....	135
5.3.- Mètodes de treball en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	136
5.3.1.- Esterilització de llavors d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	137
5.4.- Mètodes de treball amb cèl·lules CHO d'ovari de hámster .....	137
<b>6.- BIOLOGIA MOLECULAR I BIOQUÍMICA D'A. THALIANA.....</b>	<b>139</b>
6.1.- Generació de plantes transgèniques d' <i>A. thaliana</i> .....	139
6.1.1.- Descripció del vector utilitzat per generar les plantes transgèniques. ....	139
6.1.2.- Transformació d' <i>A. thaliana</i> .....	139
6.2.- Extracció de DNA genòmic.....	142
<b>7.-TÉCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR .....</b>	<b>143</b>
7.1.-Tecnologia del DNA recombinant .....	143
7.2.- Preparació de cèl·lules competents .....	144
7.3.- Anàlisi de proteïnes mitjançant <i>Western-blot</i> .....	146
7.4.-Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	154

---

<b>8.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR .....</b>	<b>157</b>
8.1.- Microbombardeig de ceba i de fulles <i>d'Arabidopsis thaliana</i> .....	157
8.1.1.- Preparació de les micropartícules .....	157
8.1.2.- Precipitació del DNA sobre les micropartícules.....	157
8.1.3.- Bombardeig de les micropartícules .....	158
8.1.4.- Preparació de la mostra .....	159
8.2.- Microscòpia làser confocal .....	160
8.3.- Immunolocalització <i>in-situ</i> .....	160
8.4.- Microscòpia electrònica sobre cèl·lules CHO .....	162
<b>9.- SOFTWARE .....</b>	<b>163</b>
<b>10.- ASSAIG D'ACTIVITAT HMGR.....</b>	<b>163</b>
10.1.- Obtenció de la mostra .....	163
10.2.- Assaig d'activitat .....	163
10.3.- Quantificació de proteïnes pel mètode Bradford .....	166

## **Bibliografia**

<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>169</b>
---------------------------	------------





## ABREVIATURES

AACT	Acetoacetyl CoA tiolasa
BSA	Seroalbúmina bovina
CA	Cantaridina
CD1	Domini catalític d'HMGR1
cDNA	DNA còpia
CoA	Coenzim A
Col.	Columbia
C-terminal	Carboxi terminal
Da, kDa	Dalton, kilodalton
FITC	Fluoresceïna isotiocianat
DMAPP	Dimetilal-lildifosfat
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DsRed	Proteïna vermella fluorescent ( <i>Discosoma sp. red</i> )
DTT	Ditiotreitòl
DXR	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat reductoisomerasa
DXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat
DXS	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat sintasa
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EGTA	Àcid etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracètic
FPP	Farnesil difosfat
FPS	Farnesil difosfat sintasa
FTasa	Farnesil transferasa
G3P	Gliceraldehid 3-fosfat
GFP	Proteïna verda fluorescent ( <i>green fluorescent protein</i> )
GGPP	Geranilgeranil difosfat
GGPS	Geranilgeranil difosfat sintasa
GPP	Geranil difosfat
GGTasa	Geranilgeranil transferasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A
HMGR	HMG-CoA reductasa
HMGR1L	Isoforma llarga d'HMGR1
HMGR1S	Isoforma curta d'HMGR1
HMGs	HMG-CoA sintasa
IPI	Isopentenildifosfat isomerasa
IPP	Isopentenildifosfat
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranòsid
1L-extra	50 residus aminoacídics extra a N-terminal d'HMGR1L

---

LB	Medi de cultiu Lauria Broth
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat
MVA	Mevalonat o àcid mevalònic
MVK	Mevalonat quinasa
mRNA	RNA missatger
NADP	Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat, forma oxidada
NADPH	Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat, forma reduïda
N-terminal	Amino terminal
pb, kb	Parells de bases, kilobases
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PMD	Mevalonat 5-fosfat quinasa
PMK	Mevalonat 5-difosfodecarboxilasa
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PP	Fosfoproteïna fosfatasa
PP2A	Proteïna fosfatasa 2A
PVDF	Fluorur de polivinilidè
RE	Reticle endoplasmàtic
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
rRNA	RNA ribosomal
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS
SQS	Esqualè sintasa
TLC	Capa prima, silicagel
WS-2	Wassilewskija-2
xg	gravetats
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranòsid

## **INTRODUCCIÓ**

---



## 1.- OBJECTE D'ESTUDI

Aquesta memòria està centrada en l'estudi de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa o HMGR) d'*Arabidopsis thaliana*. Aquest enzim ha sigut objecte de nombrosos estudis, i Goldstein i Brown a l'any 1985 van ser mereixedors del premi Nobel pel seu ampli treball sobre HMGR, la seva regulació a mamífers i el seu paper en el control del metabolisme del colesterol (revisat a Goldstein i Brown, 1990).

L'enzim HMGR catalitza la reacció irreversible de reducció del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonat. Aquest, és el primer intermediari específic de la via del mevalonat (MVA) que s'encarrega de l'aport de substrats per a la síntesi dels compostos isoprenoides, com ara els esterols.

Al genoma d'*A. thaliana* l' HMGR es troba codificada per dos gens que donen lloc a tres isoformes de l'enzim. El gen *hmg1* dona lloc a dues isoformes de l'enzim HMGR que difereixen únicament a nivell de la regió N-terminal citosòlica del domini de membrana. Aquesta diferència, de 50 aminoàcids és suficient per a la localització subcel·lular diferencial d'ambdues proteïnes. Tant la presència de diferents isoformes d'HMGR com la diferència en la seva localització subcel·lular fan pensar que aquestes estan implicades en funcions específiques a *A. thaliana*. L'objecte d'aquesta tesi doctoral és aprofundir en el coneixement de la localització subcel·lular i funció d'HMGR d'aquest organisme model.

## 2.- ELS ISOPRENOIDES

### 2.1. – Varietat estructural, funcional i biosíntesi

Els isoprenoides, són un ampli grup de compostos, també anomenats terpenoides, que se sintetitzen a tots els organismes coneguts. És un grup extremadament divers, tant pel que fa a funcions com a estructures, i és a les plantes on trobem una major diversitat (Chapman, 2000). S'han identificat més de 29000 compostos isoprenoides diferents amb funcions diverses a la planta que van des de la formació i el manteniment de diferents teixits, o la resposta i/o adaptació al medi. Per exemple existeixen els isoprenoides que formen part de la cadena de transport d'electrons (com la cadena lateral de la clorofil·la), reguladors del creixement i desenvolupament (citoquinines, àcid abscísic), reguladors del cicle cel·lular formant part de cascades de senyalització (proteïnes prenilades), estructurals (esterols de membrana), protectors de la maquinària fotosintètica (carotenoides), etc (Chappel, 1995a, b; McGarvey i Croteau, 1995; Bramley, 1997; McCaskill i Croteau, 1998).

A banda d'un gran nombre de compostos isoprenoides, que són comuns a totes les espècies de plantes, dits essencials, trobem també que cada espècie ha desenvolupat una varietat de compostos específics que li permeten una millor adaptació al medi concret on viuen. Aquests isoprenoides són molt diversos i poden tenir diferents funcions com ara l'afavoriment de la pol·linització o bé la defensa contra patògens. Alguns d'aquests productes han estat aprofitats per la indústria per a diferents usos (pigments, aromes) o bé com a productes beneficiosos per l'home com els fitosterols o els carotenoides com a precursor de la vitamina A.

En contrast amb aquesta gran diversitat funcional i estructural, tots els compostos isoprenoides, deriven d'un únic precursor comú de cinc àtoms de carboni, l'isopentenil difosfat (IPP) i del seu isòmer dimetilal·lildifosfat (DMAPP), que reben el nom d'unitats d'isoprè (Figura I.1). Aquestes unitats d'isoprè són la base estructural per a la formació dels isoprenoides (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey i Croteau, 1995; Bramley, 1997; Rodríguez-Concepció i Boronat, 2002). Els enzims prenil-transferases, catalitzen la reacció de condensació d'unitats d'isoprè que donen lloc a prenildifosfats de cadena lineal, com el geranil difosfat (GPP, 10 carbonis), el farnesil difosfat (FPP, 15 carbonis) i els geranilgeranil difosfat (GGPP, 30 carbonis). La condensació de dues molècules d'FPP donen lloc a l'esqualè (C30), i la condensació de dues molècules de GGPP donen lloc al fitoè, en reaccions catalitzades respectivament per la esqualè i la fitoè sintasa. A partir d'aquests prenildifosfats es formaran les diferents branques de la via per donar lloc a la gran varietat

estructural d'aquests compostos, donant-se per això elongacions electrofíliques, ciclacions i reordenacions (revisat a Gray, 1987; Chappell 1995b; McGarvey i Croteau, 1995). En base al nombre d'àtoms de carboni, trobem: hemiterpens o compostos de 5 àtoms de carboni que deriven de l'IPP; monoterpens, de 10 àtoms de carboni, derivats del GPP; compostos de 15 àtoms de carboni, o sesquiterpens, derivats del FPP; els diterpens, derivats del GGPP i que tenen 20 àtoms de carboni. A partir de la condensació de dues molècules de FPP es formen els triterpens (C30), mentre que la condensació de dues molècules de GGPP forma els tetraterpens (C40). Els politerpens provenen de prenildifosfats de cadena més llarga.

La gran varietat de compostos s'incrementa gràcies a diferents reaccions sobre aquests compostos, com ara processos d'hidroxilació, metilació, isomerització, desmetilació o reducció. Alguns grups prenils són transferits també a altres components cel·lulars com és el cas de la cadena fitol al grup hemo de la clorofil·la.

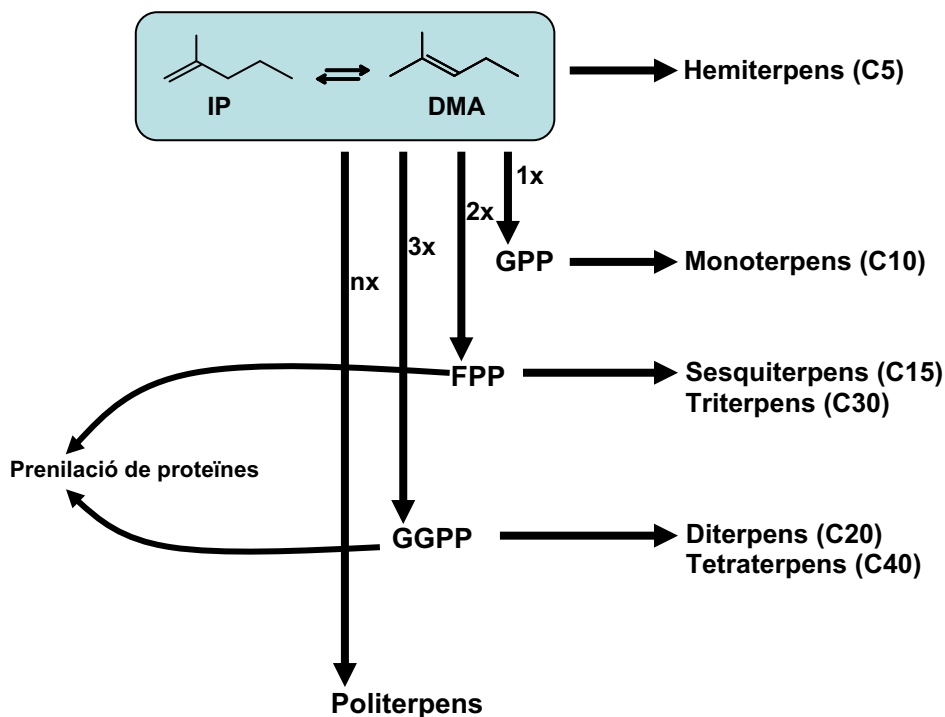


Figura I.1: Esquema de la biosíntesi d'isoprenoides a partir dels prenildifosfats IPP, GPP, FPP i GGPP.



## 2.2.- Distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes

Al 1950 es descobreix la via del mevalonat (MVA), en animals i llevats (revisat a Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002), i es pensà que d'ella en derivaven tots els isoprenoides sintetitzats. En alguns casos, però, restà impossible determinar com se sintetitzaven alguns d'aquests compostos, tenint en consideració només aquesta via (revisat a Lichtenthaler *et al.*, 1997; McCaskill, 1998; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Cap a finals dels anys 90, es determina a bacteris i plantes l'existència d'una via alternativa de la síntesi d'isoprenoides, la via del metileritritol 4-fosfat (MEP).

La major part d'organismes sintetitza els precursors dels terpenoides, IPP i DMAPP, exclusivament a partir d'una de les dues vies de síntesi (revisat a Lichtenthaler *et al.*, 1997a; Lange *et al.*, 2000; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). Sembla que la via del MEP, està relacionada amb els precursors procariotes que van donar lloc als cloroplasts, mentre que la cèl·lula eucariota va desenvolupar la via del mevalonat, com els heteròtrofs, fongs i metazous. Els animals, els fongs i els arqueobacteris sintetitzen tots els seus isoprenoides a partir de la via del mevalonat. En eubacteris, en la majoria d'algues i en alguns protozous, aquesta síntesi té lloc gràcies a la via del MEP. Hi ha alguns casos en que aquestes dues vies coexisteixen: en moltes, en algunes soques d'actinomicets, en algunes algues i en plantes superiors.

Així, són les plantes el grup d'organismes més extens i important, on tots els seus membres tenen la capacitat de síntesi d'IPP i DMAPP a partir de dues vies diferents que es troben compartimentades (Figura 1.2). En els plastidis es troba la via del MEP, mentre que la síntesi d'IPP per la via del mevalonat, té lloc al citoplasma (revisat a Lichtenthaler, 1997a; McCaskill, 1998; Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). Per a la síntesi d'ubiquinona al mitocondri, l'IPP necessari és importat a dins l'òrganul des del citoplasma.

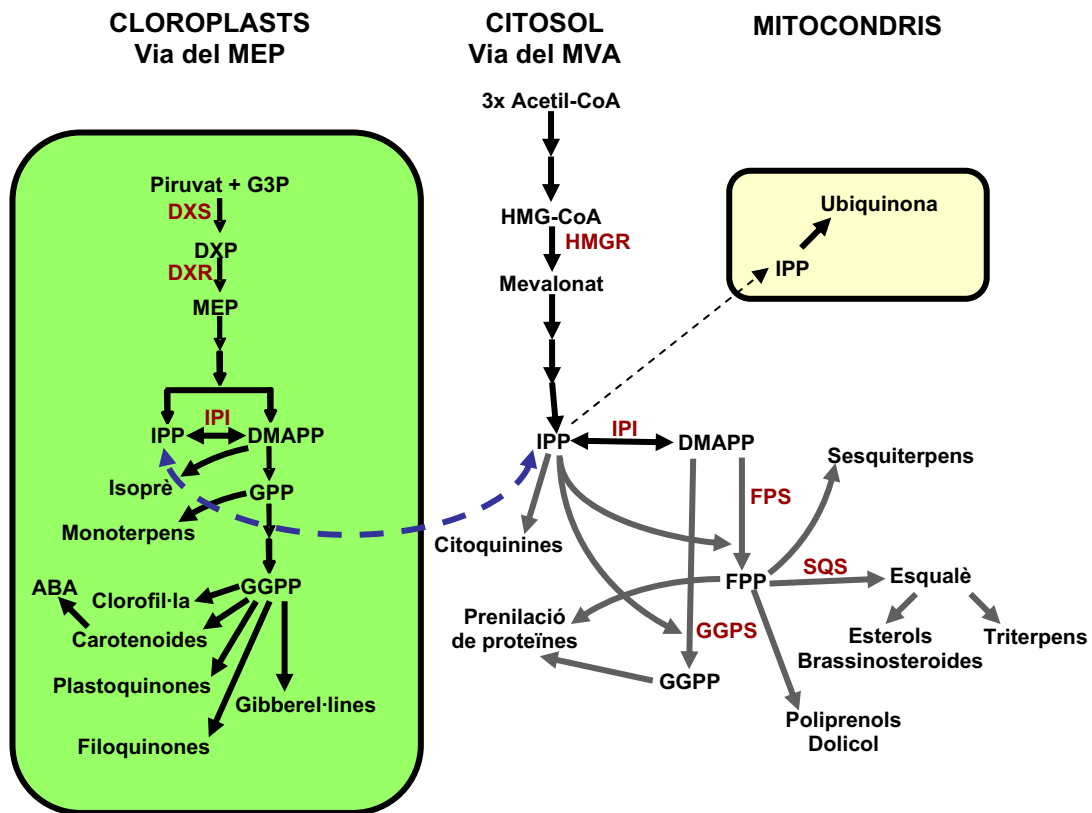


Figura 1.2: Biosíntesi d'isoprenoides a la cèl·lula vegetal (adaptat de Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). Es mostren les dues vies de síntesi d'IPP: la via del mevalonat (MVA), citosòlica i la via del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP), que té lloc a plastidis. ABA, àcid abscísic; DXP, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat; DXR, deoxixilulosa-5-fosfat reductoisomerasa; DXS, deoxixilulosa-5-fosfat sintasa; FPP, farnesil difosfat; FPS, farnesil difosfat sintasa; G3P, gliceraldehid 3-fosfat; GGPP, geranilgeranil difosfat; GGPS, GGPP sintasa; GPP, geranil difosfat; IPI, isopentenil difosfat isomerasa; SQS, esqualè sintasa.

### 2.2.1.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del mevalonat

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la biosíntesi d'isoprenoides citosòlics té lloc gràcies a la producció d'IPP en aquest compartiment a través de la via del MVA (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey i Croteau, 1995; McCaskill, 1998). Aquesta via s'inicia a partir de la condensació seqüencial en dues reaccions de 3 molècules d'acetil-CoA per a donar lloc al 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzim A (HMG-CoA), gràcies a l'acció de la acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) i la HMG-CoA sintasa (HMGS). Posteriorment el HMG-CoA és reduït per la HMG-CoA reductasa (HMGR) per donar lloc a MVA,

utilitzant NADPH com a cofactor. És aquest últim pas el limitant d'aquesta via de síntesi d'isoprenoides. Finalment el MVA és doblement fosforilat per l'acció de la mevalonat quinasa (MVK) i la fosfomevalonat quinasa (PMK), i pateix una descarboxilació mitjançant la mevalonat 5-difosfat descarboxilasa (PMD), donant lloc a una molècula d'IPP. L'isòmer DMAPP del IPP es forma gràcies a l'acció de la isopentenil difosfat isomerasa (IPI) (Figura I.3).

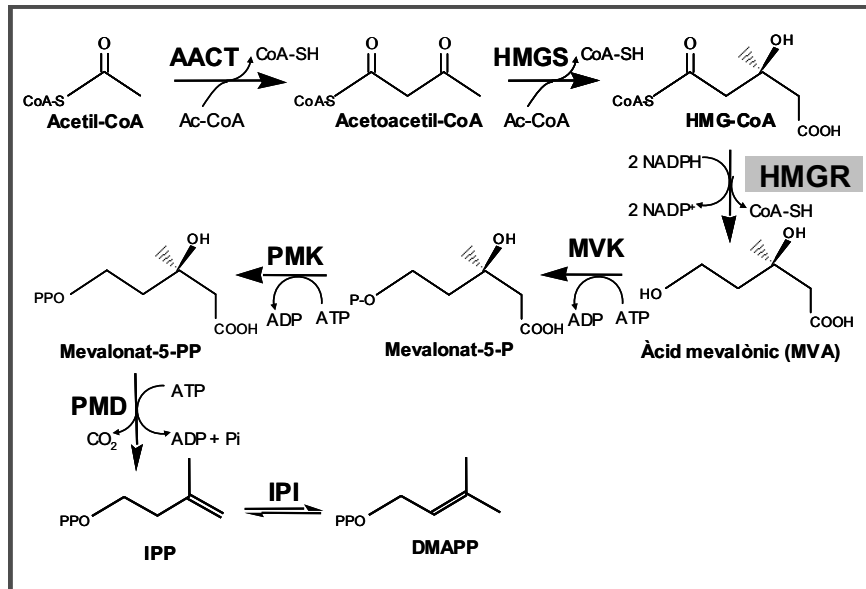


Figura I.3: La via del mevalonat. *AACT*, acetoacetil-CoA tiolasa; *HMGS*, HMG-CoA sintasa; *MVK*, mevalonat quinasa; *PMK*, fosfomevalonat quinasa; *PMD*, difosfomevalonat descarboxilasa; *IPI*, IPP isomerasa.

Els isoprenoides de plantes que deriven de la via del mevalonat són altament diversos. A partir de l'FPP la via es ramifica donant lloc a diferents isoprenoides (Figura I.2). A partir d'ells se sintetitza l'esqualè, que és, al seu torn, mitjançant ciclació, el precursor d'esterols, i triterpens. És a partir dels esterols que en deriven els brassinosteroides. També a partir de la ciclació de l'FPP se sintetitzen els poliprenols i els sesquiterpens. Al mateix temps aquest compost és substrat per la prenilació de proteïnes, així com ho és també el GGPP. A partir dels prenil difosfats de cadena llarga (<C40) es formen els dolícols, necessaris per a la glicosilació de proteïnes, i els politerpens. Alguns derivats d'unitats d'isoprè com ara les citoquinines, tenen un origen incert i controvertit, però s'ha postulat que a la ruta del MVA es genera la cis-zeatina (Kasahara *et al.*, 2004). D'altra banda, l'IPP generat per la via del MVA al citosol, és importat a mitocondris on té lloc la síntesi de la cadena lateral de la ubiquinona.

### 2.2.2.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del MEP

Com s'ha comentat anteriorment, en plantes superiors, coexisteixen dues rutes per a la biosíntesi d'isoprenoides, la via del MVA, comentada en l'apartat anterior, i la via del MEP. La raó de la coexistència d'ambdues vies en plantes, podria ser deguda al fet que la complexitat de compostos i funcions en aquests organismes, és tan alta, que es necessitarien les dues vies per donar lloc a tal quantitat de molècules diferents.

La ruta del MEP es dona completament a l'interior dels plastidis i general els precursors IPP i DMAPP dels isoprenoides plastídics.

### 2.2.3.- Bescanvi de precursors entre les dues vies de síntesi d'IPP

Com s'ha comentat anteriorment, la major part d'organismes presenten només una de les dues vies per a la biosíntesi d'isoprenoides. Són pocs els casos en que trobem ambdues vies coexistent, i entre aquests trobem les plantes. Ja hem vist que a plantes les dues vies de síntesi d'isoprenoides, es troben compartimentades, la via del MVA té lloc al citoplasma, mentre la via del MEP té lloc als plastidis. A pesar d'aquesta separació física entre ambdues vies, s'ha pogut comprovar que existeix cert bescanvi d'IPP i/o d'algun derivat posterior de les vies (Figura 1.2).

Per a estudiar aquest fenomen s'han utilitzat plantes amb una de les dues vies bloquejades, bé per una mutació en algun dels seus gens, o bé amb inhibidors específics per un dels enzims de la via. En plàntules d'*A. thaliana*, el tractament amb un inhibidor específic de l'enzim DXR, la fosmidomicina, inhibeix el creixement i provoca albinisme. Les estatines (com la mevinolina), en canvi, són inhibidors de l'HMGR de la via del MVA, provocant també una aturada del creixement, adoptant les plàntules un color verd intens. Quan en aquests casos s'hi afegeix un substrat de la via bloquejada, mevalonat per a la via del MVA, i desoxixilulosa per a la via del MEP, es recupera el fenotip com és d'esperar.

En aquestes plantes, amb una de les vies de síntesi d'isoprenoides bloquejada, se li afegeix substrats de la via que resta activa, s'observa un rescat parcial del fenotip. Com a exemple trobem el cas del mutant *cla1-1*, deficient en l'enzim DXS, que presenta una recuperació parcial del creixement quan

se'l suplementa amb mevalonat (Kasahara *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2002). Aquestes dades indiquen que existeix un intercanvi d'IPP entre ambdues vies de síntesi d'isoprenoides, a pesar de la compartimentació. Aquest bescanvi s'ha estudiat també en altres sistemes com ara les cèl·lules en cultiu de la línia BY-2 de tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2). També en aquest cas, s'observa una recuperació del creixement gràcies a la suplementació de substrat de la via activa. Gràcies al marcatge radioactiu dels substrats utilitzats per al rescat de la inhibició, es va poder deduir el bescanvi d'IPP entre vies, o bé d'alguns dels seus derivats posteriors (Hemmerlin *et al.*, 2003).

Recentment s'ha proposat que el mecanisme d'intercanvi de substrats de les vies de síntesi d'isoprenoides podria estar regulat negativament per la llum, gràcies al mutant *rim-1* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). Aquest mutant és hiposensible a llum, ja que té una alteració a nivell del fitocrom-B i per tant és defectiva en la transducció de senyal generada per la llum. Les plantes *rim-1* presenten un retard en el desenvolupament fotomorfogènic, i presenten uns hipocòtils allargats simulant plantes etiolades, i també retard en la formació de cloroplasts. Aquests mutants presenten una resistència augmentada tant a mevinolina com a fosmidomicina, inhibidors respectivament de les vies del MVA i del MEP. També presenten una major activitat HMGR (via del MVA) i per tant la resistència a fosmidomicina podria ser deguda a l'intercanvi de substrats que aniria des de la via del MVA cap als plastidis. En la mateixa línia en estudis d'incorporació d'acetat, MVA i IPP marcats radioactivament en fruit de tomàquet, s'ha trobat presència de carotenoides i quinones plastídiques marcats, així com la recuperació de l'IPP marcat a l'interior dels cromoplasts, demostrant l'intercanvi d'IPP i MVA des de el citosol cap al cromoplast en pericarp (Angaman, 2009).

En quant a la proteïna responsable d'aquest intercanvi de precursors isoprenoides, malgrat els intents en els últims anys per tal d'identificar-la, encara és desconeguda. Treballs recents, utilitzant cloroplasts d'espinaç (Bick i Lange, 2003), han demostrat que a la membrana interna dels cloroplasts es produeix un mecanisme simport amb protons, i que l'eficiència d'aquest transport és major en el sentit plastidi cap al citoplasma.

### **2.3.- Famílies multigèniques implicades en la síntesi d'isoprenoides en *A. thaliana***

Des de la seqüenciació de genomes, en aquest cas d'*A. thaliana*, s'ha demostrat una duplicació ancestral, i una pèrdua de gens, així com una duplicació local d'alguns gens. Sovint, algunes proteïnes

són codificades per famílies multigèniques, degut a aquestes duplicacions. Aquestes duplicacions tenen com a conseqüència que alguns d'aquests gens poden conservar les mateixes funcions, però també dona peu a diferents especialitzacions, i fins i tot a adquirir noves funcions. A *A. thaliana*, gràcies a la seqüenciació del seu genoma, s'ha pogut comprovar que els gens que pertanyen a famílies multigèniques, es troben pròxims a nivell cromosòmic organitzats en *clusters* (Lange i Ghassemian, 2003).

En el cas d' *A. thaliana*, i més concretament, dels gens que codifiquen per proteïnes de la síntesi d'isoprenoides, és especialment destacable l'existència de nombroses d'aquestes famílies multigèniques (taula 1). Sovint les diferents isoformes proteiques provinents d'una família multigènica presenten una expressió diferencial durant el desenvolupament o bé localitzacions subcel·lulars diferents. Com a exemple, les isoformes de l'enzim geranilgeranil difosfat sintasa (GGPS): GGPS1 es troba localitzada al mitocondri, implicada en la síntesi d'ubiquinona, mentre que GGPS3 i GGPS4 es troben localitzades al reticle endoplasmàtic i participen en la síntesi d'isoprenoides citosòlics (Lange i Ghassemian, 2003). També a la via del MEP d'*A. thaliana* trobem algun exemple de coexistència d' isoformes. En concret és el cas de la DXS, de la qual només s'ha pogut demostrar la funció per a DXS1. Les isoformes DXS2 i DXS3, a pesar de la seva alta homologia amb DXS1, no s'ha pogut demostrar la seva funció.

Totes aquestes dades, indiquen que les vies de síntesi d'isoprenoides tenen una regulació molt fina, i que aquesta respon a les necessitats d'aquests compostos a nivell cel·lular, tissular, de planta, i durant les diferents etapes del desenvolupament.

Taula 1.1: Famílies multigèniques que codifiquen per alguns dels enzims implicats en la biosíntesi d'isoprenoides, tant en la via del MVA, com del MEP, d'*A. thaliana*

Enzim	Gens	Isoformes	Característiques	Referències
Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT)	• <i>AAT1</i>	• AACT1	• Citosòlica; expressió constitutiva	(Ahumada, 2001)
	• <i>AAT2</i>	• AACT2	• Peroxisomal; expressió en inflorescències i en arrels	
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> , 1995b)
	• <i>HMG2</i>	• HMGR2	• Expressió en teixits meristemàtics, florals i arrels	(Enjuto <i>et al.</i> , 1995)
Mevalonat 5-difosfat descarboxilasa (PMD)	• <i>PMD1</i>	• PMD1		(Cordier <i>et al.</i> , 1999)
	• <i>PMD2</i>	• PMD2		(Lange and Ghassemian, 2003)
Desoxixilulosa 5-fosfat sintasa (DXS)	• <i>DXS1</i>	• DXS1	• Plastídica	(Carretero-Paulet, 2003)
	• <i>DXS2</i>	• DXS2	• Hipotètica DXS proplastídica	
	• <i>DXS3</i>	• DXS3	• Funció desconeguda	
Isopentenil difosfat isomerasa (IPI)	• <i>IPI1</i>	• IPI1	• Localització plastídica i citosòlica	(Lange and Ghassemian, 2003)
	• <i>IPI2</i>	• IPI2	• Localització plastídica i citosòlica	
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		
Geranilgeranil difosfat sintasa (GGPS)	• <i>GGPS1</i>	• GGPS1	• Citosòlica	(Lange and Ghassemian, 2003)
	• <i>GGPS2</i>	• GGPS2	• Plastídica	
	• <i>GGPS3</i>	• GGPS3	• Citosòlica	
	• <i>GGPS4</i>	• GGPS4	• Citosòlica	
	• <i>GGPS12</i>	• GGPS12	• Plastídica	

### 3.- L'HMG-CoA REDUCTASA

#### 3.1.- Importància de l'enzim en la via del MVA:

El mevalonat és el primer precursor específic d'isoprenoides en arqueobacteris, *Streptomyces*, en llevats, animals, i també en el citosol de les cèl·lules vegetals. La síntesi de MVA a partir d'HMG-CoA és catalitzada per l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, també anomenat HMG-CoA reductasa, o simplement HMGR. Aquest enzim utilitza dues molècules de NADPH com a cofactor en la reacció.

L'HMGR s'ha estudiat àmpliament en llevats i mamífers, ja que la reacció que catalitza és el pas limitant de la síntesi d'ergosterol i colesterol respectivament (revisat a Goldstein i Brown, 1990; Hampton, 2002). Tant en llevats com a cèl·lules animals, el control sobre l'activitat HMGR és molt fi i complex, i inclou diversos mecanismes reguladors tant a curt plaç (inhibició competitiva, efectes al·lostèrics, fosforilació, proteòlisi regulada) com a llarg plaç (control transcripcional) (revisat a Goldstein i Brown, 1990; Hampton *et al.*, 1996)

En plantes també s'ha descrit que la reacció catalitzada per l'HMGR és limitant (Stermer *et al.*, 1994; Chappel *et al.*, 1995c) Concretament, a *A. thaliana* la sobreexpressió del domini catalític de la isoforma HMGR1S provoca un augment d'esterols d'entre 3 i 10 vegades (González, 2002). La complexa diversitat de compostos isoprenoides presents en plantes fan pensar però, que la HMGR no és l'únic pas de regulació a la via del MVA. La sobreexpressió del domini catalític de la HMGR de hámster provocà un augment de l'activitat HMGR entre 3 i 6 vegades (Chappel *et al.*, 1995c). No obstant això en mesurar els productes finals de síntesi (sitosterol, campesterol i estigmaesterol) es va comprovar que els nivells eren normals, mentre que els nivells de cicloartenol, un compost intermediari, augmentaren unes cent vegades. Per tant, en tabac, el pas posterior a la síntesi del cicloartenol, catalitzat per la C24-esterol metiltransferasa, és també un pas limitant de la via i està molt regulat. Treballs posteriors on s'expressà també aquest enzim, provocaren una acumulació dels productes finals demostrant que poden haver-hi diversos punts de regulació a la via del MVA (Holmberg *et al.*, 2002).



### 3.2.- Els gens *HMG*: una família multigènica en plantes

L'HMGR de mamífers és codificada per un únic gen, mentre que en llevats aquest enzim està codificat per dos gens, *HMG1* i *HMG2* (Hampton *et al.*, 1996). A llevat, la presència de dues variants d'HMGR codificades per dos gens representa un avantatge d'adaptabilitat a diferents circumstàncies del medi. En aerobiosi, s'indueix l'expressió de *HMG1*. En condicions anaeròbiques, en canvi, degut a la demanda d'oxigen d'alguns dels passos intermedis de la síntesi d'ergosterol, el flux de la via és interromput. És en aquestes condicions que s'expressa *HMG2* que estaria implicada en la síntesi d'altres isoprenoides importants per als llevats, evitant l'acumulació d'intermediaris tòxics.

En totes les espècies conegudes de plantes l'HMGR està codificada per una família multigènica. En aquests casos, com en el llevat, sembla que la presència de diferents gens i isoformes per un mateix enzim, respondria a la necessitat d'ajustar la maquinària biosintètica d'isoprenoides en resposta a diferents estímuls i/o necessitats de la planta.

En el cas de tomàquet (*Lycopersicon esculentum*) l'HMGR està codificada per quatre gens (*HMG1*, *HMG2*, *HMG3* i *HMG4*). Se sap que el gen *HMG1*, s'expressa en fruits immadurs en desenvolupament, mentre que l'expressió d'aquest gen en fases de maduració més avançades del fruit de tomàquet és baixa (Narita i Gruissem, 1989). L'expressió del gen *HMG2*, és, en canvi, ràpidament induïda, en els teixits pròxims al lloc d'atac de diferent tipus de patògens (Cramer *et al.*, 1993). Tractaments amb l'elicitador fúngic àcid araquidònic provoquen un augment de l'expressió a fruit d'*HMG2* i una disminució de l'expressió d'*HMG1* (Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999) Així sembla que *HMG2* estaria implicat en la síntesi de sesquiterpens (fitoalexines defensives), mentre que *HMG1* estaria implicat en la síntesi d'esterols necessaris per a la formació de membranes.

Un altre cas paradigmàtic de l'especialització de diferents isoformes de HMGR és la patata (*Solanum tuberosum*). En aquesta espècie, s'han identificat al menys 12 gens que s'ha classificat en tres famílies diferents: *hmg1*, *hmg2* i *hmg3*. Quan es produeix una ferida es produeix una inducció dels gens de la família *hmg1*, mentre disminueix l'expressió dels gens pertanyents a les altres dues famílies. Els tractaments amb àcid araquidònic (elicitador) o amb el fong *Phytophthora infestans*, provoquen la inducció de l'expressió dels gens de les famílies *hmg2* i *hmg3*, que va associada a un augment en la síntesi de fitoalexines (Choi *et al.*, 1992) (Figura I.4).

A *Hevea brasiliensis* trobem tres gens que codifiquen per HMGR: *HMG1*, *HMG2* i *HMG3*. L'expressió de *HMG1* es dona principalment en els laticífers (cèl·lules secretores) i està induïda per etilè, de manera que sembla estar implicada en la síntesi de làtex en aquesta espècie. Per contra, *HMG3* és d'expressió ubiqüa i constitutiva, i estaria implicat en la biosíntesi d'isoprenoides (Chye *et al.*, 1992).

També en d'altres espècies s'han identificat famílies multigèniques que codifiquen per l'HMGR. En *Raphanus sativus* (Ferrer *et al.*, 1990), en *Pisum sativum*, *Nicotiana sylvestris* (Genschik *et al.*, 1992), *Triticum aestivum* (Aoyagi *et al.*, 1993), *Catharanthus roseus* o *Catharantus acuminata* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997) que estan expressades diferencialment en resposta a situacions d'estrès o desenvolupament.

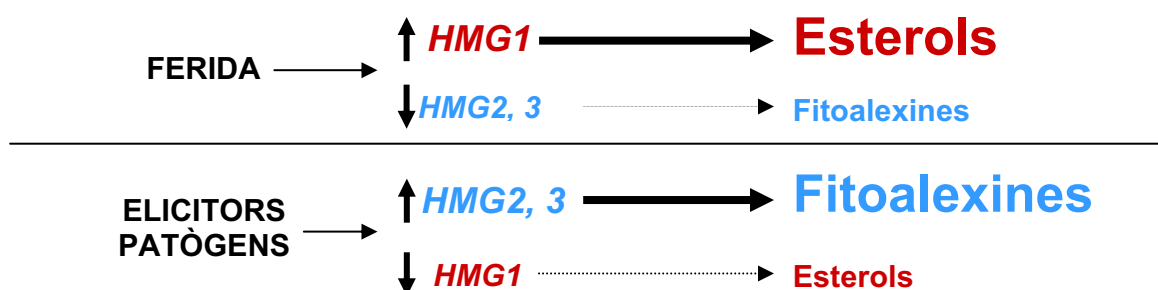


Figura I.4: Especialització de les famílies de gens *HMG* a patata. La inducció dels gens *HMG1* per ferida, produeix la síntesi d'esterols, mentre un atac per patògens o un tractament amb àcid araquidònic (elicitor) produeix un augment en l'expressió dels gens *HMG2* i *HMG3* donant lloc a una major síntesi de fitoalexines.

S'ha proposat que la N-glicosilació que presenten algunes de les isoformes d'HMGR de diverses espècies a la seqüència que separa les dues seqüències transmembrana (veure apartat 3.3.1) pot tenir a veure amb l'especialització funcional. S'ha vist que les isoformes de la proteïna implicades en la síntesi de metabòlits secundaris com fitoalexines tenen aquest lloc de N-glicosilació, mentre que les dedicades a la síntesi d'esterols en teixits meristemàtics no el presenten (Denbow *et al.*, 1996; McCaskill, 1998).

### 3.2.1.- La família multigènica HMG d'*A. thaliana*

A *A. thaliana* l'HMGR està codificada per dos gens: *HMG1* i *HMG2*. A partir del gen *HMG1* se sintetitzen dos transcrits i per tant dues proteïnes. Gràcies a la utilització de dos inicis de transcripció diferents es tradueixen dues isoformes de la proteïna. El transcrit *HMGR1S* és ubicu i de nivells molt elevats, mentre que el transcrit *HMGR1L* es troba principalment en plàntules, inflorescències i rels (figura I.5, panells A i B) (Enjuto *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995). La diferència entre ambdues isoformes, deguda a la utilització dels dos inicis de transcripció, es basa en un domini extra a N-terminal de la proteïna HMGR1L de 50 aminoàcids (Lumbreras *et al.*, 1995). Per la seva banda el gen *HMG2* s'expressa en teixits meristemàtics, rels i teixits florals i codifica per un única isoforma de la proteïna, HMGR2 (Enjuto *et al.*, 1994).

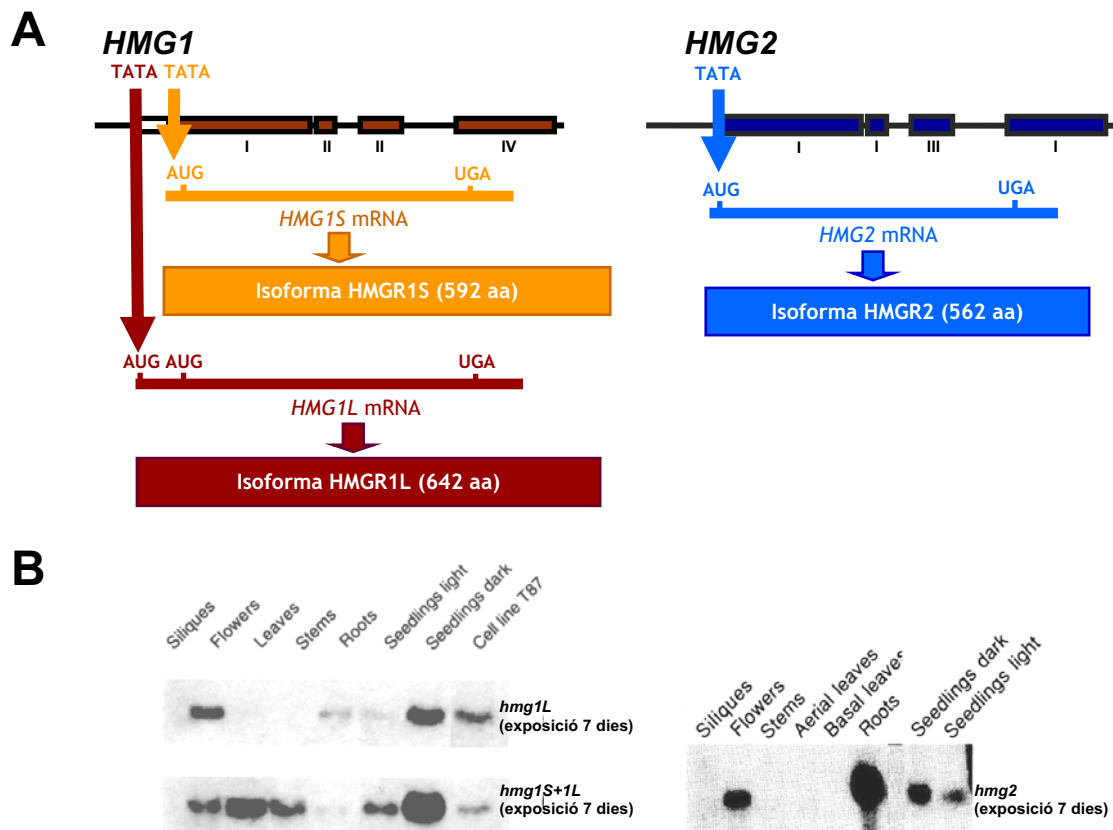


Figura I.5: Esquema i expressió dels gens *HMG* d'*A. thaliana*. **(A)** Organització estructural dels gens *HMG* i de les proteïnes que codifiquen. Les isoformes HMGR1S i HMGR1L estan codificades al gen *HMG1*, gràcies a la utilització d'un inici de transcripció alternatiu. Les caixes representen els exons dels gens, i les línies que les separen, els introns. **(B)** Patró d'expressió dels transcrits *hmg1S*, *hmg1L* (extret de Lumbreras *et al.*, 1995) i *hmg2* (extret de Enjuto *et al.*, 1994) per *Northern Blot*. Entre parèntesi s'indica el temps d'exposició dels films revelats, indicatiu del nivell d'expressió dels gens.

### 3.3.- L'HMGR de plantes

L'HMGR ha estat classificada en dues subfamílies d'acord amb la seqüència del domini catalític: la classe I formada per HMGR eucariotes, i la classe II formada per HMGR procariotes (Bochar *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2000). L'HMGR de classe I es caracteritza per tenir un domini transmembrana a N-terminal de la proteïna, a excepció de les HMGR d'arqueobacteris, i les de *Trypanosoma cruzi* i *Leishmania major* (Pena-Diaz, 1997). Per la seva banda les HMGR de classe II són solubles. A pesar de la separació en dues classes, el domini catalític conserva una identitat d'entre el 14% al 20% entre elles (Lange *et al.*, 2000), i els residus clau per a reconeixement del substrat i per a la catàlisi, es troben conservats en totes elles.

L'HMGR de classe I de plantes, animals i fongs està formada per un domini N-terminal de membrana i pel domini C-terminal on es troba l'activitat catalítica. El domini N-terminal conté seqüències transmembrana que ancoren la proteïna a la membrana del reticle endoplasmàtic (RE). L'HMGR de mamífers conté vuit seqüències transmembrana (Brown i Simoni, 1984), la de llevat en conté set (revisat a Hampton *et al.*, 1996), mentre que a plantes el domini N-terminal conté només dues (Campos i Boronat, 1995). Els dominis transmembrana de mamífers i llevats contenen la informació necessària per a la retenció i ancoratge de la proteïna al RE, així com per definir la seva topologia (Basson *et al.*, 1988; Olender i Simoni, 1992).

El domini catalític de l'HMGR presenta una gran similitud en tots els organismes. Estudis cristal·logràfics van demostrar que l'HMGR humana forma tetràmers i que les quatre subunitats donen lloc a quatre centres catalítics, cadascun d'ells format a la interfase de dos monòmers (Istvan *et al.*, 2000). A plantes, s'ha estudiat el cas d'*Hevea* i de rave (Bach, 1987), que semblarien formar tetràmers, mentre que a patata la unitat funcional seria un dímer (Kondo i Oba, 1986).

#### 3.3.1.- Estructura de l'HMGR de plantes

L'HMGR de plantes és una proteïna de membrana, ancorada al RE, i que està formada per dos dominis. Per una banda trobem el domini N-terminal o de membrana que conté la informació per l'ancoratge a la membrana del RE i per a la seva localització subcel·lular, i per altra el domini C-terminal on es troba l'activitat catalítica. Dins el domini N-terminal o de membrana trobem una regió citosòlica molt divergida entre isoformes, la zona de les seqüències transmembrana, i una regió

d'unió (*linker*) amb el domini C-terminal. Per la seva banda, el domini C-terminal és el responsable de l'activitat enzimàtica de la proteïna (Campos i Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996; Re *et al.*, 1997).

Les seqüències transmembrana són dues seqüències hidrofòbiques, i són les responsables de l'ancoratge i retenció de l'HMGR a la membrana del RE. Degut a la presència d'aquestes seqüències, que són reconegudes per la Partícula de Reconeixement de Senyal (SRP), l'HMGR s'insereix al RE de manera cotraduccional, en un procés que determina la topologia de la proteïna. Aquest model de inserció a RE cotraduccionalment s'ha demostrat en les isoformes d'HMGR d' *A. thaliana* i per dues isoformes de tomàquet (Campos i Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996).

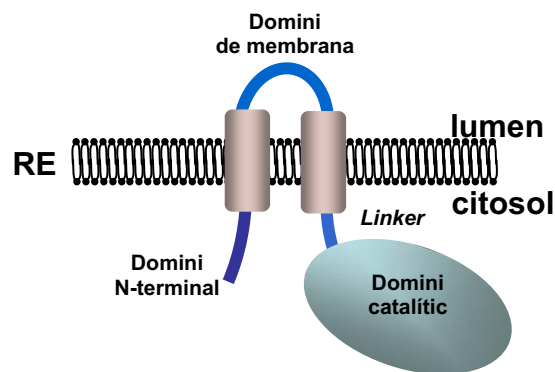


Figura I.6: Topologia de l'HMGR de plantes a la membrana del RE. El domini N-terminal inclou: una regió N-terminal citosòlica, la regió transmembrana (formada al seu torn per dos seqüències transmembrana ancorades al RE i una zona d'unió entre elles encarada al lumen del RE) i el *linker* o regió d'unió entre els dos dominis de la proteïna. Per la seva banda en el domini C-terminal trobem el domini catalític.

### 3.3.2.- El domini N-terminal de l'HMGR de plantes

L'HMGR es troba ancorada a la membrana del RE mentre que la reacció enzimàtica que catalitza té lloc al citosol. En això influeix, com s'ha comentat en l'apartat anterior, la topologia de la proteïna gràcies al domini transmembrana format per dues seqüències transmembrana hidrofòbiques (Campos i Boronat 1995). El domini catalític, doncs, està exposat cap al citosol, de la mateixa manera que ho està el domini N-terminal, que es troba divergit no només entre classes I i II, o entre organismes, sinó també entre isoformes d'una mateixa espècie. A llevats i mamífers, el domini N-terminal citosòlic és necessari per a la localització subcel·lular, per establir correctament la topologia proteica i també per a la seva estabilitat (Gil *et al.*, 1985; Basson *et al.*, 1988; Olender i Simoni, 1992; Gardner i Hampton 1999b).

La regió N-terminal citosòlica de l'HMGR de plantes està poc conservada, excepte per un motiu d'arginines que podem trobar a la majoria de les isoformes. Aquest motiu presenta una certa variació entre isoformes, però es va poder establir una seqüència aminoacídica consens amb una metionina inicial, un aminoàcid carregat negativament, un aminoàcid hidrofòbic i tres arginines: M[D,E][L,V,I]RRR (Leivar *et al.*, 2003). Si es comparen els diferents motius de la regió N-terminal citosòlica presents en les HMGR de plantes, es pot fer una classificació d'aquestes, sent el grup I el grup que presenta el motiu consens (HMGR1S d'*A. thaliana*), el grup II serien les proteïnes que contenen un motiu proper al consens (com l'HMGR2 d'*A. thaliana*), mentre el grup III són les proteïnes que tenen un motiu diferent del consens (HMGR1L d'*A. thaliana*) (Leivar, 2003). Com ja s'ha comentat anteriorment, en plantes les diferents isoformes semblen tenir una especialització funcional en quant als productes finals de la via que sintetitzen, de manera que isoformes molt homòlogues com ara les que codificades pel gen *HMG1* d'*A. thaliana* (HMGR1S i HMGR1L) haurien de diferenciar-se entre elles, presentant propietats exclusives a nivell, per exemple, de la seva regulació, o bé de la seva localització subcel·lular, en resum contenir algun motiu que permeti el reconeixement per a aquesta especialització funcional. La regió N-terminal citosòlica és un bon candidat a contenir informació específica d'isoforma degut a que és un domini molt divergit i que alhora conté, com s'ha comentat, un motiu conservat ric en arginines, el qual s'ha classificat en tres grups en les HMGR de plantes. Si prenem com a exemple per a estudiar l'especialització funcional el cas de les isoformes codificades pel gen *HMG1* (HMGR1S i HMGR1L), que presenten com a única diferència a nivell de seqüència aminoacídica, els 50 aminoàcids "extra" que la isoforma HMGR1L té a N-terminal (Lumbreras *et al.*, 1995) és evident que aquest ha de contenir algun senyal que li confereixi al menys la capacitat de tenir un patró d'expressió diferenciat entre elles. Per tant, per a estudiar la implicació d'aquest domini en la possible especialització funcional d'aquestes dues isoformes es van produir construccions d'ambdues, on el domini catalític va ser substituït per la proteïna verda fluorescent o GFP (*green fluorescent protein*), donant lloc a la quimera 1S:GFP derivada de la isoforma HMGR1S, i a la quimera 1L:GFP derivada de la isoforma HMGR1L (Leivar, 2003). En estudiar la localització d'aquests quimeres mitjançant expressió transitòria (Figura I.7), es va comprovar que mentre la proteïna quimèrica 1L:GFP localitzava exclusivament a la xarxa del RE, la quimera 1S:GFP localitzava a més en unes estructures vesiculars d'un tamany aproximat d'entre 0,5 µm i 2 µm que semblen connectades al RE. Si, s'estudia el patró de localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP on els residus d'arginina del domini N-terminal han estat substituïts per alanines, s'observa que la quimera es detecta exclusivament a la xarxa del RE (figura I.7). Els mateixos experiments en plantes

transgèniques sobreexpressores del domini catalític compartit per les isoformes del gen *HMG1* donaven senyal al citosol de la cèl·lula, demostrant que el domini N-terminal és necessari per a la inserció de la proteïna a la membrana del RE.

### 3.3.3.- Control de la localització subcel·lular

S'han fet estudis d'interacció proteïna-proteïna utilitzant les regions N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR1L com a esquer en un crivellatge per doble híbrid en llevat d'una llibreria de cDNA d'*A. thaliana*. En aquest estudi es va trobar que ambdues proteïnes interaccionen amb subunitats B o reguladores de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A), mentre que HMGR1L interacciona amb una proteïna que presenta homologia amb la subunitat lleugera de quinesina de tipus I (AtKLC1) (Leivar, 2003). Aquesta interacció diferencial està provocada per les diferències de seqüència entre els dos dominis N-terminal citosòlics, i podria ser la causa de la seva diferent localització subcel·lular. El fet que HMGR2 es trobi també localitzada en la xarxa del RE i en vesícules, i que alhora el seu domini N-terminal citosòlic tampoc interaccioni amb AtKLC1 reforça aquesta hipòtesi. A més la substitució dels residus arginina conservats en el domini N-terminal citosòlic d'HMGR per alanines produeix un canvi de localització subcel·lular de la isoforma HMGR1S, observant-se únicament en el RE i no formant-se les vesícules observades prèviament (Leivar, 2003).

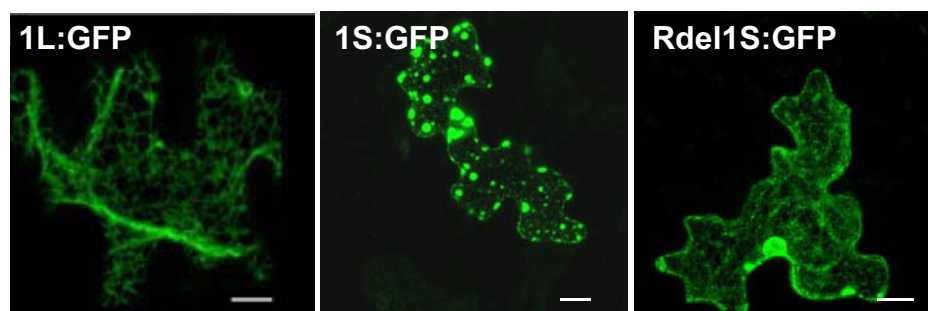


Figura 1.7: Localització subcel·lular de les quimeres 1L:GFP, 1S:GFP i Rdel1S:GFP. A Rdel1S:GFP s'han substituït les arginines de la regió N-terminal citosòlica per alanines (adaptat de Leivar, 2003, Antolín-Llovera, 2005).

Mitjançant estudis d'expressió transitòria de la quimera 1S:GFP sobre fulles d'*A. thaliana* s'ha demostrat la importància de la interacció amb PP2A per a la localització subcel·lular d'aquesta (Antolín-Llovera, 2006). La PP2A va ser inhibida farmacològicament amb cantaridina o genèticament amb mutants de diferents subunitats de PP2A en les mostres on es va realitzar l'expressió transitòria d'1S:GFP. Els resultat d'aquesta incubació va resultar en una disminució dràstica del nombre de

cèl·lules que presentaven formació d'estructures vesiculars derivades de la sobreexpressió d'1S:GFP (Figura 1.8, panell A). Per altra banda, per testar la inhibició genètica de PP2A es van realitzar experiments d'expressió transitoria sobre fulles d'*A. thaliana* de plantes mutants per alguna de les subunitats de PP2A. Els resultats amb plantes amb inhibició genètica de la PP2A és de nou una disminució en el nombre de cèl·lules que presenten vesícules derivades d'1S:GFP (Figura 1.8, panells B i C). Aquests experiments demostren la implicació de PP2A en el control de la localització subcel·lular de l'HMGR1S.

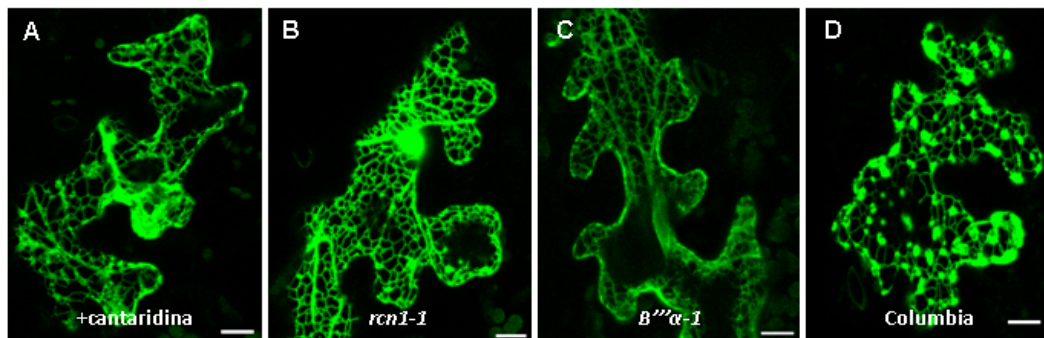


Figura 1.8: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana*. (A) Efecte de la cantaridina sobre cèl·lules de plantes d'ecotip Columbia.0 (B) Cèl·lules de plantes mutants *rcn1-1*. (C) Cèl·lules de plantes mutants *B''α-1*. (D) Cèl·lules de plantes silvestres Columbia 0. La barra indica 10 μm. (Adaptat d'Antolin-Llovera, 2005).

### 3.3.4.- La Proteïna Fosfatasa 2A

Les fosfoproteïna fosfatases tenen un paper molt important en la regulació de molts processos cel·lulars en eucariotes (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Sontag, 2001; Luan, 2003). Catalitzen la desfosforilació de residus de serina, treonina o de tirosina prèviament modificats covalentment per fosforilació. La proteïna fosfatasa 2A (PP2A) és una de les serina/treonina fosfatases majoritàries en cèl·lules i presenta un ampli espectre de substrats i de funcions. S'ha identificat a llevats, mamífers, insectes, algues i plantes superiors (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Virshup, 2000; Janssens and Goris, 2001; Sontag, 2001).

La PP2A és un heterotrímer format per la subunitat A o PR65 que té una funció estructural, la subunitat B o subunitat reguladora, i la subunitat C o catalítica. La subunitat A o PR65 a *A.thaliana* està codificada per tres gens (Slabas *et al.*, 1994): el gen *PDF1* (*At3g25800*) que codifica per la



isoforma PDF1, el gen *PDF2* (*At1g13320*) que codifica per la PDF2 i el gen *RCN1* (*At1g25490*). La subunitat B o reguladora confereix propietats específiques al heterotrímer de PP2A, en apropar-lo al substrat, i també modulant la seva activitat i condicionant la seva localització subcel·lular (revisat a Sontag. 2001; Luan, 2003). La subunitat B es classifica en tres famílies. B, B' i B'', sense relació filogenètica. A *A. thaliana*, la major part de les subunitats B de PP2A s'han identificat per homologia i se'n desconeix la funció. A *A. thaliana* dos gens codifiquen per subunitats B (Rundle *et al.*, 1995), vuit per subunitats B' (Haynes *et al.*, 1999; Terol *et al.*, 2002), i cinc per subunitats B'' (Hendershot *et al.*, 1999). També s'ha identificat el gen *TONNEAU2* que codifica per un altra classe de subunitat B'' (Camilleri *et al.*, 2002). Pel que fa a la subunitat C o catalítica, a *A. thaliana* s'han identificat cinc gens que codifiquen per aquesta subunitat de PP2A a *A. thaliana* (Arino *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 1994; Perez-Callejon *et al.*, 1998). La combinació de totes aquestes isoformes podria generar fins a 255 combinacions de l'heterotrímer de PP2A.

### 3.3.5.- El domini N-terminal de l'HMGR i la seva implicació en la morfogènesi del RE

Estudis realitzats en llevats, mamífers i plantes han posat de manifest la capacitat del domini de membrana de l'HMGR eucariota per a induir la formació d'estructures específiques dins el RE.

Les cèl·lules de ovari de hàmtster, CHO, adaptades al creixement amb compactina que inhibeix específicament HMGR, són capaces d'augmentar fins a 500 vegades l'activitat HMGR present en una cèl·lula no tractada. Aquest acúmulo de proteïna HMGR indueix la formació d'unes estructures cristal·loides hexagonals derivades del RE (Figura I.10, panell A) (Chin *et al.*, 1982). En aquest mateix tipus cel·lular, es va demostrar que quan se sobreexpressava el cDNA complet d'HMGR es produïen aquestes mateixes estructures cristal·loides mentre que si se sobreexpressava el cDNA d'HMGR amb deleccions de parts del domini N-terminal o bé quan se sobreexpressava només el domini catalític aquestes estructures cristal·loides no es formaven. (Jingami *et al.*, 1987).

Així doncs, el domini N-terminal d'HMGR en mamífers, a banda de ser indispensable per a la seva inserció a membranes i per al control de la vida mitjana de la proteïna en resposta a esterols, també presenta la capacitat de induir la proliferació de membranes en resposta a increments en l'activitat HMGR (Chin *et al.*, 1982; Skalnik *et al.*, 1985; Jingami *et al.*, 1987; Chun and Simoni, 1992).

La sobreexpressió de l'HMGR en llevats també determina canvis en la morfologia del RE. Estudis de sobreexpressió de l'isoenzim HMG1 en cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* mostren una acumulació de membranes derivades del RE i ordenades en capes concèntriques que s'acumulen específicament al voltant del nucli de la cèl·lula sense arribar a tancar-lo completament (Figura I.10, panell B). Aquestes estructures van ser anomenades *karmellae*. A més, en aquestes cèl·lules la producció de *karmellae* no es veu afectada en mutants defectius per HMG2, mentre que la sobreexpressió del gen *HMG2* no produeix aquestes estructures ordenades tot i que si s'observa proliferació de membranes (Wright *et al.*, 1988). Quimeres resultants de fusions entre diferents parts dels dominis N-terminal dels dos isoenzims de *S. cerevisiae* van demostrar que HMG1 conté, en aquesta regió, una senyal responsable de la formació de *karmellae* (Parrish *et al.*, 1995). Aquesta senyal es troba al lumen del RE, al *loop G*, en un dels *loops* entre dos motius transmembrana, i és la zona amb menys homologia entre els dos isoenzims (figura I.9).

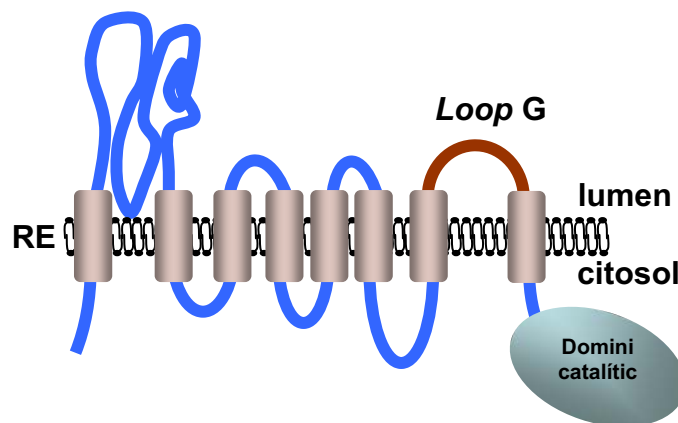


Figura I.9: Topologia de l'HMGR de llevats. El domini N-terminal està formada per vuit seqüències de transmembrana (Profant *et al.*, 2000). El *loop G* forma part del domini N-terminal, delimitat per les seqüències de transmembrana 7 i 8, està encarat cap al lumen del RE i és necessari per la capacitat biogenètica de membranes d'HMGR al RE.

La capacitat morfogenètica de l'HMGR eucariota en la membrana del RE també es conserva en sistemes heteròlegs. L'expressió en cèl·lules de *S. cerevisiae*, d'HMGR humana i d'hàmmster, que no presenten homologia amb els isoenzims d'HMGR de llevat provoca l'aparició de *karmellae*, que són estructures pròpies d'aquestes cèl·lules. Per la seva banda, l'expressió heteròloga d'HMG1 de llevat en cèl·lules de simi COS-1 condueix a la formació d'estructures cristal·loides (Wright *et al.*, 1990).

Existeixen d'altres proteïnes, a banda d'HMGR, que presenten aquesta capacitat d'induir la formació regulada de dominis específics del RE, amb una estructura apilada i ordenada de concentració de

membranes. Aquestes proteïnes reben el nom d'OSER (termed organized smooth ER), o proteïnes amb capacitat d'organització del RE llis (Snapp *et al.*, 2003). Aquest nom és degut a que les estructures formades sempre són de RE llis.

Així doncs, tant en llevat com en mamífers el domini N-terminal d'HMGR presenta específicament la capacitat d'inducció d'estructures ordenades derivades del RE. Aquesta capacitat intrínseca del domini N-terminal està però condicionada pel sistema, i les estructures formades serien les pròpies del tipus cel·lular. Deu ser doncs, la maquinària cel·lular la que determina els senyals que, interaccionant amb HMGR defineixin el tipus d'estructura. Només algunes proteïnes de membrana tenen capacitat biogenètica, és a dir, la mera inserció d'una proteïna a la membrana no és condició suficient per conferir-li aquesta capacitat (Wright *et al.*, 1990).

Per altra banda s'ha de tenir en compte que aquestes estructures ordenades existeixen de manera constitutiva a determinats tipus cel·lulars de mamífers com ara les cèl·lules adrenocorticals o els hepatòcits (Black *et al.*, 2005). Les cèl·lules adrenocorticals sintetitzen colesterol o l'agafen de les lipoproteïnes com a precursor de la síntesi d'hormones esteroidees, mentre els hepatòcits són els encarregats de la síntesi d'apoproteïnes que posteriorment que seran conjugades amb lípids per formar les lipoproteïnes que seran exportades. Es postula que els enzims, com l'HMGR, encarregats de la síntesi de colesterol tenen alts nivells d'expressió en aquestes cèl·lules. En aquestes cèl·lules existeixen abundants estructures cristal·loides de RE llis que poden ser més o menys complexes depenen del tipus cel·lular (Black *et al.*, 2005).

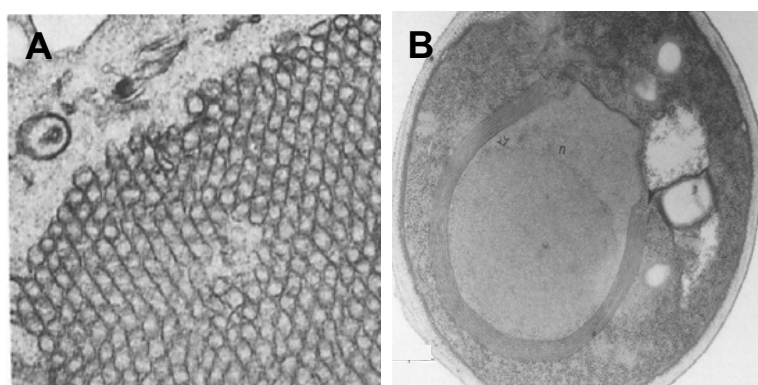


Figura I.10: Formacions de membranes derivades del RE induïdes per la sobreexpressió d'HMGR. (A) Cèl·lula CHO amb estructures cristal·loides (adaptat de Jingami *et al.*, 1987). (B) Cèl·lula de *S. cerevisiae* amb *karmellae* (adaptat de Wright *et al.*, 1988).

### 3.4.- Regulació de l'activitat HMGR

Degut a la importància de l'HMGR en la síntesi d'isoprenoides (veure apartat 3.1) com a enzim limitant del flux de la via del MVA, resulta imprescindible per a la cèl·lula mantenir un fi control de l'activitat d'aquest enzim mitjançant diversos mecanismes tant a nivell transcripcional com post-transcripcional.

A llevats i mamífers els nivells de proteïna i activitat HMGR es troba regulada per la concentració de productes finals de la via del MVA, principalment esterols. Els esterols modulen no només la expressió gènica sinó també la traducció i l'estabilitat enzimàtica. Especialment sensible és la regulació a mamífers de l'activitat HMGR en resposta a nivells d'esterols en sang (revisat a Goldstein i Brown, 1990; Hampton *et al.* 1996; Gardner i Hampton, 1999a). A nivell post-traduccionals també trobem regulació, gràcies a mecanismes de fosforilació reversible sobre una serina conservada al domini catalític, que afecten l'activitat enzimàtica (revisat a Halford i Hardie, 1998).

En plantes l'HMGR està regulada a diferents nivells. Un dels mecanismes implicats en la regulació de l'HMGR és l'acumulació de productes finals de la via del MVA. S'ha fet estudis d'aportació externa per polvorització d'esterols en plàntules de pèsol, on es va demostrar una reducció de l'activitat HMGR entre un 30-35%, a través de mecanismes de regulació post-traduccionals (Russell *et al.*, 1985). En patata i en l'alga *Ochromonas malhamensis*, l'adició de mevastatina (inhibidor específic de l'HMGR) provoca un augment de l'activitat de l'enzim, per a compensar el bloqueig de la via, (Stermer, 1994), i en cèl·lules BY-2 de tabac, la mevinolina (un altre inhibidor específic de l'HMGR) augmenta l'activitat aparent de l'HMGR (Hemmerlin i Bach, 2000). En fruits d'alvocat s'ha demostrat que un aport exògen d'esterols inhibeix el desenvolupament del fruit, degut a l'augment en la taxa de degradació de l'HMGR per l'estigmasterol (Cowan *et al.*, 1997).

S'ha observar també una relació inversa entre els nivells d'àcid abscísic (ABA) i l'activitat HMGR. En el cas de l'alvocat els nivells d'àcid abscísic (ABA) augmenten en tractar els fruits amb mevastatina que inhibeix la divisió cel·lular, i aquest efecte és revertit per mevalonat (Cowan *et al.*, 1997). Si pel contrari es tracten exògenament amb ABA, s'inhibeix el creixement cel·lular i l'activitat HMGR. Comparativament, l'endosperma de blat de moro de plantes mutants que sintetitzen baixes quantitats d'ABA, presenta més activitat HMGR que aquells de plantes silvestres. El tractament amb ABA fa disminuir l'activitat HMGR a blat de moro (Moore i Oishi, 1994) i a l'àpex de brots de pèsol

(Russell *et al.*, 1985). També s'ha observat un augment de l'activitat HMGR per citoquinines i gibberel·lines (Russell *et al.*, 1985)

L'HMGR en plantes també està regulada per calci. A *Hevea brasiliensis* en presència de calci la proteïna calmodulina parcialment purificada, és capaç de fer augmentar a més del doble l'activitat HMGR d'extractes proteics totals (Stermer *et al.*, 1994). Per la seva banda, la fracció microsomal provinent d'extractes de plàntules de pèsol, presenta una inhibició reversible de l'activitat HMGR quan s'afegeixen concentracions nanomolars de calci, inhibició que no està promoguda per calmodulina (Russell *et al.*, 1985). Resultats recents del nostre grup indiquen, que, a *A. thaliana*, el calci afavoreix la interacció de subunitats reguladores B'' de PP2A amb HMGR1S i HMGR1L, les isoformes codificades pel gen *hmg1* (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2005). Aquestes subunitats de PP2A presenten dos motius conservats d'unió a calci (*EF-hands*). El segrest del calci per l'adició d'un quelant durant les extraccions proteiques i els assajos enzimàtics per a determinar l'activitat HMGR, produeix uns nivells màxims de detecció d'aquesta activitat. El calci lliure en les fases d'extracció i d'assaig enzimàtic pel contrari disminueixen l'activitat al mínim nivell. Al mateix temps es va poder comprovar que l'augment d'activitat HMGR en extractes de plantes d'*A. thaliana* és susceptible a inhibició per calci quan aquesta és deguda a la sobreexpressió de la isoforma HMGR1S sencera, però és insensible al catió quan és deguda a la sobreexpressió només del domini catalític de l'enzim. PP2A és un regulador negatiu d'HMGR, probablement per desfosforilació, i la interacció de PP2A amb el domini N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR1L a *A. thaliana* (veure apartat 3.3.2) està mediada per calci

Els patrons d'expressió dels gen *hmg* varien depenent de l'estadi de desenvolupament a les plantes. Així s'han associat alts nivells d'activitat HMGR amb zones de creixement com zones meristemàtiques, a pèsol (Stermer, 1994), en patata (Korth *et al.*, 2000), o en els primers estadis de desenvolupament del fruit de tomàquet (Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999). Les llavors de blat de moro presenten una activitat HMGR elevada just després de la fecundació, mentre que aquesta va disminuint a mesura que madura (Moore i Oishi, 1993). També a *A. thaliana* s'ha constatat una menor activitat HMGR en teixits madurs (Enjuto *et al.*, 1994; Lumberras *et al.*, 1995; Manzano *et al.*, 2004).

Els factors ambientals també tenen un paper en la regulació d'HMGR. Un exemple paradigmàtic és la síntesi de fitoalexines en resposta a atacs per patògens. En patata, un atac per fongs promou la

expressió dels gens de les famílies *hmg2* i *hmg3* (Choi *et al.*, 1992) i en fruit de tomàquet, la del gen *HMG2* (Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999).

L'activitat HMGR també està regulada per llum. En la majoria de sistemes analitzats la llum actua com a inhibidor de l'HMGR, la qual cosa es correspon amb una disminució del flux de la via del MVA durant el període diürn i el concomitant augment del flux de la via del MEP. Plàntules d' *A. thaliana*, pèsol i blat de moro, presenten una activitat HMGR superior crescudes en condicions de foscor (Russell *et al.*, 1985; Enjuto *et al.*, 1994; Stermer *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995; Learned, 1996). En *A. thaliana* s'ha comprovat com la llum reprimeix l'expressió del gen *HMG1* i que aquest fenomen depèn de la taxa d'irradiació, del temps d'il·luminació i de la qualitat espectral de la llum (Learned, 1996; Learned i Connolly, 1997). La participació dels fotoreceptors en la modulació de l'activitat HMGR es va posar de manifest gràcies als mutants de fotoreceptors Cry1 (que s'indueix per llum blava) i Phy B (induit per llum vermella). En aquests mutants es va observar un increment en l'expressió d'*hmg1* i *hmg2* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). També s'ha demostrat que el temps d'il·luminació afecta l'activitat HMGR (Manzano *et al.*, 2004). Així, plantes d' *A. thaliana* crescudes a dia curt presenten més activitat HMGR que plantes crescudes a dia llarg. Tot i que en pràcticament tots els sistemes la llum actua com un regulador negatiu de l'activitat HMGR, s'han descrit excepcions. En el cas de patata, els nivells de proteïna HMGR està regulat negativament a nivell post-traduccional en foscor (Korth *et al.*, 2000).

També trobem regulació de l'activitat HMGR deguda a modificacions post-traduccional sobre la proteïna. En llevats, i en mamífers, l'HMGR és fosforilada i inactivada per serina/treonina quinases pertanyents a la mateixa família, anomenades SNF1 en el cas de llevats, i AMPK (quinases activades per AMP) en el cas de mamífers (revisat a Halford i Hardie, 1998). A plantes existeixen homòlegs d'aquestes quinases, anomenades SNF1-related quinasa (SnRKs), dels quals en *A. thaliana* trobem dues variants: AKIN 10 i AKIN11. Les SnRKs, es diferencien dels seus homòlegs de llevats i mamífers en que no s'activen per AMP. No s'ha comprovat *in vivo* la inactivació d'HMGR per SnRKs, però la disminució de l'activitat HMGR en fraccions microsomals de pèsol, després d'una incubació amb extractes proteics de les mateixes plantes en presència de magnesi i ATP, és consistent amb la inactivació per SnRKs (Russell *et al.*, 1985).

Per últim trobem el control a nivell de l'estabilitat proteica. En mamífers s'ha pogut demostrar que el domini N-terminal és necessari i suficient per portar a terme la degradació de la proteïna. Els nivells

alts tant de mevalonat com d'esterols, promouen la ràpida degradació d'HMGR, gràcies a l'augment de la susceptibilitat a cisteïna proteases del RE (Goldstein i Brown, 1990; McGee *et al.*, 1996; Moriyama *et al.*, 1998). No s'ha pogut comprovar directament aquest sistema de degradació en plantes, però quan es fan servir inhibidors de cisteïna proteases, s'observa un augment de l'activitat HMGR (Stermer, 1994).

## 4.- EL RETICLE ENDOPLASMÀTIC

El reticle endoplasmàtic (RE) és un orgàdul format per un xarxa molt extensa de túbuls i també de cisternes que es pensa formen un espai continu. Aquest orgàdul està separat del citosol per una membrana simple i el seu interior és anomenat lumen. L'àrea membranosa del RE respecte a l'àrea de membrana total de la cèl·lula pot arribar a representar el 50%, mentre que el lumen pot representar el 10% del total del volum cel·lular.

El RE juga un paper central en la síntesi de biomolècules a la cèl·lula. Totes les proteïnes transmembrana i els lípids tant del RE, de l'aparell de Golgi, dels lisosomes així com de la membrana plasmàtica tenen com a origen biosintètic el RE. Al RE també es troba gran part de la producció de lípids destinats a les membranes dels mitocondris i peroxisomes. De la mateixa manera totes les proteïnes que formaran part del lumen del RE, del Golgi o dels lisosomes, així com aquelles que seguiran la via de secreció, són inicialment sintetitzades al RE.

Tot aquest tràfic de proteïnes i lípids que s'inicia al RE té lloc gràcies al tràfic directe i revers de diferents tipus de vesícules, de manera que tot el sistema d'endomembranes es troba interconnectat.

### 4.1.- Vesícules derivades del RE

S'han descrit molts tipus de vesícules derivades del RE (Staehelein, 1997; Chrispeels i Herman, 2000; Hara-Nishimura *et al.*, 2003) (Figura I.11). A totes les cèl·lules eucariotes trobem les anomenades COPII (coat protein complex II) que deriven del reticle endoplasmàtic i que són d'un tamany d'entre 0.05-0.1 µm. En contrast amb aquestes vesícules de petit tamany, a cèl·lules de plantes hi ha d'altres de major tamany també derivades del RE, implicades en diferents funcions. Entre aquestes trobem els cossos proteics (1-2 µm diàmetre), que s'encarreguen de l'emmagatzematge de proteïnes a diverses espècies, com ara el blat de moro o l'arròs (Okita i Rogers, 1996; Herman i Larkins, 1999). Un altre tipus vesicular específic de plantes són les vesícules acumuladores de precursors o PAC (0.3-0.5 µm) (precursor accumulating) que trobem a les llavors en maduració, i que també poden ser induïbles a fulles o rels. Les vesícules PAC són les encarregades del transport de precursors proteics insolubles en



forma d'agregats (Hara-Nishimura *et al.*, 1998) Encara a plantes les vesícules KDEL (0.2-0.5 µm) acumulen proteïnes amb una senyal específica de retenció a reticle endoplasmàtic, i estan implicades en la mobilització de proteïnes després de la germinació de la llavor (Toyooka *et al.*, 2000). També podem trobar els ricinosomes (aproximadament 0.9 µm) del ricí (*Ricinus communis*) que podrien estar implicats en la mort cel·lular del endosperma (Schmid *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2001). Finalment s'han descrit els *ER-bodies*, o cossos del reticle endoplasmàtic, que estan implicats en la resposta de la planta enfront situacions d'estrès (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002).

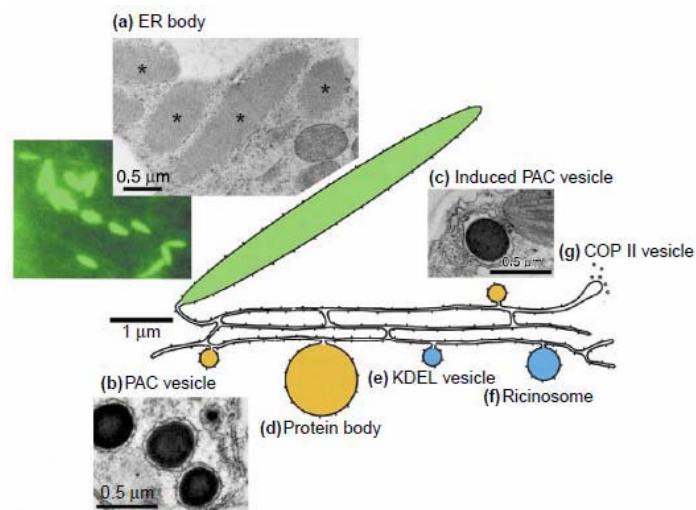


Figura I.11: Representació esquemàtica dels diferents tipus de vesícules presents a la cèl·lula vegetal.

#### 4.2.- Els *ER-bodies*

Hara-Nishimura i col·laboradors defineixen per primera vegada un nou tipus vesicular derivat del RE: que van anomenar *ER-bodies* o cossos del reticle endoplasmàtic (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002). Aquestes vesícules es diferenciaven d'altres descrites prèviament al RE, en estructura, forma i tamany i van ser descobertes a cotiledons de plantes transgèniques d'*A. thaliana* que expressaven la proteïna quimèrica fluorescent GFP-HDEL, la qual havia estat dissenyada com a marcador específic del lumen del RE (Haseloff *et al.*, 1997; Gunning *et al.*, 1998; Köhler *et al.* 1998). Les primeres observacions dels *ER-bodies* van mostrar que tenien un contingut fibrós i que estaven rodejades per ribosomes, i el seu tamany era d'aproximadament unes 5 µm de llargada i 0.5 µm de diàmetre. En el desenvolupament normal de la planta els *ER-bodies* són específics de cotiledons, i en

canvi no es troben en fulles de roseta. Els *ER-bodies* havien estat observats prèviament a rels de rave per microscòpia electrònica, com unes vesícules rodejades de ribosomes (Bonnett i Newcomb, 1965) i a més de 50 espècies de Brassicàcies com cisternes dilatades del RE (Iversen, 1970; Behnke and Eschlbeck, 1978).

Durant la última dècada s'han dut a terme molts experiments amb l'objectiu de conèixer el contingut i la funció dels *ER-bodies*. Els primers assajos que pretenien descobrir el contingut proteic de les vesícules, es van fer mitjançant immunocitoquímica i com a resultat es van trobar dues proteïnes, RD21 i  $\gamma$ VPE, que s'hi acumulaven específicament. Ambdues eren proteases induïbles per estrès (Hayashi *et al.*, 2001). RD21 és una proteïna de la família de les papaines, i és induïda per sequera (Koizumi *et al.*, 1993), mentre que  $\gamma$ VPE és un homòleg dels enzims encarregats del processat vacuolar i se sap que s'expressa en diferents condicions d'estrès (Hara-Nishimura *et al.*, 1998a; Kinoshita *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1999). Aquestes dades i els posteriors experiments de microscòpia electrònica després d'estressar plàntules amb sal que demostren la fusió entre els *ER-bodies* i vacuoles, van portar a pensar que aquestes vesícules transportaven diferents enzims encarregats del processament vacuolar, implicant doncs, en última instància els *ER-bodies* en la mort cel·lular programada produïda per algun tipus d'estrès (Hayashi *et al.*, 2001).

Els *ER-bodies* estan presents de manera constitutiva a plàntules d'*A. thaliana*, sent els cotiledons on la seva observació és més senzilla degut a l'alt nombre d'aquests a les cèl·lules epidèrmiques. Les fulles de roseta de planta adulta d'*A. thaliana* no presenten *ER-bodies* de manera constitutiva, però si que poden ser induïts per estrès, tals com ferida o per tractament amb metil jasmonat, hormona medidora de la resposta a atacs per insectes o ferida (Matsushima *et al.*, 2002). Aquestes dades mostren de nou la implicació dels *ER-bodies* en defensa.

Un altra proteïna que s'acumula específicament als *ER-bodies* és BGLU23, un enzim de la família de les  $\beta$ -glucosidases (BGLU) que té una senyal de retenció KDEL i que també s'anomena PYK10 (Hara-Nishimura, 2003). Aquesta  $\beta$ -glucosidasa és un dels components majoritaris dels *ER-bodies* constitutius dels cotiledons de plàntules d'*A. thaliana* (Matsushima *et al.*, 2003). Es va postular que la funció dels *ER-bodies* constitutius dels cotiledons pot estar lligada a la funció de PYK10 (Matsushima *et al.*, 2003b), tot recordant que les  $\beta$ -glucosidases es troben implicades en activació de fitohormones, en catabolisme de paret cel·lular i també en mecanismes de defensa de la planta

(Poulton, 1990; Oxtoby *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1992; Babcock i Esen, 1994; Gus-Mayer *et al.*, 1994; Bones i Rossiter, 1996; Cicek i Esen, 1998; Rask *et al.*, 2000).

Els *ER-bodies* induïts a fulles de roseta de plantes d'*A. thaliana*, semblen tenir una composició diferent a la dels *ER-bodies* constitutius dels cotiledons però també estan implicats en la resposta a estrès. El tractament de fulles de roseta amb metiljasmonat que activa la proliferació d'*ER-bodies*, no produeix un augment en l'expressió de PYK10, mentre que si que produeix un augment de l'expressió de fins a 10 vegades de BGL1, un homòleg de PYK10 amb una senyal de retenció a reticle endoplasmàtic putativa, i un 70% d'identitat amb PYK10. Així BGL1 podria ser la proteïna majoritària als *ER-bodies* induïbles a fulles de roseta per metiljasmonat i senyals d'estrès. Aquesta  $\beta$ -glucosidasa podria estar implicada en defensa de manera similar a PYK10 als cotiledons (Matsushima *et al.*, 2003).

Finalment, s'ha trobat que BGLU18, un altre homòleg de PYK10 a *A. thaliana*, s'acumula específicament als *ER-bodies* induïbles. A més plantes mutants *bglu18* no presenten formació d'*ER-bodies* induïbles després de ferida, fet que fa pensar que BGLU18 pot ser una  $\beta$ -glucosidasa implicada en la producció de una senyal per a la formació dels *ER-bodies* induïbles mitjançant el processament d'un substrat (Ogasawara *et al.*, 2009).

Així sembla que els *ER-bodies* estan implicats de manera general en la resposta contra diferents tipus de estrès i en defensa. Els *ER-bodies* constitutius es troben en cotiledons i semblen estar destinats a defensar la planta durant les primeres etapes del desenvolupament, que poden ser més susceptibles a àtacs i a patir estrès. En aquest sentit s'ha vist que mutants *pyk10* resulten més susceptibles a la infecció pel fong *Piriformospora indica* (Sherameti *et al.*, 2008). Per altra banda tant durant les primeres etapes del desenvolupament com a plantes adultes d'*A. thaliana* hi ha una formació de *ER-bodies de novo* en resposta a estrès. Aquests són els *ER-bodies* induïbles que acumulen específicament proteïnes de la família BGLU. La formació d'aquests *ER-bodies* induïbles està relacionada en la resposta a ferida i a metiljasmonat. A pesar, però, de totes aquestes observacions, encara es desconeix la funció concreta dels *ER-bodies* i les  $\beta$ -glucosidases que acumulen específicament en la resposta a diferents tipus d'estrès.

### 4.3.- Proteïnes implicades en la formació dels *ER-bodies*

A *A. thaliana* la formació dels *ER-bodies* està controlada pel gen *NAI1*. En els mutants d'aquest gen no es formen *ER-bodies* als cotiledons durant el desenvolupament normal de la planta (*ER-bodies* constitutius). La proteïna NAI1 és un factor de transcripció amb un domini bHLH (basic *hèlix-loop-hèlix*). Les proteïnes amb el domini bHLH són una superfamília de factors de transcripció que s'uneixen a llocs específics del DNA formant dímers (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). El mutant d'*A. thaliana* *nai1-1* presenta una mutació puntual que provoca una disrupció en el lloc d'*splicing* de l'intró 1. D'altra banda el mutant *nai1-2* (CVJ9, de fons genètic Wassilewskija) presenta una inserció de T-DNA al segon exó del gen. El creuament entre els mutants *nai1-1* i *nai1-2* no presenten *ER-bodies* i són per tant mutants al·lèlics (Matsushima *et al.*, 2004).

Les plantes *nai1-1* i *nai1-2* no formen *ER-bodies* de manera constitutiva a cotiledons mentre que si que són capaces de formar *ER-bodies* a cotiledons o fulles de roseta en resposta a ferida (*ER-bodies* induïbles). Així doncs la proteïna NAI1 sembla ser un dels efectors necessaris per a la formació d'*ER-bodies* del tipus constitutiu (Matsushima *et al.*, 2004). Les plantes *nai1* a més tenen disminuïda l'expressió del mRNA de *PYK10* i també l'acumulació de la proteïna PYK10 (Matsushima *et al.*, 2003b), la qual cosa és consistent amb el fet que NAI1 sigui un factor de transcripció i també amb la manca d'*ER-bodies* constitutius, ja que PYK10 és el component majoritari.

Quan les plantes mutants *nai1-1* són polvoritzades amb metil jasmonat es formen *ER-bodies* induïbles, però aquests són aberrants, presenten irregularitats morfològiques i de tamany, la qual cosa no succeeix en plantes silvestres. Alhora s'ha comprovat que en plantes silvestres, durant la formació dels *ER-bodies* induïts per metil jasmonat, es produeix un augment dels transcrits de *NAI1* i *PYK10*. Totes aquestes dades demostren que NAI1 també participa en la formació dels *ER-bodies* induïbles per situacions d'estrès (Matsushima *et al.*, 2004).

NAI2 és un altra proteïna també implicada en la formació dels *ER-bodies* constitutius. NAI2 pertany a una família de proteïnes de funció desconeguda exclusives de Brassicàcies, amb un domini EFE (Glu-Phe-Glu) i un domini específic d'aquesta proteïna que es va anomenar domini NAI2.

NAI2 no es troba localitzada a la xarxa del reticle endoplasmàtic, sinó que s'acumula específicament als *ER-bodies* de manera soluble, degut a la seva manca d'un domini transmembrana. A pesar de no contenir un senyal consens de retenció en aquest orgànul, com ara KDEL, que es troba present en la

major part de proteïnes solubles del reticle endoplasmàtic, NAI2 s'acumula de manera independent d'aquest senyal. Plantes d' *A. thaliana* mutants pel gen *NAI2* presenten els mateixos nivells d'expressió de transcrits dels gens *PYK10* i *NAI1*. Aquests mateixos mutants *nai2*, en canvi, presenten una menor acumulació de la proteïna PYK10, i aquesta, presenta un canvi en la seva localització subcel·lular, passant de ser el component majoritari dels *ER-bodies*, a distribuir-se d'una forma més homogènia per la xarxa del reticle endoplasmàtic. D'altra banda a les plantes mutants *nai1*, que presenten una manca de formació d'*ER-bodies* constitutius, els nivells d'expressió de *NAI2* es veuen dràsticament reduïts.

Així, doncs, sembla que NAI1, actua com a factor de transcripció, no només del component majoritari dels *ER-bodies* constitutius, PYK10, sinó també sobre NAI2, una proteïna que sembla implicada en la via de secreció, i que sembla un efector imprescindible per a la formació d'aquestes vesícules i per a la acumulació de PYK10 en elles (Yamada *et al.*, 2008).

**OBJECTIUS**

---



## OBJECTIUS

En treballs previs al nostre grup d'investigació es va analitzar la localització subcel·lular d'HMGR d'*A. thaliana* (Leivar, 2003; Leivar *et al.*, 2005) i el control d'aquesta localització (Antolín-Llovera, 2008).

D'una banda es van preparar i analitzar les proteïnes quimèriques 1S:GFP, 1L:GFP i 2:GFP, formades pel domini N-terminal de les diferents isoformes d'*A. thaliana*, HMGR1S, HMGR1L i HMGR2, respectivament, i la proteïna fluorescent GFP. En aquestes quimeres, la GFP substitueix el domini catalític de l'enzim corresponent. Fonamentalment, es va observar que les proteïnes quimèriques es localitzen a la xarxa del reticle endoplasmàtic (RE) i unes vesícules d'un tamany variable entre 0,5 i 2 µm de naturalesa desconeguda. Per altra banda, estudis immunocitoquímics van permetre visualitzar HMGR en unes vesícules citosòliques en cèl·lules dels cotiledons d'*A. thaliana*. La identitat d'aquestes vesícules no ha sigut definida, així com tampoc la seva relació amb les vesícules derivades de l'expressió de les quimeres 1S:GFP i 2:GFP.

En cèl·lules de mamífers i llevats s'ha demostrat la capacitat d'HMGR de formar estructures ordenades derivades del RE.

Tenint en compte aquestes dades la present tesi té com a objecte global aprofundir en l'estudi de la localització subcel·lular de l'HMGR de plantes definit pels següents objectius concrets:

- 1.- Definició de la identitat de les estructures vesiculars d'HMGR i estudi del paper del domini de membrana de l'enzim en la seva formació
- 2.- Caracterització de les vesícules d'HMGR a diferents teixits, tipus cel·lulars i a diferents etapes del desenvolupament de la planta
- 3.- Anàlisi de la relació entre formació de les vesícules i l'activitat HMGR i la resposta a diferents tipus d'estrès
- 4.- Estudi de la formació d'estructures de membrana per expressió del domini N-terminal d'HMGR1S d'*A. thaliana* en sistemes heteròlegs





## **RESULTATS**



## **1.- EFECTE DE L'EXPRESSION D'1S:GFP EN LA MORFOLOGIA DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN CÈL·LULES D'A. THALIANA**

### **1.1.- Expressió transitòria d'1S:GFP**

#### **1.1.1.- L'1S:GFP indueix la formació de vesícules**

La distribució subcel·lular de HMGR1S d'*A. thaliana* ha sigut objecte d'estudis previs mitjançant la construcció de una quimera proteica adequada per a la seva expressió en cèl·lules (Leivar, 2003). Aquesta proteïna quimèrica està formada pel domini N-terminal de membrana de l'HMGR1S unit a GFP, la qual cosa permet el seu estudi per microscòpia de fluorescència. La proteïna quimèrica resultant va rebre el nom d'1S:GFP.

En aquest primer capítol de resultats s'ha aprofundit en l'estudi de la localització subcel·lular de la isoforma HMGR1S, i per tant, s'ha fet servir àmpliament la proteïna quimèrica 1S:GFP. Els experiments realitzats mitjançant bombardeig de micropartícules sobre fulles de plàntules d'uns 10-20 dies d'*A. thaliana* (figura R.1, panells A-C) mostren que aquesta proteïna quimèrica localitza al reticle endoplasmàtic (RE) i alhora en unes estructures vesiculars de tamany variable entre 0,5 i 2 µm, confirmant els resultats obtinguts prèviament (Leivar, 2003). La caracterització d'aquestes vesícules serà estudiada i discutida en els següents capítols d'aquesta memòria.

#### **1.1.2.- La formació de vesícules 1S:GFP no és deguda a GFP**

Estudis cristal·logràfics posen de manifest que la proteïna GFP pot formar dímers amb una orientació antiparal·lela (Yang *et al.*, 1996; Zacharias *et al.*, 2002). Aquesta capacitat pot donar lloc a la formació d'agregats a l'interior de la cèl·lula sobretot quan la GFP es fusiona a proteïnes que localitzen en el sistema de membranes. En el cas de l'ascorbat peroxidasa d'*A. thaliana*, localitzada normalment a la membrana dels peroxisomes, s'ha vist que la seva expressió com a proteïna de fusió amb la GFP, dóna lloc a grans agregats en el sistema d'endomembranes que poden arribar a embolcallar completament orgànuls sencers com els mitocondris (Mullen *et al.*, 2001). La formació d'aquests agregats és incompatible amb la viabilitat de la cèl·lula. Per altra banda, també s'ha descrit algunes proteïnes quimèriques que continguin GFP poden ser responsables de la formació d'estructures a

dins el RE degut a interaccions febles entre proteïnes (Snapp *et al.*, 2003). Mentre que hi ha proteïnes que tenen una capacitat intrínseca de formar estructures d'engruiximent del RE, en el cas de les quimeres, la GFP podria convertir una proteïna sense aquesta capacitat en una proteïna que indueix la formació d'estructures. Tenint en compte aquestes observacions és important comprovar si les vesícules d'1S:GFP són un producte de la dimerització i subsegüent agregació de la GFP, o si per contra, són degudes a la presència del domini N-terminal de membrana de l'HMGR1S en la quimera.

S'ha descrit que la substitució de l'Alanina 206 per Lisina en la fulla  $\beta$ 10 de la GFP, un únic canvi aminoacídic (Figura R.1, panell D), és suficient per prevenir la dimerització d'aquesta proteïna, mentre que les seves propietats fluorescents no es veuen alterades degut a aquest canvi (Zacharias *et al.*, 2002; Snapp *et al.*, 2003; Shaner *et al.*, 2007). Així, per tal de demostrar que les vesícules 1S:GFP no eren degudes a la dimerització de la GFP, es va obtenir la variant GFP A206K contenint la citada mutació. A la GFP resultant d'aquest canvi aminoacídic se la va anomenar GFPmono, i a la proteïna quimèrica que conté GFPmono unida al domini N-terminal d'HMGR1S, se la va anomenar 1S:GFPmono.

Amb aquesta nova proteïna quimèrica, es van realitzar experiments d'expressió transitòria mitjançant bombardeig de micropartícules sobre fulles de roseta de plantes d'entre 10 i 20 dies després de la germinació d'*A. thaliana*. Els resultats que es van obtenir amb aquests experiments (Figura R.1, panells E-G) mostren que la proteïna quimèrica 1S:GFPmono localitza en la xarxa del RE i en estructures vesiculars de tamany variable. Aquesta distribució es correspon exactament amb la obtinguda amb la quimera 1S:GFP original (Figura R.1, panells A-C).

Aquests resultats indiquen que la formació de les vesícules 1S:GFP no és deguda a la dimerització de la GFP. Les vesícules 1S:GFP semblen doncs derivades de l'expressió del domini N-terminal d'HMGR1S.

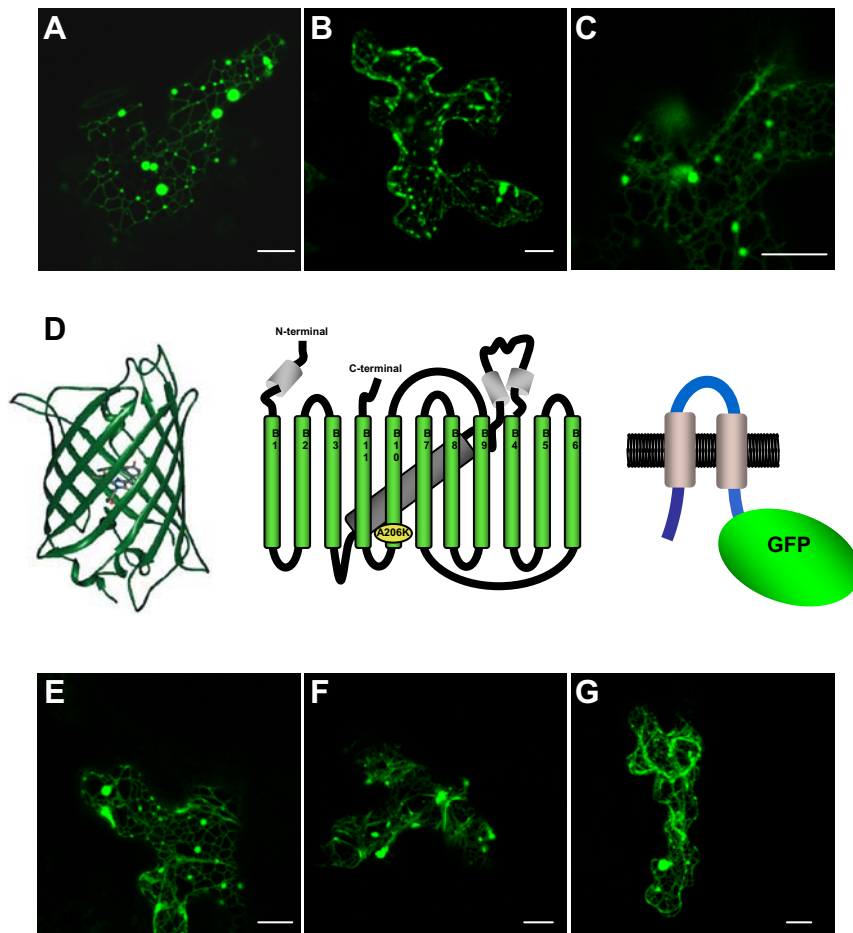


Figura R.1: Estructura i localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP i 1S:GFPmono. **(A-C)** Localització subcel·lular de l'1S:GFP. **(D)** Estructura terciària i representació esquemàtica de la GFP i representació de la quimera 1S:GFP. S'observa la presència de 11 fulles  $\beta$  a la GFP. El canvi aminoacídic de Ala 206 a Lys en la fulla  $\beta$ 10 provoca la pèrdua de la capacitat de dimerització de la GFP. **(E-G)** Localització subcel·lular de l'1S:GFPmono.

Les fulles de plantes de fons genètic Columbia van ser microbombardejades amb les construccions quimèriques. Posteriorment, van ser incubades amb llum contínua, a 22°C durant 18h i observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula. La barra de tamany indica 10  $\mu$ m.

### 1.1.3.- Desenvolupament d'un nou marcador fluorescent de RE

Amb l'objectiu de definir l'origen i naturalesa de les vesícules 1S:GFP, es va procedir a la construcció d'una nova proteïna quimèrica fluorescent que ens permetés marcar amb fluorescència el RE. Es va prendre com a model la construcció quimèrica EGFP<sub>ER</sub>, que té a N-terminal de la GFP el pèptid de trànsit de la quitinasa, i a C-terminal de GFP una senyal de retenció al lumen del RE la qual està formada pels aminoàcids His, Asp, Glu i Leu (HDEL) (Haseloff *et al.*, 1997; Danon *et al.*, 2004) (Figura R.2). Aquesta quimera de GFP és un bon marcador del lumen del RE, que constitueix la seva única localització subcel·lular (figura R.2, panells A-C).

Els marcadors fluorescents de l'espectre del vermell, basats en DsRed són molt útils en estudis de localització subcel·lular, degut a la diferència espectral (longituds d'ona d'excitació i d'emissió) d'aquesta proteïna amb la GFP. No obstant això la utilització de DsRed presenta problemes de maduració lenta i d'agregació. En els últims anys s'han desenvolupat diferents variants de DsRed per tal de millorar les seves característiques. En la present tesi s'ha provat la proteïna original DsRed1, així com les variants DsRedT3 i DsRedT4 (Bevis i Glick, 2002). Es va tenir en compte els temps de maduració, el seu nivell de fluorescència, els coeficients d'extinció, i també, les seves característiques d'agregació. S'ha descrit que les variants DsRedT3 i DsRedT4 presenten una menor tendència a l'agregació comparades amb DsRed1 (Bevis and Glick, 2002). La variant DsRedT3 té una brillantor relativa de 0.83 respecte a la proteïna DsRed1 mentre que en el cas de la DsRedT4 aquest valor és de 0.38. Per altra banda el temps mitjà de maduració de DsRedT4 és més baix que el DsRedT3, 0.71h i 1.3h respectivament, enfront de les 11h de la proteïna DsRed1.

Mitjançant tècniques d'enginyeria genètica es va afegir a DsRedT3 i a DsRedT4 el pèptid de trànsit de la quitinasa, i la senyal de retenció a reticle endoplasmàtic formada pels aminoàcids Lys, Asp, Glu i Leu (KDEL) (Haseloff *et al.*, 1997; Danon *et al.*, 2004) (figura R.2). A la proteïna quimèrica resultant de la fusió de DsRedT3 i DsRedT4 amb el pèptid de trànsit de la quitinasa i la senyal de retenció KDEL, se les va anomenar T3RE i T4RE respectivament (Figura R.2).

Per tal de comprovar que les proteïnes quimèriques T3RE i T4RE eren adients com a marcadors del reticle endoplasmàtic, es van realitzar experiments d'expressió transitòria per bombardeig de micropartícules. El sistema triat va ser l'epidermis de ceba ja que permet una visualització clara, sense la interferència causada per la fluorescència en l'espectre del vermell de la clorofil·la. El

marcador EGFP<sub>ER</sub> (Figura R.2, panells A-C) va ser utilitzat com a control de localització subcel·lular de les nostres construccions quimèriques. Els resultats obtinguts mostren que tant la quimera T3RE (Figura R.2, panells D-F) com T4RE (Figura R.2, panells G-I) localitzen única i exclusivament en el RE. A l'epidermis de ceba el RE presenta un patró clàssic reticulat, format per túbuls que delimiten zones poligonals lliures de membranes, i que molt puntualment poden derivar en zones amb aparença de cisterna més habituals a cèl·lules menys diferenciades (Ridge *et al.*, 1999).

Tenint en compte tots els paràmetres físics de les proteïnes DsRedT3 i DsRedT4 així com els resultats de les observacions amb el microscopi confocal, es va triar com a variant més adequada pel nostre estudi la DsRedT3, i per tant el marcador T3RE, principalment degut a la major brillantor que presentava. DsRedT3 és una proteïna molt més robusta durant els experiments on s'ha d'utilitzar microscòpia confocal, degut a la seva major resistència a l'extinció de la fluorescència al aplicar el làser.

El marcador T3RE també va ser utilitzat en *A. thaliana*. Per aquest propòsit es van fer expressions transitòries per bombardeig de micropartícules sobre fulles de roseta de plantes d'entre 10 i 20 dies després de la germinació. Es pot observar en la figura R.3 que en aquest sistema, T3RE localitza en el RE.

Es pot concloure que el marcador T3RE és adient per l'estudi del RE a diferents sistemes de plantes. Amb aquest nou marcador es pot aconseguir la traçabilitat de les estructures connectades o derivades d'aquest orgànel. Amb la variant DsRedT3 descrita es poden evitar els problemes d'agregació derivats de la sobreexpressió d'aquesta proteïna fluorescent, que malmeten l'estructura del RE. El marcador T3RE pot ser combinat amb altres marcadors derivats de GFP per fer estudi de colocalització o segregació de proteïnes dins el sistema d'endomembranes.



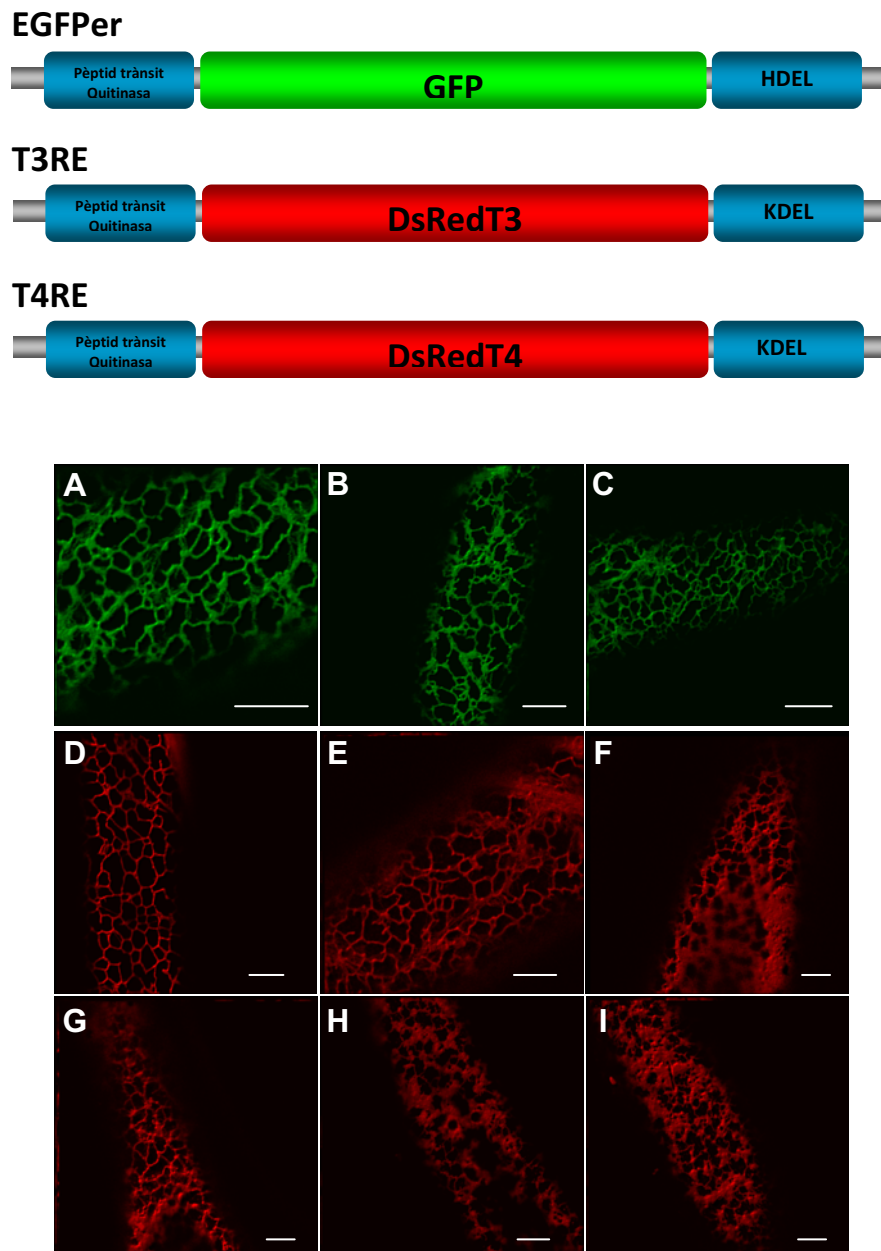


Figura R.2: Marcadors fluorescents de lumen de RE. A la part superior de la figura es pot observar l'estructura de les quimeres EGFPer, T3RE i T4RE. A N-terminal presenten el pèptid de trànsit de la quitinasa, i a C-terminal una senyal de retenció al lumen del RE composta per la seqüència aminoacídica HDEL (EGFPer) o KDEL (T3RE/T4RE). **(A-C)** Localització subcel·lular de la quimera EGFPer. **(D-F)** Localització subcel·lular de la quimera T3RE **(G-I)** Localització subcel·lular de la quimera T4RE. Les tres proteïnes quimèriques es localitzen única i exclusivament al lumen del RE. En tots tres casos s'observa el patró reticular clàssic d'un RE propi de cèl·lules diferenciades d'epidermis de ceba.

L'epidermis de ceba va ser microbombardejada amb les tres construccions quimèriques esmentades. Posteriorment, van ser incubades amb llum contínua, a 22°C durant 18h i observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions tridimensionals de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula. La barra de tamany indica 10 µm.

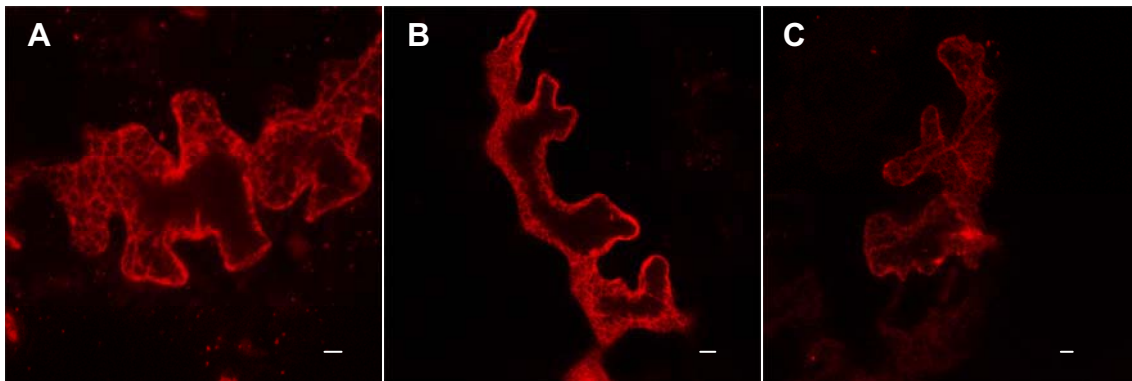


Figura R.3: Localització subcel·lular de T3RE a epidermis d'*A. thaliana*. **(A-C)** Localització subcel·lular de la quimera T3RE. Les fulles de roseta de plantes d'entre 10 i 20 dies després de la germinació van ser micorbombardejades amb el plasmidi pT3RE. Posteriorment, van ser incubades amb llum contínua, a 22°C durant 18h i observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula. La barra de tamany indica 10 µm.

#### 1.1.4.- Les vesícules 1S:GFP són part del RE

Amb el marcador T3RE descrit en l'apartat anterior disposàvem d'una eina que ens permetia estudiar si una altra proteïna localitzava en aquest orgànul. Per tal de discernir si les vesícules formades per 1S:GFP formen part del reticle endoplasmàtic, es van realitzar nous experiments d'expressió transitòria mitjançant bombardeig de micropartícules. En aquest cas es van fer una co-expressió de 1S:GFP i T3RE. Els plasmidis codificant per aquestes quimeres van ser coprecipitats sobre les partícules a bombardejar, sistema pel qual s'aconsegueix que gairebé el 100% de les cèl·lules que expressen una de les quimeres, expressi també l'altra. Els experiments es van dur a terme tant en epidermis de ceba (Figura R.4 panells A-C) com en fulles de roseta d'*A.thaliana* (Figura R.4, panells D-L), obtenint en tots dos casos el mateix resultat. Les vesícules no només presenten un marcatge verd propi d'1S:GFP, sinó també marcatge vermell, provinent de la quimera T3RE. Les imatges de la Figura R.4 mostren que les dues proteïnes expressades presenten una coincidència plena a nivell de localització subcel·lular, tant en el reticle endoplasmàtic com a vesícules.

Donat que el marcador T3RE té un senyal funcional de retenció a RE es pot concloure que les vesícules 1S:GFP observades a epidermis de ceba i fulles d'*A. thaliana* són part del reticle endoplasmàtic, quan no un subcompartiment d'aquest.

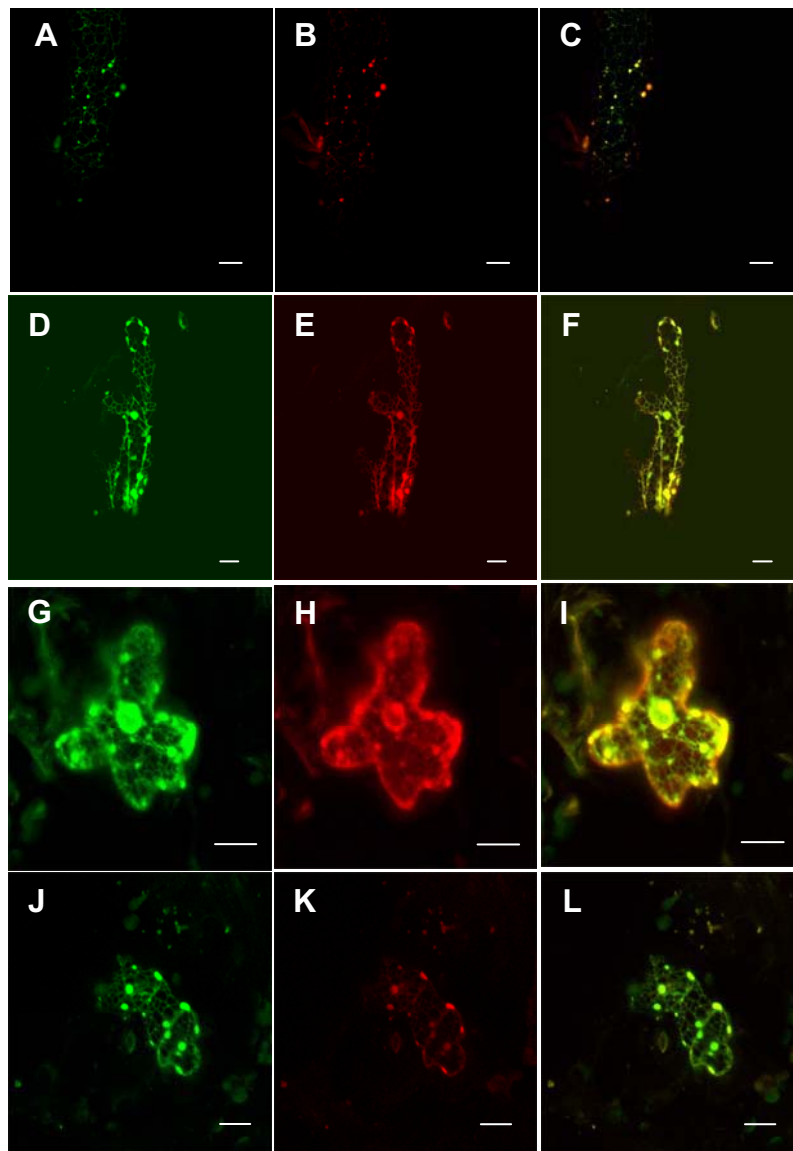


Figura R.4: Colocalització de les quimeres 1S:GFP i T3RE a reticle endoplasmàtic i vesícules de cèl·lules epidèrmiques de ceba i fulla de roseta d'*A. thaliana*. Les epidermis de ceba (A-C) i de fulles de plantes d'entre 10 i 20 dies d'*A.thaliana* (D-F) (G-I) (J-L) van ser cobombardejades les construccions de les dues quimeres. Posteriorment, van ser incubades amb llum contínua, a 22°C durant 18h i observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions tridimensionals de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula. La barra de tamany indica 10 µm.

## 1.2.- Expressió d'1S:GFP a plantes transgèniques d'*A. thaliana*

Un cop definida la localització subcel·lular d'1S:GFP mitjançant expressió transitòria a cèl·lules de ceba i de fulla d'*A. thaliana*, es va procedir a contrastar els resultats mitjançant l'expressió estable de la mateixa quimera en plantes d'*A. thaliana*. Per a aquest propòsit es va clonar 1S:GFP sota el control d'un tàndem de dues còpies del promotor CaMV35S del virus del mosaic de la coliflor. La construcció resultant va ser introduïda en *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz and Schell, 1986) que va servir per a la transformació de plantes d'*A. thaliana*. La generació de les plantes transgèniques va permetre caracteritzar la localització subcel·lular de la proteïna quimèrica 1S:GFP durant el desenvolupament de la planta, a diferents tipus de teixits d'aquesta, i també analitzar les estructures vesiculars derivades de la expressió d'aquesta quimera.

Per a obtenir la primera generació de plantes transformants (generació T1) es va realitzar un senzill crivellat sobre les plantes resistents a Kanamicina consistent en una observació a la lupa de fluorescència, seleccionant així aquelles que presentaven expressió d'1S:GFP. Es van poder descartar més de 20 plantes transformants resistents a l'antibiòtic i que en canvi no presentaven expressió de la proteïna quimèrica. Gràcies a aquest crivellat es van poder aïllar tres plantes de la T1 que presentaven una bona expressió d'1S:GFP. Aquestes línies van ser anomenades 1S1, 1S2 i 1S3. Després d'analitzar la descendència de cada una de les línees transgèniques (generacions T2 i T3 obtingudes per autofecundació) es va seleccionar un reservori de llavors descendent de la planta 1S3.11, pertanyents a la generació T3 i homozigotes pel transgen ja que presentava un patró característic d'expressió d'aquest que era coincident amb el de la major part de plantes de les tres línees, i a més presentava uns nivells de fluorescència òptims per a la observació per microscòpia confocal. S'ha de tenir en compte que tant nivells baixos de fluorescència, com un excés d'aquesta dificulten notablement l'estudi mitjançant microscòpia de fluorescència.

### 1.2.1.- Expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament d'*A. thaliana*

Com a primer pas per a la caracterització del patró de localització subcel·lular d'1S:GFP en plantes transgèniques es van analitzar individus de la generació T2. A pesar que el transgen es troba sota el control del promotor constitutiu CaMV35S es van observar variacions en el que respecta a la distribució i nivell d'expressió d'1S:GFP a la planta. En observacions macroscòpiques d'individus de la

T2 s'observa una expressió generalitzada a cotilèdons i a fulles verdaderes emergents (Figura R.5, panells A-C). A fulles més desenvolupades l'expressió d'1S:GFP és menys intensa i es va restringint en l'epidermis (Figura R.5, panells D-F). D'altra banda és de destacar que durant aquestes primeres etapes del desenvolupament les zones de proliferació cel·lular, la rel, els primordis foliars, i els feixos vasculars mantenen un alt nivell d'expressió (Figura R.5, panells E i G-I). L'expressió d'1S:GFP es va continuar reduint progressivament durant el desenvolupament de les plantes de la T2 fins que va desaparèixer totalment, aproximadament entre els 20 i els 25 dies després de la germinació.

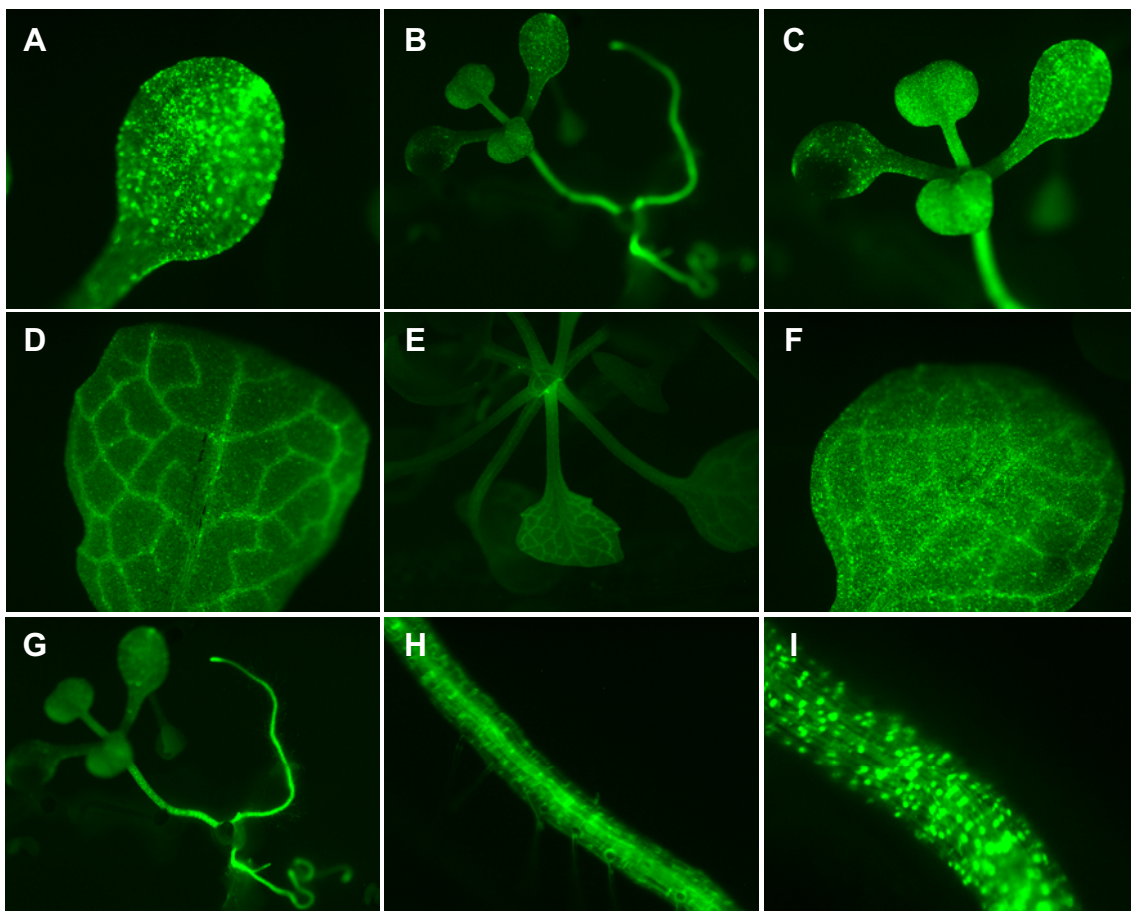


Figura R.5: Expressió de la quimera 1S:GFP durant el desenvolupament de les plantes transgèniques d'*A.thaliana* de la generació T2. S'observa una expressió generalitzada en les primeres etapes del desenvolupament, a cotilèdons i a fulles joves (A-C) i a rels (G-I). A plantes de més de 15 dies s'observa com les fulles conserven expressió de 1S:GFP però aquesta és menor que a cotilèdons, i les úniques cèl·lules que conserven un alta expressió són les dels feixos vasculars i les de les zones meristemàtiques (D-F).

Per a obtenir la generació T3, es van autofecundar 15 plantes de la línia 1S3 de la T2, que obtenint les sublínies 1S3.1 fins a 1S3.15. Les plantes de la T3 van ser analitzades sota la lupa de fluorescència. Al cap de 4 dies després de la germinació la major part d'aquestes plantes presentaven expressió d'1S:GFP. De totes aquestes línies es van seleccionar només aquelles que presentaven acumulació de la quimera 1S:GFP en totes les plantes, ja que amb tota certesa eren descendents d'una planta homozigota pel transgen d'1S:GFP de la generació T2. De totes aquestes i atenent als seus nivells de fluorescència que permetessin l'estudi per microscòpia confocal a nivell subcel·lular es va seleccionar la línia de la generació T3 descendent de 1S3.11 com la més adequada.

Totes les plantes de la generació T3 presentaven un patró característic d'expressió de la quimera 1S:GFP, molt similar a les plantes de la generació T2. La diferència, però, és que a les plantes de la T3 l'1S:GFP va deixar d'expressar-se cap als 15 dies després de la germinació, és a dir, entre 5 o 10 dies abans que les plantes de la generació anterior (Figura R.6). Les plantes de la generació T4 van ser estudiades pel que fa a l'expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament, i presenten exactament el mateix patró que la T3, arribant la fluorescència fins aproximadament els 15 dies després de la germinació. No es pot descartar que generacions subsegüents mostrin un patró de l'acumulació d'1S:GFP encara més restringit.

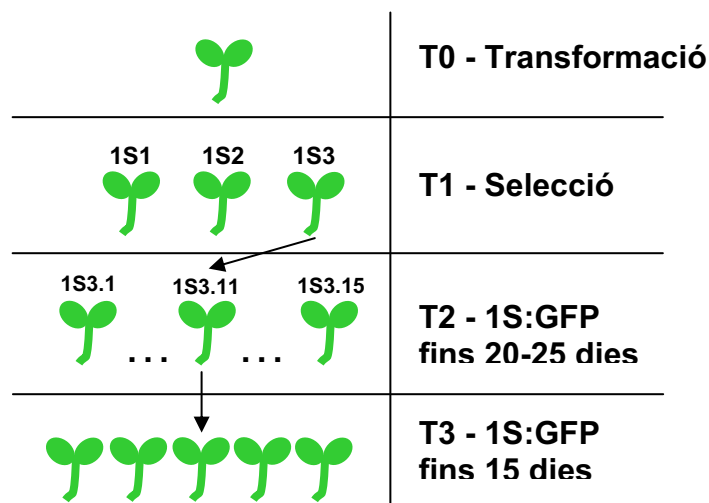


Figura R.6: Representació esquemàtica de les diferents generacions de plantes transgèniques 1S:GFP atenent a l'expressió de la quimera durant el desenvolupament.

### 1.2.2.- Distribució subcel·lular d'1S:GFP

La localització subcel·lular d'1S:GFP va ser estudiada a diferents tipus cel·lulars i al llarg del desenvolupament de les plantes transgèniques. Aquest estudi semblava particularment interessant en el context de les variacions observades en el patró d'expressió d'1S:GFP. Es van analitzar diferents teixits i tipus cel·lulars de plantes 1S3.11 de 11 després de la germinació. El primer que es va observar és que no totes les cèl·lules d'un mateix teixit expressen 1S:GFP sinó que hi havia un mosaic en quant a presència de la quimera. També s'observaren diferències entre teixits en quant al nombre de cèl·lules amb presència d'1S:GFP. Mentre les zones meristemàtiques de la rel (Figura R.7, panell A) presenten gairebé un 100% de cèl·lules fluorescents, aquest percentatge és inferior a zones més diferenciades de la mateixa rel (Figura R.7, panell C). Tal i com s'observa a la figura R.7 (panells A, B i C) a les cèl·lules meristemàtiques i diferenciades de la rel, així com a les cèl·lules guarda dels estomes, l'1S:GFP es troba exclusivament al RE. En cada cas la morfologia d'aquest orgànul és la descrita com a pròpia per al tipus cel·lular corresponent (Ridge *et al.*, 1999). Es pot observar com les cèl·lules meristemàtiques de la rel (Figura R.7, panell A) presenten un RE perinuclear. Possiblement les cèl·lules que no el presenten són cèl·lules en divisió. A la part més diferenciada de la rel, en canvi, s'observa RE cortical amb distribució tubular formant espais poligonals (Figura R.7, panell C). També les cèl·lules guarda dels estomes (Figura R.7, panell B) presenten aquesta distribució cortical.

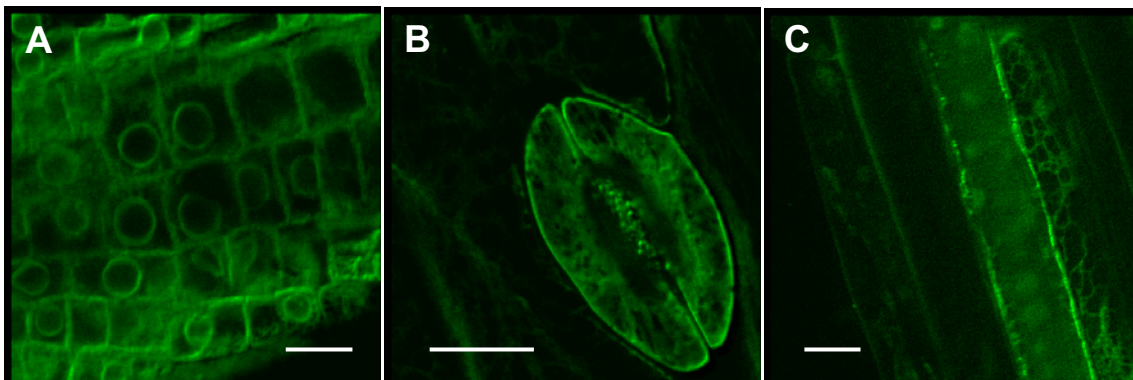


Figura R.7: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP a diferents tipus cel·lulars de plantes transgèniques d'*A. thaliana*. **(A)** Cèl·lules de la zona meristemàtica de la rel on la major part del RE es troba concentrat perinuclearment. **(B)** Cèl·lules guarda dels estomes. **(C)** Cèl·lules diferenciades de la rel on s'observa el RE cortical.

Plantes 1S3.11 van ser crescudes en condicions de dia curt a 22°C. Als 11 dies després de la germinació van ser observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals. La barra de tamany indica 10 µm.

Tenint en compte aquests resultats en plantes de 11 dies després de la germinació va resultar interessant analitzar detalladament a nivell subcel·lular, cèl·lules dels cotiledons i fulles a diferents etapes del desenvolupament.

En primer lloc es van analitzar plantes de 4 dies després de la germinació de la generació T3 de la línia 1S3.11. En augmentar la resolució d'observació mitjançant un microscopi confocal, es va constatar que no totes les cèl·lules presenten fluorescència ni en el cas de tenir-ne, no totes presenten el mateix nivell d'expressió. Es van analitzar cèl·lules epidèrmiques de la part proximal del cotiledó, propera al pecíol. Aquesta és la zona amb major nombre de cèl·lules amb expressió d'1S:GFP. En aquestes cèl·lules la quimera 1S:GFP localitza majoritàriament al RE, però també a una sèrie de vesícules de morfologia fusiforme que semblaven derivades del RE o en contacte amb ell (Figura R.8, panells A-C i A'-C').

Així doncs, l'1S:GFP s'acumula en vesícules tant en sistemes d'expressió transitòria, com en plantes transgèniques, però amb una diferència molt significativa. Mentre la morfologia de les vesícules derivades de l'expressió transitòria d'1S:GFP és més o menys esfèrica amb un diàmetre aproximat d'entre 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  (Figura R.1, panells A-C; Figura R.4), les vesícules observades a les plantes 1S3.11 són de morfologia fusiforme, amb una llargada entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  i una amplada entre 0,5 i 1  $\mu\text{m}$  (Figura R.8, panells A-C). A més, la distribució de la fluorescència és diferent al comparar ambdós tipus de vesícules. En el sistema d'expressió estable a les vesícules només trobem marcatge a la membrana, la qual cosa és coherent amb l'estructura de la quimera, que conté les dues seqüències de transmembrana d'HMGR1S. Per contra, en el sistema d'expressió transitòria la fluorescència derivada de GFP ocupa tot l'interior de les estructures vesiculars, la qual cosa semblaria indicar la presència de membranes al seu interior.



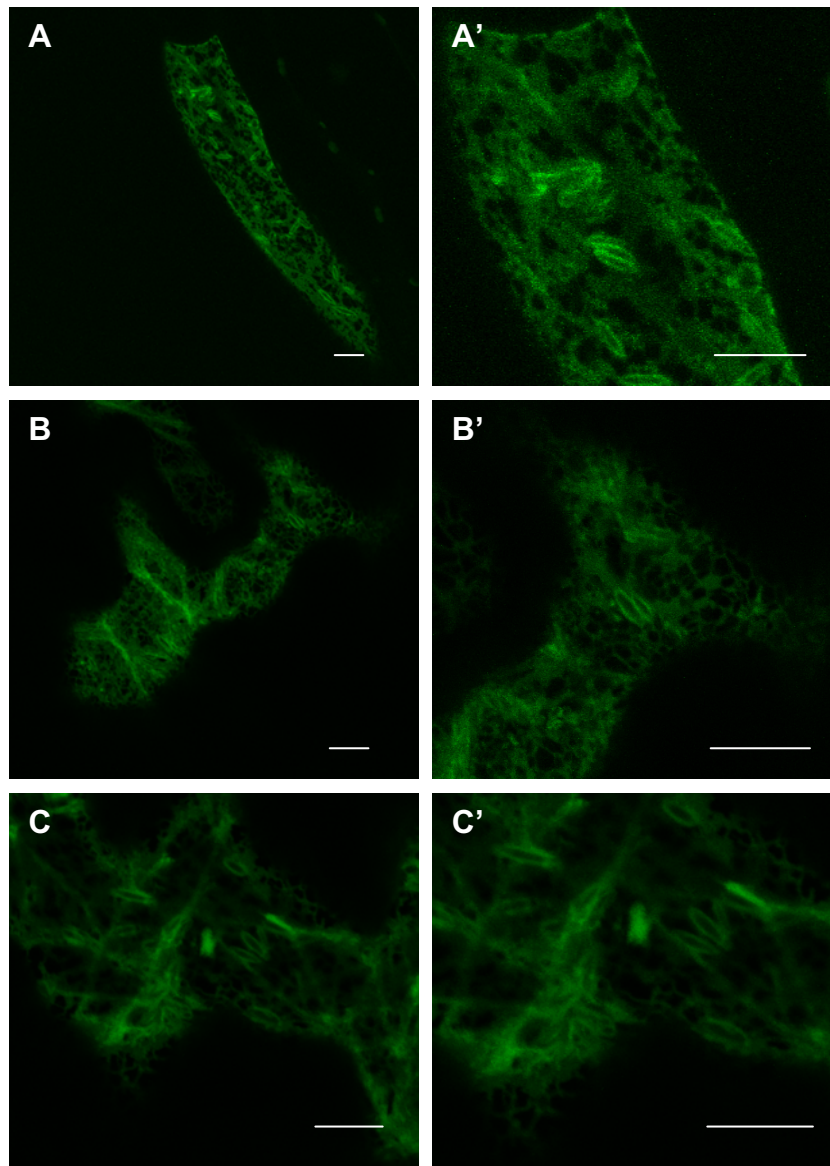


Figura R.8: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP a cèl·lules epidèrmiques de la zona proximal de cotiledó de plantes transgèniques d'*A. thaliana* de 4 dies després de la germinació. Plantes de la línia 1S3.11 van ser crescudes en condicions de dia curt a 22°C i als 4 dies després de la germinació els cotiledons van ser observats al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula (**A-C**) i es representen ampliacions de cada cèl·lula per mostrar en detall com 1S:GFP localitza al RE i a vesícules fusiformes associades en ell (**A'-C'**). La barra de tamany indica 10  $\mu\text{m}$ .

A la zona distal dels cotiledons de plantes d'*A. thaliana* de 4 dies després de la germinació de la línia 1S3.11 trobem un nombre menor de cèl·lules epidèrmiques que expressen 1S:GFP respecte a la zona proximal. A la major part de les cèl·lules epidèrmiques de la zona distal l'1S:GFP està localitzada

exclusivament a la xarxa del RE (Figura R.9, panell A i B). En un menor nombre es troben cèl·lules que tenen una zona d'acumulació de la fluorescència en forma d'agregat (Figura R.9, panells C i D). Igual que en les vesícules derivades de l'expressió transitòria d'1S:GFP en aquests agregats el marcatge fluorescent no es troba únicament a la membrana sinó que envaeix tota l'estructura i a més és molt intens.

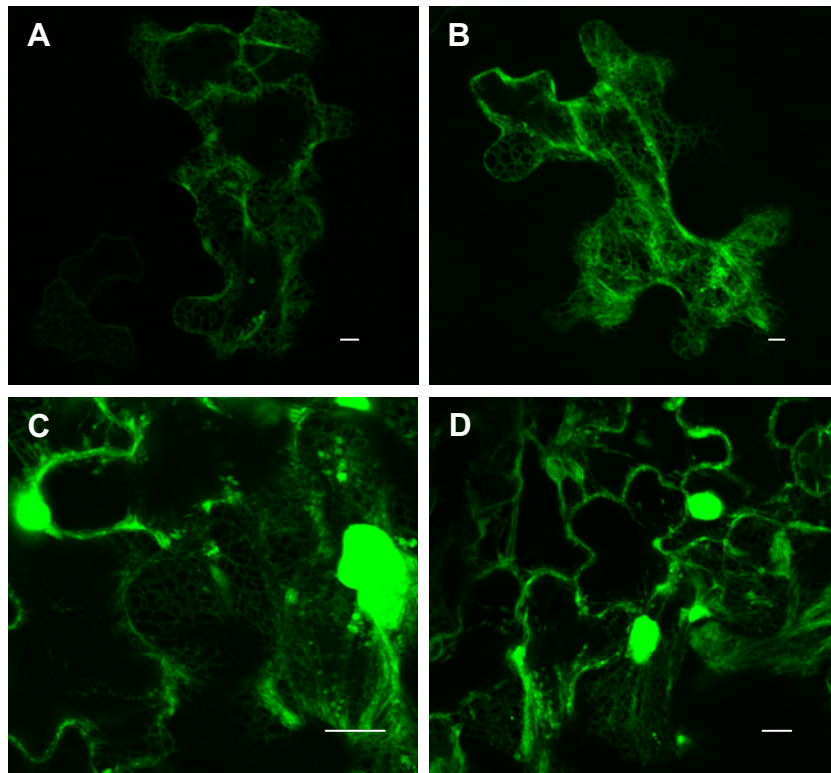


Figura R.9: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP a cèl·lules de la zona distal de cotiledons de plantes transgèniques d'*A. thaliana* de 4 dies després de la germinació. Plantes de la línia 1S3.11 van ser crescudes en condicions de dia curt a 22°C i els cotiledons van ser observats al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula on es pot observar que l'1S:GFP està localitzada exclusivament a la xarxa del RE (**A, B**) o també concentrada en un gran agregat (**C, D**). La barra de tamany indica 10 μm.

Es posa de manifest doncs, que en plantes de 4 dies després de la germinació, el patró de localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP canvia depenen de la zona del cotiledó. Mentre que a la part proximal, l'1S:GFP localitza a la xarxa del RE i a vesícules fusiformes, a la part distal trobem una majoria de cèl·lules amb localització exclusiva a la xarxa del RE, i un nombre reduït de cèl·lules que presenten un gran agregat que concentra la major part de la fluorescència.

### 1.2.3.- Extinció de la fluorescència d'1S:GFP

Com s'ha comentat anteriorment (apartat 1.2.1 de Resultats), les plantes transgèniques 1S:GFP presenten una reducció de la fluorescència durant el desenvolupament, que va quedant progressivament restringida a les zones més joves amb proliferació cel·lular, i en un limitat nombre de cèl·lules diferenciades de les fulles. Aquest procés s'observa en totes les generacions de plantes provinents de la transformació amb la construcció 1S:GFP. A partir de la generació T3, a més, la fluorescència (i per tant la presència d'1S:GFP) desapareix completament al voltant dels 15 dies després de la germinació. En les generacions successives aquest fenomen queda fixat. Les plantes transgèniques de la línia 1S3.11 i les seves descendents presenten un bon nivell d'expressió d'1S:GFP a la germinació, fins aproximadament els 15 dies després de la germinació, donant-se durant aquest temps una extinció progressiva.

Per tal de determinar la localització subcel·lular de la construcció 1S:GFP just abans de la desaparició de l'expressió, es van analitzar cèl·lules que encara conservaven la fluorescència en plàntules de 13 dies després de la germinació. En aquestes plantes la major part de les cèl·lules que encara presentaven la quimera 1S:GFP es trobaven a la part més proximal de la fulla. Tal i com es pot observar en la figura R.10 (panells A-D) totes les cèl·lules presentaven un patró de localització de la quimera 1S:GFP a la xarxa del RE i en la membrana de vesícules fusiformes. Aquest patró coincideix amb el trobat en cèl·lules de la part proximal de cotiledons de plantes de 4 dies després de la germinació (figura R.8), mentre que a les cèl·lules de zones distals de cotiledons de plantes de 4 dies després de la germinació (figura R.9) no s'observen les estructures vesiculars.

Sembla doncs que només les cèl·lules més joves poden formar estructures fusiformes dins el RE amb marcatge d'1S:GFP a la membrana.

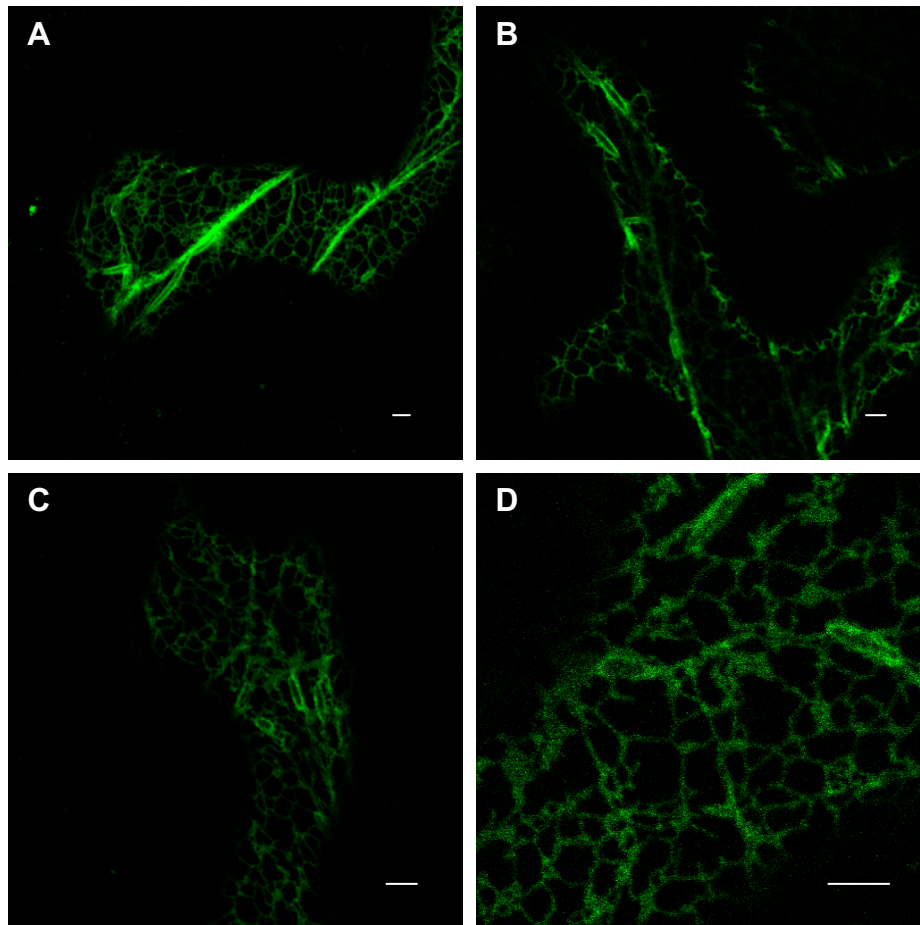


Figura R.10: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP a cèl·lules de la zona proximal de fulles de plantes transgèniques d'*A.thaliana* de 13 dies després de la germinació. Plantes de la línia 1S3.11 van ser crescudes en condicions de dia curt a 22°C i les fulles van ser observats al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula. Es pot observar que l'1S:GFP localitza a la xarxa del RE i a vesícules fusiformes amb marcatge fluorescent a la membrana. La barra de tamany indica 10 µm.

Així doncs, la localització subcel·lular d'1S:GFP en plantes transgèniques, estudiada a nivell de diferents teixits, tipus cel·lulars i etapes del desenvolupament, permet constatar que la formació de vesícules derivades de l'expressió d'aquesta quimera es dona específicament en cèl·lules de la zona proximal de cotiledons i fulles. Per altra banda la quimera 1S:GFP manté la seva localització primària a la xarxa del RE, en la resta de tipus cel·lulars, permetent així pensar en una regulació de la formació de les estructures vesiculars mitjançant el domini N-terminal d'HMGR1S en funció de senyals presents en determinats tipus cel·lulars i en determinats moments del desenvolupament.

#### 1.2.4.- Motilitat de les vesícules d'1S:GFP

Estudis previs han constatat que el reticle endoplasmàtic és un orgànul molt dinàmic (Ridge *et al.*, 1999). En aquests estudis el marcatge amb GFP-HDEL va permetre observar que els túbuls i cisternes del RE es troben en permanent canvi. En la present tesi, l'estudi de plantes transgèniques 1S:GFP de 4 i 13 dies després de la germinació va permetre confirmar el gran dinamisme del RE, però a més es va poder observar que les vesícules fusiformes d'1S:GFP es mouen de forma encara més ràpida en el si de la xarxa del RE.

Per tal de caracteritzar aquest moviment es van realitzar experiments de *time lapse*. En aquesta tècnica es prenen fotografies *in vivo* d'una o varies cèl·lules adjacents, amb un interval de temps determinat. Cal recordar que el làser del microscopi confocal permet captar imatges de diferents plans focals de manera que en fer projeccions dels plans presos en un temps determinat, obtenim una imatge d'una zona concreta de la cèl·lula, que s'anomena *stack*. Adjuntant de manera seqüencial les diverses projeccions (*stacks*), preses en els diferents intervals de temps obtenim una imatge en vídeo que ens mostra, en el nostre cas, la motilitat intracel·lular de les vesícules 1S:GFP al llarg de la xarxa del RE. Es pot observar com les vesícules migren a través de la xarxa del RE d'una manera altament dinàmica (vídeo CD adjunt i figura R.11 panells consecutius A-I). La membrana de les vesícules fusiformes observades presenten una continuïtat amb la membrana del RE, i juntament amb la migració a través dels túbuls de la xarxa del RE permet concloure que aquestes estructures formen part del RE.

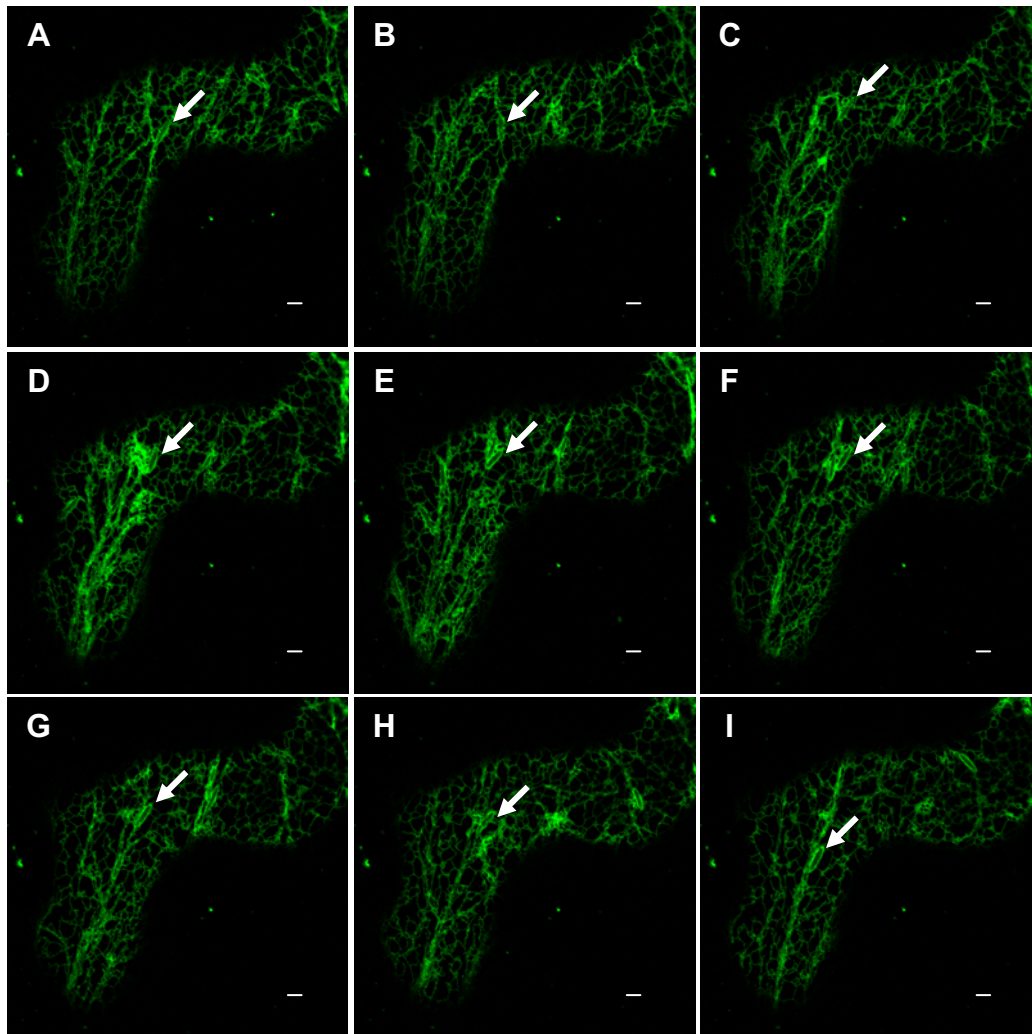


Figura R.11: *Time lapse* d'una cèl·lula de la zona proximal de fulla de plantes de la línia 1S3.11 d'*A. thaliana* de 13 dies després de la germinació. Totes les imatges corresponen al mateix pla focal que té un gruix de  $0.045\ \mu\text{m}$ . L'interval de temps entre cada una d'elles és de 30 segons. Les fletxes indiquen una de les vesícules fusiformes que presenta una alta motilitat al llarg de la xarxa del RE. L'aparició i desaparició d'algunes d'aquestes vesícules a les imatges consecutives probablement respon a un desplaçament a nivell de diferents plans focals. El tamany de la barra representa  $10\ \mu\text{m}$ .

## 2.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR D'A. *THALIANA*

Els resultats d'aquesta tesi (capítol 1 de Resultats) indiquen que la sobreexpressió del domini N-terminal de l'HMGR1S d'A. *thaliana* unit a GFP (quimera 1S:GFP), induïx la formació d'estructures vesiculars al RE. En els experiments d'expressió transitòria l'1S:GFP forma estructures esfèriques que contenen la quimera. En les plantes transgèniques 1S:GFP, la quimera es localitza a la membrana de cossos fusiformes que presenten una alta mobilitat i que formen part del RE. Donat que aquestes estructures fusiformes contenen la quimera també podrien ser un producte de la seva sobreexpressió.

En aquest context queden per dilucidar qüestions fonamentals relatives a la localització subcel·lular d'HMGR. En primer lloc s'hauria d'analitzar si l'HMGR endògena de cèl·lules d'A. *thaliana* també localitza en algun tipus de vesícules i s'hauria d'identificar la naturalesa d'aquestes. En segon lloc s'hauria d'identificar si existeix una coincidència física entre aquestes vesícules d'HMGR i les derivades de la sobreexpressió del domini de membrana (N-terminal) d'HMGR1S (quimera 1S:GFP). Finalment s'hauria d'investigar si les vesícules d'HMGR o d'1S:GFP coincideixen amb alguna estructura descrita prèviament en el RE. Aquestes qüestions seran tractades a continuació en els apartats 2.1 fins 2.4 del Resultats d'aquesta memòria. S'ha d'assenyalar que la presència d'HMGR d'A. *thaliana* en estructures esfèriques al citosol ja va ser reportada en un estudi previ (Leivar *et al.*, 2005).

### 2.1.- Assajos d'immunocitoquímica *in-situ* amb sèrum anti-CD1

Per tal de localitzar l'HMGR a cèl·lules d'A. *thaliana* es va utilitzar una tècnica d'immunocitoquímica *in-situ* en plàntules senceres (*whole mount*). En aquesta tècnica es van utilitzar anticossos policlonals anti-CD1-623, que havien sigut generats en conills contra el domini catalític d'HMGR1. La mostra de domini catalític utilitzada com a immunogen havia estat expressada en *E. coli* a partir d'una construcció recombinant purificada a homogeneïtat. Aquesta mostra era catalíticament activa. En assajos de *Western Blot* el sèrum obtingut reconeix el domini catalític d'HMGR1 i d'HMGR2 d'A. *thaliana* (Nieto *et al.*, 2009).

L'estudi immunocitoquímic es va portar a terme a plantes silvestres d'*A. thaliana* (ecotip Columbia 3) de 6 dies després de la germinació. Les imatges obtingudes en aquests experiments corresponents a cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons es mostren a la figura R.12. El marcatge de la proteïna HMGR es detecta en unes estructures vesiculars esfèriques de tamany variable amb un diàmetre entorn a les 2  $\mu\text{m}$ . Les vesícules es troben formant una xarxa discontinua al voltant dels espais lluïres al citosol que deixen els cloroplasts. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en estudis previs (Leivar *et al.*, 2005).

Es pot concloure que a cotiledons de plàntules d'*A. thaliana* l'HMGR s'acumula majoritàriament a vesícules esfèriques d'un tamany variable entorn a 2  $\mu\text{m}$  localitzades en el citosol.

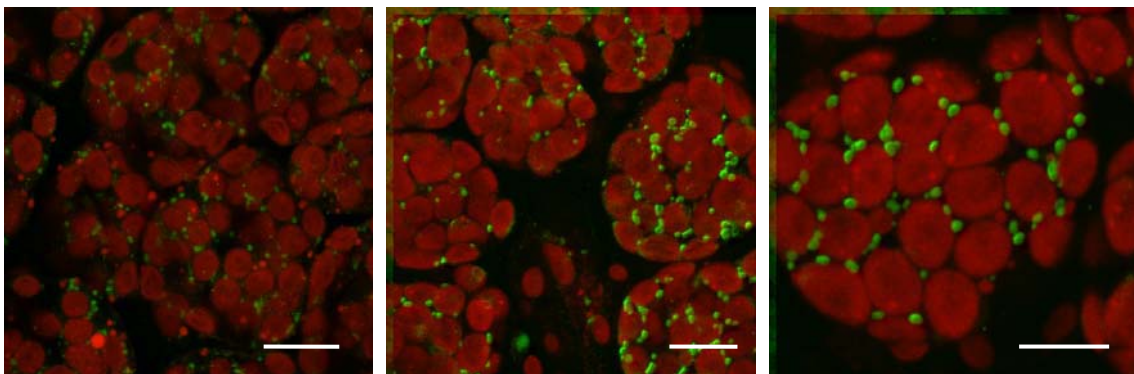


Figura R.12: Immunolocalització *in-situ* en whole mount d'HMGR en plàntules d'*A. thaliana* de 6 dies després de la germinació. L'HMGR ha estat detectada mitjançant l'anticòs policlonal anti-CD1-623 i un anticòs secundari anti-IgG de conill marcat amb el fluoròfor AlexaFluor 488, i per tant apareix en color verd a les imatges. Les estructures de color vermell corresponen als cloroplasts degut a l'autofluorescència de la clorofil·la. La detecció d'ambdues fluorescències es va fer per microscòpia confocal, i les imatges mostrades són projeccions tridimensionals de 10 plans focals. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Tenint en compte que el RE és el destí subcel·lular primari de l'HMGR d'*A. thaliana*, aquestes vesícules podrien correspondre al RE o a una altra localització del sistema d'endomembranes. De tota manera, aquests resultats han de ser considerats com a preliminars doncs van ser obtinguts amb un sèrum encara cru que podria reconèixer altres proteïnes a banda d'HMGR. La naturalesa de les vesícules observades amb l'anticòs anti-CD1-623 serà descrita posteriorment en aquesta memòria.



## 2.2.- Immunosostracció del sèrum anti-CD1-623

En un treball anterior es va fer servir el sèrum anti-CD1-623 per analitzar extractes d'*A. thaliana* mitjançant *Western Blot* (Leivar, 2003). Amb aquests anticossos es va detectar un total de quatre bandes al patró electroforètic corresponent, amb la sospita que alguna d'aquestes bandes no correspongués a l'HMGR (Leivar, 2003). A les imatges obtingudes per immunocitoquímica no es pot distingir entre senyals específiques (corresponents a HMGR) i inespecífiques (corresponents a d'altres proteïnes), ja que no tenim altres criteris més enllà de la intensitat del senyal, com si passa en d'altres aproximacions, com per exemple la mobilitat electroforètica en *Western Blot*. Per tal de verificar l'especificitat del sèrum anti-CD1-623 i en un intent de purificació del mateix, es va procedir a la immunosostracció de les IgG que reconeixin proteïnes d'*E. coli*. Tal i com s'ha comentat en l'apartat 2.1 de Resultats, la mostra de CD1 utilitzada com a immunogen havia estat produïda a *E. coli*. És doncs factible, que aquesta mostra tingui traces de proteïnes d'*E. coli* contaminants i que el sèrum anti-CD1-623 reconeixi no només aquestes sinó també d'altres proteïnes d'*A. thaliana* que tinguessin epítops similars als de les proteïnes contaminants.

Per procedir a la immunosostracció del sèrum anti-CD1-623 es va preparar una matriu de resina sefarosa amb proteïnes d'*E. coli* unides de manera covalent. L'extracte d'*E. coli* utilitzat va ser purificat a partir de la mateixa soca (BL21 [DE3]) i seguint el mateix procediment utilitzat en la purificació de l'immunogen CD1 (Dale *et al.*, 1995), però ometent la cromatografia en "Affi-Gel Blue", que és l'últim pas del procés. Concretament, es va fer servir una mostra de 10 mg de proteïna purificada d'*E. coli* que es va unir covalentment a la resina amb una eficiència del 75%.

La immunosostracció de l'anticòs es va fer passant el sèrum anti-CD1-623 original (fracció crua) a través de la matriu que contenia les proteïnes d'*E. coli*. Amb aquest mètode s'aconsegueix que les IgG presents al sèrum amb afinitat per les proteïnes d'*E. coli* quedin retingudes a la matriu. La fracció no retinguda haurà perdut IgG inespecífiques. Aquest sèrum purificat va ser anomenat anti-CD1[26-8].

Per tal de comprovar la qualitat del sèrum anti-CD1[26-8] es va fer un assaig de *Western Blot* a partir d'extractes de plantes senceres d'*A. thaliana* (ecotip silvestre Columbia 0) crescudes en fotoperíode de dia llarg. En aquest tipus de mostra s'esperaria detectar HMGR1S i HMGR2, però no HMGR1L (Lumbreras *et al.*, 1995a; Leivar, 2003). Tal i com es pot observar a la figura R.13 amb el sèrum Anti-

CD1-623 en aquestes condicions es detecten dues bandes, una més intensa d' aproximadament 63 KDa i un altre d'uns 66 KDa de menor intensitat. Només la banda de 63 KDa és reconeguda pel sèrum Anti-CD1[26-8]. Presumiblement aquesta banda correspon a l'HMGR1S, ja que l'HMGR2 és minoritària en aquesta mostra. La banda de 66 KDa pot ser atribuïda a una altra proteïna de l'extracte d'*A. thaliana* que tindria similitud amb alguna proteïna d'*E. coli* que va contaminar l'immunogen utilitzat..

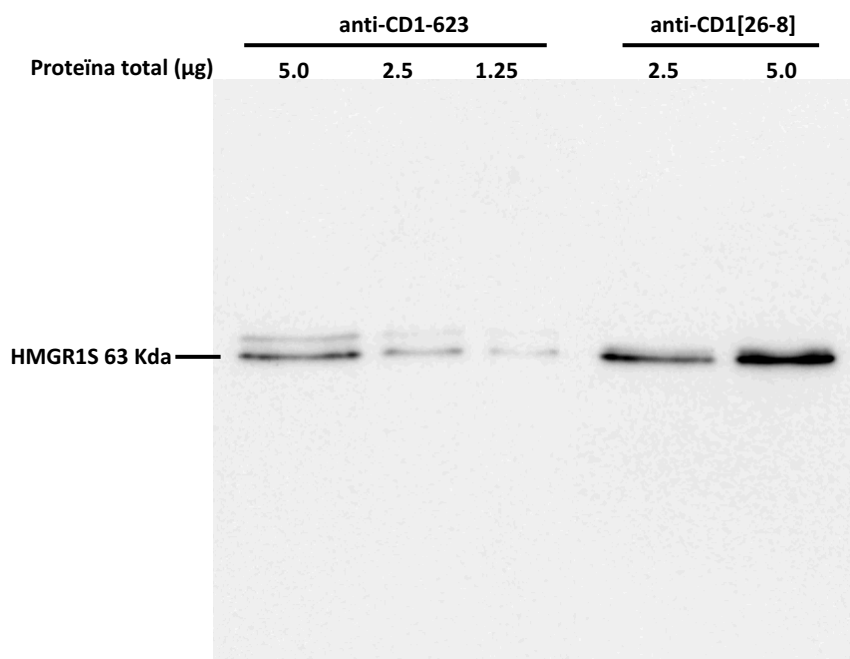


Figura R.13: Detecció d'HMGR amb anticossos anti-CD1 en extractes de plàntules d'*A. thaliana*. S'observa com el sèrum cru anti-CD1-623 detecta específicament una banda de 63 KDa que correspon a HMGR1S, però també una banda de 66 KDa que no és específica. El sèrum anti-CD1[26-8], obtingut per immunosostracció reconeix únicament HMGR1S.

Així doncs, el sèrum anti-CD1[26-8], obtingut mitjançant una immunosostracció del sèrum cru anti-CD1-623 pot ser utilitzat per a la detecció específica d'HMGR en mostres d'*A. thaliana*.

### 2.3.- Colocalització de les vesícules d'HMGR i les vesícules d'1S:GFP

Fins al moment, l'estudi de la localització subcel·lular d'HMGR ha estat abordat per dues estratègies alternatives. En una primera aproximació emprada en estudis previs (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006, 2008) i en aquesta memòria es van fer servir quimeres d'HMGR d'*A. thaliana* en les que el domini catalític havia estat substituït per GFP. En experiments d'expressió transitòria la quimera formada pel domini N-terminal d'HMGR1S (1S:GFP) localitza en unes vesícules esfèriques d'entre 0,5 i 2 µm derivades del RE. Donat que s'està fent servir una quimera i no la proteïna sencera no es pot assegurar que aquesta sigui la localització subcel·lular final de l'HMGR1S, ja que el domini catalític que ha estat eliminat podria influir en aquesta localització. En una segona aproximació, també emprada en estudis previs (Leivar *et al.*, 2005) i en aquest treball, es va immunolocalitzar l'HMGR a cotiledons d'*A. thaliana* amb un sèrum que reconeix el domini catalític de l'enzim. En aquest cas es va detectar unes vesícules d'un tamany entre 1 i 2 µm que acumulen HMGR. La coincidència entre ambdues aproximacions és suggerent i queda per determinar si les vesícules d'1S:GFP corresponen de fet a les vesícules detectades amb l'anticòs anti-CD1-623 (vesícules d'HMGR).

Per abordar aquesta qüestió es van realitzar experiments d'immunocitoquímica *in-situ*, realitzats sobre plantes transgèniques 1S:GFP de la línia 1S3.11. L'anàlisi es va fer sobre plantes senceres amb la tècnica *whole mount*. En un primer intent es va utilitzar el sèrum anti-CD1[26-8] per a detectar l'HMGR, mentre que es pretenia detectar directament la fluorescència de la quimera 1S:GFP en microscòpia confocal. Tal i com es descriurà en l'apartat 2.4 de Resultats, el processament per immunocitoquímica de les mostres *whole mount* provoca la desnaturalització de la GFP i per tant la pèrdua de la seva fluorescència. Per solucionar aquest problema, també es va haver de recórrer a la tècnica immunocitoquímica per detectar la 1S:GFP. Així doncs es van utilitzar dos sèrums policlonals com a anticossos primaris: un generat a conill contra l'HMGR (anti-CD1[26-8] ja descrit) i un generat a ovella contra la GFP (comercial, veure Material i mètodes). Com anticossos secundaris es van fer servir un anti-IgG de conill marcat amb el fluoròfor AlexaFluor 568, que dóna fluorescència en la banda del vermell i un altre anti-IgG d'ovella marcat amb el fluoròfor FITC que dóna fluorescència a la banda del verd. D'aquesta manera es va poder analitzar la possible colocalització de l'HMGR marcada en color vermell i l'1S:GFP en color verd.

Amb la doble tècnica immunocitoquímica es va observar que l'HMGR i l'1S:GFP colocalitzen en la membrana d'estructures fusiformes que tenen un tamany d'unes 5  $\mu\text{m}$  aproximadament (Figura R.14, panells A i B). La generació d'una imatge dual on estan representades les senyals de detecció d'HMGR i 1S:GFP (Figura R.14, panell C) mostren una completa coincidència entre les localitzacions d'ambdues proteïnes, com també es pot comprovar en la imatge dels punts de colocalització generada pel software ImageJ (Figura R.14, panell D).

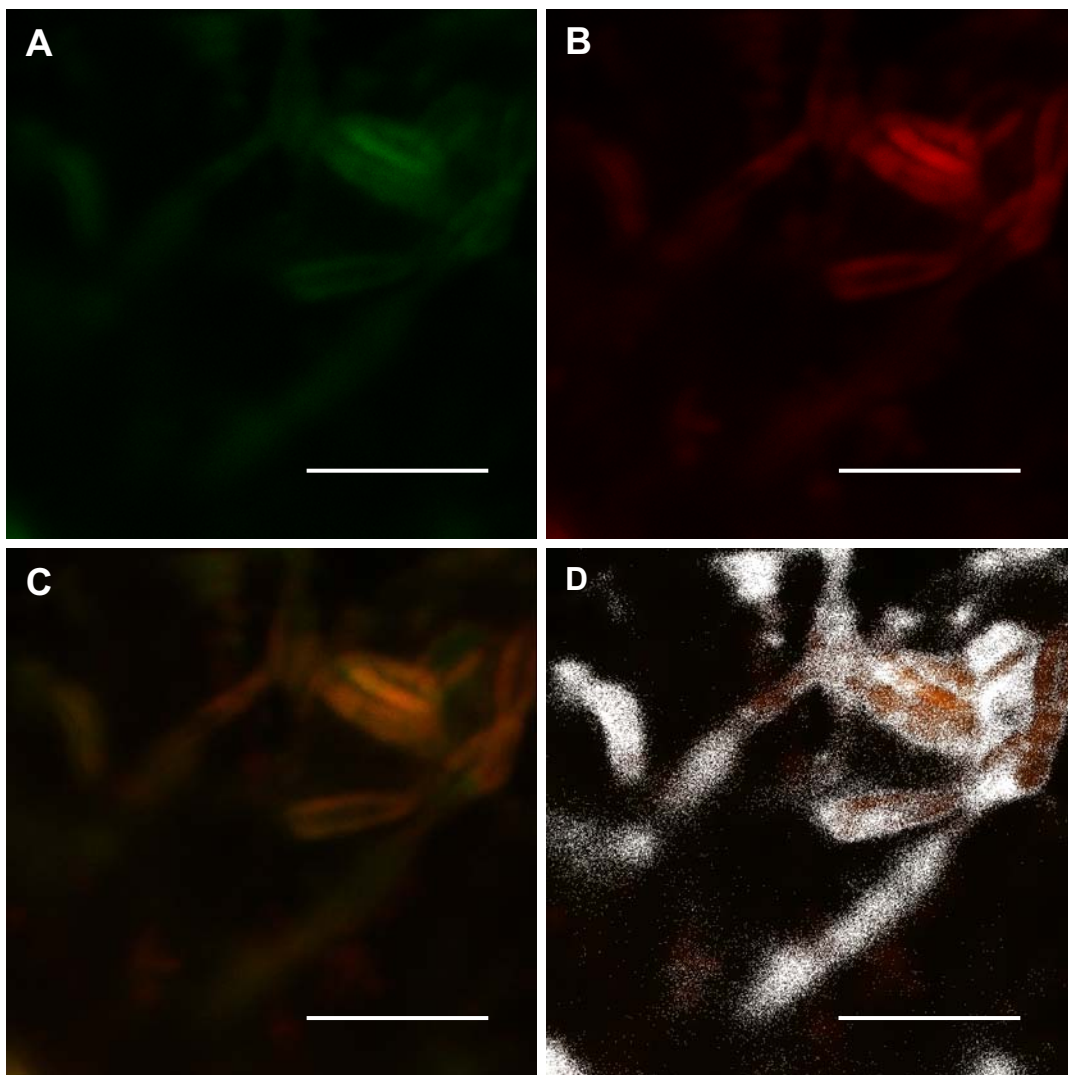


Figura R.14: Immunolocalització d'HMGR1 i 1S:GFP en plàntules transgèniques 1S3.11 d'A. *thaliana* de 6 dies després de la germinació. S'observen les fluorescències pertanyents als dos canals. **(A)** En verd corresponent a la fluorescència de FITC es representa la localització d'1S:GFP **(B)** En vermell corresponent a la fluorescència de l'AlexaFluor 568 es representa HMGR. **(C)** La colocalització d'ambdues proteïnes es presenta com un *merge* d'ambdós canals. **(D)** Superposició dels píxels que colocalitzen a ambdós canals analitzats mitjançant el software ImageJ..

A la figura R.14 s'aprecia clarament que ambdós canals són gairebé totalment coincidents, i només el nombre diferent d'ambdós molècules i la diferència de penetrància i funcionament dels dos anticossos primaris podrien estar produint lleugeres diferències en la colocalització d'ambdues proteïnes.

Així doncs, aquests resultats permeten concloure que les vesícules d'1S:GFP que s'havien descrit prèviament i les vesícules d'HMGR detectades amb l'anticòs anti-CD1[26-8] són de fet les mateixes vesícules. La substitució del domini catalític per GFP a HMGR1S (per obtenir la quimera 1S:GFP) no afecta la seva localització subcel·lular en les vesícules derivades del RE.

#### **2.4.- Colocalització de les vesícules d'HMGR i els *ER-bodies***

Per tal d'estudiar si les vesícules 1S:GFP (vesícules d'HMGR) coincideixen amb alguna estructura prèviament descrita al RE es van utilitzar plantes transgèniques que contenen el marcador GFP-HDEL. Aquest marcador localitza al lumen del RE ja en ell s'ha incorporat el senyal de retenció His-Asp-Glu-Leu (HDEL) a l'extrem C-terminal de la GFP (Haseloff *et al.*, 1997; Gunning *et al.*, 1998; Köhler *et al.* 1998; Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002). Tal i com s'ha descrit a l'apartat 4.1 de la Introducció d'aquesta memòria existeixen diverses estructures vesiculars derivades del RE. El marcador GFP-HDEL permet detectar unes vesícules de morfologia fusiforme, d'uns 5 a 10 µm de llarg i que són específiques dels cotiledons. Aquestes vesícules, que contenen la construcció GFP-HDEL, són doncs, derivades del RE, i conseqüentment van rebre el nom d'*ER-bodies*. Donat que els *ER-bodies* de les plantes GFP-HDEL coincideixen en morfologia i tamany amb les vesícules d'1S:GFP presents en les plantes transgèniques de la línia 1S3.11 (apartat 1.2 de Resultats), es van realitzar estudis per a determinar si les vesícules fusiformes d'1S:GFP coincidien físicament amb els *ER-bodies*.

Per abordar aquesta qüestió es van obtenir plantes de sis línies transgèniques diferents (N70007, N70017, N70030, N70031, N70074, N70078) que expressaven la construcció GFP-HDEL provinents del NASC (The European Arabidopsis Stock Centre). Aquestes línies van ser generades mitjançant transformacions sobre plantes d'*A. thaliana* (ecotip C24) amb un vector *enhancer trap* amb la construcció UAS::GFP-HDEL i l'activador transcripcional GAL4-VP16 sota el control d'un promotor mínim constitutiu CaMV35S. Es va realitzar un crivellat de totes les línies atenent a criteris de

germinació i fluorescència. Totes les línies eren homozigotes pel transgen, però el nivell de fluorescència era molt variable. Després del crivellat per germinació, on es van seleccionar les tres línies amb més vigor germinatiu (N70007, N70017, N70031), el crivellat per fluorescència va determinar que d'entre les tres línies només la línia N70007 tenia uns nivells de fluorescència adequats per un estudi a nivell subcel·lular mitjançant microscòpia confocal. A més, d'acord amb la informació facilitada pel NASC, la línia N70007 era la única de les tres línies seleccionades on s'havia comprovat que la construcció no havia provocat una disrupció gènica. Això permet minimitzar els riscos de que la línia presenti un fenotip apart del desitjat d'expressió de la quimera GFP-HDEL. Com s'ha comentat prèviament en aquesta memòria, els nivells de fluorescència són molt importants en els estudis de microscòpia làser confocal, i tant un defecte que no permetés observar suficientment les estructures com un excés que les emmascarés, podrien alterar la percepció sobre el sistema a estudiar.

Es van realitzar observacions *in vivo* de les plantes de la línia N70007 per a determinar la presència de la quimera GFP-HDEL i la seva localització subcel·lular. Els resultats que es van obtenir corresponien perfectament amb el patró descrit (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003) i la proteïna quimèrica es va poder localitzar en a la xarxa del RE, i als *ER-bodies* tal i com es mostra a la figura R.15 (panells A i B).

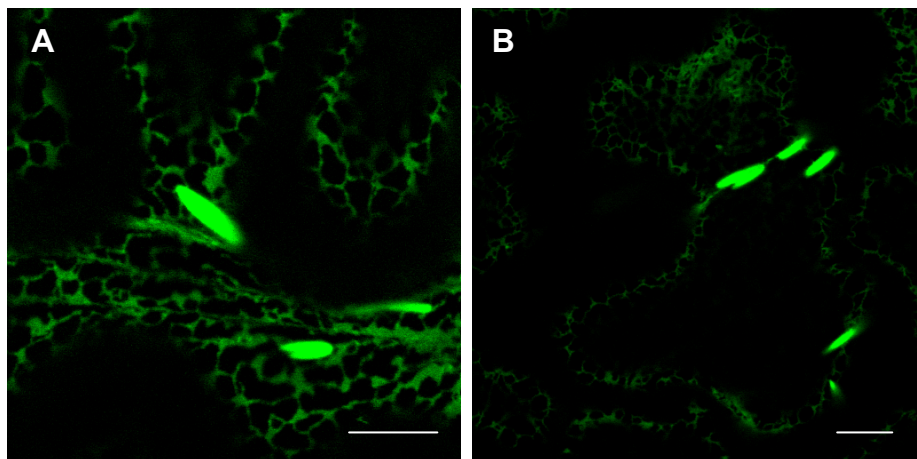


Figura R.15: Localització subcel·lular de GFP-HDEL en plantes transgèniques d'*A. thaliana*. Per l'estudi es van utilitzar plantes de 6 dies després de la germinació i es van observar cèl·lules epidèrmiques de cotiledons al microscopi confocal. S'observa la xarxa del RE i la morfologia fusiforme dels *ER-bodies* que presenten un tamany aproximat d'entre 5 i 10  $\mu\text{m}$ . Ç Les imatges mostrades són projeccions de 10 plans focals. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Tal i com s'ha mostrat en els apartats 1.2 i 2.3 de Resultats, en plantes transgèniques la quimera 1S:GFP es localitza a la membrana d'estructures vesiculars fusiformes connectades al RE. Aquestes vesícules coincideixen en morfologia i en tamany amb els *ER-bodies* de les plantes GFP-HDEL, totes dues estructures són fusiformes i d'un tamany aproximat entre 5 i 10  $\mu\text{m}$ . A més en aquesta memòria s'ha demostrat que hi ha coincidència física entre les vesícules 1S:GFP i les vesícules HMGR. Per tant es postula que les vesícules 1S:GFP són, precisament *ER-bodies* i que l'HMGR pot formar part d'aquests. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, es va procedir a localitzar la proteïna HMGR en plantes transgèniques GFP-HDEL.

Concretament, en aquest cas es van utilitzar les plantes GFP-HDEL de la línia N70007 de 6 dies després de la germinació, on s'havien descrit els *ER-bodies* i on en el present treball havíem confirmat la seva presència (Figura R.15). Per a la detecció d'HMGR es va utilitzar l'anticòs anti-CD1-623 i un anticòs secundari amb un fluoròfor en l'espectre del blau (Alexa Fluor 350), mentre GFP-HDEL es va voler detectar utilitzant la fluorescència verda de la GFP. Alhora es volia conservar l'autofluorescència de la clorofil·la i poder observar els cloroplasts. Els resultats mostren com HMGR localitza en una trama de vesícules al voltant dels espais dels cloroplasts (Figura R.16). Contràriament al que s'esperava la construcció GFP-HDEL no apareix en aquesta xarxa vesicular o bé no s'observava la seva fluorescència. La fluorescència de la construcció GFP-HDEL semblava perdre's en la major part d'aquests assajos degut a que el processament amb solvents orgànics destrueix l'estructura de la GFP i la fa indetectable (Sauer *et al.*, 2006) (figura R.16).

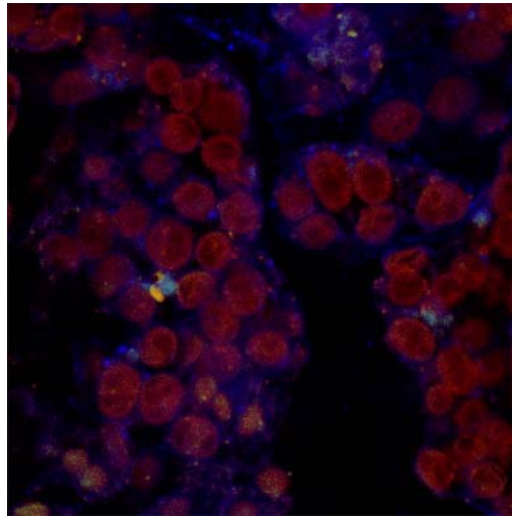


Figura R.16: Pèrdua de la fluorescència del marcador GFP-HDEL durant el processament de les plantes d'*A. thaliana* per immunocitoquímica. Plantes transgèniques GFP-HDEL de la línia N70007 de 6 dies després de la germinació van ser processades per immunocitoquímica mitjançant al tècnica *whole mount*. L'HMGR va ser detectada amb el sèrum anti-CD1-623 i un anticòs secundari marcat amb el fluoròfor AlexaFluor 350 (fluorescència blava). Els cloroplasts van ser visualitzats gràcies a l'autofluorescència de la clorofil·la. La pèrdua de fluorescència del marcador GFP-HDEL fa impossible l'estudi de la seva colocalització amb HMGR. La detecció de les tres fluorescències es va fer per microscòpia confocal, i la imatge mostrades són projeccions de 10 plans focals. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Per a poder detectar GFP-HDEL i estudiar la seva colocalització amb HMGR es van realitzar experiments amb una doble immunolocalització. Per a la detecció d'HMGR es va utilitzar l'anticòs primari anti-CD1[26-8] combinat amb un secundari amb fluoròfor vermell (Alexa Fluor 568). Per la seva banda la detecció de GFP-HDEL es va fer amb un anticòs primari anti-GFP comercial i un secundari verd (FITC). En aquesta tècnica es va eliminar la clorofil·la per facilitar la tria d'anticossos. Els resultats de la doble immunocitoquímica de HMGR i GFP:HDEL en plantes de 6 dies després de la germinació (figura R.17) van resultar en una alt grau de colocalització d'ambdues proteïnes en unes estructures vesiculars idèntiques a les vesícules HMGR observades en les plantes silvestres amb la mateixa tècnica (figura R.12).



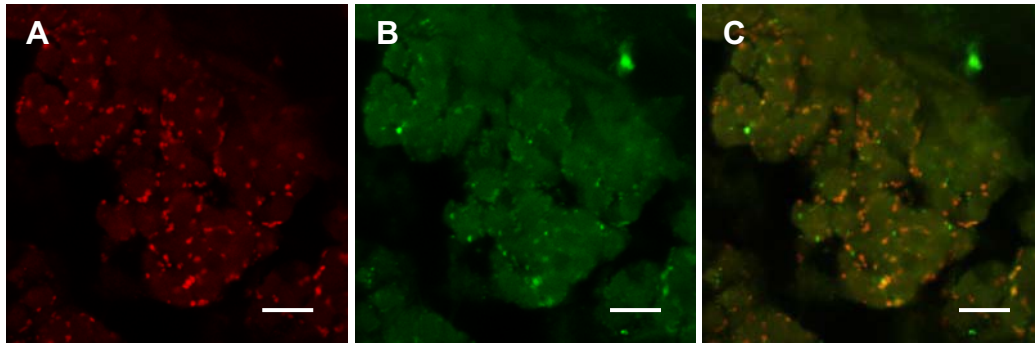


Figura R.17: Immunolocalització *in-situ* en whole mount d'HMGR i GFP-HDEL en plantes transgèniques GFP-HDEL. Per l'estudi es van fer servir plantes GFP-HDEL de 6 dies després de la germinació i es van observar cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons per microscòpia confocal. **(A)** Detecció d'HMGR amb el sèrum anti-CD1[26-8] i un anticòs secundari marcat amb el fluoròfor AlexaFluor 568 (color vermell). **(B)** Detecció de GFP-HDEL amb un anticòs primari anti-GFP i un secundari marcat amb FITC (color verd). **(C)** Superposició dels dos canals.

Les imatges mostrades són projeccions de 10 plans focals. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

#### 2.4.1.- Anàlisi estadístic de colocalització

Els resultats de les colocalitzacions de les proteïnes HMGR1 i GFP:HDEL es va examinar mitjançant un anàlisi de correlació de la intensitat de les respectives fluorescències amb el software ImageJ i el plugin ICA (Intensity Correlation Analysis) (taula R.1). Per dur a terme un anàlisi qualitatiu i quantitatiu de la colocalització es van calcular els coeficients de Pearson i de Manders per a cada imatge. El coeficient de Pearson ( $R_r$ ) és un mètode quantitatiu per a trobar correlació entre dos variables i pot variar entre -1 i 1, sent 1 una correlació perfecta positiva (els dos canals tenen una relació directa), sent 0 una exclusió o no correlació, mentre que -1 representa una correlació perfecta negativa o inversa. El coeficient de superposició de Manders ( $R$ ) varia entre 0 i 1 depenent del grau de colocalització. D'altra banda els coeficients de Manders,  $M_1$  i  $M_2$ , estan normalitzats per al nombre total de píxels de la imatge.  $M_1$  representa el nombre de píxels del canal 1 que colocalitzen amb el canal 2, en tant que  $M_2$  representa el nombre de píxels del canal 2 que colocalitzen amb el canal 1. Els coeficients de Manders són molt sensibles a la correcció del fons de la imatge. En el nostre estudi van fent una correcció del fons de les imatges mitjançant el mateix software ImageJ. A partir d'aquestes correccions només es van comparar imatges del mateix pla focal on la correcció del fons hagués resultat en un ratio de píxels entre ambdós canals (ch1:ch2) el més proper possible a 1.

D'aquesta manera es va evitar que el fons de les imatges, produït pels anticossos o les autofluorescències fessin augmentar artificialment els coeficients de colocalització donats.

Els resultats de l'estudi de colocalització es mostren a la taula R.1. L'índex de Pearson resulta amb un valor promig de  $-0.55 \pm 0.079$ . Aquest resultat indica una alta relació entre els dos canals fluorescents, és a dir, entre la HMGR1 endògena i la construcció GFP:HDEL, i aquesta relació és inversa, això és, la fluorescència vermella augmenta quan la verda disminueix i a l'inrevés. D'altra banda el coeficient de superposició de Manders (R) entre ambdues fluorescències resulta amb un valor  $0.43 \pm 0.078$  i ens indica que el 44% de les dues proteïnes colocalitzen. Per últim, i en el nostre cas de molta utilitat, trobem que els valors per als coeficients de Manders per cada canal són  $0.4 \pm 0.09$  per a M1, i de  $0.48 \pm 0.09$  per a M2, o traduint aquests valors en percentatge, podem afirmar que el 40% de HMGR coincideix amb GFP-HDEL, mentre que el 48% de GFP-HDEL coincideix amb HMGR.

Taula R.1: Anàlisi de colocalització mitjançant Intensity Correlation Analysis (ICA) del software ImageJ. Es mostren els coeficient de Pearson (Rr) i el coeficient de superposició de Manders (R). També es mostren els coeficients de Manders M1 i M2 específics per a cada canal. Per a cada imatge es dona el ratio de píxels entre els dos canals (ch1:ch2) així com els “thresholds” aplicats en cada cas.

IMATGE	Rr	R	ch1:ch2	M1	M2	Threshold Red	Threshold Green
1	-0,486	0,476	1,747	0,36	0,63	55	40
2	-0,575	0,418	1,316	0,365	0,48	55	35
3	-0,615	0,385	1,035	0,378	0,391	55	30
4	-0,721	0,269	1,596	0,213	0,34	55	30
5	-0,503	0,495	1,118	0,468	0,524	85	75
6	-0,5	0,499	0,915	0,521	0,477	90	70
7	-0,513	0,486	1,063	0,472	0,502	90	70
8	-0,452	0,548	1,036	0,538	0,558	75	70
9	-0,507	0,485	1,286	0,428	0,55	80	70
10	-0,553	0,444	1,163	0,412	0,479	80	65
11	-0,538	0,409	1,346	0,353	0,475	70	60
12	-0,616	0,362	1,725	0,276	0,476	50	40
13	-0,511	0,487	1,127	0,459	0,517	75	72
14	-0,636	0,363	1,083	0,349	0,378	80	65
15	-0,669	0,331	1,036	0,325	0,337	75	50
16	-0,719	0,279	1,19	0,256	0,305	75	45
17	-0,432	0,561	0,817	0,621	0,507	75	58
18	-0,538	0,461	0,97	0,468	0,455	75	55
19	-0,602	0,394	1,242	0,354	0,439	67	50
20	-0,717	0,28	0,779	0,317	0,247	50	57
21	-0,525	0,474	0,94	0,489	0,46	70	67
22	-0,528	0,456	1,47	0,376	0,553	70	62
23	-0,53	0,435	1,807	0,324	0,585	70	56
24	-0,464	0,534	1,122	0,504	0,566	95	60
25	-0,515	0,481	1,216	0,436	0,53	95	60
26	-0,521	0,465	1,435	0,388	0,557	95	58
27	-0,508	0,461	1,694	0,354	0,6	87	54

Així, doncs tenint en compte la restrictivitat necessària amb que s'han processat les imatges per dur a terme l'estudi de colocalització entre la quimera GFP-HDEL i la proteïna HMGR1S endògena, els valors d'aquesta colocalització són bastant elevats. Tal i com es pot observar a la figura R.18 que mostra tant les imatges de els dos canals de fluorescència separats com la superposició d'aquests, i a més la colocalització dels punts resultants d'aplicar els thresholds. És en aquesta última imatge on es pot apreciar que els coeficients de Manders M1 i M2 tenen els valors de 0.4 i 0.48 respectivament, però que les zones de colocalització gairebé en tots els casos contenen ambdós senyals. A dins de cada zona de colocalització, però, els senyals no estan uniformement distribuïts de manera que els coeficients baixen. Aquesta falta d'uniformitat pot ser deguda a la diferent especificitat dels anticossos primaris utilitzats, a la diferència entre els fluoròfors dels secundaris, i per últim, no és descartable que la incubació amb dos anticossos, un dels quals detecta una proteïna de membrana (HMGR) i l'altre una de lumen (GFP-HDEL) provoqui una disminució en la penetrància física d'un d'ells al RE.

Tal i com es mostra en la figura R.17 i figura R.18 les estructures vesiculars on es troba GFP-HDEL presenten també HMGR. Els resultats de l'anàlisi estadístic sobre les colocalitzacions d'HMGR i GFP-HDEL permeten confirmar i concloure que ambdues proteïnes es troben presents en unes estructures vesiculars comunes. Aquestes estructures vesiculars on està present la quimera GFP-HDEL han sigut descrites com a *ER-bodies*. Els valors estadístic de les colocalitzacions permeten afirmar que l'HMGR es troba present en les mateixes estructures que la quimera GFP-HDEL i per tant que un percentatge de les molècules d'HMGR es troben presents en els *ER-bodies*.

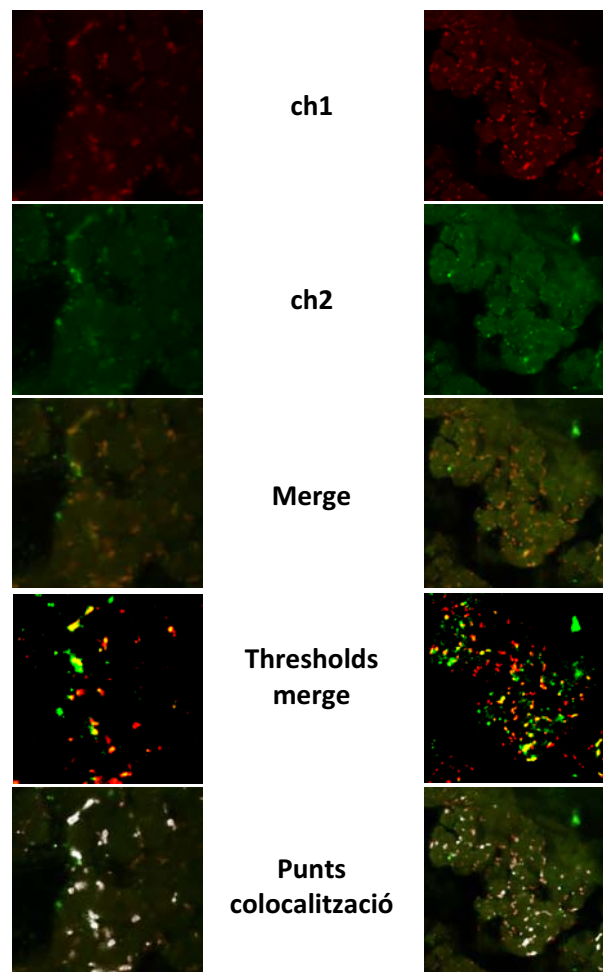


Figura R.18: Representació visual de l'anàlisi de colocalització. Es mostren els dos canals separats, tant de la immunolocalització d'HMGR (ch1) com de GFP-HDEL (ch2), així com la superposició de tots dos (Merge). També es mostra la superposició de les imatges resultants d'aplicar els límits de fluorescència significativa (Thresholds merge), i la superposició d'aquests amb la imatge original (Punts colocalització). Es pot observar com a pesar dels nivells variables d'immunolocalització d'HMGR i GFP-HDEL en cada una de les vesícules, en totes elles ambdues proteïnes estan representades.

### 3.- CONTROL DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'HMGR

#### 3.1.- Paper de PP2A

L'HMGR d'*A. thaliana* té com a primera destinació cel·lular el RE, i tal com s'ha descrit en aquesta memòria, també localitza en unes vesícules derivades d'aquest. Aquestes vesícules d'HMGR corresponen en un alt grau amb els *ER-bodies*. Tots els estudis han confirmat que el domini N-terminal de la isoforma HMGR1S determina la presència de HMGR en aquestes vesícules.

Estudis previs indiquen que la Proteïna fosfatasa 2A (PP2A) té un paper important en el control de la localització subcel·lular d'HMGR. Es pot concloure que en assajos d'expressió transitòria el bloqueig farmacològic de PP2A amb cantaridina, o el bloqueig genètic (mutants *rcn1-1*, defectiu en la variant majoritària de la subunitat A de PP2A) produeix canvis en la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulles d'*A. thaliana* (Antolín-Llovera, 2005). Tal i com s'ha descrit en aquesta memòria l'expressió transitòria d'aquesta quimera dóna lloc a un patró reticulo-vesicular en la major part de cèl·lules observades, és a dir, en la xarxa del RE i en vesícules derivades d'aquest. Per una banda les incubacions de les fulles transformades amb 1S:GFP amb cantaridina (inhibidor específic de PP2A) produeixen un augment del nombre de cèl·lules que acumulen aquesta quimera exclusivament en la xarxa del RE. Per altra banda, l'expressió transitòria d'1S:GFP en fulles de plantes mutants *rcn1-1* d'*A. thaliana*, dóna lloc a una majoria de cèl·lules amb un patró de localització de la quimera exclusivament a la xarxa del RE i a cèl·lules amb un gran agregat o vesícula única.

Per a determinar si el bloqueig farmacològic o genètic de PP2A també evitaria la formació de vesícules d'HMGR durant el desenvolupament de la planta es van realitzar experiments d'immunocitoquímica *in situ* utilitzant el sèrum anti-CD1-623 per la detecció d'HMGR. En aquest estudi es van fer comparacions entre plantes tractades i no tractades amb cantaridina, així com entre plantes silvestres i plantes mutants *rcn1-1*.

Per a inhibir farmacològicament PP2A, les plantes d'*A. thaliana* d'ecotip Columbia 0 es van germinar i créixer durant 6 dies en presència d'una concentració 10  $\mu$ M de cantaridina. Els resultats de la detecció d'HMGR per immunocitoquímica es mostren a la figura R.19, panells A i B. S'observa que les cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons de les plantes crescudes en presència de cantaridina, continuen presentant formació de vesícules on localitza HMGR. Els patrons observats en un limitat

nombre de cèl·lules (n=5), mostra però, diferències a nivell d'intensitat de marcatge a RE. Mentre a les plantes no tractades (Figura R.19, panell A) s'observa el patró ja descrit vesicular, a les plantes tractades amb cantaridina aquestes vesícules són menys visibles i es confonen amb la xarxa del RE que és més aparent (Figura R.19, panell B).

Per a estudiar els efectes del bloqueig genètic de PP2A, es van crèixer plantes silvestres de l'ecotip WS-2 i plantes mutants *rcn1-1* durant 6 dies. La localització de les vesícules d'HMGR característica de les cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons de plantes silvestres (Figura R.19, panell C) es manté en els mutants *rcn1-1*, però, així com succeeix amb el bloqueig farmacològic, el patró del RE també sembla més evident en les cèl·lules d'aquestes plantes (Figura R.19, panell D).

Per tant mentre que en experiments d'expressió transitòria de la quimera 1S:GFP el bloqueig farmacològic (cantaridina) i genètic (*rcn1-1*) de PP2A produeixen una desaparició de les vesícules 1S:GFP, no s'ha pogut constatar que les vesícules d'HMGR es vegin severament afectades per aquestes inhibicions de PP2A. Per altra banda però, trobem canvis en el patró del RE deguts a aquesta inhibició donant lloc a un possible engruiximent d'aquest que és més evident en el tractament amb cantaridina.

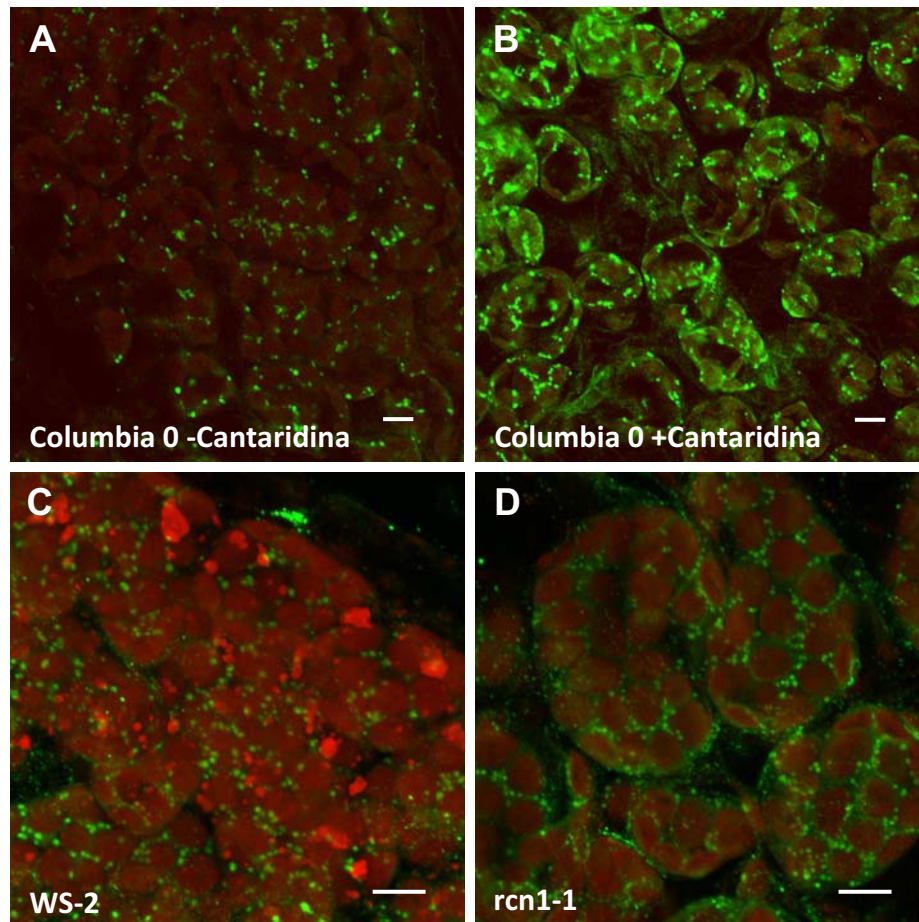


Figura R.19: Efecte del bloqueig farmacològic i genètic de PP2A sobre la localització subcel·lular d'HMGR d'*A. thaliana*. Plantes Col.0, WS-2 i *rcn1-1* van ser crescudes durant 6 dies en presència o absència de cantaridina, segons s'indica. Passat aquest temps les plantes es van processar per immunocitoquímica *in-situ* amb la tècnica *whole mount*, per tal d'observar cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons. Per a la detecció d'HMGR s'utilitza el sèrum de conill anti-CD1-623 i un anticòs secundari contra IgG de conill marcat amb el fluorocrom Alexa Fluor 488 (color verd). **(A i B)** Plantes de l'ecotip Columbia 0 sense i amb cantaridina. **(C i D)** Plantes de l'ecotip WS-2 silvestres i mutants *rcn1-1*.

Tant en les plantes tractades amb cantaridina com en les plantes mutants *rcn1-1*, es confirma la presència de vesícules HMGR, quan les comparem amb plantes silvestres del seu fons genètic. S'observa però, un engruiximent del RE que és més evident en les plantes tractades amb cantaridina que en les *rcn1-1*.

Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals. Les barres corresponen a 10  $\mu\text{m}$ .



### 3.2.- Paper del gen *NAI1*

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 4.3 de la Introducció d'aquesta memòria el gen *NAI1* d'*A. thaliana* està implicat en la formació dels *ER-bodies*. Les plantes homozigotes *nai1-1* que presenten una mutació puntual que elimina un lloc d'*splicing* no presenten *ER-bodies*, com tampoc no el presenten les plantes resultants de l'encreuament entre aquestes plantes i les plantes *nai1-2*, que presenta una inserció de T-DNA a l'exó 2, demostrant que són mutants al·lèlics (Matsushima *et al.*, 2004).

Per tal d'aprofundir en la relació entre les vesícules d'HMGR i els *ER-bodies*, la quimera 1S:GFP va ser expressada de manera transitòria per bombardeig de micropartícules en fulles de roseta de plantes d'*A. thaliana* de la línia mutant *nai1-2* i en plantes del seu fons genètic silvestre, WS-2.

Tal i com es mostra en la figura R.20 (panells A, B, C) en cèl·lules epidèrmiques de fulles dels mutants *nai1-2* d'*A. thaliana*, l'1S:GFP localitza a la xarxa del RE i a més en una gran vesícula connectada en aquest. Algunes d'aquestes cèl·lules dels mutants *nai1-2* presenten vesícules marcades amb 1S:GFP sempre de tamany inferior a 1  $\mu\text{m}$  (Figura R.20, panell C), però en cap d'elles s'observa el patró reticulo-vesicular, amb vesícules d'entre 2 i 5  $\mu\text{m}$ , típic del fons genètic silvestre WS-2 (Figura R.20, panell E).

Per últim es va intentar complementar el defecte en la formació de les vesícules d'1S:GFP, mitjançant la coexpressió transitòria d'aquesta quimera i el cDNA del gen *NAI1*. Els resultats, encara preliminars, mostren un rescat parcial del patró reticulo-vesicular de localització subcel·lular d'1S:GFP. En aquest cas es va trobar una cèl·lula que presentava formació de diverses vesícules les quals però sempre presentaven un tamany superior a 5  $\mu\text{m}$  (Figura R.20, panell D).

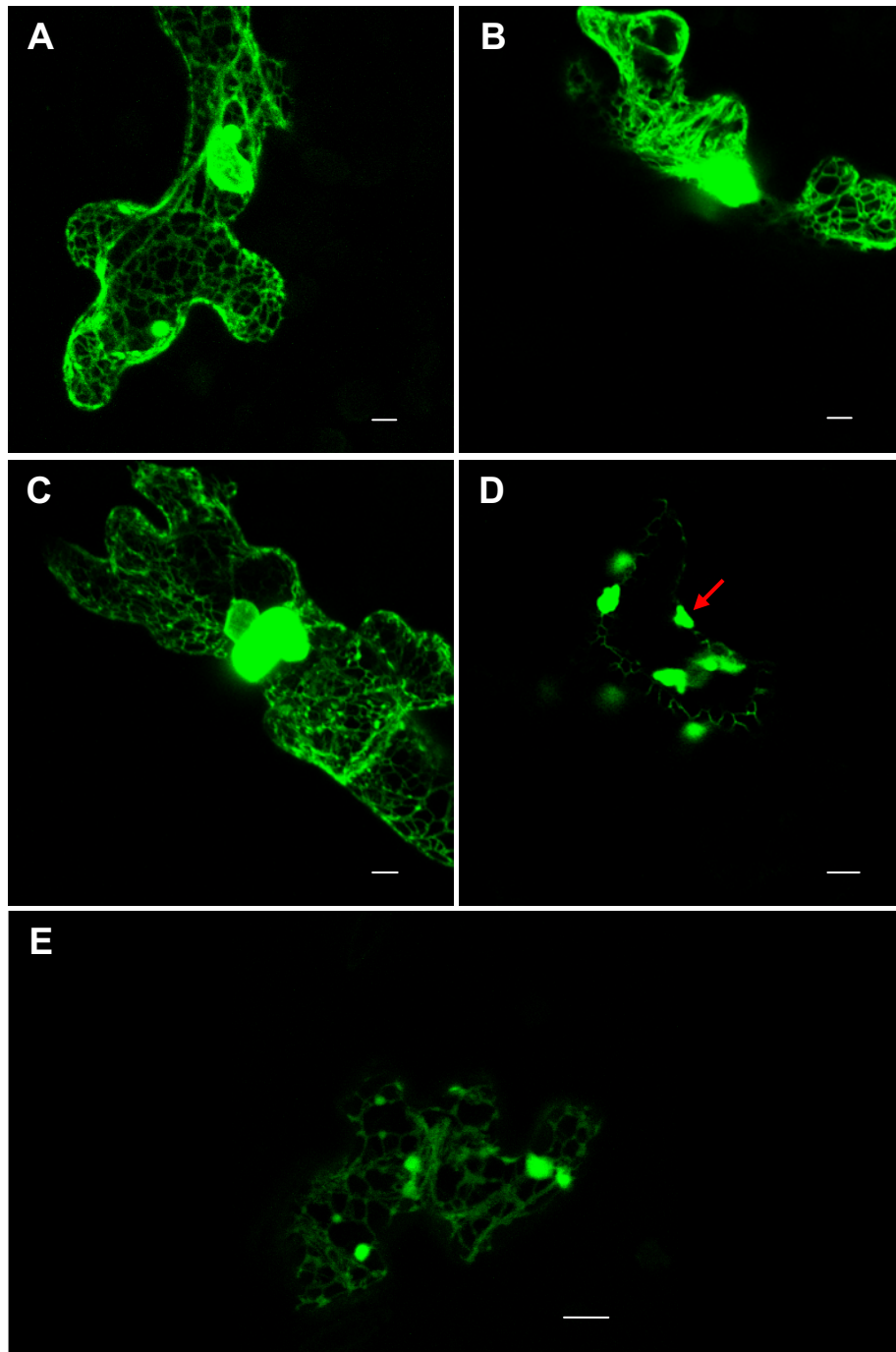


Figura R.20: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulles de plantes mutants *nai1-2*. Les fulles d'aquestes plantes van ser microbombardejades amb la quimera 1S:GFP i el cDNA de NAI1. **(A-C)** Expressió d'1S:GFP en plantes *nai1-2*, on la quimera localitza en la xarxa del RE i en un gran acúmul **(D)** Cèl·lula de plantes *nai1-2* on s'ha coexpressat la quimera 1S:GFP i el cDNA del gen NAI1. En aquest cas sembla que tot i que parcial, es dona un rescat del fenotip de localització subcel·lular reticulo-vesicular de 1S:GFP. **(E)** Expressió d'1S:GFP en plantes silvestres WS-2. Les fulles de plantes de fons genètic WS-2, silvestres i *nai1-2* van ser microbombardejades amb construccions de la quimera 1S:GFP sola o en combinació amb el cDNA de *nai1*. Posteriorment, van ser incubades amb llum contínua, a 22°C durant 18h i observades al microscopi confocal. Les imatges corresponen a projeccions de 10 plans focals consecutius de cada cèl·lula, excepte la imatge D que correspon a un sol pla focal. La barra de tamany indica 10 µm.

#### 4.- CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA D'HMGR

Com s'ha descrit prèviament en aquesta memòria, l'HMGR1S localitza en unes vesícules, que coincideixen amb els anomenats *ER-bodies*, i la sobreexpressió del seu domini N-terminal indueix la formació de vesícules. No es coneix la funció de la HMGR1S en aquest subdomini del RE, si conserva o no la seva funció metabòlica, si és uns dels efectors principals d'aquestes vesícules, o si té una funció a part de la funció metabòlica, tal vegada implicat en mecanismes de defensa, que és la funció principal dels *ER-bodies* (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003).

Les vesícules d'HMGR, com s'ha indicat, tenen un alt grau de semblança amb els *ER-bodies*, i se sap que aquests *ER-bodies*, no es troben a la planta adulta, però un atac per patògens o algun altre tipus d'estrès pot induir la seva formació. Per tal d'esbrinar si l'estrès produeix alhora una modulació de l'activitat HMGR present a la cèl·lula es van realitzar una sèrie d'experiments per tal de mesurar aquesta activitat prenent com a model una línia de suspensió cel·lular d'*A. thaliana*. Concretament s'ha utilitzat el sistema de cèl·lules en cultiu derivades del cultivar Landsberg-Erecta d'*A. thaliana*, anomenada línia cel·lular MM1. En els primers experiments que es van realitzar es va constatar que en aquestes cèl·lules, l'activitat HMGR basal és de nivells molt alts (aproximadament sobre 600 pmol HMG-CoA/min·mg) unes 40-60 vegades superior comparada amb l'activitat mitjana que mesurada en plàntules d'*A. thaliana*, la qual cosa podria alterar o anular la resposta als tractaments d'estrès. Així es van proposar experiments per tal de trobar les condicions òptimes del cultiu, de manera que els nivells d'activitat HMGR fossin el suficientment baixos per tal de poder observar modificacions després de l'aplicació de tractaments. Treballs anteriors en el nostre laboratori (resultats no publicats) havien mostrat que l'activitat HMGR de plàntules d'*A. thaliana* és modulada en resposta a estrès salí. En cèl·lules en cultiu no és tan fàcil discernir quan estan estressades i quan no, i per tant tenint en compte els resultats en plantes, es va aplicar el nivell d'activitat basal HMGR com a mesura d'estrès, és a dir, a menys activitat basal, menys estrès, i per tant, més possibilitat de modulació de l'activitat.

#### 4.1.- Efecte del temps de cultiu en la línia cel·lular MM1

Tal i com està descrit amb detall a l'apartat de Mètodes, les cèl·lules MM1 es van cultivar durant 10 dies, després dels quals es fa una dilució en medi de cultiu fresc per tal de continuar mantenint el cultiu. Durant aquest temps les cèl·lules creixen de manera exponencial fins a arribar a una fase de "plateau". Els primers experiments es van realitzar prenent mostres de cultius joves inferint que estarien més sans, degut a la poca acumulació de tòxics per cèl·lules mortes i també per la presència de nutrients i hormones en quantitats òptimes. Els resultats que es van obtenir mostraven una activitat HMGR que oscil·lava aproximadament entre els 200 i els 600 pmols HMG-CoA/min·mg, i es va intentar comprovar si aquesta activitat variava amb l'edat del cultiu. Així es van realitzar una sèrie d'experiments prenent mostres de cultiu cel·lular a diferents dies de la vida del cultiu, i es comprovava l'activitat en cada una d'aquestes fases. Els resultats obtinguts demostren que l'edat del cultiu influeix de manera notable en la activitat HMGR basal. Els valors mínims d'activitat es van trobar a cultius de 7 dies, i estaven sempre per sota de 150 pmols HMG-CoA/min·mg. En la figura R.21, es mostren les mesures d'activitat relatives sobre el 100% d'activitat (els valors més alts).

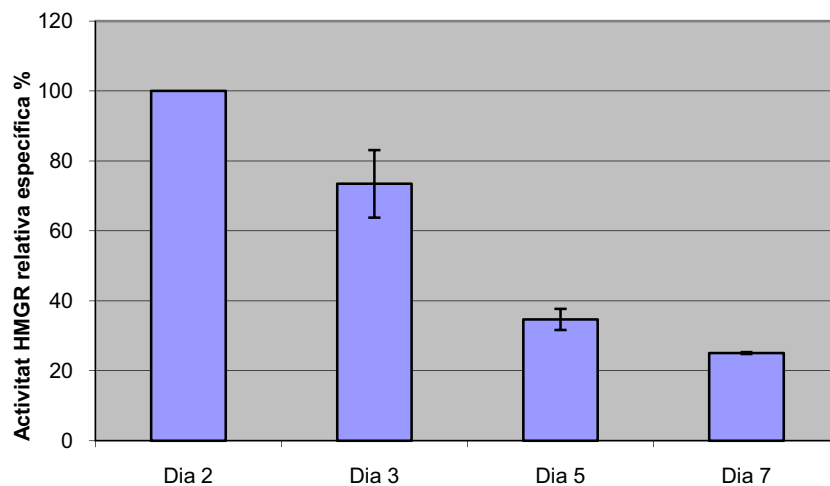


Figura R.21: Variacions en l'activitat específica HMG-CoA reductasa en cultius cel·lulars de la línia MM1, durant la vida d'un subcultiu. Es van obtenir mostres al cap de 2, 3, 5 i 7 dies de l'inici del cultiu i es va mesurar l'activitat HMGR. S'observa una disminució de l'activitat durant el creixement del cultiu de gairebé el 80%. El 100% d'activitat específica HMGR correspon al valor més alt, a dia 2 del cultiu. A la setmana després del subcultiu es troba la mínima activitat específica al voltant dels 150 pmols HMG-CoA/min·mg.

Els resultats obtinguts tenen una importància rellevant en la obtenció de mostres de línies cel·lulars per a realitzar mesures d'activitat específica i modulació d'aquesta per diferents factors. Com s'ha comentat anteriorment una alta activitat de l'HMGR podria implicar una menor capacitat de modulació d'aquesta activitat per altres factors de tipus ambiental. Sorprenentment, els cultius són més estables en quant als nivells d'activitat HMGR a mesura que les cèl·lules es van dividint. L'activitat mínima es dona als 7 dies de creixement del cultiu..

#### **4.2.- Efecte de la font de carboni**

Per tal d'aconseguir una activitat específica HMGR basal el més baixa possible, es va optimitzar el medi de cultiu de la línia cel·lular MM1. El mètode d'esterilització a l'autoclau i la tria del sucre com a font de carboni, tenen una importància cabdal en les vies de metabolisme secundari (Weathers *et al.*, 2004). S'ha estudiat àmpliament com, en plantes, la manipulació de l'aportació de nutrients té un efecte molt important a nivell de creixement i desenvolupament Així s'ha descrit com certes molècules, com la glucosa, tenen un paper molt important en l'activació de vies de senyalització que poden donar lloc a activacions diferencials de cascades de gens (Coruzzi and Bush, 2001; Harrington and Bush, 2003). Tenint en compte aquests estudis, es volia comprovar si la modificació de la font de carboni podria produir un efecte a nivell de l'activitat específica HMGR a la línia cel·lular MM1, i si això ens permetria reproduir els nostres experiments partint d'una activitat basal encara inferior a la aconseguida en els experiments de l'apartat 4.1. Degut a que els derivats tòxics produïts tant com per un tipus de molècula, com per un tipus de manipulació, en aquest cas esterilització, poden ser una font d'estrès afegit, creiem que aquest estudi és imprescindible, no només per a la posada a punt dels mètodes, sinó com un resultat en si mateix pel que fa referència a les condicions d'estrès dels cultius.

Es van realitzar estudis on es van fer créixer dos cultius en paral·lel en diferents condicions. Un dels cultius es va suplementar amb sacarosa com a font de carboni, mentre l'altre es va suplementar amb glucosa. Les mostres dels cultius per a fer les mesures d'activitat es van prendre a 5 dies de creixement del cultiu i els resultats es mostren a la figura R.22. Els resultats mostren que mentre amb sacarosa els valors d'activitat HMGR es trobem sempre entre 200 i 250 pmols HMG-CoA/min·mg, el cultiu suplementat amb glucosa mostra consistentment uns valors d'activitat per sota dels 200 pmols HMG-CoA/min·mg.

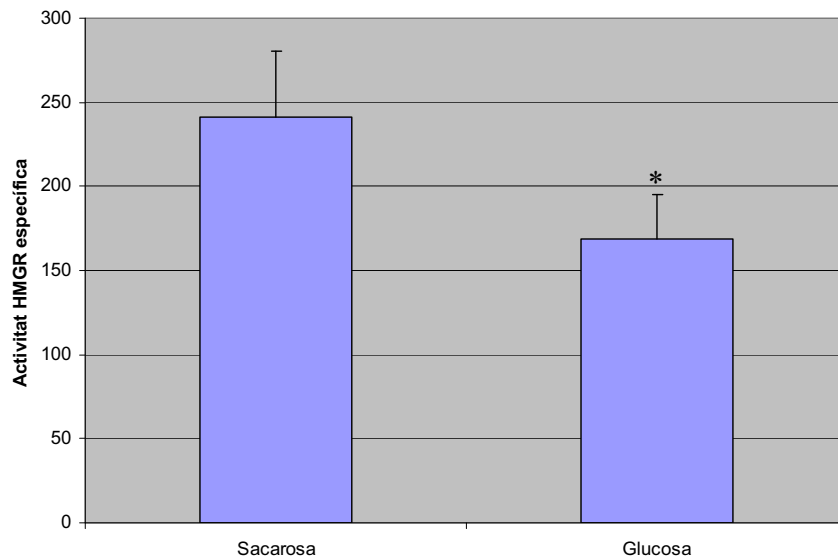


Figura R.22: Variacions en l'activitat específica HMG-CoA reductasa expressada en pmol HMG CoA/min\*mg, en cultius cel·lulars de la línia MM1, amb diferents fonts de carboni: sacarosa i glucosa. Les mostres es van prendre d'un cultiu de cèl·lules MM1 després de 5 dies de creixement. L'activitat específica basal es troba afectada per la naturalesa del sucre aportador de carboni, i s'observa una activitat basal significativament més baixa quan aquest aportament es fa amb glucosa.

Queda demostrat, doncs, la importància de la font de carboni en forma de sucre. La glucosa permet partir d'una activitat específica significativament ( $p < 0,05$ ) més baixa, cosa que ens indica que en general l'estat fisiològic de les cèl·lules és millor. Sembla que la sacarosa esterilitzada a l'autoclau dona lloc a derivats tòxics per les cèl·lules MM1, de manera que aquest augment de l'activitat específica basal en cultius cel·lulars suplementats amb aquest sucre, es troben en situació d'un cert estrès. Sembla ser que es produeix una certa especificitat pel que fa a sucres com a font de carboni, dependent d'espècie i teixit. Així, els embrions en cultiu de *Brassica napus*, creixen millor en sacarosa que en glucosa (Slesak and Przywara, 2003).

Així doncs, aquests resultats permeten la optimització de les condicions fisiològiques dels cultius de la línia cel·lular MM1. La utilització de glucosa ens permet uns cultius fisiològicament més vigorosos, en una situació de menys estrès i per tant presumiblement més adequats a estudis de modulació de l'activitat enzimàtica HMGR per estrès.

### 4.3.- Efecte d'*Agrobacterium tumefaciens*

La formació dels *ER-bodies* està induïda per l'atac de patògens o insectes, i s'ha relacionat la fusió de *ER-bodies* amb vacuoles amb fenòmens de mort cel·lular programada com a mecanisme de defensa de la planta enfront aquests atacs (Hayashi *et al.*, 2001). Donat que l'HMGR sembla ser un dels components d'aquestes vesícules, la inducció dels *ER-bodies* pot produir un reclutament de molècules d'HMGR cap a ells, i per tant es vol investigar si hi ha variacions en l'activitat d'aquest enzim en aquestes condicions.

Es van utilitzar cultius d'*Agrobacterium tumefaciens* amb els quals es van incubar els cultius de cèl·lules vegetals. Durant la incubació dels cultius vegetals amb i sense tractament es van recollir mostres de cèl·lules per tal d'analitzar la seva activitat HMGR específica fins a les 2 hores després de l'inici del tractament. Els resultats obtinguts (Figura R.23) mostren una disminució de l'activitat HMGR en les cèl·lules infectades amb *Agrobacterium tumefaciens* a les 2 hores d'incubació. En aquests resultats preliminars, l'efecte d'un estrès biòtic, en aquest cas, infecció per *Agrobacterium*, provoca en cèl·lules MM1 en cultiu una disminució de l'activitat HMGR, que es produeix entre els 40 minuts i els 120 minuts. És per tant una resposta relativament ràpida, i podria ser deguda al reclutament, inactivació o degradació d'un nombre de molècules d'HMGR1S com a part del procés morfogènec dels *ER-bodies*.

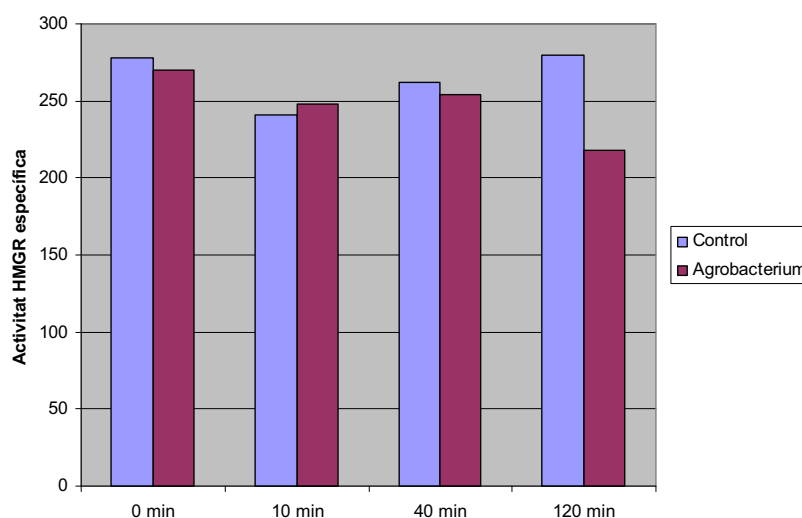


Figura R.23: Variacions en l'activitat HMGR específica expressada en pmol HMG CoA/min\*mg d'un cultiu de 5 dies de creixement de cèl·lules MM1 d'*A. thaliana* sotmès a un estrès biòtic produït per infecció amb *Agrobacterium tumefaciens*. Durant els primers 40 minuts d'infecció no s'observen diferències a nivell d'activitat HMGR entre grups control i infectats. A

partir de 40 minuts, i mesurat a 2 hores després de la infecció s'observa una davallada en les cèl·lules tractades amb el patogen.

#### 4.4.- Efecte de xoc osmòtic i salí amb NaCl

Tal com s'ha descrit en l'apartat anterior, els resultats preliminars mostren que podria existir una modulació de l'activitat HMGR en condicions d'estrès biòtic. Es va voler també comprovar si els efectes de l'estrès abiòtic podrien de la mateixa manera contribuir a la modulació d'aquesta activitat enzimàtica. Concretament es va estudiar l'efecte de xoc osmòtic i salí. El procediment que es va seguir va ser paral·lel a l'utilitzat per a testar l'efecte d'*Agrobacterium*. En aquests experiments es va afegir una concentració de 660 mM de NaCl a cultius de la línia cel·lular MM1 d'*A. thaliana* crescuts durant 5 dies en condicions de llum continua. Es van prendre mostres de cèl·lules a diferents temps fins a les 2 hores de tractament.

Tal i com es mostra a la Figura R.24, mentre que l'activitat específica HMGR no varia a les cèl·lules control, les mostres tractades amb 660 mM de clorur de sodi, presenten una disminució significativa ( $p < 0,05$ ) de l'activitat HMGR als 40 min. Els nivells d'activitat HMGR tornen a augmentar a les 2 h del tractament. Comparativament amb els efectes observats amb *Agrobacterium* (veure apartat 4.3), amb tractament amb NaCl la disminució en l'activitat HMGR apareix més ràpidament. Per altra banda el fet que l'activitat HMGR augmenti entre els 40 i els 120 minuts del tractament podria indicar que aquest efecte de l'estrès salí és específic i que no es tracta d'una completa desregulació de la cèl·lula per mort cel·lular programada, al menys durant el temps mesurat.

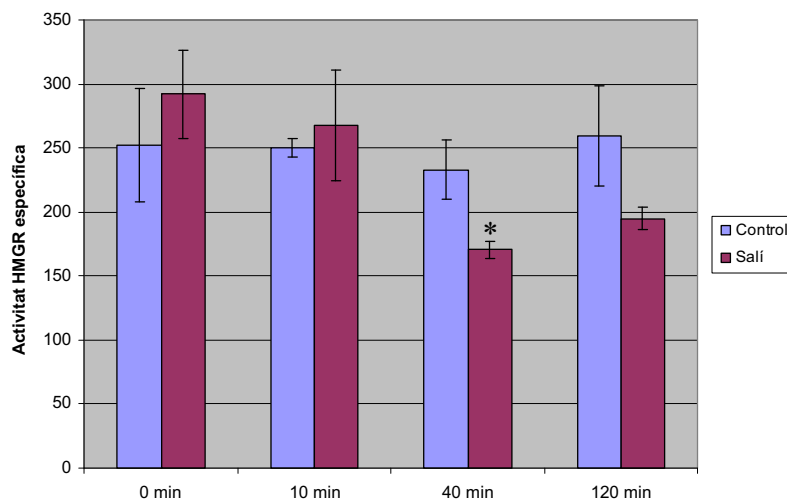


Figura R.24: Variacions en l'activitat HMGR específica expressada en pmol HMG CoA/min\*mg d'un cultiu de 5 dies de creixement de cèl·lules MM1 d'*A. thaliana* sotmès a un xoc osmòtic i salí per tractament amb 660 mM NaCl. Les cèl·lules



control no pateixen canvis significatius en l'activitat HMGR durant les 2 hores, mentre que les cèl·lules tractades amb clorur de sodi presenten una disminució de l'activitat HMGR als 40 minuts que es comença a recuperar als 120 minuts.

## 5.- CAPACITAT MORFOGENÈTICA DEL DOMINI DE MEMBRANA D'HMGR1S EN CÈL·LULES DE MAMÍFER

Algunes proteïnes de membrana, ubicades al RE, presenten la capacitat de modelar l'assemblatge del sistema d'endomembranes de la cèl·lula eucariota. Aquest procés és de cabdal importància durant el creixement i el desenvolupament cel·lular i ha sigut àmpliament estudiat (Parrish *et al.*, 1995).

En el cas d'HMGR, en mamífers ha estat descrit que l'acúmul d'aquesta proteïna determina la proliferació de túbuls del RE, que formen una estructura compacta i ordenada, d'aparença cristal·loide, on cada túbul presenta una secció hexagonal (Chin *et al.*, 1982; Pathak *et al.*, 1986). Per altra banda en llevats, s'ha descrit l'acúmul d'HMGR donen lloc a la formació d'estructures concèntriques derivades del RE anomenades *karmellae* (Wright *et al.*, 1988; Parrish *et al.*, 1995; Profant *et al.*, 1999).

La capacitat morfogènica d'HMGR també es manifesta quan s'expressa l'enzim en un sistema heteròleg. L'HMGR de hàmsster forma estructures de tipus *karmellae* quan és expressada en llevat, mentre que l'HMGR de llevat forma estructures cristal·loides en ser expressada en cèl·lules de mamífer. Totes aquestes dades suggereixen que les estructures induïdes per HMGR són dependents del tipus cel·lular i no tant de la variant d'HMGR expressada.

En aquest context va semblar interessant estudiar si l'expressió de la quimera 1S:GFP podia donar lloc a la formació d'algun tipus d'estructura de membrana en ser expressada en cèl·lules de mamífer. En el cas de l'HMGR de llevats i humana sembla que les estructures que es formen depenen del sistema on se sobreexpressen i l'expressió d'elles en un sistema heteròleg produeix l'estructura típica d'aquell sistema (Wright *et al.*, 1990). Així doncs, es va plantejar l'expressió de la quimera 1S:GFP per transfecció estable en un sistema de cèl·lules d'ovari de hàmsster xinès (CHO). Experiments previs amb sobreexpressió d'HMGR humana en cèl·lules CHO van requerir d'adaptació d'aquesta línia cel·lular a compactina. Aquest compost és un inhibidor competitiu d'HMGR i en la seva presència les cèl·lules presenten un increment compensatori d'HMGR degut a la menor acumulació de productes de la via del mevalonat que regularien negativament l'enzim (Chin *et al.*, 1982). L'habitució de les cèl·lules CHO a compactina és un procés llarg i complex, en el qual els increments en les concentracions de l'inhibidor provoquen la mort en els cultius de més del 90% de les cèl·lules en cada

subcultiu de manteniment de la línia cel·lular. Per a evitar els problemes de l'alta taxa de mortalitat, accelerar el procés de selecció i aconseguir l'acumulació d'HMGR d'*A. thaliana* en cèl·lules CHO evitant la degradació de les molècules de l'enzim per acumulació de colesterol, es va utilitzar la proteïna quimèrica 1S:GFP. L'eliminació del domini catalític hauria de permetre una major acumulació de proteïna quimèrica minimitzant els efectes regulatoris negatius sobre aquesta. La construcció 1S:GFP va ser transfectada en cèl·lules CHO sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV) que assegura una alta expressió en cèl·lules en cultiu.

Les cèl·lules CHO transformades amb 1S:GFP van ser analitzades a nivell ultraestructural mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. Els resultats, encara preliminars mostren que les cèl·lules sobreexpressores d'1S:GFP presenten zones de proliferació del RE llis (Figura R.25, panells A-C) mentre a les cèl·lules control la presència de RE llis és mínima (Figura R.25, panell D). Aquestes zones de proliferació del RE llis són similars a les zones anastomòsiques (acumulació de cisternes, vesícules i túbuls de RE llis) que es formen amb la sobreexpressió d'altres proteïnes de membrana del RE com la subunitat Sec61 $\gamma$  (Snapp *et al.*, 2003). Per altra banda, aquestes acumulacions de RE llis produïdes en la sobreexpressió d'1S:GFP no presenten una estructura definida i ordenada com en al cas de llevats (*karmellae*) o mamífers (estructures cristal·loides).

Sembla, per tant que la capacitat de biogènesi dins el RE es conserva en les expressions heteròlogues d'1S:GFP a cèl·lules CHO. En aquest cas però s'ha observat una proliferació de membranes sense la formació d'estructures definides. És possible que els senyals que requereix el domini N-terminal d'HMGR d'*A. thaliana* per a la formació de determinats tipus d'estructures no es trobin presents a aquestes cèl·lules o bé que els senyals en CHO no reconeguin aquest domini.

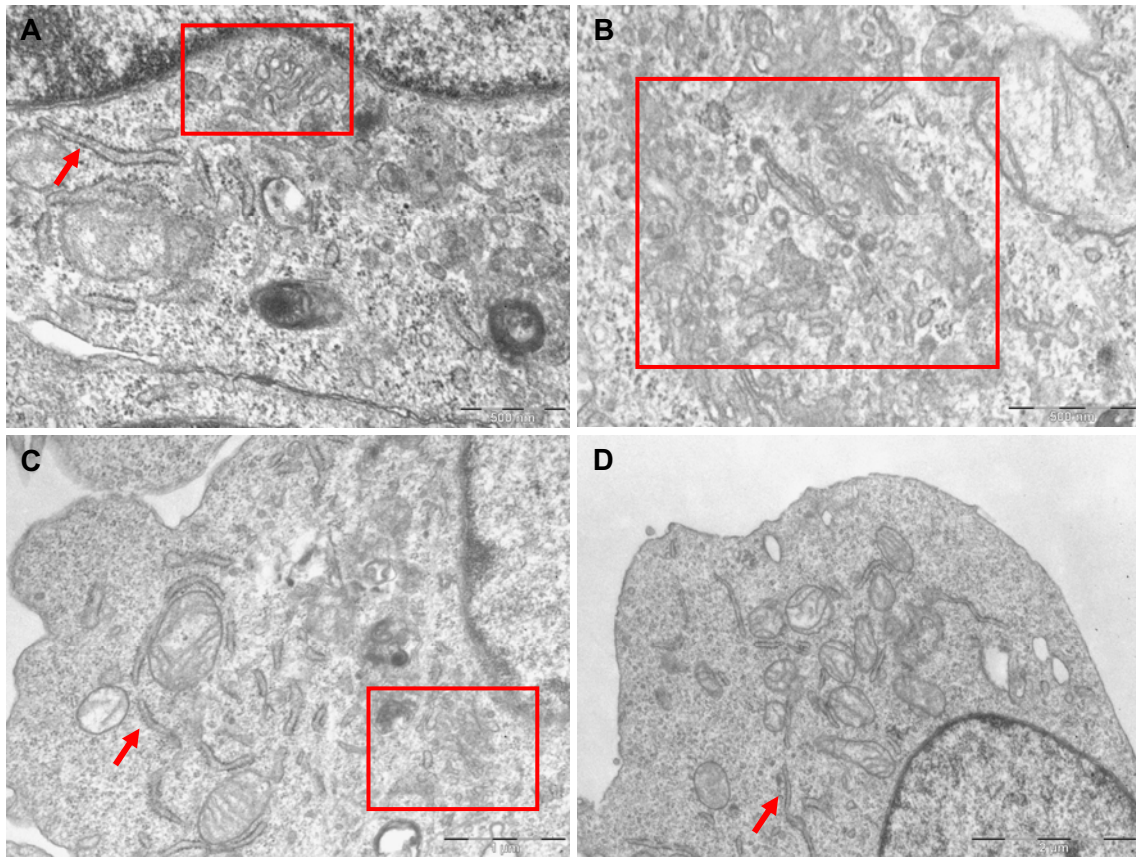


Figura R.25: Expressió heteròloga de la quimera 1S:GFP en cèl·lules CHO. **(A-C)** Imatges de cèl·lules transfectades amb el plasmidi pEGFP-1S:GFP. **(D)** Cèl·lules transfectades amb el plasmidi pEGFP buit. Les fletxes mostren el RE rugós, i els requadres les zones d'acumulació de RE llis. Les cèl·lules CHO van ser transfectades amb el mètode del fosfat de calci i es van seleccionar amb genèticina (G418).

**DISCUSSIÓ**

---



## 1.- CAPACITAT MORFOGENÈTICA D'1S:GFP EN *A. THALIANA*

### 1.1.- Formació d'estructures vesiculars derivades de l'expressió d'1S:GFP

La utilització de la proteïna quimèrica 1S:GFP (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2005) ha permès l'estudi de les característiques específiques del domini N-terminal de l'HMGR1S i de la seva localització subcel·lular. La quimera 1S:GFP indueix la formació d'unes vesícules derivades i/o connectades a la xarxa del reticle endoplasmàtic. En un sistema d'expressió transitòria mitjançant bombardeig de micropartícules sobre fulles de plantes d'entre 10 i 20 dies d'*A. thaliana* es pot observar com l'expressió de la quimera 1S:GFP dóna lloc a la formació d'unes estructures vesiculars d'un tamany aproximat d'entre 0,5 i 2 µm de diàmetre, de morfologia esfèrica. Aquestes estructures vesiculars són induïdes específicament per l'expressió de la quimera 1S:GFP com ho demostra el fet que expressions transitòries sobre el mateix sistema d'altres proteïnes que localitzen al RE, com els marcadors GFP-HDEL i T3RE, no indueixen aquestes estructures.

#### 1.1.1.- La formació de vesícules 1S:GFP no és deguda a l'expressió de GFP

Un dels aspectes més criticats en l'ús de la GFP com a eina per a l'estudi de localització subcel·lular és la seva capacitat de dimerització en orientació antiparal·lela (Yang *et al.*, 1996; Zacharias *et al.*, 2002). Aquesta capacitat de dimerització fa que la localització de GFP a membranes pugui produir fenòmens d'agregació degut a interaccions febles entre proteïnes. S'ha demostrat que certes proteïnes tenen la capacitat de formar estructures derivades del RE llis, anomenades OSER (organized smooth ER). Entre aquestes proteïnes es troba l'HMGR de mamífers (Profant *et al.*, 1999; Zacharias *et al.*, 2002; Snapp *et al.*, 2003). Per altra banda algunes proteïnes de membrana del RE són capaces de induir estructures del tipus OSER un cop unides a GFP i sobreexpressades, sent la GFP la proteïna inductora d'aquestes estructures. Aquest és el cas de la proteïna Sec61γ, un dels components del translocó del RE, amb un domini citoplasmàtic petit. La unió de Sec61γ amb GFP indueix la formació d'estructures OSER derivades del RE a cèl·lules COS-7. D'altra banda, la utilització d'una GFP monomèrica que presenta una mutació de la Leucina 221 a Lisina (L221K), per la construcció de la quimera amb Sec61γ, no indueix la formació d'estructures OSER en aquestes mateixes cèl·lules (Figura D.1) (Snapp *et al.*, 2003).

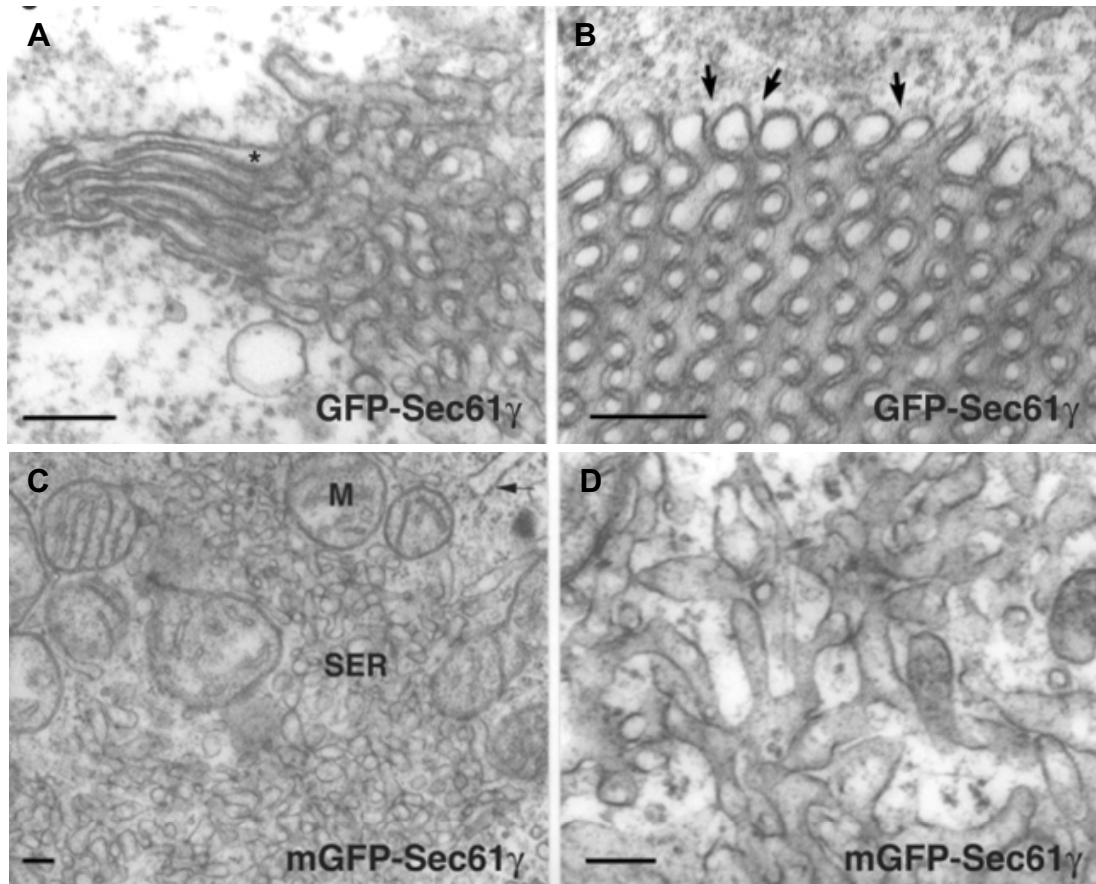


Figura D.1: La proteïna quimèrica GFP-Sec61 $\gamma$  induïx la formació d'estructures ordenades de membranes de RE llis. Adaptada de Snapp *et al.*, 2003. (M: mitocondri; SER: reticle endoplasmàtic llis; mGFP: GFP monomèrica).

Tenint en compte aquestes dades, no es podia descartar que la formació de vesícules esfèriques a les cèl·lules d'*A. thaliana* fos un producte de la dimerització de la GFP, i per tant d'un enrotllament de les membranes derivades del RE que formarien aquestes estructures. A més, la quimera 1S:GFP presenta uns nivells d'expressió molt elevats en cèl·lules epidèrmiques de fulles d'*A. thaliana* en expressions transitòries per bombardeig de micropartícules. Aquests alts nivells d'expressió combinats amb la capacitat de dimerització de la GFP podrien produir una alta acumulació de la quimera 1S:GFP a la membrana del RE, i per tant un afavoriment de la interacció entre GFPs i consegüentment de la formació d'estructures vesiculars. Per tant es va fer necessària una demostració per descartar la possibilitat que la GFP per si mateixa sigui la responsable de l'aparició de vesícules 1S:GFP.



Tal i com s'havia fet en el cas de proteïnes com Sec61 $\gamma$  (Snapp *et al.*, 2003), es va creure convenient eliminar la capacitat de dimeritzar de la GFP present a la quimera 1S:GFP. Un dels residus hidrofòbics implicats en la dimerització és una Alanina en posició 206. La substitució d'aquesta Alanina per Lisina (A206K), amb càrrega positiva, impedeix la dimerització de la GFP sense que això afecti les seves propietats espectrals d'una manera significativa (Zacharias *et al.*, 2002). La substitució A206K es va dur a terme directament sobre la proteïna quimèrica 1S:GFP, i la construcció resultant d'aquest canvi va ser anomenada 1S:GFPmono.

L'expressió transitòria d'1S:GFPmono en cèl·lules epidèrmiques de fulles d'*A. thaliana* va resultar en la formació d'unes estructures vesiculars d'un tamany aproximat entre 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  que contenen la quimera. Aquesta es localitzava també a la xarxa del RE. La morfologia i el tamany de les vesícules d'1S:GFP (Figura D.2, panell A) i el de les formades per 1S:GFPmono (Figura D.2, panell B) són essencialment idèntics, així com també és comparable el nombre d'aquestes que es formen per cèl·lula observada. Així doncs, l'agregació de la GFP no és la causant de la formació de les vesícules, i per tant és deguda al domini de membrana d'HMGR1S que presenta la quimera.

Treballs anteriors (Leivar, 2003) van mostrar que la proteïna quimèrica formada pel domini N-terminal de la isoforma HMGR1L, que es diferencia d'HMGR1S només en un domini extra de 50 aminoàcids a l'extrem N-terminal, unida a GFP localitzava exclusivament al RE. És aquesta, per tant una altra indicació que l'aparició d'estructures vesiculars en el sistema d'expressió transitòria d'*A. thaliana* no és deguda a la GFP per si mateixa.

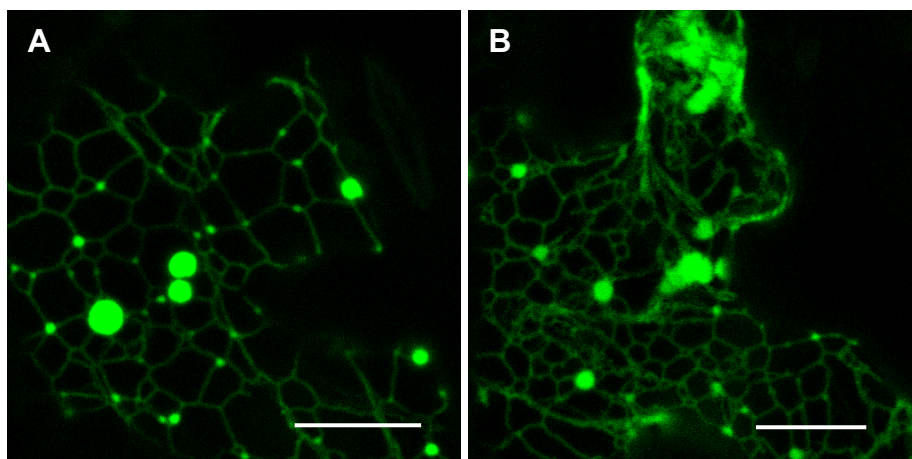


Figura D.2: Localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP i 1S:GFPmono. (A) Expressió transitòria d'1S:GFP (B) Expressió transitòria d'1S:GFPmono. Fulles de *A. thaliana* van ser bombardejades amb la quimera corresponent. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.2.- Les vesícules 1S:GFP són part del RE

Durant la seva síntesi l'HMGR d'*A. thaliana* s'insereix en la membrana del RE (Campos and Boronat, 1995). Per tal d'examinar si les vesícules d'1S:GFP deriven del RE es va fer servir un nou marcador del lumen del RE. Els experiments de co-expressió transitòria de ambdues proteïnes quimèriques, van mostrar que les vesícules 1S:GFP contenen també T3RE. La incorporació de contingut del lumen del RE, i per tant, del marcador T3RE a dins les vesícules és per tant una prova directa que les vesícules 1S:GFP no només deriven del RE, sinó que són part d'aquest.

Per altra banda, seria d'esperar que a pesar de que tant 1S:GFP com T3RE colocalitzen perfectament tant a nivell de la trama del RE, com a nivell de les vesícules 1S:GFP, les dues quimeres haurien de presentar a priori una distribució diferencial a nivell de les vesícules. La quimera 1S:GFP és una proteïna de membrana, mentre que T3RE es troba al lumen. Les nostres observacions al microscopi confocal mostren que les vesícules 1S:GFP són vesícules que semblen plenes d'aquesta quimera. La resposta això deriva del nivell d'expressió de la quimera 1S:GFP. La sobreexpressió de proteïnes de membrana unides a GFP pot provocar la acumulació d'estructures membranoses que s'observen com acúmul en forma de vesícules (Snapp *et al.*, 2003). Això no està en contraposició amb el fet que les vesícules 1S:GFP siguin producte de la capacitat del domini N-terminal d'HMGR1S per a formar-les. Els resultats indiquen que aquest domini presenta aquesta capacitat i que la formació d'aquestes vesícules es pot veure desbordada pels alts nivells d'expressió de la quimera formant-se unes estructures vesiculars de morfologia aproximadament esfèrica que acumulen l'excés d'1S:GFP.

## 1.2.- Estudis en plantes transgèniques

Per tal d'analitzar les característiques, naturalesa i dinàmica de les vesícules 1S:GFP es va procedir a la generació de plantes transgèniques amb aquesta proteïna quimèrica. Donat que l'expressió d'aquesta quimera es troba sota el control del promotor constitutiu CaMV35Ses va poder estudiar en diferents situacions del desenvolupament, i en diferents teixits i tipus cel·lulars.

### 1.2.1.- Expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament d'*A. thaliana*

Per tal de seleccionar les plantes que presentaven el transgen es va realitzar un crivellatge amb l'antibiòtic kanamicina per a la generació de les plantes transgèniques d'1S:GFP. Una de les primeres coses a destacar d'aquestes plantes és que es va trobar un nombre significatiu de plantes resistents a kanamicina que no expressaven 1S:GFP, mentre que només es van poder aïllar tres plantes transformants que presentaven fluorescència. Degut a la utilització de GFP el crivellatge per a conèixer l'expressió o no del transgen és relativament senzill, i gràcies a una lupa de fluorescència es va poder determinar un nombre limitat de plantes que presentaven fluorescència derivada d'1S:GFP.

Les plantes d'aquesta primera generació (T1) es van autofecundar i les llavors generades es van sembrar i posteriorment es van seleccionar a la lupa de fluorescència aquelles plantes que presentaven expressió del transgen. Un seguiment les plantes de la generació T2 pel que respecte a la presència de la quimera 1S:GFP, va mostrar que, a pesar que 1S:GFP es troba sota el control del promotor constitutiu CaMV35S, les plantes no presentaven fluorescència més enllà dels 20 dies després de la germinació i aquesta no estava uniformement distribuïda a la planta.

Després d'autofecundar les plantes de la T2, es va seleccionar aquelles plaques en que totes les plantes presentaven fluorescència. Aquestes plantes, són per tant filles de plantes homozigotes pel transgen. Es va tornar a fer un seguiment de la fluorescència present en les plantes de la T3 durant el desenvolupament, i es va comprovar que en aquesta generació les plantes presentaven expressió de la quimera 1S:GFP únicament fins als 15 dies després de la germinació. Successives generacions a partir de les plantes T3 presentaven exactament aquesta patró d'expressió d'1S:GFP, que va des de el moment de la germinació fins aproximadament els 15 dies després de la germinació.

És sorprenent que la quimera 1S:GFP en plantes transgèniques 1S3.11 deixi d'expressar-se en plantes de més de 15 dies després de la germinació, a pesar d'estar sota el control d'un promotor CaMV35S constitutiu. De la mateixa manera, sembla que el pas entre generacions comporta una reducció de l'expressió d'1S:GFP, fins que aquesta arriba a uns nivells tolerables, i compatibles amb el desenvolupament de la planta durant els primers 15 dies del desenvolupament en la generació T3. Donat que el promotor CaMV35S determina, en principi, una expressió constitutiva, sense modulació espai-temporal, els resultats que s'han obtingut requereixen d'una regulació de l'expressió d'1S:GFP. Aquesta regulació podria ser a nivell post-transcripcional (degradació del transcrit 1S:GFP) o bé a

nivell post-traducciona (degradació de la proteïna). De fet, sembla que el que estaria succeint és que les plantes que sobreviuen són aquelles que no tenen una excessiva acumulació de la quimera 1S:GFP a pesar de ser resistents a kanamicina, o bé aquelles que són capaces de regular l'expressió. Així aquestes plantes són les úniques que sobreviurien, i alhora, aquesta regulació, ens permet l'observació dels patrons de localització subcel·lular d'1S:GFP. És possible que només aquelles plantes que presentin una capacitat de regulació sobre l'acumulació de la quimera 1S:GFP siguin viables. L'acumulació d'aquesta quimera a nivell del RE podria afectar la maquinària cel·lular producte d'un desestructurament d'aquest orgànul. La capacitat d'induir formacions vesiculars a partir de la membrana del RE exhibida per 1S:GFP podria ser la causa d'aquest hipotètic desestructurament del RE.

També convé apuntar que pel que fa a l'expressió d'1S:GFP, s'han analitzat plantes de la línia 1S3.11 de les generacions T2, T3 i T4. Com s'ha comentat anteriorment, les plantes de la generació T2 presenten acumulació d'1S:GFP fins aproximadament els 20-25 dies després de la germinació. Per la seva banda, les plantes de les generacions T3 i T4 presenten acumulació d'1S:GFP fins als 15 dies després de la germinació. L'expressió d'1S:GFP sembla fixada en la línia 1S3.11 pel que respecte al seu patró temporal durant el desenvolupament de les plantes transgèniques d'*A. thaliana* en aquests 15 dies. De tota manera, no es pot descartar que generacions subsegüents de plantes de la línia 1S3.11 presentin encara una disminució de la presència d'1S:GFP. Els mecanismes regulatoris que semblen estar influïnt l'expressió d'1S:GFP han de ser investigats.

### **1.2.2.- Diferències en la distribució d'1S:GFP a nivell subcel·lular durant el desenvolupament**

Un cop analitzada l'expressió d'1S:GFP durant el desenvolupament de plantes transgèniques de la línia 1S3.11, es va voler examinar la localització subcel·lular de la quimera en diferents teixits i tipus cel·lulars. Aquestes observacions a nivell subcel·lular es van realitzar amb plantes de les generacions T3 i T4.

El fet que la fluorescència més intensa i generalitzada es trobés en cotiledons, va fer interessant un estudi exhaustiu de la localització subcel·lular d'1S:GFP en aquest òrgan. El primer que es va observar és que ni als cotiledons ni a cap altre teixit totes les cèl·lules presenten acumulació d'1S:GFP. En tots

els casos s'observa un mosaic amb cèl·lules que presenten i cèl·lules que no presenten 1S:GFP. En segon lloc es pot constatar que el nombre de cèl·lules fluorescents varia en funció de la zona del cotiledó. Així s'observa que a la zona proximal (la més propera al pecíol) dels cotiledons el nombre de cèl·lules fluorescents és major que a la zona distal.

Per tal de determinar si la distribució d'1S:GFP a nivell cel·lular dintre del teixit està relacionada amb la distribució de la quimera a nivell subcel·lular, es va realitzar un estudi de la localització subcel·lular d'1S:GFP a les diferents parts del cotiledó.

Als cotiledons de plantes de 4 dies després de la germinació la localització subcel·lular d'1S:GFP presenta diferències depenen de la zona estudiada. A la zona proximal del cotiledó (Figura D.3, panell A) l'1S:GFP es troba a la xarxa del RE i també en unes vesícules de morfologia fusiforme d'un tamany d'entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  de llargada (Figura D.3, panells B i C; Figura R.8 a Resultats). Aquestes vesícules estan lligades a la xarxa del RE.

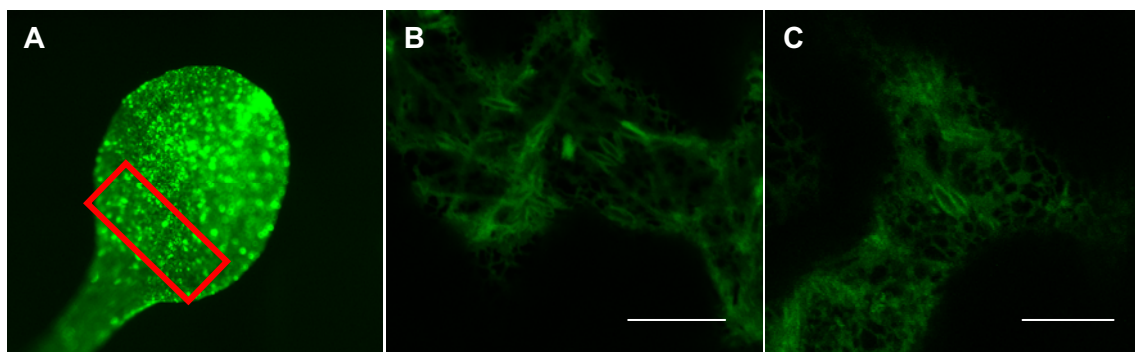


Figura D.3: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de la zona proximal de cotiledons de plantes d'*A. thaliana* de 4 dies després de la germinació. **(A)** Visió macroscòpica del cotiledó amb lupa binocular de fluorescència on se senyala la zona proximal estudiada **(B-C)** La quimera 1S:GFP localitza a nivell de la xarxa del RE i a la membrana de vesícules fusiformes. S'observa com al voltant d'una cèl·lula que presenten expressió d'1S:GFP es troben d'altres que no expressen. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Per la seva banda, les cèl·lules de la zona distal dels cotiledons de plantes de 4 dies després de la germinació presentaven en la seva majoria una localització subcel·lular exclusivament en el RE (Figura D.4, panell B). En un nombre menor també es van trobar cèl·lules que presentaven una acumulació de la quimera 1S:GFP en una zona que aparentment embolcallaria el nucli (Figura D.4, panell C).

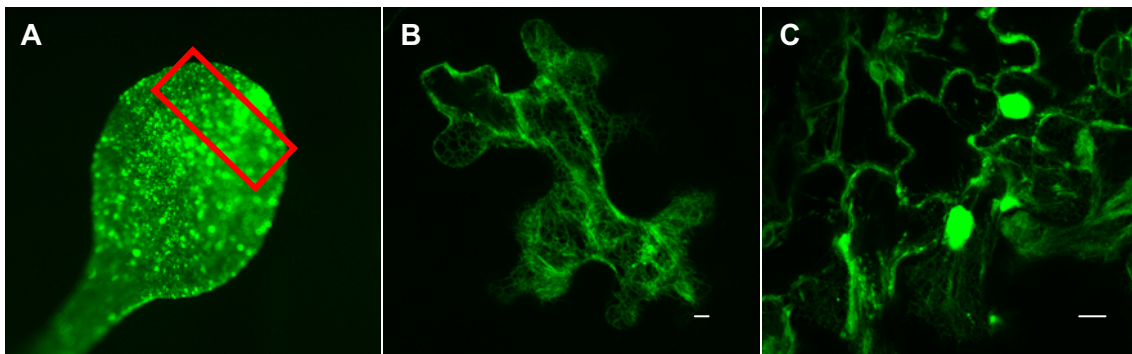


Figura D.4: Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de la zona distal de cotiledons de plantes d'*A. thaliana* de 4 dies després de la germinació. **(A)** Visió macroscòpica del cotiledó amb lupa binocular de fluorescència on se senyala la zona distal estudiada **(B)** La quimera 1S:GFP localitza a nivell de la xarxa del RE a la major part de les cèl·lules d'aquesta zona. **(C)** Algunes cèl·lules presenten un agregat d'1S:GFP. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Tenint en compte que la quimera 1S:GFP durant el desenvolupament de les plantes 1S3.11 va quedant cada cop més reduïda, i que a partir d'aproximadament els 15 dies després de la germinació no es podia detectar, es va considerar interessant estudiar si al llarg del procés del desenvolupament hi havia canvis a nivell de localització subcel·lular. A les fulles de plantes transgèniques de la línia 1S3.11 de 13 dies després de la germinació la major part de cèl·lules amb fluorescència d'1S:GFP es troben a la part més proximal. En aquestes cèl·lules la localització subcel·lular d'1S:GFP és exactament igual a la descrita per les cèl·lules d'aquesta zona dels cotiledons en plantes de 4 dies, és a dir, tant a nivell de RE com a nivell de la membrana d'unes estructures vesiculars fusiformes.

Sembla doncs que la localització a nivell subcel·lular de la quimera 1S:GFP dins les plantes de la línia 1S3.11 té relació amb el desenvolupament dels cotiledons i fulles. La presència de la proteïna quimèrica 1S:GFP és més generalitzada als cotiledons de 4 dies que a fulles de 13 dies. Al mateix temps, les cèl·lules de la part proximal de les fulles i cotiledons presenten unes estructures vesiculars marcades a la membrana. El nombre de cèl·lules amb aquest tipus de localització subcel·lular és menor a mesura que es va desenvolupant la fulla. Mentre que als cotiledons de plantes de 4 dies trobem cèl·lules amb vesícules fins a ben bé el centre de la fulla que dividiria l'eix proximo-distal; a les fulles de plantes de 13 dies les cèl·lules que presenten vesícules d'1S:GFP es troben limitades a la part més proximal tocant al pecíol.

El patró d'expressió temporal així com les diferències en el patró de localització subcel·lular d'1S:GFP coincideix plenament amb el patró de proliferació cel·lular durant el desenvolupament de la fulla. La

fulla es desenvolupa des de la punta fins a la base. Un cop es comença a desenvolupar la fulla a partir d'un meristem apical, i aquesta es fa plana i es forma l'eix abaxial-adaxial, es desenvolupa un primordi pla on la proliferació cel·lular està extesa per tota la fulla. A mesura que la fulla es va desenvolupant existeix un front que atura l'activitat meristemàtica mitjançant cascades gèniques (Figura D.5) (Tsukaya, 2005). Així doncs, les cèl·lules presents a la part més distal són les que aturen abans la divisió cel·lular, mentre que les de la zona més proximal encara conserven aquesta capacitat de dividir-se.

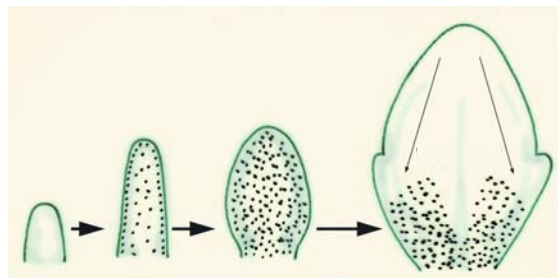


Figura D.5: Esquema del desenvolupament de la fulla d'*A. thaliana*. Els punts negres representen les zones que mantenen activitat proliferativa. A mesura que la fulla es va desenvolupant i gràcies a l'activació de cascades gèniques l'activitat proliferativa s'atura en una onada que va des de la zona més distal a la més proximal. (Adaptada de Tsukaya, 2005).

Les cèl·lules menys diferenciades, és a dir, aquelles que es troben en zones del cotiledó amb proliferació cel·lular són les que presenten vesícules fusiformes d'1S:GFP. A les cèl·lules més diferenciades, de zones amb menys proliferació cel·lular, l'1S:GFP es troba majoritàriament només a la xarxa del RE. Quan les fulles estan encara més desenvolupades (en el cas de les plantes 1S3.11, a partir dels 15 dies) simplement no s'observa presència d'1S:GFP. Aquestes dades suggereixen una funció específica de les vesícules 1S:GFP, que podria estar relacionada amb el desenvolupament. La funció d'aquestes vesícules serà comentada posteriorment en aquesta discussió.

En els estudis previs d'expressió transitòria, l'1S:GFP s'expressa a nivells molt elevats i dona lloc a unes estructures vesiculars més o menys esfèriques totalment plenes de marcatge. En les plantes transgèniques 1S3.11 en canvi, la quimera 1S:GFP té un nivell d'expressió més baix i està localitzada només a nivell de la membrana de les vesícules fusiformes. El control post-transcripcional o post-traducciona de l'1S:GFP a la línia transgènica es posa en evidència pel fet que tot i que el cDNA corresponent està sota el control del promotor constitutiu CaMV35S, la proteïna quimèrica deixa d'observar-se a partir dels 15 dies després de la germinació. A més existeixen diferències d'expressió del transgen a nivell de diferents teixits de la planta i inclús a nivell del mateix teixit, com ara als

cotiledons. En aquests s'observen diferències en la distribució subcel·lular d'1S:GFP, suggerint també una regulació a nivell post-traduccional.

Quan s'observa la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en plantes de la línia 1S3.11, trobem diferents distribucions a nivell subcel·lular (Figures D.3 i D.4). La major part de les cèl·lules de la part proximal de cotiledons i fulles joves presenten localització d'1S:GFP a nivell de la xarxa del RE i a la membrana d'unes vesícules fusiformes de tamany variable entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  de llargada. En aquest cas el sistema d'expressió podria compensar i regular l'expressió de la quimera 1S:GFP permetent d'aquesta manera reproduir de manera més acurada i més propera al que succeeix a dins la cèl·lula amb la proteïna HMGR1S.

Així doncs, sembla que la proteïna HMGR1S forma part, i indueix la formació d'uns cossos vesiculars, i aquesta capacitat radica en el domini N-terminal, tal com s'ha mostrat tant en expressió transitòria. D'acord amb aquest paper la quimera 1S:GFP també està localitzada en vesícules en el sistema de transformació estable de plantes transgèniques. En les expressions transitòries, aquestes vesícules tenen una morfologia esfèrica i un tamany d'entre aproximadament 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre. Per altra banda quan transformem plantes amb 1S:GFP, a pesar de que aquesta construcció estigui sota el control del promotor constitutiu CaMV35S, la seva expressió es veu reduïda als primers estadis de desenvolupament de la planta, no trobant-se en planta adulta. Alhora 1S:GFP localitza, en aquestes plantes, en unes vesícules lligades al RE, que només es troben presents en cèl·lules de zones amb proliferació. La morfologia d'aquestes vesícules, comparades amb aquelles de l'expressió transitòria, és fusiforme, i el marcatge fluorescent es troba restringit a la membrana de la vesícula. El tamany d'aquestes estructures es troba entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  de llarg i aproximadament 0,5  $\mu\text{m}$  d'ampla.

Un estudi en detall d'aquestes vesícules d'1S:GFP, permet observar que aquestes presenten una elevada motilitat. Com s'ha mostrat en la figura R.11 de Resultats la mateixa vesícula es mou al llarg de la xarxa formada pel RE. Per una banda aquestes observacions permeten constatar que les membranes de les vesícules semblen formar un continu amb la membrana del RE i per tant permet concloure que les vesícules fusiformes que presenten 1S:GFP no només deriven del RE, sinó que són de fet part d'aquest. Els mecanismes pels quals aquestes vesícules es mouen al llarg de la xarxa és encara desconegut.



Es pot especular que els nivells d'expressió massa elevats distorsionen la capacitat del domini N-terminal d'HMGR1S d'induir la formació de vesícules formant-se estructures vesiculars aberrants. S'ha descrit que la unió d'algunes proteïnes de membrana del RE amb GFP pot induir la formació d'estructures derivades precisament de la membrana d'aquest orgànul. Per altra banda la formació d'aquestes estructures sempre és dependent de les capacitats de la proteïna de membrana del RE per a formar estructures d'aquest tipus (Snapp *et al.*, 2003).

Queda per dilucidar el mecanisme de regulació que afecta l'expressió i la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en plantes transgèniques de la línia 1S3.11. En primer lloc el fet que les cèl·lules més diferenciades no presentin formació de vesícules fusiformes d'1S:GFP fa pensar en una implicació d'aquestes estructures amb alguna funció pròpia del desenvolupament. Les cèl·lules de la zona distal del cotiledó (plantes de 4 dies) presenten marcatge d'1S:GFP exclusivament a la xarxa del RE, mentre un nombre menor d'aquestes presenta un agregat on s'acumula 1S:GFP. Això suggereix que en aquestes cèl·lules no hi ha els senyals que permeten la formació de les vesícules. La implicació del domini N-terminal d'HMGR1S en la formació de les vesícules, o els senyals que permeten a la quimera 1S:GFP estar present en elles són encara desconeguts. La presència d'agregats d'acumulació d'1S:GFP en algunes cèl·lules és aberrant i podria ser el resultat de la sobreexpressió d'aquesta quimera en aquestes cèl·lules.

### **1.2.3.- Influència del domini catalític d'HMGR en la localització subcel·lular**

Els experiments d'expressió de la quimera 1S:GFP han permès determinar la capacitat del domini N-terminal de l'HMGR per induir la formació de vesícules lligades al RE (expressió transitòria) o per formar part de la membrana de vesícules fusiformes (expressió en plantes transgèniques) que es troben presents en tipus cel·lulars específics, en teixits específics i en moments concrets del desenvolupament.

Tot sembla indicar que el domini N-terminal de la proteïna HMGR1S, no només determina el seu destí subcel·lular primari sinó que també té capacitat morfogenètica a dins el RE. S'ha demostrat que les vesícules formades en sobreexpressar 1S:GFP de manera transitòria deriven del RE, ja que presenten marcatge del marcador de lumen T3RE. Per altra banda, la manca del domini catalític en la quimera 1S:GFP podria condicionar la localització subcel·lular final, i per tant s'ha de determinar que tant 1S:GFP com HMGR presenten la mateixa distribució a la cèl·lula. Els experiments

d'immunocitoquímica sobre les plantes transgèniques 1S3.11 permeten determinar la completa colocalització d'ambdues proteïnes, 1S:GFP i HMGR, en unes vesícules d'un tamany aproximat entre 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  (Figura D.7, panell B). En aquest cas també es va poder observar cèl·lules epidèrmiques que no havien estat totalment degradades per la digestió enzimàtica, on es pot observar la presència tant d'1S:GFP com d'HMGR en la membrana de vesícules fusiformes, d'un tamany aproximat entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  (Figura R.14 de Resultats).

Aquest resultat confirma la capacitat del domini N-terminal de definir la localització subcel·lular de l'HMGR i de, si no induir la formació d'estructures vesiculars al menys formar part d'estructures vesiculars fusiformes, tot recolzant els resultats previs presentats en aquesta memòria en expressions de la quimera 1S:GFP. Queda palès que la manca del domini catalític d'HMGR a la quimera 1S:GFP no condiciona la localització subcel·lular de la mateixa.

## 2.- IDENTITAT I FUNCIO DE LES VESÍCULES D'HMGR

Tal i com s'ha exposat en els Resultats d'aquesta tesi, el domini N-terminal de l'HMGR1S d'*A. thaliana* és el responsable de la localització de l'enzim en unes vesícules derivades del RE.

A partir d'aquestes observacions es volia aprofundir en l'estudi d'aquestes estructures vesiculars. En primer lloc és important saber si les vesícules existeixen a plantes silvestres, i si les estructures en qüestió contenen HMGR endògena. En segon lloc és important dilucidar si les vesícules formades en l'expressió transitòria i en transformacions estables d'1S:GFP coincideixen amb algunes vesícules que tinguin HMGR. Finalment i per a determinar la naturalesa d'aquestes vesícules en el seu conjunt, és necessari saber si les vesícules on trobem HMGR havien sigut descrites prèviament i quina funció tenen per tal de intentar esbrinar el paper de l'HMGR en aquestes estructures.

### 2.1.- Detecció de vesícules d'HMGR a plantes d'*A. thaliana*

Per tal de localitzar HMGR en plantes silvestres es va fer immunocitoquímica *in situ* amb la tècnica de *whole mount* a plantes d'*A. thaliana* de 6 dies. Prèviament s'havien descrit una xarxa de vesícules al voltant dels cloroplasts que contenien HMGR i que presentaven una morfologia esfèrica. A més aquestes vesícules no corresponien ni als cloroplasts ni als peroxisomes ja que no colocalitzen amb l'enzim catalasa que es troba en aquest orgànul (Leivar *et al.*, 2005). L'HMGR d'*A. thaliana* va ser detectada amb l'anticòs anti-CD1-623 i un anticòs secundari marcat Alexa Fluor 488 que dona fluorescència en l'espectre del verd. Es pretenia definir amb més detall aquestes vesícules i observar la seva estructura. Els resultats obtinguts coincideixen amb els resultats previs (Leivar *et al.*, 2005), i van servir per confirmar la presència d'HMGR a estructures vesiculars del citosol.

La morfologia esfèrica de les vesícules d'HMGR i el seu tamany d'entre 0,5 i 2 µm no és coincident amb la morfologia de les vesícules d'1S:GFP de plantes transgèniques 1S3.11. Entre ambdues observacions, però, existeixen abundants diferències tant a nivell cel·lular com metodològic que convé destacar. En primer lloc, les cèl·lules observades en expressió transitòria de la quimera 1S:GFP són cèl·lules epidèrmiques abaxials, i les cèl·lules observades en plantes transgèniques són cèl·lules epidèrmiques tant adaxials com abaxials. En el cas de els experiments d'immunocitoquímica en *whole mount* les cèl·lules observades amb marcatge d'HMGR són cèl·lules parenquimàtiques. No

s'observen pràcticament cèl·lules epidèrmiques degut possiblement a la digestió enzimàtica que s'ha realitzat per permetre la penetració dels anticossos. Així doncs les cèl·lules observades per immunocitoquímica són concretament cèl·lules del clorènquima en palissada, que es troben immediatament a sota de la capa de cèl·lules epidèrmiques adaxials (Figura D.6). La diferència en la morfologia, tamany o abundància de les vesícules podria estar relacionada amb la diferència de teixits. La presència d'un gran nombre de cloroplasts en aquestes cèl·lules fa que la presència de vesícules només sigui factible i detectable en els petits espais citosòlics.

La diferent metodologia també condiona el resultat observat. Les cèl·lules epidèrmiques observades en plantes transgèniques que expressen 1S:GFP permeten una visualització clara i directa. En el cas de la immunocitoquímica l'estructura vesicular detectada sembla ser esfèrica, però la detecció amb anticossos sovint no permet la determinació exacte de l'estructura d'un orgànul. La detecció de la proteïna PYK10 amb anticossos, en *ER-bodies* aïllats de plantes transgèniques GFP-HDEL d'*A. thaliana* de 8 dies mostra unes estructures semiesfèriques d'un tamany entre 2 i 3  $\mu\text{m}$  que no es corresponen ni en tamany ni en morfologia amb les vesícules fusiformes de 5-10  $\mu\text{m}$  de llargada, teòricament les mateixes estructures, observades *in vivo* a les mateixes plantes (Matsushima *et al.*, 2003a; Matsushima *et al.*, 2003b).

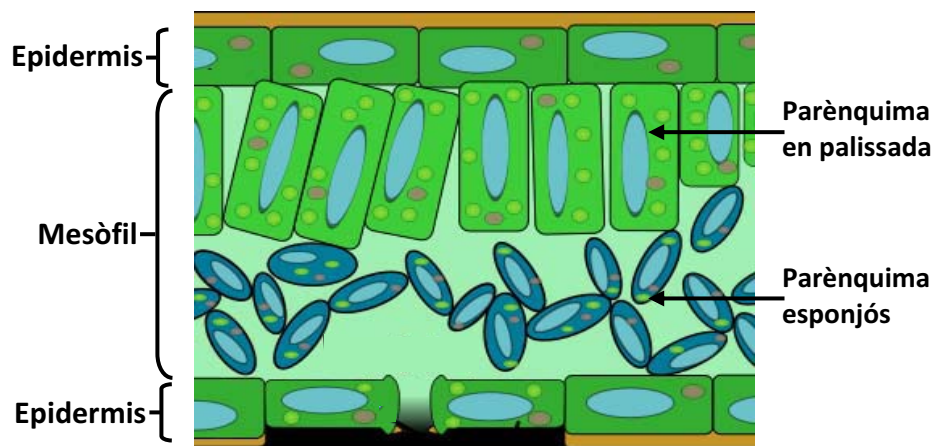


Figura D.6: Representació esquemàtica de l'anatomia foliar a dicotiledònies. Les dues capes de cèl·lules epidèrmiques engloben el mesòfil, que està compost d'una capa de cèl·lules parenquimàtiques en palissada o clorènquima, que presenten una gran quantitat de cloroplasts, i una capa de parènquima esponjós o lacunar, que presenten menys cloroplasts i menys organització tissular.

## 2.2.- HMGR localitza als *ER-bodies*

Com s'ha vist en l'apartat 2.3 de Resultats, i 1.2.4 de Discussió, 1S:GFP i HMGR formen part de les mateixes vesícules en les plantes transgèniques 1S3.11. D'altra banda, a cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons de plantes silvestres d'*A. thaliana* s'ha immunodetectat HMGR en vesícules. El següent punt a clarificar és si aquestes estructures corresponen amb d'altres prèviament descrites. D'entre totes les estructures vesiculars derivades del RE, els *ER-bodies* coincideixen en un gran nombre de característiques sobretot amb les vesícules 1S:GFP de les plantes 1S3.11 (Taula D.1).

Taula D.1: Comparació entre els diferents tipus de vesícules observades experimentalment i els *ER-bodies*

VESÍCULES	Morfologia	Tamany	Tipus cel·lular	Marcatge	Motilitat
1S:GFP (expressió transitòria)	Esfèrica	0,5-2 µm	Epidèrmiques	Complet	No
1S:GFP (plantes 1S3.11)	Fusiforme	5-10 µm	Epidèrmiques	A membrana	Si
1S:GFP (immunocitoquímica)	Fusiforme	0,5-2 µm/ 5-7 µm	Parenquimàtiques/ Epidèrmiques	Complet/A membrana	No observable
HMGR (immunocitoquímica)	Esfèrica	0,5-2 µm	Parenquimàtiques	Complet	No observable
<i>ER-bodies</i> (GFP-HDEL)	Fusiforme	5-10 µm	Epidèrmiques	Complet	Si

Per tal de resoldre aquesta qüestió es van realitzar experiments d'immunocitoquímica, plantes transgèniques d'*A. thaliana* que expressen el marcador de lumen del RE GFP-HDEL per tal de veure si hi ha colocalització entre aquest marcador i HMGR. Els resultats en cèl·lules parenquimàtiques obtinguts mostren un marcatge a nivell d'una xarxa d'estructures vesiculars d'ambdues proteïnes (Figura D.7, panell C i Figura R.17 de Resultats).

Les vesícules fusiformes de les plantes 1S3.11 i els *ER-bodies* tenen un gran nombre de característiques comunes. Tant la morfologia com el tamany són idèntics. Els *ER-bodies* es troben presents de manera constitutiva als cotiledons (encara que també són induïbles per estrès en fulles de roseta de planta adulta), i les vesícules d'1S:GFP es troben sobretot a la zona proximal dels cotiledons de plàntules de 4 dies després de la germinació així com en la zona proximal de fulles de plantes almenys fins a 13 dies. Aquesta distribució de les vesícules d'1S:GFP als cotiledons sembla

estar relacionada amb les zones de proliferació cel·lular tenint en compte el patró de desenvolupament del cotiledons i fulles (Figura D.5).

S'ha demostrat que els *ER-bodies* són orgànuls especialitzats en defensa. En ells s'acumulen específicament proteïnes implicades en defensa, i presenten un contingut diferencial si són constitutius (glucosidasa PYK10) (Matsushima *et al.*, 2003b) o induïbles (glucosidasa BGLU18) (Ogasawara *et al.*, 2009). S'ha postulat que els *ER-bodies* constitutius estan especialitzats en la defensa de la planta en les etapes del desenvolupament més susceptibles a patir estrès i/o atac per patògens. En aquest sentit s'ha vist que plantes mutants *pyk10* d'*A. thaliana*, que no acumulen PYK10 als *ER-bodies* constitutius presenten més susceptibilitat a la infecció pel fong *Piriformospora indica* (Sherameti *et al.*, 2008).

Tenint en compte que les vesícules 1S:GFP de plantes 1S3.11 s'expressen en zones en desenvolupament amb proliferació cel·lular; que les cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons de plantes silvestres de 6 dies contenen vesícules d'HMGR, i que HMGR i GFP-HDEL colocalitzen en aquestes mateixes cèl·lules, aquestes observacions suggereixen la presència d'HMGR almenys en els *ER-bodies* constitutius. Per altra banda, la presència d'HMGR en *ER-bodies* induïbles està menys clara. No es pot descartar, però, que els *ER-bodies* presents en les cèl·lules parenquimàtiques siguin induïbles. El tractament enzimàtic i amb solvents orgànics necessari per a portar a terme els experiments d'immunocitoquímica podria actuar com a factor estressant que desencadenés la resposta de formació d'aquestes estructures.

Per tal de reforçar les observacions de colocalització entre HMGR i GFP-HDEL (*ER-bodies*) amb microscòpia confocal, es van processar totes les imatges obtingudes d'immunocitoquímica i es van analitzar amb el software ImageJ per tal d'estudiar estadísticament quin grau de colocalització presenten les dues proteïnes, a nivell de resolució de píxel de la imatge i prescindint així de la subjectivitat de l'observador.

Un dels inconvenients tècnics de realitzar una immunocitoquímica amb dues combinacions d'anticossos, cada una composta per un primari i un secundari per cada proteïna, és la poca eficiència demostrada pels anticossos. L'anticòs anti-CD1[26-8] s'havia demostrat altament específic per a la detecció d'HMGR en plantes silvestres d'*A. thaliana*. La combinació però, d'anti-CD1[26-8] amb un anticòs anti-GFP ha presentat problemes de marcatge. Les concentracions d'ambdós

anticossos quan s'han utilitzat conjuntament s'havia d'incrementar pràcticament un ordre de magnitud per a obtenir els marcatges. Això ha provocat problemes de soroll de fons en els marcatges.

Per altra banda en el decurs d'aquesta tesi, el protocol d'immunocitoquímica s'ha anat adaptant. La detecció d'HMGR en plantes silvestres d'*A. thaliana* (Figura D.7, panell A) permet l'observació dels cloroplasts, mentre que la detecció en plantes transgèniques 1S3.11 (1S:GFP) (Figura D.7, panell B) i N70007 (GFP-HDEL) (Figura D.7, panell C) no ho permet, degut a un tractament més agressiu de solvent orgànics. En aquest cas aquest procediment era necessari ja que la combinació d'anticossos requeria de l'eliminació de la fluorescència de la clorofil·la. Les proves amb anticossos que permetessin la conservació de la clorofil·la (Alexa Fluor 350) feien molt pobre l'obtenció d'imatges i per tant l'anàlisi de colocalització.

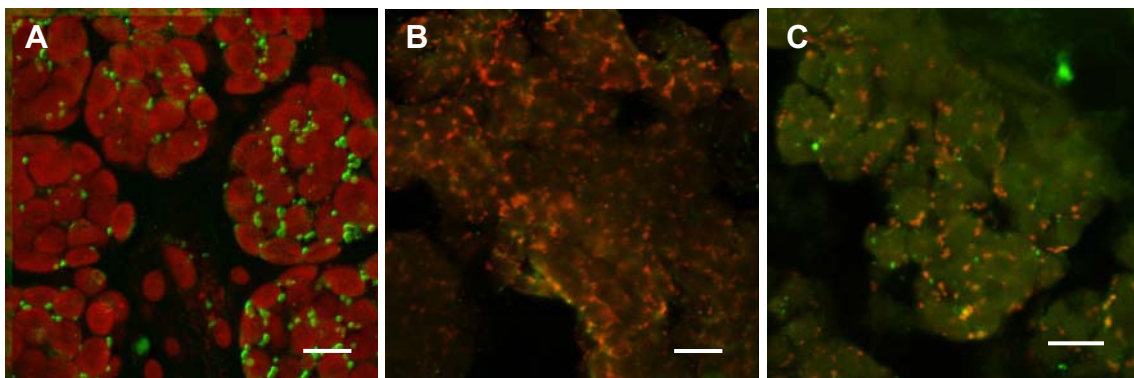


Figura D.7: Resum de la immunolocalització *in-situ* d'HMGR en *whole mount*: (A) HMGR i cloroplasts (B) HMGR i 1S:GFP (C) HMGR i GFP-HDEL; en plàntules d'*A. thaliana* de 6 dies. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

Tal i com s'observa en la figura D.7, el marcatge combinat d'HMGR amb 1S:GFP, i de HMGR amb GFP-HDEL produeixen un alt nivell de soroll de fons. Això com s'ha comentat és degut a les altes concentracions d'anticossos que s'han fet servir. Per altra banda, cal destacar la diferència en el marcatge de dels anticossos secundaris utilitzats. La fluorescència emesa per l'anticòs secundari anti-anti-GFP és molt inferior. Això pot ser degut a la menor eficiència de marcatge del seu corresponent primari (anti-GFP) o bé a diferències en l'eficiència excitació-emissió. Per altra banda no es pot obviar el fet que a les plantes GFP-HDEL les proteïnes GFP i HMGR estan en les mateixes estructures però tenen una sublocalització diferent. Mentre que l'HMGR està present a la membrana de les vesícules, la GFP es troba al lumen.

Per tal d'evitar els problemes ocasionats pel soroll de fons i la subjectivitat de l'observador es va proposar un anàlisi estadístic basat en l'eliminació de senyal inespecífica i la posterior comparació de les zones de localització de cada una de les proteïnes detectades.

Per a fer aquest anàlisi es va partir de imatges de colocalització per immunocitoquímica in situ preses d'un sol pla focal. La comparativa entre diversos plans focals pot produir augments artefactuals en els índexs de colocalització degut a possibles coincidències entre estructures situades a diferents plans de la cèl·lula. D'entre totes les imatges preses de cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons de plantes GFP-HDEL es van descartar aquelles on la penetrància d'un dels dos anticossos havia sigut clarament més baixa. No es van tenir en compte diferències en les intensitats de marcatge d'ambdós anticossos pel que fa a estructures concretes ja que això pot venir determinat per la diferent penetrància dels anticossos.

Atenent a tots aquests criteris es van seleccionar 27 imatges de cèl·lules. Aquestes imatges seleccionades es van processar mitjançant el software ImageJ. Les imatges s'han processat completes, en cap cas s'han seleccionat zones de la imatge, i totes les imatges es van prendre en les mateixes condicions al microscopi confocal en quan a intensitat dels làsers per a cada un dels canals. A cada una de les imatges se li ha aplicat uns límits (*thresholds*) independent per a cada canal, sent el canal 1 (ch1) el vermell i per tant el corresponent a la detecció d'HMGR, i el canal 2 (ch2) el verd corresponent a la detecció de GFP-HDEL. Amb aquest procés s'ha volgut eliminar el soroll de fons produït pels anticossos. Aquests filtres s'han aplicat de manera que la relació entre píxels marcats a un i altre canal (ch1:ch2) sigui el més propera a 1 possible. Sabent que gran part dels píxels corresponien a soroll de fons la relació entre píxels propera a 1 ens permet evitar zones d'exclusió de la colocalització que són exclusivament degudes a aquest soroll de fons. Al mateix temps aquests límits ens han permès delimitar les zones marcades específiques. Un cop processades els canals de cada una de les imatges d'aquesta manera gràcies al *plugin* Intensity Correlation Analysis s'han obtingut diferents mesures de colocalització per a cada imatge (Taula R.1). En la taula D.2 es mostren els valors obtinguts de la mitjana de totes aquestes mesures.



Taula D.2: Anàlisi de colocalització mitjançant Intensity Correlation Analysis (ICA) del software ImageJ. Es mostren els coeficient de Pearson (Rr) i el coeficient de superposició de Manders (R). També es mostren els coeficients de Manders M1 i M2 específics per a cada canal.

IMATGE	Rr	R	ch1:ch2	M1	M2	Threshold Red	Threshold Green
Promig	-0,55533	0,434741	1,23237	0,400148	0,478444	73,851851	56,444444
Desviació	0,078997	0,078038	0,281983	0,091052	0,092408	13,536517	12,582566

En les 27 imatges analitzades s'ha obtingut un coeficient de correlació de Pearson (Rr) de -0,56 de promig. Els valors negatius per Rr representen una relació inversa entre els dos canals, és a dir, existeix colocalització en les mateixes estructures però l'augment de senyal en un canal fa disminuir la senyal en l'altre. Aquesta correlació negativa podria estar determinada pel fet que HMGR i GFP tenen diferent sublocalització (membrana i lumen, respectivament) en les mateixes estructures vesiculars.

Per la seva banda el valor mitjà del coeficient de superposició de Mander (R) és 0,43. Aquest coeficient amb un rang des de 0 a 1 representa el total de colocalització sent 1 una colocalització completa. En aquest cas la influència dels objectes marcats presents en els dos canals adquireix gran importància, i és per això que es van aplicar els thresholds, minimitzant així la detecció de soroll de fons. El valor obtingut com a mitjana és un valor significativament alt. Per una banda, la quantitat de molècules d'ambdues proteïnes és diferent ja que GFP-HDEL està sobreexpressada. També la localització, tot i que a les mateixes estructures, és diferent. Mentre HMGR es troba a la membrana, GFP-HDEL es troba al lumen del RE, cosa que pot explicar la menor detecció de GFP-HDEL per part dels anticossos anti-GFP, sobretot en un doble marcatge on anticossos anti-CD1 estarien marcant la membrana. Per últim, tenim els valors dels coeficients de colocalització de Mander (M1 i M2) per a cada canal per separat. El coeficient M1 indica que un 40% de la senyal de marcatge d'HMGR coincideix amb la de GFP-HDEL, mentre que M2 indica que un 48% de la senyal de marcatge de GFP-HDEL coincideix amb la de HMGR. S'ha de tenir en compte que els coeficients M1 i M2 estan normalitzats i no tenen en compte les diferències en intensitat de senyal. Per una senyal donada es calcula la quantitat de colocalització sense correcció per intensitat. Això provoca que si un píxel conté dues senyals però existeixen diferències d'intensitat entre canals, el resultat de la colocalització seria del 100%. Per tant aquests coeficients ens indiquen que independentment de la quantitat de marcatge, de proteïna o de intensitat, entre un 40% i un 48% de les proteïnes HMGR i GFP-HDEL

colocalitzen. De la mateixa manera que en el coeficient de superposició de Mander (R) si ambdues senyals colocalitzen en un orgànul però presenten una sublocalització diferent dins aquest (bé per diferències en la distribució, per diferències en la detecció per part dels anticossos, o bé per diferències en la intensitat agreujades per l'aplicació de thresholds) tant M1 com M2 seran inferiors al 100%.

Així doncs, els resultats obtinguts permeten afirmar que a nivell de cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons de plantes de 6 dies després de la germinació d'*A. thaliana*, HMGR es troba dins unes vesícules on colocalitza amb GFP-HDEL amb gairebé el 50% dels cassos. No es pot descartar que HMGR estigui present en baixa quantitat (comparat amb GFP-HDEL) en aquestes estructures, o bé que HMGR formi part d'altres estructures diferents als *ER-bodies*, cosa que explicaria la manca de colocalització completa.

Tal i com es mostra en la Figura D.8 en gairebé el 100% de les estructures vesiculars detectades, hi ha presència d'ambdues proteïnes encara que a cada vesícula trobem una distribució diferencial a nivell de píxel de cada una d'elles, molt probablement producte d'una combinació de diferències en el funcionament dels anticossos i també de l'aplicació restrictiva dels thresholds a les imatges.

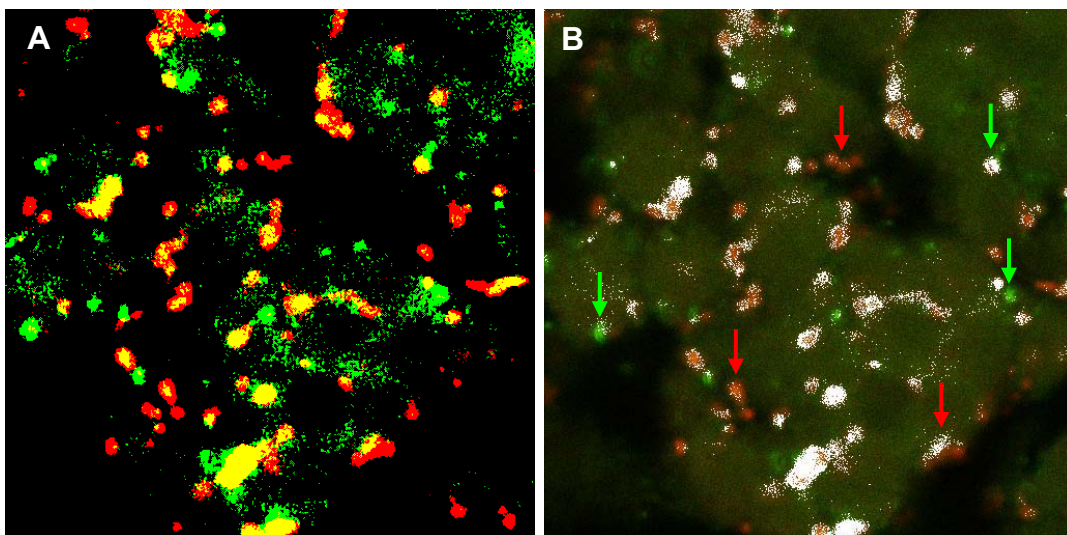


Figura D.8: Representació visual de l'anàlisi de colocalització. **(A)** Imatge de la superposició dels píxels dels dos canals que presenten senyal després de l'aplicació dels thresholds. **(B)** Superposició dels punts de colocalització (blanc) amb la imatge de microscòpia original on es mostren els dos senyals. Les fletxes vermelles indiquen estructures on localitza HMGR però GFP-HDEL està poc localitzada, i les fletxes verdes estructures on GFP-HDEL és molt abundant i HMGR poc abundant. Tot i així en totes les estructures amb marcatge hi ha presència d'ambdues proteïnes.

### 2.3.- Control de l'activitat enzimàtica HMGR en resposta a estrès

Els resultats que s'han presentat al llarg d'aquesta tesi, demostren la presència d'HMGR d'*A. thaliana* en unes vesícules que coincideixen amb els *ER-bodies*. Aquestes vesícules, com s'ha comentat, estan implicades en la defensa de la planta d'*A. thaliana* i es troben de manera constitutiva als cotiledons, i de manera induïble en fulla de roseta (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Matsushima *et al.*, 2003a; Matsushima *et al.*, 2003b; Yamada *et al.*, 2008; Ogasawara *et al.*, 2009). La funció d'HMGR en els *ER-bodies* és encara desconeguda, tot i que la implicació en defensa dels *ER-bodies* podria relacionar a HMGR amb la resposta enfront estrès abiòtic o atac per patògens.

D'altra banda, els alts nivells d'expressió d'*hmg1* i d'activitat HMGR en plantes joves d'*A. thaliana* és major que els seus requeriments metabòlics, suggerint una funció a banda de la metabòlica d'HMGR a plantes (Antolín-Llovera, 2005). Consistent amb això és que plantes homozigotes mutants del gen *hmg1* (*hmg1-3*) creixen de manera normal quan són cultivades *in vitro*, en un ambient molt controlat, estèril i en altes condicions d'humitat. Quan plantes *hmg1-3* són transferides a terra el canvi de condicions els hi provoca greus problemes de desenvolupament (Antolín-Llovera, 2005). Així, l'elevada sensibilitat a l'estrès d'aquest mutant pot tenir a veure amb la manca d'HMGR. Mentre la planta es troba en l'ambient controlat (cultiu *in vitro*), sembla que HMGR2 és suficient per a compensar l'activitat HMGR i realitzar la funció metabòlica a la via del MVA. S'ha d'apuntar que en d'altres espècies de plantes, gens que codifiquen per HMGR estan induïts en resposta a diferents estressos. En tomàquet el gen *HMG2* es troba induït per dany, elicitors fúngics i patògens (Cramer *et al.*, 1993), i en patata els gens de la família *hmg1* estan induïts per metiljasmonat (Choi *et al.*, 1994; Korth *et al.*, 1997).

Tenint en compte aquestes dades, es va proposar comprovar si l'estrès té influència sobre els nivells d'activitat HMGR. Per a fer-ho es va utilitzar com a sistema la línia cel·lular d'*A. thaliana* MM1. En aquestes cèl·lules l'activitat basal HMGR és molt alta. Mentre que les plantes d'*A. thaliana* presenten una activitat HMGR al voltant de 10-15 pmol HMG-CoA/min·mg, les cèl·lules MM1 mostraven una activitat entre 200 i 600 pmol HMG-CoA/min·mg. El fet que uns nivells d'activitat HMGR tant alts poguessin emmascarar una possible influència de l'estrès va fer que en primer lloc s'optimitzés els cultius d'MM1 per a obtenir la menor activitat basal.

Els resultats obtinguts demostren que l'edat del cultiu té una gran influència en l'activitat HMGR. Les cèl·lules que porten en cultiu líquid dos dies s'han pres com a 100% d'activitat. Un dia després, el dia 3, les cèl·lules presenten al voltant d'un 75% d'activitat HMGR, que es redueix a menys del 40% el dia 5. Per últim, als 7 dies d'haver-ne engegat el cultiu l'activitat es troba a un 25% de l'activitat mesurada a dia 2.

En quant a la font de carboni que complementa el medi de cultiu també presenta una gran influència sobre l'activitat HMGR. Mentre unes cèl·lules en cultiu suplementades amb sacarosa al cap de 5 dies d'engagar-ne el cultiu, tenen una activitat HMGR al voltant dels 250 pmol HMG-CoA/min·mg, un cultiu paral·lel amb glucosa presenta uns valors al voltant dels 175 pmol HMG-CoA/min·mg. Aquestes dades en si mateixes suggereixen que les cèl·lules tenen disminuïda la seva activitat HMGR quan les condicions del cultiu són més favorables. Es pot postular que l'estrès provocat per un subcultiu (és a dir, una al·lquota de cèl·lules en cultiu que es propaguen a medi nou per a continuar el cultiu) podria estar induint el gen *hmg1* i es detectaria un augment d'activitat HMGR que aniria baixant al cap dels dies degut a l'estabilització del cultiu. En la mateixa línia, la tria de la font de carboni té influència en els nivells d'activitat HMGR, i és depenent d'espècie (Slesak and Przywara, 2003; Weathers *et al.*, 2004). Sembla que la sacarosa produeix augments en els nivells d'activitat HMGR comparada amb la glucosa.

### **2.3.1.- Resposta de l'HMGR a estrès**

Per tal de comprovar si l'atac per part d'un patògen produeix una modulació de l'activitat HMGR, es van infectar amb *Agrobacterium tumefaciens* cultius de 5 dies de creixement de cèl·lules MM1. Fins als 40 minuts de tractament, les cèl·lules que estan en contacte amb l'*Agrobacterium* no presenten cap variació en els nivells d'activitat HMGR respecte a cèl·lules control. Per contra la mesura d'activitat HMGR de cèl·lules infectades amb *Agrobacterium* al cap de 120 minuts presenten una menor activitat HMGR que la de les cèl·lules control. Aquests resultats, tot i ser preliminars, suposen una primera evidència de la modulació de l'activitat enzimàtica d'HMGR en resposta a l'atac per un patògen.

De la mateixa manera es va voler comprovar si un estrès de tipus abiòtic podria tenir influència en els nivells d'activitat HMGR. Per tal de simular condicions d'estrès salí, es van incubar cultius cel·lulars MM1 amb una alta concentració de clorur de sodi, de 660 mM. En aquestes condicions la resposta és

més acusada que la observada en condicions d'estrès biòtic. A partir d' aproximadament 40 minuts d'incubació amb sal, l'activitat HMGR es troba significativament reduïda respecte a cèl·lules control. Aquesta resposta no sembla ser deguda a mort cel·lular ja que als 120 minuts s'observa una recuperació també significativa dels valors d'activitat enzimàtica mesurats. De fet els cultius tractats amb sal van romandre en bon estat i s'observà creixement del mateix durant 24 hores després del tractament.

### 2.3.2.- Implicacions de la modulació d'activitat HMGR per estrès

Les dades recollides en els experiments de modulació de l'activitat HMGR suggereixen la implicació d'HMGR en la resposta a estrès. La ràpida disminució de l'activitat HMGR en cèl·lules que s'han tractat amb un patògen o amb xoc osmòtic i salí podrien ser degudes a la formació dels *ER-bodies*. Tot i que no s'ha demostrat la presència d'HMGR específicament en els *ER-bodies* de tipus induïble, la disminució de l'activitat enzimàtica juntament amb la determinació de la capacitat del domini N-terminal d'HMGR per induir la formació de cossos vesiculars derivats del RE, i la posterior demostració de la presència d'HMGR en *ER-bodies* (possiblement constitutius) porten a pensar en una funció d'HMGR dins aquestes vesícules que encara està per determinar. HMGR podria formar part dels *ER-bodies*, integrada en aquest subdomini del RE com a part de la síntesi de isoprenoides específics o bé amb funció estructural i/o d'organització de membranes. Per altra banda, si la funció fos metabòlica, implicada en la síntesi d'isoprenoides específics semblaria lògic pensar en un augment de l'activitat HMGR en resposta a estrès, presumiblement per inducció de la transcripció. No es tenen dades d'aquesta inducció a *A. thaliana*, però sí que s'ha observat una inducció de gens *HMG* a patata i tomàquet en resposta a dany, elicitors, atac per patògens o metiljasmonat (Choi *et al.*, 1992; Cramer *et al.*, 1993; Korth *et al.*, 1997). En patata una ferida en el tubercle provoca augments de fins a 5 vegades de l'activitat HMGR mesurada 24 h després del dany, traduint-se en un acúmulo de fitoalexines a partir de les 24 h. (Stermer i Bostock, 1987). També a patata el metiljasmonat produeix un augment de la transcripció de *hmg1* (Choi *et al.*, 1994). A *Camptotheca acuminata* l'efecte de ferida sobre discos de fulles provoca un augment d'entre 15-20 vegades en l'expressió de la construcció *hmg1::GUS*, observant-se a 6 h els primers increments en l'activitat GUS (Burnett *et al.*, 1993). Així doncs, es postula que la disminució de l'activitat HMGR detectada en aquesta tesi, a les cèl·lules MM1 podria ser deguda a la resposta a curt plaç enfront una situació d'estrès. Durant els primers minuts després de l'exposició a estrès, les molècules d'HMGR podrien estar implicades en la formació o ser reclutades als *ER-bodies*. Degut a aquest reclutament la planta

podria estar compensant la reducció en l'activitat de l'enzim, amb una inducció diferencial d'algun gen *HMG*. Cal recordar, a més, que els sistemes de tomàquet i patata enfront *A. thaliana* són diferents en quant que els gens induïts podrien estar implicats en la síntesi de fitoalexines de defensa, però en el cas d'*A. thaliana* aquestes molècules no són de naturalesa isoprenoide. El sistema de cèl·lules MM1 però, podria necessitar un temps per a compensar l'activitat HMGR i els experiments que s'han fet en aquesta tesi estarien detectant l'etapa de transició. Estudis realitzats en suspensions cel·lulars de tabac (*Nicotiana tabacum*) presenten una inducció de l'activitat HMGR en resposta a l'adició al medi de cultiu d'un elicitor fúngic a partir aproximadament de les 2 h, que arriba al seu màxim a les dues hores. Aquesta inducció representa a més un augment en els nivells del sesquiterpè capsidiol a partir de les 4 h de tractament i arriba al seu màxim a les 15 h (Chappell i Nable, 1987)

Per altra banda, les dades observades permeten pensar que HMGR podria ser un efector de la formació dels *ER-bodies*. En aquest cas, la inactivació d'HMGR podria ser el senyal per a la formació dels *ER-bodies* enfront un atac. Consistent amb això seria la inactivació per desfosforilació d'un residu situat a N-terminal d'HMGR per part de PP2A. Aquesta desfosforilació, i per tant inactivació de l'activitat, seria el senyal per a la formació dels *ER-bodies*, implicant HMGR1S com a efector d'aquests cossos vesiculars. PP2A interactua també amb la isoforma HMGR1L. La interacció d'aquesta isoforma amb AtKLC1 i aquesta podria competir amb a subunitat A de PP2A, evitant la desfosforilació d'HMGR1L i per tant conservant la seva activitat i mantenint aquesta isoforma a la xarxa del RE (Antolín-Llovera, 2005).

### 3.- ESTUDI DE LA CAPACITAT MORFOGENÈTICA DEL DOMINI N-TERMINAL D'HMGR EN UN SISTEMA HETERÒLEG

Tenint en compte la capacitat del domini N-terminal d'HMGR d'*A. thaliana* d'induir la formació de vesícules en assajos d'expressió transitòria, i també la localització d'HMGR en *ER-bodies*, es va voler aprofundir en l'anàlisi de la capacitat morfofenètica del domini N-terminal d'HMGR1S.

En cèl·lules de mamífer, s'ha observat la capacitat d'HMGR d'induir la formació d'estructures ordenades de túbuls del RE, anomenats estructures cristal·loides (Chin *et al.*, 1982; Pathak *et al.*, 1986), mentre que en llevats s'ha determinat la formació de membranes concèntriques derivades del RE al voltant del nucli cel·lular en resposta a increments en els nivells de proteïna HMGR (Wright *et al.*, 1988; Parrish *et al.*, 1995; Profant *et al.*, 1999).

En el cas de plantes, l'expressió de la quimera 1S:GFP en epidermis de ceba, mostra que també en aquest sistema heteròleg l'expressió del domini N-terminal d'HMGR1S d'*A. thaliana*, pot induir estructures vesiculars. A més aquestes estructures vesiculars són part del RE, com ho demostra el fet que en elles colocalitza el marcador de lumen T3RE. Els senyals que indueixen la formació d'estructures derivades del RE haurien d'estar conservats respecte a *A. thaliana*.

En aquest context es va plantejar l'expressió d'HMGR en un sistema heteròleg més llunya evolutivament, per estudiar la seva capacitat morfofenètica dins el RE. Els experiments d'expressió d'HMGR en un sistema heteròleg havien determinat que el sistema on se sobreexpressa HMGR determina les estructures que es formen (Wright *et al.*, 1990).

L'HMGR de mamífers està regulada negativament per acumulació de productes finals de la via de síntesi d'isoprenoides. L'adició de colesterol a cèl·lules en cultiu provoca una ràpida degradació de l'HMGR. Per tal d'evitar aquest control negatiu es va expressar en cèl·lules d'ovari d'hàmmster xinès (CHO) la quimera 1S:GFP i no l'HMGR1S completa d'*A. thaliana*. D'aquesta manera l'expressió de la proteïna heteròloga no pot provocar un augment dels nivells de colesterol que podrien exercir el mateix tipus de control negatiu que el de l'HMGR endògena. D'altra banda la presència de la GFP va permetre una ràpida identificació de les cèl·lules transfectades. Els resultats obtinguts, encara preliminars, mostren zones d'acumulació de RE llis en resposta a la sobreexpressió d'1S:GFP.

Aquestes acumulacions no tenen una estructura ordenada. La capacitat d'induir estructures derivades del RE sembla doncs una característica comuna a un gran nombre d'isoformes d'HMGR i és present en diferents espècies, i regnes. L'HMGR1S d'*A. thaliana* també presenta aquesta capacitat de formació d'estructures. Tenint en compte aquestes dades, la capacitat biogenètica i morfogenètica de l'HMGR en el RE, en els tres regnes eucariotes (animals, plantes, llevats) podria tenir un objectiu diferent en cada un dels organismes o tipus cel·lulars. En el cas de la cèl·lula vegetal o al menys a *A. thaliana*, l'objectiu final d'aquesta capacitat morfogenètica podria ser el de formació dels *ER-bodies* i, d'aquesta manera contribuir a la defensa de la planta enfront situacions d'estrès.



## 4.- CONTROL DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'HMGR

### 4.1.- Efecte del bloqueig de PP2A sobre la localització subcel·lular d'HMGR

Experiments previs suggereixen que les isoformes HMGR1S i HMGR1L, codificades ambdues al gen *HMG1* d'*A. thaliana*, presenten una diferent localització subcel·lular (Leivar, 2003). Per altra banda, s'ha demostrat que HMGR1S interacciona amb la subunitat B'' de PP2A mitjançant el seu domini N-terminal. Per la seva banda HMGR1L interacciona amb PP2A i també amb AtKLC1 (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006). Aquestes interaccions poden ser la base de les diferències entre ambdues isoformes en relació a la seva localització subcel·lular. La interacció (i desfosforilació) d'HMGR1S amb PP2A podria conduir a la localització en vesícules pròpia d'aquesta isoforma. Per la seva banda, HMGR1L mitjançant la seva interacció específica amb AtKLC1 mantindria una localització exclusivament al RE.

Donada la importància que sembla tenir PP2A en la localització subcel·lular d'HMGR (Antolín-Llovera, 2005), en el nostre grup s'han fet estudis d'expressió transitòria per bombardeig de micropartícules d'1S:GFP amb inhibició de PP2A.. Els efectes sobre la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de fulles d'*A. thaliana*, d'un inhibidor específic de fosfatasa, la cantaridina, resultà en una disminució del nombre de cèl·lules que presentaven presència d'1S:GFP en vesícules, i en la major part d'aquestes cèl·lules aquesta quimera es trobà a la xarxa del RE, i en un nombre menor d'aquestes cèl·lules es va observar la presència de grans agregats fluorescents. Per la seva banda experiments d'expressió transitòria d'1S:GFP sobre mutants d'*A. thaliana* de la línia mutant *rcn1-1* que és defectiva en la isoforma majoritària de la subunitat A de PP2A van demostrar que la major part de les cèl·lules presentaven un patró de localització subcel·lular d'1S:GFP a nivell del RE, i disminuïa notablement el nombre de cèl·lules amb estructures vesiculars.

Per tal de demostrar la implicació de PP2A en la presència d'HMGR en vesícules, es van voler realitzar experiments d'immunocitoquímica *in situ* sobre plantes silvestres d'*A. thaliana* tractades amb cantaridina i sobre plantes mutants de la línia *rcn1-1*. Amb aquests experiments es pretén detectar l'HMGR endògena de la planta.

Quan es comparen els resultats de la immunocitoquímica en plantes d'*A. thaliana* de l'ecotip Columbia 0, crescudes en absència o presència de cantaridina no s'observen diferències a nivell de

marcatge d'HMGR en una xarxa de vesícules que es troben en els espais citoplasmàtics que deixen els cloroplasts de les cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons. Per altra banda sembla haver-hi un augment de la intensitat del marcatge d'HMGR al RE. En el cas de la cantaridina l'adaptació de les plantes al creixement en presència de l'inhibidor pot haver provocat un augment en els nivells de PP2A o simplement el nivell d'inhibició no és suficient per a produir un efecte sobre la localització subcel·lular d'HMGR. S'ha de tenir en compte que la concentració de cantaridina utilitzada per al creixement d'aquestes plantes és subletal, la qual cosa implica una inhibició parcial de PP2A. Aquesta inhibició parcial pot també ser suficient en aquest cas per a la interacció amb HMGR. Encara que no s'observi a nivell visual, és possible que la inhibició parcial produeixi una disminució en el nombre de vesícules i conseqüentment una acumulació de la quimera a la xarxa del RE.

Pel que fa a la detecció per immunocitoquímica d'HMGR en plantes mutants *rcn1-1* es va observar que aquestes també es troba present en estructures vesiculars en les cèl·lules parenquimàtiques dels cotiledons. En aquests mutants però també s'observa un efecte acumulatiu d'1S:GFP fora de les vesícules, en el que podria ser el RE, però aquest efecte és menys acusat que el trobat amb cantaridina. Aquests mutants presenten una disminució del 50% en l'activitat PP2A, ja que són defectives en la variant majoritària de la subunitat A (Deruere *et al.*, 1999). Existeixen tres gens codificant tres isoformes de la subunitat A de PP2A (Slabas *et al.*, 1994), i encara que RCN1 és la isoforma majoritària, no es pot descartar que la compensació per part d'alguna de les altres isoformes sigui suficient per restablir la funció de PP2A en la localització subcel·lular d'HMGR1S.

Així doncs el bloqueig genètic o farmacològic de PP2A té un efecte més evident en experiments d'expressió transitòria que en les deteccions d'HMGR per immunocitoquímica. S'ha de tenir en compte que els assajos d'expressió transitòria produeixen uns nivells molt alts d'expressió de la quimera 1S:GFP en un temps relativament curt. Aquests nivells farien que la inhibició per cantaridina (que es fa sobre fulles i per tant la planta no hi està adaptada) fos suficient per observar els canvis en la localització subcel·lular. També en el cas dels mutants *rcn1-1*, aquests alts nivells d'expressió d'1S:GFP no farien possible la compensació de la pèrdua del 50% d'activitat PP2A produïda per la manca de RCN1, amb altres isoformes. No és descartable però, que la major acumulació d'HMGR observada per immunocitoquímica en plantes crescudes en cantaridina i en mutants *rcn1-1* sigui deguda a una menor capacitat de la cèl·lula per a formar vesícules on localitzaria la proteïna.

## 4.2.- Localització subcel·lular d'HMGR en plantes mutants *nai1-2*

El gen *NAI1* codifica per un factor de transcripció que presenta un domini bHLH (basic *hèlix-loop-hèlix*). *NAI1* pertany a una superfamília de factors de transcripció que s'uneixen a llocs específics del DNA formant dímers (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). S'ha descrit que les plantes mutants per aquest gen, *nai1-1* són defectives en la formació de *ER-bodies* als cotiledons, és a dir, els de tipus constitutiu, mentre que si presenten *ER-bodies* induïbles en fulla de roseta en resposta a atacs per patògens (Matsushima *et al.*, 2004). El mutant *nai1-2* és un mutant al·lèlic de *nai1-1*, i les plantes resultants del creuament d'aquestes dues línies no presenten *ER-bodies* (Matsushima *et al.*, 2004).

La expressió transitòria d'1S:GFP indueix la formació d'estructures vesiculars que contenen la quimera en cèl·lules epidèrmiques de fulles d'*A. thaliana*. Al llarg d'aquesta tesi s'han aportat proves que el domini N-terminal d'HMGR1S present a la quimera 1S:GFP té capacitat morfogènica al RE. En plantes transgèniques 1S:GFP, la quimera colocalitza amb l'HMGR endògena. La colocalització d'HMGR en cèl·lules parenquimàtiques de cotiledons de plantes d'*A. thaliana* transgèniques que sobreexpressen GFP-HDEL, en unes vesícules on també es troba la pròpia quimera GFP-HDEL permet proposar que HMGR té una funció als *ER-bodies*.

A partir d'aquestes dades es va plantejar aprofundir en la relació entre la quimera 1S:GFP i *NAI1*. Es coneix que la proteïna *NAI1* indueix la expressió de *PYK10*, el component majoritari dels *ER-bodies* constitutius, així com de *NAI2*, que és un dels efectors de la formació dels *ER-bodies* (Yamada *et al.*, 2008).

A cèl·lules epidèrmiques de plantes mutants *nai1-2*, l'1S:GFP expressada de forma transitòria localitza a la xarxa del RE (Figura R.20). En aquests assajos no es van observar vesícules d'1S:GFP. Al mateix temps totes les cèl·lules observades presenten un gran agregat d'1S:GFP (Figura R.20, Resultats). Així doncs segons aquests resultats la capacitat del domini N-terminal d'HMGR1S en 1S:GFP, per induir la formació de vesícules en expressió transitòria sembla estaria controlada pel factor de transcripció *NAI1*. La falta de senyals de formació de vesícules produïda per *NAI1* podria ser la responsable, a més de la formació dels agregats ja que els alts nivells d'expressió de la quimera 1S:GFP en aquests assajos podria provocar l'acumulació de la proteïna en un agregat degut a la

manca de formació de vesícules,. No és descartable que aquest acúmul es formi en zones riques en RE, com ara a nivell perinuclear, fet que no s'ha pogut demostrar fins al moment.

Queda per discernir si el control de la formació de vesícules derivades de l'expressió d'1S:GFP es produeix de manera directa pel factor de transcripció NAI1, o bé de manera indirecta per algun dels gens sobre els quals aquest actua. No es pot descartar que, a pesar de la importància del domini N-terminal d'HMGR1S sobre la formació dels *ER-bodies*, sigui algun altra proteïna (com NAI2) la que impossibiliti la formació degut a la falta de NAI1 en les plantes *nai1-2*.

Per últim, els experiments preliminars per rescatar el patró de formació de vesícules 1S:GFP en les plantes *nai1-2* també apunten que NAI1 és necessari per a la formació de les vesícules d'HMGR, com s'havia descrit (Matsushima *et al.*, 2004).

## **CONCLUSIONS**



- I.** S'han realitzats estudis de localització subcel·lular amb la proteïna quimèrica 1S:GFP, formada pel domini de membrana de l'HMGR d'*A. thaliana* i la GFP. L'expressió transitòria d'aquesta quimera en cèl·lules epidèrmiques de fulla de roseta d'*A. thaliana* i epidermis de ceba indueix la formació d'unes estructures vesiculars aproximadament esfèriques d'un tamany entre 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre. Es confirmen els resultats previs obtinguts amb expressions transitòries d'1S:GFP en cèl·lules en cultiu i plantes d'*A. thaliana*.
- II.** La mutació de l'Alanina 206 a Lisina en la seqüència proteica de GFP, que evita la dimerització de la proteïna, no afecta a la formació d'estructures vesiculars 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla de roseta d'*A. thaliana*. Així doncs, l'efecte morfogènètic de la quimera 1S:GFP no és degut a la GFP sinó al domini de membrana de l'HMGR.
- III.** S'ha desenvolupat un marcador específic del lumen del reticle endoplasmàtic basat en la variant de la proteïna fluorescent vermella DsRedT3, que ha estat anomenat T3RE,. La localització del marcador T3RE s'ha comprovat tant en el sistema de fulles d'*A. thaliana* com de ceba, demostrant-se que T3RE presenta com a única localització subcel·lular el lumen del RE. Aquest marcador és doncs adient per a estudis de localització subcel·lular de proteïnes.
- IV.** En assajos de co-expressió a cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* i epidermis de ceba, la quimera 1S:GFP colocalitza amb el marcador T3RE, tant en la xarxa del reticle endoplasmàtic com a les vesícules 1S:GFP. Donat que el marcador T3RE té un senyal funcional de retenció a reticle endoplasmàtic es pot concloure que les vesícules 1S:GFP no només deriven d'aquest orgànul sinó que a més són part del mateix.
- V.** S'han generat plantes transgèniques d'*A. thaliana* transformades de manera estable amb la quimera 1S:GFP i s'ha estudiat l'expressió d'aquesta quimera al llarg del desenvolupament, en diferents teixits i tipus cel·lulars Tots els tipus cel·lulars presenten marcatge d'1S:GFP al reticle endoplasmàtic. A determinats tipus cel·lulars com les cèl·lules epidèrmiques de cotiledó i fulla, l'1S:GFP es troba no només en aquest orgànul sinó també a la membrana de vesícules de morfologia fusiforme d'un tamany entre 5 i 10  $\mu\text{m}$  de llargada i entre 0,5 i 1  $\mu\text{m}$  d'ampla.

**VI.** Durant el desenvolupament de les plantes transgèniques 1S:GFP, l'expressió de la quimera 1S:GFP va quedant progressivament restringida a zones de proliferació cel·lular, a pesar que la quimera es troba sota el control del promotor constitutiu CaMV35S. A partir de la generació T3, en aquestes plantes l'acumulació d'1S:GFP s'observa fins als 15 dies després de la germinació. En aquestes plantes a més, s'observen diferències en els nivells d'expressió de la quimera entre diferents teixits de la planta, així com també entre cèl·lules d'un mateix teixit, formant-se un mosaic en quant a presència d'1S:GFP. Aquestes dades indiquen que l'expressió d'1S:GFP està regulada a nivell post-transcripcional o post-traducciona.

**VII.** Als cotiledons de plantes transgèniques 1S:GFP de 4 dies després de la germinació, l'expressió d'1S:GFP és generalitzada però en mosaic. En les cèl·lules que expressen 1S:GFP, el patró de localització subcel·lular d'aquesta quimera varia segons la zona del cotiledó estudiada. Mentre que les cèl·lules epidèrmiques de la zona proximal presenten marcatge d'1S:GFP a la xarxa del reticle endoplasmàtic i a la membrana de vesícules fusiformes, a la major part de les cèl·lules epidèrmiques de la zona distal el marcatge és exclusiu al reticle endoplasmàtic. A plantes de 13 dies l'expressió d'1S:GFP es veu reduïda a les cèl·lules de la part proximal de fulles i la quimera està localitzada a la xarxa del reticle endoplasmàtic i a vesícules fusiformes. Les estructures vesiculars fusiformes tant de cotiledons com de fulles presenten una alta mobilitat. Totes aquestes observacions suggereixen un control de la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP degut a un mecanisme desconegut, en el que podria estar implicat el domini N-terminal d'HMGR1S.

**VIII.** L'HMGR ha estat immunolocalitzada a cèl·lules parenquimàtiques de plantes d'*A. thaliana* de 6 dies, fent servir un anticòs policlonal generat contra el domini catalític d'HMGR1 d'*A. thaliana*. En aquestes cèl·lules l'HMGR apareix en unes vesícules de 0,5 a 2 µm de diàmetre que es troben en els espais citosòlics que deixen els cloroplasts.

**IX.** La localització subcel·lular de l'HMGR i de la quimera 1S:GFP ha estat estudiada a cèl·lules epidèrmiques de fulla de plantes transgèniques 1S:GFP mitjançant doble immunocitoquímica. Aquestes dues proteïnes co-localitzen a la membrana del reticle endoplasmàtic i de vesícules fusiformes d'entre 5 i 10 µm de llargada i d'unes 0,5 µm d'ample. Es pot concloure que l'absència del domini catalític de l'HMGR en la quimera 1S:GFP no afecta a la seva localització subcel·lular. La localització subcel·lular de l'HMGR està determinada exclusivament pel domini de membrana.



**X.** Les vesícules 1S:GFP observades en les plantes transgèniques amb la quimera presenten una morfologia, mobilitat i patró d'expressió durant el desenvolupament molt similar a unes estructures prèviament descrites, derivades del reticle endoplasmàtic, anomenades *ER-bodies*.

**XI.** S'han dut a terme assajos de doble immunocitoquímica per localitzar HMGR i GFP a plantes transgèniques GFP-HDEL. En aquests assajos s'ha observat coincidència física entre les vesícules HMGR i els *ER-bodies*. Estudis estadístics han permès determinar el grau de colocalització d'HMGR i GFP a nivell submicroscòpic a dins les vesícules entorn el 45%. Es pot concloure que l'HMGR d'*A. thaliana* està localitzada als *ER-bodies*.

**XII.** S'han dut a terme estudis immunocitoquímics per localitzar HMGR en el mutant *rcn1-1* d'*A. thaliana*, defectiu en una de les variants de la subunitat A de PP2A, i en plantes d'*A. thaliana* germinades i crescudes en presència de cantaridina, un inhibidor específic de PP2A. El bloqueig genètic o farmacològic de PP2A no sembla afectar al nombre de vesícules d'HMGR però sí la quantitat de marca en aquestes vesícules, observant-se una major quantitat relativa de proteïna HMGR a la xarxa del reticle endoplasmàtic.

**XIII** La quimera 1S:GFP no indueix la formació de vesícules en cèl·lules del mutant d'*A. thaliana nai1-2*, defectiu en el gen *NAI1*. Això suggereix que el producte de *NAI1*, està implicat en la biogènesi de les vesícules 1S:GFP.

**XIV.** Un estrès salí (estrès abiòtic) o la presència en el medi d'*Agrobacterium tumefaciens* (estrès biòtic) fa disminuir l'activitat HMGR de la suspensió cel·lular MM1 d'*A. thaliana* entre 30 minuts i dues hores després de l'exposició. Aquesta resposta podria ser part de la defensa de les cèl·lules d'*A. thaliana* front a la situació d'estrès.

**XV.** L'expressió de la quimera 1S:GFP en cèl·lules de mamífer CHO mostren la formació de zones d'acumulació de túbuls de RE llis. Aquesta acumulació és pròpia d'alguns tipus cel·lulars de plantes i també de cèl·lules de mamífer productores d'esteroides com les cèl·lules adrenocorticals. Aquests resultats suggereixen que el domini N-terminal d'HMGR1S conserva la capacitat de formar estructures derivades del RE en un sistema heteròleg.



## **MATERIAL I MÈTODES**



## 1. MATERIAL BIOLÒGIC

### 1.1.- *Escherichia coli*

Soques utilitzades per amplificar o expressar el DNA plasmídic:

**DH5 $\alpha$** : *endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 supE44  $\Delta$ (*lacIZYA-argFV169*) *deoR* ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (*lacZ*)M15)*

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

**BL-21 (DE3)**: [F- *ompT hsdSB (rB- mB-)* gal dcm] (Invitrogen)

### 1.2.- *Agrobacterium tumefaciens*

Soques utilitzades per a transformació de material vegetal:

GV3101 pMP90RK (Koncz and Schell, 1986)

### 1.3.- *Arabidopsis thaliana*

Els experiments descrits en aquesta memòria es realitzaren amb l'espècie *A. thaliana* amb les línies descrites a continuació:

Línea silvestre	Obtinguda de	
Columbia (Col) 0, 3	Lehle Seeds, EEUU	
Wassilewskija-2 (Ws-2)	Lehle Seeds, EEUU	
C24	Lehle Seeds, EEUU	
Línea transgènica	Descripció	Fons genètic
35S::1S:GFP	Seqüència codificant pel domini N-terminal d'HMGR1S i GFP a C-terminal, sota el control del promotor CaMV35S	Col 0
35S::mGFP5-ER	Seqüència codificant de GFP amb el pèptid de trànsit de la quitinasa a N-terminal i la seqüència de retenció a RE, HDEL a C-terminal sota el promotor CaMV35S	C24
<i>nai1-2</i>	Mutant del gen <i>nai1</i>	Ws-2
<i>rcn1-1</i>	Mutant de la subunitat A de PP2A	Ws-2

#### **1.4.- Cèl·lules MM1 d'*Arabidopsis thaliana***

S'han emprat cèl·lules de la línia MM1 de l'espècie vegetal *A. thaliana* en cultiu, de l'ecotip Landsberg erecta. Aquestes cèl·lules es van mantenir en cultiu líquid amb medi MSS (sals de medi MS, 3% glucosa, 0,5 mg/l d'àcid naftalenacètic (NAA) i 0,05 mg/l de quinetina). El pH d'aquest medi es de 5,8 ajustat amb KOH.

Per a tal de mantenir en creixement el cultiu, es van realitzar passis a nou medi cada 10 dies, en una proporció 1:4.

#### **1.5.- Cèl·lules CHO d'ovari de hámster**

Els experiments d'expressió heteròloga de proteïnes en cèl·lules de mamífer es van dur a terme en cèl·lules d'ovari d'hámster xinès CHO-K1.

Per al manteniment en cultiu d'aquestes cèl·lules es va utilitzar medi DMEM/F12 (Sigma) que conté L-Glutamina, 15nM HEPES i bicarbonat de sodi. Aquest medi va ser suplementat amb sèrum fetal boví (FBS) (Gibco) a una concentració final del 10%.

Les cèl·lules van ser cultivades en a 37°C durant dos dies, fins al 90% aproximat de confluència, moment en el qual es procedeix a fer un subcultiu de manteniment.

## 2.- PLASMIDIS

### 2.1.- Expressió transitòria en ceba i fulles d'*A. thaliana*

Es van utilitzar les construccions clonades en pGFPau

p1S:GFP: Codifica per la proteïna quimèrica formada pel domini N-terminal (aminoàcids 1-178) de la isoforma HMGR1S d'*A. thaliana* a la que està unida a l'extrem C-terminal la proteïna verda fluorescent GFP.

pT3RE: Codifica per la proteïna quimèrica formada per la proteïna vermella fluorescent DsRedT3 unida al pèptid de trànsit de la quitinasa i a una senyal de retenció a reticle endoplasmàtic (HDEL).

pT4RE: Codifica per la proteïna quimèrica formada per la proteïna vermella fluorescent DsRedT4 unida al pèptid de trànsit de la quitinasa i a una senyal de retenció a reticle endoplasmàtic (HDEL).

pNai1: Codifica pel cDNA del gen *NAI1* d'*A. thaliana*.

Es va utilitzar la quimera EGFP<sub>er</sub> com a marcador del lumen del reticle endoplasmàtic (Haseloff *et al.*, 1997) (Danon *et al.*, 2004)

pEGFP-N1: Codifica per la GFP i va ser utilitzat per a la construcció de quimeres amb els dominis N-terminal d'HMGR1S d'*A. thaliana* i HMGCR humana utilitzades en les transfeccions de cèl·lules CHO-K1.

### 3.- OLIGONUCLEÒTIDS

Nom	Seqüència 5'-3'	Longitud	Temperatura de fusió
H1.3F	GCTAGCACTAACAGAGGCTGCA	22	65,7
H1.2R	GTCGCTAGCCTCCTTTCGTTTC	21	71,4
H1.1F	CCAACAGACATGCGAGTTCGTC	22	69
H1.1R	CCAGCAATCCCAACAGGAATCTG	23	70,5
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	22	72
TermR	CAACACATGAGCGAAACC	18	63,5
GFP5R	TCAGCTTGCCGTAGGTGG	18	65,2
NaiF1	GAAAAAGAGTTCTTGCCATGG	21	66,5
NaiR1	AACCACTGCGGCCGCCACATA	21	79,2
DAG-F1	AACCCCGGGTTCAAAGCAAGTG	22	78,9
DAG-R1	GAGGATCCCCGGGCTGCAGG	21	78,5
pRTL2-R1	GCAAGACCGCAACAGGATTC	21	69,9
A206K-GFP-F1	CTGAGCACCCAGTCCAAGCTGA	22	82,9
A206K-GFP-R1	GGGGTCTTTGCTCAGCTTGAC	22	82,9
A206K-GFP-F2	TACCTGAGCACCCAGTCCAAG	21	66,3
GFP1F	GGCCACAAGTTCAGCGTGTC	21	71,2
SeqRedF1	GATGACCACCGCTTGTACAG	21	72,1
SeqRedF2	CTACAAGAAGCTGTCTTCCC	21	61,7
SeqRedR1	ATGAACTCCTTGATGACGTCC	21	62,9
SeqRedR2	TTGTGGGAGGTGATGTCCAGC	21	69,6
RE-F	CATGAAGACCAACTTGTTCTTCTTCTGATT TTCTCCCTTCTCCTTAGCCTCGCTTCTGCTGA	63	87,2
RE-R	CATGTCAGCAGAAGCGAGGCTAAGGAGAAGG GAGAAAATCAAGAAGAGGAACAAGTTGGTCTT	63	86,8
LB4	CGTGTGCCAGGTGCCACGGA	21	78,8
Tag5	CTACAAATTGCCTTTCTTATC	22	62,6
Nai-A	CTGGAGGAGGAGCGAGTGGTG	21	70,7
Nai-B	GCTCTGCTGCGTCTCCTCTGTC	22	70
Nai-C	CCTTAGTGAGAATGGTTATAACGAG	25	60,7
Nai-D	ACGCAACTCTTATGTTCTTACCAC	25	66,1
LB2	TGCCGATTTTCGGAACCACATC	22	73,7
T7	GTAATACGACTCACTATAGGG	21	64,3
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGAA	21	68
GAm1	CGGATCTGATCGAAGGTCGTGGGGAAA TCGATTCGGATCCTCGAGATTTACCC	53	89,5
GAm2	GGGTAATCTCGAGGATCCGAATCGA TTTCCCCACGACCTTCGATCAGATCCG	53	89,5
Ga-scr	ATCGAAGGTCGTGGGGAAATC	21	71,8



## 4.- ANTICOSSOS

Els anticossos primaris:

- Anti-CD1-623: anticossos policlonals obtinguts en conill i generats contra el domini catalític de l'HMGR1 (CD1) recombinant expressat en *E.coli* (Dale *et al.*, 1995). Aquests anticossos van ser cedits per la Dra. Montse Arró i el Dr. Albert Ferrer (Dept. de Bioquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona). S'utilitza una dilució 1:1000 per assaig per immunohistoquímica en *whole mount*.
- Anti-GFP: anticossos policlonals obtinguts en ovella i generats contra GFP (proteïna completa). Aquests anticossos són de la casa comercial Novus Biologicals (Littleton, Estats Units, Ref: NB110-75114). Es van utilitzar a una dilució d'entre 1:200 i 1:1000.

Els anticossos secundaris:

- Alexa Fluor 350: anticossos policlonals obtinguts en cabra, contra IgG de conill, conjugats amb un fluoròfor que emet en la longitud d'ona del blau (350 nm). Es van utilitzar a una dilució d'entre 1:200 i 1:300. Aquests anticossos van ser adquirits a la companyia Invitrogen (Carlsbad, Estats Units, Ref: A11069).
- Alexa Fluor 488: anticossos policlonals contra IgG de conill, conjugats amb un fluoròfor que emet en la longitud d'ona del verd (488 nm). Es van utilitzar a una dilució d'entre 1:200 i 1:300. Aquests anticossos van ser adquirits a la companyia Invitrogen (Carlsbad, Estats Units, Ref: A11070).
- Alexa Fluor 568 F(ab)<sub>2</sub>: anticossos policlonals contra IgG de conill, conjugats amb un fluoròfor que emet en la longitud d'ona del vermell (603nm). Es van utilitzar a una dilució d'entre 1:200 i 1:300. Aquests anticossos van ser adquirits a la companyia Invitrogen (Carlsbad, Estats Units, Ref: A21069).
- $\alpha$ -Ovella FITC: anticossos policlonals secundaris obtinguts en burro, contra IgG d'ovella, per a la detecció dels primaris  $\alpha$ -GFP. Aquests anticossos estan conjugats amb FITC, per tant, són detectables per fluorescència, amb emissió a longituds d'ona en la zona del verd (521nm). Es van utilitzar en immunohistoquímica a una dilució d'entre 1:500 i 1:1000. Aquests anticossos van ser adquirits a la companyia Abcam (Cambridge, Regne Unit, Ref. Ab6896).

#### 4.1.- Obtenció del sèrum anti-CD1[26-8]

En una tesi realitzada al nostre laboratori es va utilitzar el sèrum anti-CD1-623 per a detectar proteïna HMGR en extractes d'*A. thaliana*, mitjançant assajos de Western Blot (Leivar, 2003). En aquest treball es va suggerir que el sèrum anti-CD1-623 no era totalment específic per HMGR, sinó que podria reconèixer altres proteïnes. Donat que la mostra utilitzada com a immunogen per a generar el sèrum anti-DC1 havia sigut expressada en *E.coli* i purificada a partir d'aquest bacteri, es va suggerir que la presència de proteïna contaminant d'*E. coli* en aquesta mostra podria ser la causa de la reacció creuada. En el present treball es pretenia utilitzar el sèrum anti-CD1-623 per immunolocalitzar HMGR en preparacions d'*A. thaliana*. En aquest tipus de tècnica no existeixen criteris addicionals com pot ser la migració electroforètica en el cas de Western, per distingir el senyal específic de l'inespecífic. Per això, es va considerar necessari eliminar en el possible totes les IgG que poguessin reconèixer proteïnes d'*E. coli*.

El primer pas per aquest propòsit fou l'obtenció d'una mostra idònia de proteïna d'*E. coli*. En aquesta preparació es va utilitzar la mateixa soca (BL21 [DE3]) i el mateix protocol que en el seu moment va permetre l'expressió i purificació de l'immunogen CD1 (Dale *et al.*, 1995), però ometent la cromatografia en columna d'afinitat *Affi-Gel Blue* que és l'últim pas del procés. Es va partir de 2 l de cultiu d'*E. coli* BL21[DE3] i es va obtenir una mostra de 5,5 ml a una concentració de 8,93 mg de proteïna per ml. L'extracte va ser finalment dialitzat en  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,30, que és el tampó d'equilibrat de la resina a la que es devia unir covalentment la proteïna (procés de *coupling* o acoblament).

Per a construir la resina d'immunosostracció es va utilitzar una columna d'1 ml *NHS-Activated HP* de la companyia Amersham-Pharmacia (Ref: 17-0716-01). Aquesta resina uneix de manera covalent la proteïna mitjançant els seus grups amino primaris. El procés d'acoblament va ser realitzat amb 1,05 ml d'extracte proteic (9,4 mg) seguint les instruccions de la casa comercial i en ell es va obtenir una eficiència de retenció del 75%, que suposa una càrrega de 7,0 mg de proteïna d'*E. coli* per ml de resina.

Per la immunosostracció la columna va ser equilibrada en PBSx1 (10 mM tris, 150 mM NaCl, pH 7,50). ES van carregar 1,5 ml de sèrum original anti-CD1-623, que van ser recuperats en un volum total de 4,5 ml, que suposa una dilució 1 a 3. La mostra recuperada contenia les IgGs no retingudes a la columna, és a dir, aquelles que no s'havien unit a cap proteïna d'*E. coli*.

## 5.- MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC

### 5.1.- Mètodes de treball en *Escherichia coli*

El manteniment i manipulació de les soques d'*Escherichia coli* es va fer segons els manuals de protocols Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1989) i Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 1989)

### 5.2.-Medis de cultiu de bacteris

Els medis de cultiu bacterians es van preparar amb aigua destil·lada i es van esterilitzar a l'autoclau durant 20 minuts a 120 °C. Els antibiòtics o suplementes requerits en cada ocasió es van afegir després d'atemperar el medi a 50 °C. Es van utilitzar els mateixos medis per cultiu líquid que per cultiu sòlid en placa de Petri, afegint per aquest últim cas agar al 1,5 %.

Generalment es va utilitzar medi LB pel creixement d'*E. coli*. El medi 2xTY, més ric, permetia un creixement més ràpid, mentre que el medi YEB es va utilitzar pel creixement d'*Agrobacterium tumefaciens*.

#### MEDI LB (1 litre):

NaCl.....0,5 %

Bactotripton.....1 %

Extracte de llevat.....0,5 %

#### MEDI 2xTY (1 litre):

Extracte de llevat.....1 %

NaCl.....1 %

KNO<sub>3</sub>.....5 mM

#### MEDI YEB (1 litre):

Extracte de llevat.....0,1 %

Extracte de bou.....0,5 %

Peptona.....0,5 %

Sacarosa.....0,5 %

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....0,05 %

Equilibrar a pH=7 amb NaOH

### 5.3.- Mètodes de treball en *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* es van cultivar en medi MS (Murashige and Skoog, 1962) sòlid o en terra, en càmeres de cultiu especials a una temperatura de 22-24 °C i una intensitat de llum de 100 µEinstein.

#### Creixement en terra:

Després de transferir plantes de medi MS a terra, es recobreixen amb Saran Wrap o similar per mantenir condicions d'humitat elevada durant tres o quatre dies. El substrat sòlid consta d'una mescla de perlita:vermiculita:turba a proporcions de 1:1:1 on s'hi afegeixen 2 g de  $K_2CO_3$ : $CaCO_3$ : $MgCO_3$  a proporcions de (7:4:5:2) per esmortir l'acidesa de la terra. La solució nutritiva de rec consta de  $KNO_3$  5 mM,  $KH_2PO_4$  2,5 mM pH 5,5,  $MgSO_4$  2 mM,  $Ca(NO_3)_2$  2mM, EDTA fèrric 50 µM,  $H_3BO_3$  70 µM,  $MnCl_2$  14 µM,  $CuSO_4$  0,5 µM,  $ZnSO_4$  1 µM,  $NaMoO_4$  0,2 µM, NaCl 10 µM,  $CoCl_2$  10 nM.

#### Creixement en condicions estèrils en medi sòlid:

Les llavors esterilitzades es sembren en medi MS en una cabina de flux laminar. La placa es segella amb un esparadrap transpirable (Leukopor). Les plaques es recobreixen amb paper d'alumini i es deixen dos dies a 4 °C (estratificació) per tal de sincronitzar el moment de germinació de les llavors. Posteriorment, es duen a les condicions de creixement.

Medi MS sòlid: - Murashige & Skoog (MS)....4.41 g/l  
- Tampó MES.....0.5 g/l

S'ajusta a pH 5.7 amb KOH  
S'afegeix agar (8 g/l) i s'esterilitza en autoclau 20 min a 121°C  
Es reparteix en plaques de petri.

- Segons les condicions suplementat amb:

Kanamicina 20µg/ml  
BASTA 5 µg/ml

Preparació de les solucions mare per la suplementació en el medi MS:

- Kanamicina 100 mg/ml. Es dissol la quantitat requerida pesada en  $H_2O$  desionitzada. Posteriorment, s'esterilitza mitjançant filtració a través de filtres de 0,2 µM de diàmetre de porus.

Es segueixen, essencialment, dos programes de desenvolupament:

- Dia curt: fotoperíode de 8 h de llum i 16 h de foscor. 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.

- Dia llarg: fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor. En aquestes condicions s'accelera l'entrada de la planta en la fase reproductiva.

### 5.3.1.- Esterilització de llavors d'*A. thaliana*

• Es submergeixen les llavors (50-100 mg en tubs de microcentrífuga) en solució d'esterilització durant 8 min en agitació orbital.

- Es renten durant 1-2 min amb etanol absolut; mantenint l'agitació orbital.
- Es repeteix aquest rentat.
- Es deixen eixugar de les restes d'etanol a la campana de flux laminar.
- Es guarden les llavors estèrils a 4 °C.

Solució d'esterilització:

- Bayrol GmbH 1,5 g en 40 ml d'aigua desionitzada estèril
- Es dilueix al 10% en etanol absolut

### 5.4.- Mètodes de treball amb cèl·lules CHO d'ovari de hámster

#### Transfeccions mitjançant fosfat de calci

- Les cèl·lules confluents al 90% es subcultiven en proporció 1:10 el dia previ a la transfecció.
- Substituir el medi de cada placa a transfectar el mateix dia de la transfecció.
- Quan les cèl·lules s'han enganxat a la placa poden ser transfectades.
- Afegir en un tub 0.5 ml de tampó 1X HBS i la quantitat necessària de DNA plasmídic a transfectar (generalment 30 µg totals) i mesclar.
- Afegir 30 µl de clorur de calci 2.5M a cada tub, mesclar immediatament i deixar incubar 20 minuts a temperatura ambient.

- Afegir la solució de DNA precipitat a la mostra de cèl·lules gota a gota, mentre amb una pipeta serològica es fan passar bombolles pel medi amb les cèl·lules.
- Deixar les cèl·lules al incubador amb 5% de diòxid de carboni.
- El dia següent a la transfecció canviar el medi per medi fresc.
- Per a fer transfeccions estables, fer un subcultiu i afegir la selecció adequada a les 48 hores.

Tampó 1X HBS:

- HEPES.....5 g/l
- NaCl.....8 g/l
- Dextrosa.....1 g/l
- KCl.....3.7 g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O)...10 ml de solució stock

## 6.- BIOLOGIA MOLECULAR I BIOQUÍMICA D'A. THALIANA

### 6.1.- Generació de plantes transgèniques d'A. thaliana

La generació de plantes transgèniques d'A. thaliana es va realitzar mitjançant infecció amb la soca GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*, utilitzant la tècnica d'infiltració anomenada *floral dip* (Clough and Bent, 1998).

#### 6.1.1.-Descripció del vector utilitzat per generar les plantes transgèniques.

Per generar plantes transgèniques es va utilitzar un únic vector, anomenat pPCV002. S'hi troba el marcador de selecció *hpt*, que confereix resistència a l'antibiòtic kanamicina, sota control de la regió promotora CaMV35S. Per la seva banda, dos promotors CaMV35S en tàndem permet l'expressió forta i constitutiva del cDNA clonat en el vector.

#### 6.1.2.- Transformació d'A. thaliana

Per la generació de plantes transgèniques d'A. thaliana es va seguir el mètode de *floral dip* (Clough and Bent, 1998). Aquesta tècnica es basa en la immersió de les plantes en una suspensió d'A. tumefaciens portadora de la construcció d'interès, amb la intenció d'infectar les cèl·lules germinals a partir de les quals es generen posteriorment llavors portadores del transgen. L'addició d'un agent tensioactiu a la solució bacteriana facilita el contacte entre aquesta solució i els teixits vegetals. L'estadi de desenvolupament de les plantes resulta fonamental pel rendiment del procés de transformació. És necessari que les plantes s'hagin desenvolupat suficientment com per resistir les lesions provocades pel procés d'infiltració. A més, s'ha d'escollir un moment de desenvolupament de la planta en el que abundin els botons florals, i d'aquesta manera augmentar el rendiment de la transformació.

#### Materials

- Llavors d'*Arabidopsis* Col 0 i Col 3.
- A. tumefaciens GV3101 portador del plasmidi pPCV002 contenint el transgen d'interès.
- Medi de cultiu YEB.

- Centrífuga *Beckman* J2-21 i rotor JA-10 (o equivalent).
- Rifampicina 50 mg/ml (solubilitzada amb DMSO), kanamicina 100 mg/ml, ampicilina 100mg/ml i higromicina (50 mg/ml).
- Medi MS.
- Sacarosa.
- Tensioactiu Silwet L-77 (*Osi Specialities*).
- Càmera de germinació y creixement.

### **Mètode**

1.- Sembrar llavors d'*Arabidopsis* en terra, i posar a germinar en condicions de dia curt. Es necessiten de 2-3 testos, amb unes 10 plantes per test, per cada construcció que es vulgui infiltrar.

2.- Mantenir les plantes en dia curt durant unes 5 setmanes, per tal que les plantes desenvolupin suficient roseta basal abans de la floració.

3.- Traspasar les plantes a condicions de dia llarg. A mesura que van apareixent les primeres tiges, es van podant des de la base, repetint la operació unes dues vegades amb un doble objectiu: Per una banda, estimular la formació de múltiples tiges laterals augmentant el número d'inflorescències susceptibles de ser posteriorment infectades per *Agrobacterium*; per una altra banda sincronitzar l'aparició de les tiges entre els diferents individus.

4.- En el moment en que les plantes han desenvolupat un número suficient d'inflorescències, unes 2-3 setmanes des de que van ser traslladades a dia llarg, estan en el moment òptim per a ser infiltrades. En aquest punt s'haurien d'eliminar les síliques que ja estiguin formades.

### **Creixement de l'*Agrobacterium***

1.- Sembrar una estria en una placa de medi YEB/agar (kanamicina 30 µg/ml-rifampicina 100 µg/ml-ampicilina 50 µg/ml) a partir d'un cultiu glicerinat congelat a -80 °C de la soca d'*A. tumefaciens* que porta el plasmidi Ti d'interès. Incubar la placa a 28 °C protegida de la llum (la rifampicina és fotosensible) fins obtenir colònies individuals.



2.- Inocular a partir d'una colònia un cultiu de 5 ml de medi YEB (kanamicina 30 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml i ampicilina 50 µg/ml). Créixer el cultiu en fosc durant 24 h a 28 °C i amb agitació suau (150 rpm).

3.- Inocular 1 ml del cultiu anterior en un matrau Erlenmeyer de 2 l amb 500 ml de medi YEB (kanamicina 30 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml i ampicilina 50 µg/ml). Créixer el durant 16-24 h amb agitació suau (150 rpm) a 28°C.

4.- Quan els cultius arriben a una  $DO_{600nm}$  de ~1, sedimentar les cèl·lules a 4000 rpm durant 15 min a 4 °C en el rotor JA-10 refredat.

5.- Resuspendre amb cura el sedimentat de cèl·lules obtingut en 150 ml d'una solució de sacarosa.

6.- Submergir les plantes durant 1 min en la suspensió bacteriana, a la que se li haurà afegit 45 µl de l'agent surfactant Silwett L-77, invertint-les i enrotllant suaument la part aerea.

7.- Col·locar les plantes tombades sobre paper de filtre en una safata i deixar en condicions de dia llarg (si pot ser amb intensitat de llum reduïda) fins que al cap de 2-3 dies es comencin a recuperar. Es tornen a col·locar els testos drets, deixant que les plantes completin el seu desenvolupament fins a formar llavors.

#### **Selecció de transformants:**

Del total de llavors obtingudes a la generació  $T_1$ , només unes poques hauran incorporat el transgen. Per seleccionar-les, es va utilitzar el marcador de selecció al transgen present en la regió del T-DNA.

1.-Esterilitzar les llavors de la generació  $T_1$  tal com es descriu a l'apartat 5.3.1.

2.-Sembrar en plaques que continguin medi de germinació suplementat amb higromicina 30 µg/ml.

3.-Al cap de 15-20 dies observar la presència de plantes resistents que seran capaces de desenvolupar fulles vertaderes.

4.- Transferir els individus resistents a terra per tal que completin el seu cicle biològic, autofecundant-se i produint llavors. Així s'obté la generació T<sub>2</sub>.

5.- Sobre la T<sub>2</sub> es pot analitzar el número de còpies del T-DNA que s'han incorporat al genoma. Per fer-ho, s'estudia el caràcter resistència en plaques suplementades amb higromicina. Les segregants que segueixin una proporció mendeliana 1:3 (sensibles:resistents) presentaran al marcador de resistència ocupant un únic locus en el genoma de la planta.

6.- Entre 5-10 individus amb les característiques descrites anteriorment es van traslladar de nou a terra completant el cicle biològic. Per tal de seleccionar les línees genèticament uniformes en quant al caràcter de resistència a higromicina, s'ha de confirmar que totes les llavors descendents, generació T<sub>3</sub>, siguin resistents a l'antibiòtic. Algunes d'aquestes línees es van portar a homozigosi. L'objectiu era poder prescindir de l'antibiòtic en estudis ulteriors.

## 6.2.- Extracció de DNA genòmic

Es pren la massa d'una mostra de la planta a analitzar (2-50 mg) en un tub d'1,5 ml prèviament tarat i es congela en N<sub>2</sub> (l). En presència de N<sub>2</sub> (l) s'homogeneïtza la mostra fins obtenir una fina pols i s'afegeix NaOH 0,5 M a una proporció de 10 µl/mg teixit. Es neutralitza la solució afegint 490 µl de tampó d'elució (TE) per cada 10 µl de l'homogenat. Es guarda a -20 °C o es procedeix a l'anàlisi per la PCR en què s'utilitzen habitualment 2 µl de DNA motlle. El producte de PCR (15 µl) s'analitza per electroforesis en gel d'agarosa a l'1,5%.

•Reacció de PCR	•Cicles de PCR
DNA motlle.....2 µl	Desnaturalització: 5 min, 95°C
Tampó de PCR 10X.....2 µl	5 min, 72°C
MgCl <sub>2</sub> 50 mM.....0,8 µl	30 cicles: 1 min, 95°C
Mescla de dNTPs (10 mM cadascun)....0,8 µl	1 min, temperatura d'hibridació .
Encebador antisentit 10 µM.....0,8 µl	2 min/kb * kb fragment, 72°C
Encebador sentit 10 µM.....0,8 µl	Extensió final: 6 min, 72°C
DNA polimerasa termostable.....0,4 µl	
H <sub>2</sub> O lliure de nucleases.....fins a 20 µl	

La temperatura d'hibridació que s'aplica és la temperatura de fusió de l'encebador que la té inferior menys 5 °C

Tampó TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM

## 7.-TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 7.1.-Tecnologia del DNA recombinant

Sota aquest epígraf s'engloben les tècniques utilitzades pel clonatge de seqüències de DNA descrites de manera general:

En primer lloc, i pel que es refereix a la minipreparació de DNA plasmídic s'ha utilitzat el sistema *QIAPREP spin miniprep kit* de Qiagen. Les digestions amb enzims de restricció del DNA es van portar a terme amb 2,5-5 unitats de cada enzim de restricció sota les condicions de salinitat, pH i temperatures recomanades pel fabricant en cada cas, i perllongant la incubació fins a 16 h quan es tractava d'una digestió preparativa o un enzim de baixa activitat específica. Els productes de digestió (o si escau els resultants de la reacció de PCR) es van resoldre en gels d'agarosa de percentatge adequat a la grandària del fragment o fragments a analitzar, preparats en tampó TAE 1x i contenint 0,5 µg/ml de Br-Et. Les bandes d'interès es van recuperar curosament evitant perllongar la irradiació amb la llum d'UV, i es van purificar mitjançant el sistema *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Una nova separació electroforètica en presència de marcadors de grandària i concentració coneguda van permetre comprovar i quantificar els fragments recuperats. Es van ajustar les quantitats de vector i insert en la reacció de lligació per a cada tipus de clonatge. Els productes de lligació així obtinguts van ser emprats per transformar cèl·lules bacterianes competents mitjançant xoc tèrmic (*Subcloning Efficiency DH5α Chemically Competent E. coli* de Life Technologies). L'anàlisi de les colònies resultants es va portar a terme en primer lloc mitjançant escrutini per PCR, seguit d'amplificació de la colònia candidata mitjançant cultiu en 3 ml de medi de creixement bacterià suplementat amb els antibiòtics de selecció i altres suplementes en funció de cada cas. L'estudi del patró de restricció del DNA recuperat i la seva posterior seqüenciació van permetre confirmar la integritat/identitat del clon generat. Finalment, el sediment de 1,5 ml de cultiu del clon en qüestió va ser resuspès en 500 µl de medi suplementat amb glicerol al 15 % prèviament esterilitzat a l'autoclau per a preparar els glicerinat a -80 °C.

## 7.2.- Preparació de cèl·lules competents

El següent protocol permet obtenir ràpidament cèl·lules competents de xoc tèrmic amb una eficiència de transformació òptima per a DNA plasmídic. S'ha utilitzat per tal d'obtenir cèl·lules competents de les soques DH5a i BL21 d'*E. coli*.

### Preparació ràpida de cèl·lules competents d'*E. coli*

#### Materials:

- Centrífuga *Beckman* J2-21 i rotor JA-10 (o equivalent).
- Placa de cultiu amb colònies aïllades de la soca d'interès d'*E. coli*.
- DNA de la construcció d'interès (apartat 5.1.1).
- Medi 2xTY.
- Cloramfenicol 34 mg/ml, kanamicina 100 mg/ml i ampicilina 100 mg/ml en solució aquosa.
- Solució Tfb I.
- Solució Tfb II.
- Nitrogen líquid.

#### Mètode:

1.-Inocular un precultiu de 3 ml de medi 2xTY amb l'antibiòtic(s) adequat(s) a partir d'una colònia aïllada de la soca desitjada d'*E. coli* i incubar en agitació a 220-240 rpm i 37 °C o/n.

2.-Inocular 300 ml de 2xTY contenint l'antibiòtic(s) adequat(s) amb 3 ml del precultiu anterior. Incubar en agitació a 220-240 rpm y 37°C fins a obtenir una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,5. Normalment, i si el precultiu original no estava excessivament saturat, el cultiu tarda unes 2 h en assolir la DO desitjada.

3.-Centrifugar les cèl·lules durant 15 min a 4.000 rpm i 4 °C en un rotor JA-10 pretemperat a 4 °C. A partir d'aquest pas les cèl·lules es van mantenir en gel, extremant les precaucions al manipular-les per tal d'evitar lisar-les mecànicament.

4.-Resuspendre suaument el sediment en 7,5 ml de solució TfbI prèviament atemperada a 4°C. Transferir a un tub Beckman de 30 ml.

5.-Centrifugar durant 5 min a 5.000 rpm i 4°C en el rotor JA-17 pretemperat a 4°C.

6.-Resuspendre suaument el sediment en 2 ml de solució TfbII.

7.-Distribuir les cèl·lules en alíquotes de 50 µl. Congelar-les en nitrogen líquid i guardar-les a -80°C.

SOLUCIÓ Tfb I:

Acetat potàssic.....40 %  
MnCl<sub>2</sub>.....50mM  
RbCl.....100mM  
CaCl<sub>2</sub>.....10mM  
Glicerol.....15%  
Ajustar el pH a 5,8 amb Àcid acètic (2N).

Esterilitzar a l'autoclau.

SOLUCIÓ Tfb II:

MOPS.....10 mM  
RbCl.....100 mM  
CaCl<sub>2</sub>.....75 mM  
Glicerol.....15%  
Ajustar el pH a 6,5 amb NaOH.

Esterilitzar a l'autoclau.

### 7.3.- Anàlisi de proteïnes mitjançant Western-blot

#### Anticossos utilitzats

S'han utilitzat els següents anticossos per a la detecció d'HMGR en Western Blot

-Anti-CD1-623: Sèrum cru provinent d'immunització de conills amb el domini catalític d'HMGR1

-Anti-CD1[26-8]: immunosostracció del sèrum anti-CD1-623.

#### SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència d' SDS (*SDS-PAGE*), permet la separació efectiva i senzilla de les proteïnes d'una mostra. La porositat del gel, les propietats del tampó de migració i els paràmetres de l'electroforesi permet afinar les condicions per tal de millorar la resolució.

#### Materials

- Font d'electroforesi.
- Equip d'electroforesis "*Mini-Protean*" II (BioRad).
- Tampó de migració.
- Tampó de desnaturalització.
- Isopropanol.
- Marcador de pesos moleculars per proteïnes: *Prestained SDS-PAGE Standards-Low Range* , BioRad.
- Acrilamida/N,N'-metilen-bis-acrilamida 30 %.
- Tris-HCl 0,5 M pH=6,8 i Tris-HCl 1,5 M pH=8,8
- Persulfat amònic.
- TEMED.
- Metanol.
- Membranes de PVDF (*Hybond-P*, Amersham-Pharmacia Biotech).

- Paper *Whatmann 3MM*.
- Sistema de transferència proteica sobre membranes de PVDF (*Mini Trans-Blot, BioRad*).
- Solució de Zeller.
- Tampó de transferència.
- Solució de tinció i destinció.
- Agitador orbital.
- Anticossos anti-IgG de conill units a peroxidasa de rave (HRP) (*GE Healthcare*).
- Sistema de detecció quimioluminiscent per antígens conjugats a la HRP i immobilitzats sobre membranes de PVDF (*ECL+Plus Western blotting detection system, GE Healthcare*).

## **Mètode**

### ***SDS-PAGE***

1.- Muntar el sistema de preparació de gels. Afegir H<sub>2</sub>O uns minuts abans d'abocar el gel separador per a confirmar que l'acoblament dels vidres deixa un compartiment completament estanc. Retirar l'aigua i assecar amb paper de filtre abans d'abocar el gel separador fins a una alçada de 5 cm. Afegir unes gotes d'isopropanol de manera que cobreixi la superfície exposada a l'oxigen atmosfèric, que inhibiria la polimerització. Deixar polimeritzar el gel uns 20-30 min. No perllongar aquest pas més d'una hora doncs l'alcohol provocaria la deshidratació del gel.

2.- Eliminar l' isopropanol i netejar la superfície del gel amb H<sub>2</sub>O. Afegir el gel apilador fins a l'extrem superior dels vidres, i encaixar immediatament la pinta corresponent amb el nombre de pouets adequat al nombre i volum de les mostres que es vulguin carregar. Tot i que transcorreguts uns 20-30 min s'ha completat la polimerització, no és fins a unes 2 hores més tard quan està assegurada l'homogeneïtat del porus del gel. Marcar amb un retolador la base dels pouets per a poder visualitzar-los en el moment de carregar les mostres. S'han utilitzat generalment vidres de 0,75 mm d'espessor i de 8 cm d'alt x 10 cm d'ample. 7 ml de gel separador i 4 de gel apilador són suficients per preparar 2 gels d'aquestes dimensions.

3.- Situar el gel en el suport corresponent i aquest al seu torn en la cubeta d'electroforesi. Afegir tampó d'electroforesi 1x fins a sobrepassar els pouets.

4.- Preparar les mostres preparades i quantificades segons es descriu en l'apartat 4.4. Afegir el volum adequat de tampó de mostra. Desnaturalitzar bullint 5 min a 100 °C, practicant un forat en el tap del tub, fer un pols de centrifuga i passar a gel.

5.- A continuació, carregar les mostres amb ajuda d'una micropipeta o una pipeta Hamilton, deixant els carrils necessaris per a carregar el volum oportú de marcador. Es van analitzar quantitats d'entre 5-20 µg de proteïna.

6.- Aplicar el voltatge apropiat per a la separació de les proteïnes contingudes en la mostra. Es van fixar amperatges de 20-40 mA, segons el nombre de gels que s'estiguessin utilitzant simultàniament en el sistema (1 o 2). Una vegada el front de migració, marcat pel colorant del tampó de mostra, ha arribat a l'extrem inferior del gel, interrompre l'electroforesi.

TAMPÓ d'ELECTROFORESI 10X:

Trizma Base.....0,25 M  
Tris-HCl pH 6,8.....100 mM  
Glicina.....1,92 M  
SDS.....1 %  
H<sub>2</sub>O  
destil·lada.....q.s.p.

SDS.....8 %  
β-mercaptoetanol.....4 %  
Azul de bromofenol.....0,02 %  
H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....10 ml

TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8:

Trizma Base.....60,5 g  
H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....1 l  
Ajustar el pH a 6,8 amb HCl.

TRIS 1,5 M pH 8,8:

Trizma Base.....181,5 g  
H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....1 l  
Ajustar el pH a 8,8 amb HCl.

TAMPÓ de MOSTRA 4x:

Tris-HCl pH 6,8.....250 mM  
Glicerol.....40 %

GEL SEPARADOR:

Tris 1,5 M pH 8,8.....1,75 ml  
Acrilamida/Bisacrilamida 40 %.....1,75 ml  
SDS 10 % (p/v).....70 µl  
PSA 10 % (p/v).....42 µl  
TEMED.....5 µl  
H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....7 ml



GEL APILADOR:

Tris 0,5 M pH 6,8.....	0,5 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 40 %.....	0,39 ml
SDS 10 % (p/v).....	40 µl
PSA 10 % (p/v).....	52,5 µl
TEMED.....	3 µl
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p.....	4 ml

L'acrilamida es neurotòxica, i és per això que s'ha d'utilitzar sempre amb guants.

El persulfat d'amoni (PSA) es prepara al moment en H<sub>2</sub>O, o bé es fan alíquotes i es congela a -20 °C.

### Transferència i immunodetecció quimioluminiscent

La tècnica de *western-blot* permet detectar la proteïna a estudi en els diferents extractes de proteïna resolts mitjançant *SDS-PAGE*, utilitzant anticossos específicament dirigits contra ella. Per fer-ho, es transfereix la proteïna del gel a membranes de PVDF. La membrana es deixa llavors reaccionar amb l'anticòs primari (apartat 5.3.1.). La posterior incubació de la membrana amb anticossos secundaris anti-IgG acoblats a la peroxidasa de rave permet la detecció quimioluminiscent de la proteïna a estudi.

7.- Recuperar el gel i rentar en solució de transferència uns 10 min. Descartar el gel apilador amb ajuda d'un bisturí.

8.- Submergir en metanol absolut durant 10 seg un fragment de membrana de PVDF de grandària igual al gel separador. Eliminar el metanol sobrant rentant amb aigua durant 5 min i finalment mantenir-la en solució de transferència fins que l'equip estigui ensamblat. Aquests passos es fan en una placa de Petri, mantenint agitació constant.

9.- Realitzar la transferència utilitzant el sistema de *BioRad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*. El sistema consta d'un casset on es manté la membrana íntimament en contacte amb el gel recobrint el conjunt per ambdós costats amb 3 fulles de paper Whatmann 3MM i una esponja. Una armadura dissenyada a aquest efecte manté fins a dos d'aquets cassets entre elèctrodes paral·lels, que seran els que promouran la transferència. Aquesta armadura s'encaixa en una cubeta, on s'afegirà una peça de gel que evitarà l'excessiva pujada de temperatura que té lloc durant el procés de transferència com a conseqüència dels voltatges aplicats. A l'hora de posar en contacte el gel i la membrana s'ha d'evitar, en tant que sigui, possible la formació de bombolles d'aire que interfereixin en el procés de transferència de les proteïnes, o eliminar les que s'haguessin generat valent-se per a això d'una pipeta.

10. -El procés de transferència es perllonga durant almenys 1 hora (en el cas de gels de 1,5 mm d'espessor mitja hora més) aplicant un voltatge constant de 100 V. Per a mantenir la temperatura del sistema homogènia es manté la solució de transferència en constant agitació tot el procés, a més de portar-se a terme a 4 °C .

11.- Transcorregut aquest temps es recupera la membrana. Un tall en una cantonada serveix d'ajuda per a orientar posteriorment la cara de la membrana que ha estat en contacte amb el gel durant la transferència i poder identificar així les bandes detectades.

12.- Realitzar un rentat de 5-10 min amb PBS 1x pH=7,6 amb l'objecte d'eliminar restes d'acrilamida que puguin haver quedat adherits a la membrana.

13.- Rentar la membrana amb solució de Zeller dues vegades durant 5 min. En aquest pas es persegueix el bloqueig dels possibles llocs d'unió inespecífics de l'anticòs primari a la membrana. Encara que el protocol convencional refereix la utilització de llet en pols desnatada al 5 % i Tween 20 al 0,1 % (v/v) en PBS 1x, els resultats obtinguts amb la solució de Zeller van ser més satisfactoris.

14.- Incubar la membrana durant tota una nit a 4 °C amb la dilució adequada d'anticòs primari en solució de Zeller. Es van utilitzar les següents dilucions:

-Anti-CD1-623: 1/10000.

-Anti-CD1[26-8]: 1/1000.

15.- Rentar de nou la membrana amb solució de Zeller durant dos períodes de 5 minuts a temperatura ambient.

16.- Incubar la membrana amb solució de Zeller contenint la dilució adequada d'anticòs secundari. Es van utilitzar anticossos anti-IgG de conill units a la peroxidasa de rave a una dilució de 1/7500.

17.- Realitzar un últim rentat de la membrana amb solució de Zeller durant 5 min.

18.- Realitzar tres rentats amb PBS pH 7,6 de 5 min cadascun.

19.- Dur a terme un últim rentat en aigua uns altres 5 min.

20.- Pel procés de detecció incubar la membrana durant 5 min protegida de la llum en un volum suficient dels reactius del sistema de detecció (*ECL+Plus*), preparats segons les proporcions descrites pel proveïdor. Transcorregut aquest temps, eliminar l'excés de reactiu amb l'ajuda de paper assecant.

21.- A continuació, visualitzar la quimiluminiscència amb l'aparell "LAS-3000 luminescent image analyser" (Fujifilm) a diferents temps (normalment entre uns pocs segons i 30 minuts com a màxim), fins a obtenir una resolució i contrast òptims de la imatge. Cal considerar que el substrat quimiluminiscent de la peroxidasa present en la solució de detecció té una estabilitat de al voltant d'una hora.

SOLUCIÓ de TRANSFERÈNCIA:

Trizma Base.....3 g  
 Glicina.....14 g  
 Metanol (opcional).....200 ml  
 H<sub>2</sub>O destil·lada q.s.p.....1 l

PBS 10x pH 7,6

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,8 M  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,2 M  
 NaCl.....0,1 M

SOLUCIÓ de ZELLER:

Tris-HCl pH 7,3.....100 mM  
 MgCl<sub>2</sub>.....100 mM  
 Tween-20.....0,5 %  
 Tritó X-100.....1 %  
 BSA (Albúmina Sèrica Bovina).....1 %  
 FCS (Sèrum Fetal Boví).....5 %  
 Aliquotar i conservar a -20°C.

**Tinció de proteïnes**

La tinció del gel i de la membrana resulta de gran ajuda a l'hora de visualitzar l'eficiència de la transferència, la integritat de la proteïna, així com la normalització en la càrrega entre els diferents carrils. Dues són les solucions de tinció més comunament usades. La primera, basada en el blau de Coomassie, resulta en una tinció més intensa, però té l'inconvenient de resultar irreversible. La segona, amb vermell Ponceau S, és més feble, però fàcilment eliminable amb aigua.

1.-Col·locar la membrana en solució de tinció (solució de Coomassie o solució de Ponceau S) durant 5-10 min a temperatura ambient i amb agitació.

2.-Destenyir la membrana en aigua durant uns min (per a solució de vermell Ponceau S) o en solució de destinció (solució de blau de Coomassie), reemplaçant el líquid de rentat corresponent quantes vegades sigui necessari fins que la relació entre la intensitat de les bandes i el soroll de fons resulti òptima.

3.-Perllongant el rentat amb aigua de les membranes tenyides amb vermell de Ponceau S s'aconsegueix eliminar el colorant lligat a la proteïna, el que haurà de considerar-se si es desitja fotografiar la membrana.

SOLUCIÓ de PONCEAU S:

Vermell Ponceau S.....0,5 g  
Àcid acètic glacial.....1 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p.....100 ml

SOLUCIÓ de COOMASSIE:

Blau brillant de Coomassie.....0,6 %  
Metanol.....100 ml  
Àcid acètic glacial.....25 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p.....250 ml

SOLUCIÓ de DESTINCIÓ:

Àcid acètic glacial.....10 %  
Metanol.....40 %

**Regeneració de la membrana**

Després de la detecció, la membrana pot sotmetre's a un procés de rentat del sèrum unit a fi de repetir la immunodetecció en diferents condicions o utilitzant altres anticossos. El següent procediment permet portar a terme, de manera senzilla, aquest propòsit:

1.-Incubar la membrana en un tub d'hibridació amb solució S durant 30 min a 50°C. Es pot utilitzar un forn d'hibridació giratori.

2.- Recuperar la membrana i rentar durant 2 etapes d'uns 10 min en abundant PBS 1x a pH=7,6.

3- Finalment continuar amb el procés d'immunodetecció descrit pel pas 13 .

#### SOLUCIÓ S

Tris-HCl pH=6,7.....62,5 mM  
 β-mercaptoetanol.....100 mM  
 SDS.....2 %  
 Preparar en el moment de fer-la servir.

### **7.4.-Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Per tal d'amplificar fragments de DNA s'ha utilitzat la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* o *PCR*) (Saiki *et al.*, 1988), fent servir oligonucleòtids específics i cDNA, DNA genòmic o DNA plasmídic com a motlle.

La seva base teòrica es troba descrita en tots els manuals de Biologia Molecular (Sambrook and Russell, 2001).

Per amplificar els fragments de DNA d'interès, es van utilitzar enzims DNA polimerasa termoestables comercials. Així doncs, per tal de confirmar la presència d'un fragment de DNA determinat es va utilitzar l'enzim *Go Taq Polymerase (Promega)*. Tot i que aquesta DNA polimerasa presenta una baixa taxa d'error (*HF, High Fidelity*), quan es va pretendre minimitzar l'aparició de mutacions en els fragments de DNA amplificats es va utilitzar la DNA polimerasa *Pfu DNA Polymerase (Promega)* que es caracteritza per una major *HF*.

#### **Materials:**

- Termociclador (model "*Mastercycler personal*", *Eppendorf*).
- GoTaq®Green Master Mix, 2x (Promega) (o altres Taq DNA polimerases) o Pfu DNA polimerasa (DNA polimerases termostables) i els seus tampons de reacció corresponents.
- Barreja de dNTPs a 2,5 y 10 mM.
- Tubs de paret fina de 0,2 o 0,5 ml.
- Oligonucleòtids a 5-10 μM.

## Mètode

La tècnica de *PCR* ha estat utilitzada per a multitud d'aplicacions al llarg d'aquest treball. Cada una d'elles contempla variacions específiques. Aquestes, comprenen des de l'elecció de la DNA polimerasa adequada, fins a la utilització del programa de PCR que es durà a terme en el termociclador. En aquest últim cas, hi ha diverses condicions que s'ajusten en cada cas.

Així doncs, en l'anellament, pas on els oligonucleòtid s'uneixen de forma específica a la seva cadena complementaria, la temperatura s'ha ajustat en cada cas depenent dels oligonucleòtids utilitzats. S'ha utilitzat una temperatura d'uns 5 °C inferior a la temperatura de fusió ( $T_m$ ) dels oligonucleòtids, que és la temperatura en la qual el 50% d'aquests estaran units a la seva cadena complementaria. Per tal de calcular la  $T_m$  dels oligonucleòtids utilitzats, s'ha considerat l'aproximació donada per la fórmula següent:

$$T_m = [4 \times \text{nombre de (C+G)}] + [2 \times \text{nombre de (A+T)}]$$

El temps d'extensió també es va ajustar depenent del tamany del fragment de DNA que es pretenia amplificar, i de la velocitat de la polimerasa utilitzada. La Taq polimerasa amplifica a una velocitat de 1Kb/min i la Pfu polimerasa a 0,5 Kb/min.

### Clonatge de cDNA:

Una de les aplicacions més interessants de la tècnica de *PCR* és la d'amplificar fragments de DNA a partir de motlles diversos. Es descriu com a exemple l'estratègia experimental abordada amb l'objecte de clonar cDNA i que ha estat molt utilitzada al llarg d'aquest treball.

#### REACCIÓ:

Motlle\* .....cDNA  
 dNTP.....0,2 mM  
 Tampó d'activitat.....1x  
 Oligonucleòtid sentit.....0,5 mM  
 Oligonucleòtid antisentit.....0,5 mM  
 Pfu DNA polimerasa.....1,25 u  
 H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada q.s.p.....fins a 20 µl

#### PROGRAMA PCR:

"Hot start"\*\*\*  
 Desnaturalització.....30 seg/94°C  
 Anellament.....30 seg/Temperatura anellament  
 Extensió.....temps d'extensió/72°C  
 Repetir 24xcicles.  
 Extensió final (només Taq).....6 min/72°C

\*Com a motlle es va utilitzar l'1-2 µgrs de cDNA d'*Arabidopsis*, obtingut de l'òrgan i estadi del desenvolupament adequat a l'expressió del gen d'interès, i utilitzant la tècnica de *RT-PCR* (apartat 5.5.2).

\*\*La tècnica de "*Hot start*" consisteix en afegir l'enzim DNA polimerasa en el moment que el termociclador ha arribat a 95°C, reduint la generació de productes inespecífics resultants de la hibridació dels cebadors a motlles no homòlegs que pot tenir lloc a baixes temperatures.

Una segona etapa de PCR, a partir de 0,5 µl del producte anterior sota les mateixes condicions durant 15 cicles i en un volum final de 50 µl, va permetre en aquells casos més problemàtics, rescatar el producte desitjat, que va ser posteriorment purificat del gel d'agarosa i finalment clonat en el vector d'interès.

### Escrutini de colònies

La tècnica de PCR s'ha utilitzat també per a determinar la presència d'un insert directament a partir de la colònia bacteriana resultant d'una transformació. Per a això, és suficient utilitzar com a motlle de la reacció de PCR següent una punta de pipeta posada en contacte amb la colònia que es vulgui analitzar.

#### REACCIÓ:

Motlle .....colònia bacteriana  
 Oligonucleòtid sentit.....0,5-1 µM  
 Oligonucleòtid antisentit.....0,5-1 µM  
*Green Taq Master Mix (Promega)*.....1X  
 H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada c.s.p.....fins a 10 µl

#### PROGRAMA PCR:

Desnaturalització.....3 min/95°C  
 Desnaturalització.....30 seg-1 min/94°C  
 Anellament.....30 seg-1min/Temp. anellament  
 Extensió.....30 seg-1min/72°C  
 Repetir 35xcicles desde el pas 2  
 Extensió final.....6 min/72°C

### Anàlisi de línees transgèniques

Partint de DNA preparat segons es descriu en l'apartat 6.2. (minipreparació de DNA genòmic) i seguint el següent protocol de *PCR* es va verificar de forma senzilla la presència del transgen en les plantes estudiades.

#### REACCIÓ:

Motlle .....50 ngr DNA  
 Oligonucleòtid sentit.....0,5-1 µM  
 Oligonucleòtid antisentit.....0,5-1 µM  
*Green Taq Master Mix (Promega)*.....1X  
 H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada q.s.p.....fins a 10 µl

#### PROGRAMA PCR:

Desnaturalització.....5 min/95°C  
 Desnaturalització ..... 1 min/94°C  
 Anellament.....1 min/Temp. anellament  
 Extensió.....1-2 min/72°C  
 Repetir 29xcicles des del pas 2  
 Extensió final.....6 min/72°C



## 8.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR

### 8.1.- Microbombardeig de ceba i de fulles d'*Arabidopsis thaliana*

#### 8.1.1.- Preparació de les micropartícules

S'utilitzen partícules de tungstè (M17, d'1 µm de diàmetre).

Procediment:

1. Es pesen 60 mg de micropartícules de tungstè en un microtub d'1,5 ml i s'afegeix 1 ml d'etanol al 70%. S'agita amb vòrtex durant 5 min.
2. Es deixen sedimentar les partícules durant 15 min a temperatura ambient.
3. Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.
4. S'addiciona 1 ml d'H<sub>2</sub>O estèril i s'agita amb vòrtex durant 5 min.
5. Es deixen sedimentar les partícules 1 min.
6. Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.
7. Es repeteixen dos cops més els passos 4, 5 i 6.
8. S'afegeix 1 ml de glicerol al 50% estèril i s'agita amb vòrtex durant 1 min. La suspensió de micropartícules (60 mg/ml) es pot guardar a -20 °C.

#### 8.1.2.- Precipitació del DNA sobre les micropartícules

Es preparen les micropartícules per dos bombardeigs, que són els realitzats habitualment sobre cada mostra:

- Es manté la suspensió de micropartícules en agitació durant 5 min per tal que es resuspenguin.
- Es transfereixen 20 µl de micropartícules (1200 µg) a un microtub d'1,5 ml.
- Mantenint l'agitació del microtub, s'afegeix:
  - 2 µg de DNA plasmídic
  - 28 µl de solució de precipitació (20 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M i 8 µl d'espermidina 0,1 M)
- Es segueix agitant durant 5 min més.
- Es deixen sedimentar les partícules durant 1 min.
- Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.

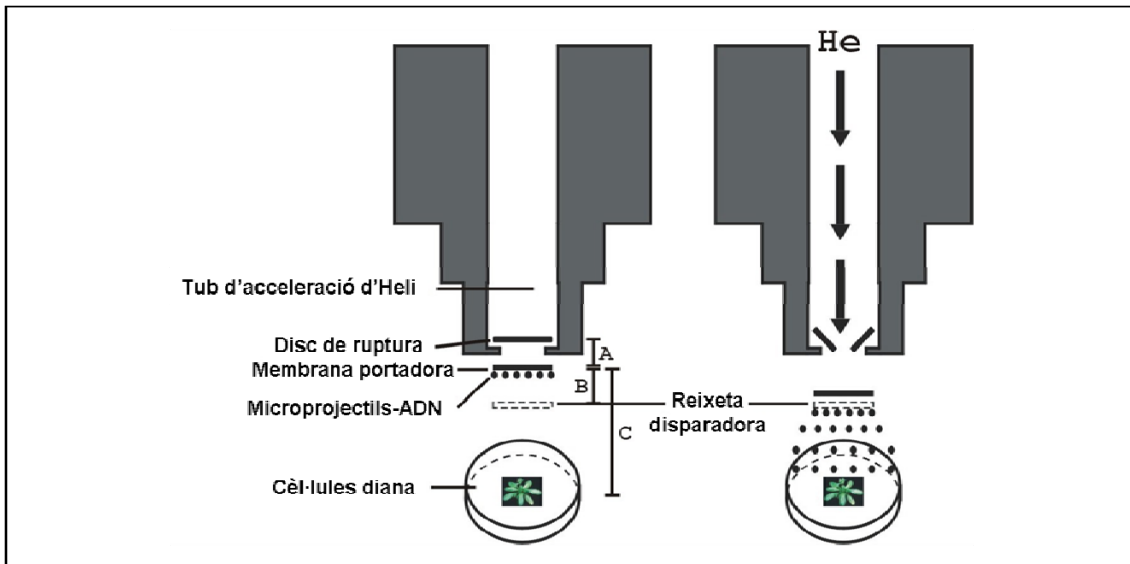
- Es renta el sediment amb 200 µl d'etanol al 70%, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. Es retira el sobrenedant.
- Es renta el sediment amb 200 µl d'etanol absolut, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. S'elimina el sobrenedant.
- Es resuspèn amb 16 µl d'etanol absolut amb l'ajut d'una micropipeta.

### 8.1.3.- Bombardeig de les micropartícules

Procediment:

- S'esterilitzen les membranes portadores, els discs de ruptura i les reixetes d'aturada amb etanol absolut, i es deixen eixugar.
- Es dipositen els 16 µl de micropartícules recobertes de la mostra de DNA que es vol transformar sobre una membrana portadora esterilitzada.
- Mentre s'evapora l'etanol de la mostra, s'ajusta el regulador de la bombona d'He a una pressió de 1100 psi.
- Es situa la reixeta d'aturada en el seu suport.
- S'ajusta la membrana portadora (amb el DNA orientat cap a la reixeta d'aturada) en el suport metàl·lic.
- S'ajusta el disc de ruptura de 900 psi, prèviament esterilitzat amb isopropanol, a la finalització del tub d'acceleració d'He.
- Es situa el muntatge que inclou la membrana portadora i la reixeta d'aturada en el nivell 5 (el més proper al disc de ruptura).
- Es situa la mostra a bombardejar en el nivell 2. Les fulles d'*A. thaliana* 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.
- Es tanca la cambra de bombardeig i s'activa el buit fins que la pressió arribi a 0,06 atm (27-29 mm Hg)
- Mantinent les condicions de buit, s'acciona el disparador fins que el disc de ruptura es trenca (900 psi)
- Es desactiva el buit, es retira la mostra i s'incuba 18 h sota llum contínua a una temperatura de 22-23 °C.

En el tractament amb cantaridina, les fulles s'incuben en agar suplementat amb cantaridina 10  $\mu$ M i s'incuben 18 h sota llum contínua a una temperatura de 22-23  $^{\circ}$ C fins al moment de preparació de les mostres.



**Figura 2:** Representació esquemàtica del sistema de microbombardeig, abans i després d'aplicar la pressió d'heli.

#### 8.1.4.- Preparació de la mostra

Es col·loca la mostra damunt el portaobjectes amb la cara que ha rebut els impactes de les micropartícules cap amunt. S'hi afegeixen unes gotes d'aigua i es col·loca el cubreobjectes de tal manera que la mostra vegetal quedi coberta d'aigua evitant la presència de bombolles. Es segella el cubreobjectes amb parafina líquida, i un cop solidificada es pot procedir a l'observació.

## 8.2.- Microscòpia làser confocal

Per a la detecció de proteïnes fluorescents i/o d'anticossos marcats amb fluoròfor, es van utilitzar els següents microscopis confocals als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona:

- Microscopi Confocal Espectral **Leica TCS-SPE**: Microscopi Manual Invertit. Làsers: 488 (per detectar fluorocroms que emeten en verd), 532 (per detectar fluorocroms que emeten en groc-taronja), 635 (per detectar fluorocroms que emeten en vermell llunyà). Objectius disponibles en el microscopi: 10, 20 i 40 secs i, 40 i 63 d'immersió en oli. Modes d'escombratge: XY, XZ, XT, XYZ, XYT, XZT, XYZT i XY-lambda.
- Microscopi confocal amb detecció espectral **Leica SP11**: excitació UV i tot el rang del visible. Sistema amb detecció de fluorescència selectiva des de 400 fins a 800 nm. Quatre canals per fluorescència més un canal per contrast de fases i DIC. Sistema automatitzat en totes les direccions, adquisició en temps real, estudis en 4D, cambra climàtica amb control de temperatura i CO<sub>2</sub>; sistema de microinjecció aplicat a la microscòpia.

## 8.3.- Immunolocalització *in-situ*

Es parteix de plàntules de 6 dies després de la germinació, en estadi de cotiledons. En aquest estadi trobem una bona expressió de la proteïna HMGR i per tant és ideal per a la seva immunolocalització.

- Extreure amb cura les plàntules de l'agar on han estat creixent i passar entre 5 i 15 a un tub Eppendorf.
- Afegir la solució de fixació (paraformaldehid 4%) i procedir a fer el buit dins una càmera adient durant una hora a temperatura ambient.
- Fer dos rentats de 10 minuts amb 1x PBS.
- Fer tres incubacions a 37 °C amb metanol. Fer incubacions extres si la clorofil·la no ha desaparegut completament.
- Fer tres incubacions amb etanol/xilol (1:1) a 37 °C.
- Fer tres incubacions amb 98% xilol a 37 °C.
- Fer dos incubacions amb etanol/xilol (1:1) a temperatura ambient.

- Fer incubacions amb una sèrie d'alcohols durant 5 minuts cada una en el següent ordre: etanol 99%, 90%, 75%, 50%, 25%.
- Fer dos rentats amb aigua a temperatura ambient durant 5 minuts.
- Transferir les plàntules amb una gota d'aigua a portaobjectes. Es poden afegir de 2 a 5 plantes per portaobjectes.
- Afegir un cubreobjectes aplicant una certa pressió sobre la mostra.
- Transferir durant 10 segons cada mostra a nitrogen líquid o fins que es congeli. Repetir aquesta operació 5 vegades, per tal de crear fractures al teixit que afavoriran la permeabilitat a l'anticòs.
- Tot seguit després de la última congelació retirar el cubreobjectes amb una ganiveta de bisturí, i deixar assecar les mostres entre una hora i tota la nit a temperatura ambient.
- Rehidratar el material amb un rentat de PBS durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Traslladar les mostres a una càmera humida, i afegir una emulsió de Driselasa (Sigma, Ref: D8037) al 2%, i incubar durant 30-60 minuts a 37°C.
- Rentar 5 cops amb PBS a temperatura ambient durant 5 minuts per rentat.
- Incubar durant 60 minuts amb una solució al 3% de IGEPAL CA-630, i 10% de DMSO.
- Fer entre 5 i 10 rentats d'entre 5 a 10 minuts amb PBS per tal de retirar el detergent.
- Afegir la solució de bloqueig amb un 3% de BSA durant 60 minuts a temperatura ambient.
- Afegir la solució de anticòs primari. El volum pot variar però idealment ha d'estar entre 100 i 150 µl, suficient per a evitar la dessecació durant la incubació que serà d'un mínim de 240 minuts a 37°C. Les mostres es tapen amb un tros de parafilm per tal de crear una pel·lícula amb la solució d'anticòs. La incubació pot continuar a partir dels 240 minuts durant tota la nit a 4°C.
- Un cop acabada la incubació es renta 5 vegades les mostres amb PBS durant 10 minuts per rentat.
- Afegir la solució d'anticòs secundari i incubar a 37°C durant un mínim de 180 minuts.
- Rentar durant 10 minuts amb PBS les mostres, i repetir aquest rentat 5 vegades.
- Rentar amb aigua durant 10 minuts. Repetir 5 vegades.
- Afegir un medi de muntatge adient i un cubreobjectes. Segellar abans de l'observació.
- Les observacions es van realitzar en un microscopi confocal Leica SP2 (???)

## 8.4.- Microscòpia electrònica sobre cèl·lules CHO

### Fixació

- Les cèl·lules CHO van ser fixades en tampó fosfat amb 2,5% de glutaraldehyd. Es van deixar incubar durant 1 hora a 4 °C.
- Es va procedir a fer un rentat en el mateix tampó.
- Post fixació amb 1% de tetraòxid d'osmi en tampó fosfat més 0,8% de ferrocianur de potassi a 4 °C.
- Deshidratació de les mostres en acetona
- Infiltració de les mostres en resina Epon durant 2 dies.
- Polimerització durant 48h de la resina Epon a 60°C

### Talls ultrafins

- Es va utilitzar un ultramicrotòtom Leica Ultracut UC6 (Leica Microsystems, Vienna) per tal de fer els talls ultrafins.
- Muntatge en gradetes Formvar recobertes de coure.

### Tinció

- Els talls ultrafins van ser tenyits en 2% d'acetat d'uranil i citrat de plom.

### Observació

- Les seccions es van observar ultraestructuralment a un microscopi electrònic Jeol 1010 (Jeol, Japan).

## 9.- SOFTWARE

Les imatges preses amb microscòpia confocal van ser processades amb el software ImageJ i el plugin Intensity Correlation Analysis (ICA) per fer els estudis de colocalització.

## 10.- ASSAIG D'ACTIVITAT HMGR

L'assaig per la determinació de l'activitat HMGR està basat en el mètode descrit per Bach (1986). S'utilitza HMG-Co-A- $^{14}\text{C}$  com a substrat i es quantifica  $^{14}\text{C}$ -mevalonolactona formada. L'HMGR és una proteïna integral de membrana i susceptible a ser degradada per cisteïna-proteases, per això per la determinació *in vitro* de la seva activitat és necessari l'ús de detergents zwitteriònics i d'inhibidors de cisteïna-proteases com l'E-64 i DTT per mantenir grups tiol lliures (Bach *et al.*, 1986).

### 10.1.- Obtenció de la mostra

Es parteix d'entre 1-2 ml de cèl·lules en cultiu, que s'homogeneïtza en presència de  $\text{N}_2$  (l) en morter o en l'aparell *Tissue Lyser* (Qiagen) fins a obtenir pols, a què s'hi afegeix tampó d'homogeneïtzació (1 ml/g). La mostra de teixit es centrifuga a 200 g, 10 min a 4 °C i es recupera el sobrenedant (SN0,2). Aquesta operació es repeteix per tal d'obtenir un sobrenedant més net i lliure de les restes cel·lulars del sediment de 200 g.

### 10.2.- Assaig d'activitat

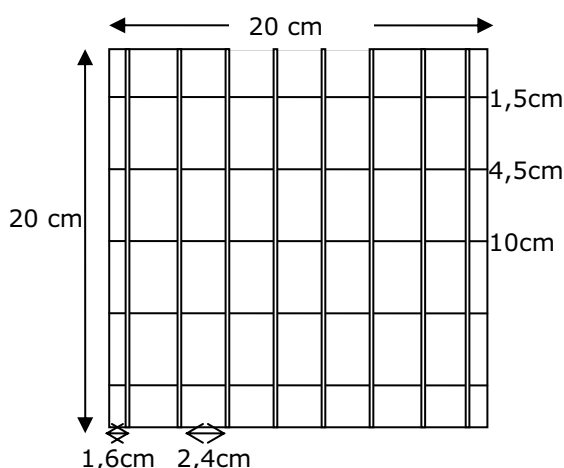
Per tal de determinar l'activitat HMGR es prepara la quantitat de la mescla de reacció necessària segons el nombre de mostres (tenint en compte que se'n mesura l'activitat HMGR per duplicat) més quatre (dos controls negatius que contenen tampó d'homogeneïtzació més dos per pal·liar possibles errors de pipeteig).

- En un bany a 37 °C s'afegeixen 33,5 µl de mescla de reacció sobre 26,5 µl de mostra. L'operació es realitza a intervals de 20 s sobre cadascuna de les mostres.

- S'incuba 2h, a 37 °C.

- S'atura la mescla afegint 10 µl de HCl 25% (a intervals de 20 s i seguint el mateix ordre que en iniciar la reacció).

- S'incuba la reacció 10 min a 50 °C per tal de lactonitzar el mevalonat format:  
 $\text{HMG-CoA} \longrightarrow \text{Mevalonat (hidrofílic)} \longrightarrow \text{Mevanolactona (hidrofòbic)}$
- Es refreda la mostra: 3-4 min a -20 °C.
- Es centrifuga 2 min 10.000 rpm a temperatura ambient en una microcentrífuga.
- S'apliquen 35 µl del sobrenedant en una placa de silicagel (figura 21), que posteriorment s'eixuga amb secador.



**Fig. 21.** Preparació de la placa TLC 20X20cm.

Es divideix i retalla la placa en 2 parts de 10X20 cm. Es dibuixa en llapis la línia d'aplicació (a 1,5cm de la base) i la part que es retallarà (a 4,5 cm del front). Amb una punta de pipeta es marquen els carrils (a 1,6 cm dels extrems i de 2,4 cm cadascun).

- Es desenvolupa la cromatografia en una cambra que conté 100 ml acetona-benzè com a eluent (1:1). Transcorreguts 20 min, quan l'eluent ja ha recorregut els 10 cm de la placa, es treu i es deixa evaporar.
- Es retallen els darrers 4,5 cm de la placa que s'introdueixen en un vial de centelleig. S'afegeixen 12 ml de líquid de centelleig CytoScint (que admet restes aquoses), es deixen els vials en fosc durant 24 h i es procedeix al comptatge en un comptador .

### Càlcul de l'activitat enzimàtica HMGR:

$$\text{Activitat específica 1 (AE 1) (pmols HMG-CoA/min.ml)} = \text{cpm} \cdot \frac{1}{\text{eficiència de comptatge (dpm/cpm)}} \cdot \frac{1}{\text{Eficiència d'arrossegament (0,77)}} \cdot \frac{\text{quantitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (pmol)}}{\text{activitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (dpm)}} \cdot \frac{\text{quantitat total HMG-CoA (pmol)}}{\text{quantitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (pmol)}} \cdot \frac{1}{\text{temps de reacció (min)}} \cdot \frac{\text{volum total assaig (}\mu\text{l)}}{\text{volum aplicat a TLC (}\mu\text{l)}} \cdot \frac{1}{\text{volum mostra assajada (}\mu\text{l)}} \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{Activitat específica 2 (AE 2) (pmols HMG-CoA/min.mg)} = \frac{\text{AE 1 (pmols HMG-CoA/min.ml)}}{\text{concentració proteica (mg/ml)}}$$



## Material emprat:

- Tampó de fosfat potàssic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM, pH 4,5
- Citrat de sodi 5 mM, pH 7,4
- Tris-HCl 0,658 M, pH 7,2
- EDTA 0,5 M
- HMG-CoA 4 mM: es dissolen 4 mg de DL-3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (Sigma) en 1096  $\mu\text{l}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM de pH 4,5. Es guarda a  $-80^\circ\text{C}$ . A partir d'aquesta, es prepara HMG-CoA 0,8 mM amb  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o  $\text{H}_2\text{O}$  desionitzada.
- [ $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA: es proveït per Amersham Biosciences (3-hidroxi-3-metil[3- $^{14}\text{C}$ ]glutaril coenzim A) en acetat de sodi 0,01 N, pH 5,7 a una concentració de 20  $\mu\text{Ci/ml}$  i 57 mCi/mmol.
- DTT 170 mM
- Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa de llevat (Roche) 1 U/ $\mu\text{l}$ : es dissolen 2500 U de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa en 2,5 ml de citrat de sodi 5 mM, pH 7,4. A partir d'aquesta, es preparen les alíquotes de treball a 0,25 U/ $\mu\text{l}$  (en citrat de sodi o  $\text{H}_2\text{O}$  desionitzada).
- Tampó regeneració NADPH (10 ml):
 

Tris-HCl 0,658 M pH 7,2 .....	7,6 ml
EDTA 0,5 M.....	2,4 ml
Glucosa-6-fosfat (Roche).....	0,365 g
NADP <sup>+</sup> (Roche) .....	0,047 g
Seroalbúmina bovina (BSA).....	12 mg
- Mescla de reacció (per cada tub):
 

Tampó de regeneració del NADPH.....	25 $\mu\text{l}$
DTT 170 mM.....	1,5 $\mu\text{l}$
HMG-CoA 0,8 mM.....	2,5 $\mu\text{l}$
Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.....	2 $\mu\text{l}$
[ $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA .....	2,5 $\mu\text{l}$
- HCl 25% (v/v)
- Plaques Silicagel TLC (Merck)
- Líquid de centelleig (admet residus aquosos) (ICN CytoScint)
- Vials de centelleig de 20 ml

- Tampó d'homogeneïtzació:

Hepes KOH 40 mM de pH 7,5

KCl 50 mM

CaCl<sub>2</sub> 5 mM o bé EGTA 5 mM

Triton X-100 0,2% (v/v)

Sacarosa 100 mM

DTT 10 mM

PMSF 100 µg/ml ( a partir de PMSF 20 mg/ml dissolt en isopropanol)

Aprotinina 15 µg/ml (a partir d'aprotinina 3 mg/ml dissolta en H<sub>2</sub>O desionitzada)

E-64 10 µg/ml (a partir d'E-64 3 mg/ml dissolt en H<sub>2</sub>O desionitzada)

Pepstatina 1,5 µg/ml (a partir de pepstatina 3 mg/ml dissolta en metanol).

Els inhibidors aprotinina, E-64 i pepstatina van ser proveïts de la casa comercial Sigma.

### 10.3.- Quantificació de proteïnes pel mètode Bradford

- En placa de microtitulació:

10 µl de mostra (diluïda 1/15) + 190 µl de reactiu de Bradford (BioRad) diluït 1/5.

- En cubeta d'1,5ml

10 µl de mostra (diluïda 1/7) + 790 µl H<sub>2</sub>O desionitzada + 200 µl reactiu de Bradford concentrat.

En els dos casos es deixa incubant de 15 a 30 min i es llegeix a una  $\lambda=595$  nm. Com a patró s'utilitza un banc de dilucions de BSA (de 100 µg/ml fins a 800 µg/ml).

## **BIBLIOGRAFIA**



- Adler, J., and Parmryd, I.** (2010). Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A* **77**, 733-742.
- Angaman, D.M.** (2009). Studies on metabolic processes related with carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. Tesi Doctoral.
- Antolín-Llovera, M.** (2005). Paper de les proteïnes AtKLC1 i AtB'' en la regulació de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis thaliana*. Tesi Doctoral.
- Aoyagi, K., Beyou, A., Moon, K., Fang, L., and Ulrich, T.** (1993). Isolation and characterization of cDNAs encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiol* **102**, 623-628.
- Arino, J., Perez-Callejon, 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**, 475-485.
- 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*. (New York: John Wiley and Sons, Inc.).
- Babcock, G.D., and Esen, A.** (1994). Substrate specificity of maize  $\beta$ -glucosidase *Plant Sci.* **101**, 31-39.
- Bach, T.J.** (1987). Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**, 163-178.
- Bach, T.J., Rogers, D.H., and Rudney, H.** (1986). Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur J Biochem* **154**, 103-111.
- Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., and Rine, J.** (1988). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* **8**, 3797-3808.
- Behnke, H.D., and Eschlbeck, G.** (1978). Dilated cisternae in *Capparales* - an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **97**, 351-363.
- Bevis, B.J., and Glick, B.S.** (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**, 83-87.

- Bick, J.A., and Lange, B.M.** (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* **415**, 146-154.
- Black, V.H., Sanjay, A., van Leyen, K., Luring, B., and Kreibich, G.** (2005). Cholesterol and steroid synthesizing smooth endoplasmic reticulum of adrenocortical cells contains high levels of proteins associated with the translocation channel. *Endocrinology* **146**, 4234-4249.
- Bochar, D.A., Stauffacher, C.V., and Rodwell, V.W.** (1999). Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* **66**, 122-127.
- Bones, A.M., and Rossiter, J.T.** (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* **97**, 194-208.
- Bonnett, H.T., Jr., and Newcomb, E.H.** (1965). Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J Cell Biol* **27**, 423-432.
- Bramley, P.** (1997). Isoprenoid Metabolism. . In *Plant Biochemistry*, 417-434.
- Brown, D.A., and Simoni, R.D.** (1984). Biogenesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, an integral glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1674-1678.
- Burnett, R.J., Maldonado-Mendoza, I.E., McKnight, T.D., and Nessler, C.L.** (1993). Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **103**, 41-48.
- 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**, 833-845.
- Campos, N., and Boronat, A.** (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**, 2163-2174.
- Casamayor, A., Perez-Callejon, E., Pujol, G., Arino, 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**, 523-528.
- Chapman, A., and Hill, B.** (2000). Dictionary of Natural Products on CD-ROM.

- Chappell, J.** (1995a). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* **107**, 1-6.
- Chappell, J.** (1995b). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 521-547.
- Chappell, J.** (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 151-157.
- Chappell, J., and Nable, R.** (1987). Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol* **85**, 469-473.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., and Saunders, C.** (1995c). Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol* **109**, 1337-1343.
- Chin, D.J., Luskey, K.L., Anderson, R.G., Faust, J.R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1982). Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1185-1189.
- Choi, D., Bostock, R.M., Avdiushko, S., and Hildebrand, D.F.** (1994). Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2329-2333.
- 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**, 1333-1344.
- Chrispeels, M.J., and Herman, E.M.** (2000). Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiol* **123**, 1227-1234.
- Chun, K.T., and Simoni, R.D.** (1992). The role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **267**, 4236-4246.

- Chye, M.L., Tan, C.T., and Chua, N.H.** (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed. *Plant Mol Biol* **19**, 473-484.
- Cicek, M., and Esen, A.** (1998). Structure and expression of a dhurrinase (beta-glucosidase) from sorghum. *Plant Physiol* **116**, 1469-1478.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Coruzzi, G., and Bush, D.R.** (2001). Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol* **125**, 61-64.
- 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**, 511-518.
- Cramer, C.L., Weissenborn, D., Cottingham, C.K., Denbow, C.J., Eisenback, J.D., Radin, D.N., and Yu, X.** (1993). Regulation of Defense-related Gene Expression during Plant-Pathogen Interactions. *J Nematol* **25**, 507-518.
- 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**, 506-513.
- Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., and Gallois, P.** (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *J Biol Chem* **279**, 779-787.
- 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**, 9710-9715.
- Deruere, J., Jackson, K., Garbers, C., Soll, D., and DeLong, A.** (1999). The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *Plant J* **20**, 389-399.



- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78-84.
- English, A.R., Zurek, N., and Voeltz, G.K.** (2009). Peripheral ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 596-602.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, 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**, 927-931.
- Ferrer, A., Aparicio, C., Nogues, N., Wettstein, A., Bach, T.J., and Boronat, A.** (1990). Expression of catalytically active radish 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **266**, 67-71.
- Friml, J., Benkova, E., Mayer, U., Palme, K., and Muster, G.** (2003). Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J* **34**, 115-124.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y.** (1999a). A highly conserved signal controls degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in eukaryotes. *J Biol Chem* **274**, 31671-31678.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y.** (1999b). A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *EMBO J* **18**, 5994-6004.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Marbach, J., Durr, A., Fleck, J., and Jamet, E.** (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* **20**, 337-341.
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1985). Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* **41**, 249-258.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430.
- González, V.** (2002). Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral.
- Gray, J.C.** (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Advances in botanical research* **14**, 25-91.

- Gunning, B.S.E.** (1998). The mystery organelles in Arabidopsis expressing GFP. *Trends Plant Sci.* **3**.
- Gus-Mayer, S., Brunner, H., Schneider-Poetsch, H.A., and Rudiger, W.** (1994). Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of beta-glucosidases. *Plant Mol Biol* **26**, 909-921.
- Halford, N.G., and Hardie, D.G.** (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* **37**, 735-748.
- Hampton, R., Dimster-Denk, D., and Rine, J.** (1996). The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci* **21**, 140-145.
- Hampton, R.Y.** (2002). Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 345-378.
- Hara-Nishimura, I., and Matsushima, R.** (2003). A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Curr Opin Plant Biol* **6**, 583-588.
- Hara-Nishimura, I., Kinoshita, T., Hiraiwa, N., and Nishimura, M.** (1998a). Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J. Plant Physiol.* **152**, 668-674.
- Hara-Nishimura, I.I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., and Nishimura, M.** (1998). Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Harrington, G.N., and Bush, D.R.** (2003). The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* **15**, 2493-2496.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., and Hodge, S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2122-2127.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (1999). Accumulation of a fusion protein containing 2S albumin induces novel vesicles in vegetative cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **40**, 263-272.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N.K., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **42**, 894-899.

- 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**, 127-136.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P.C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* **20**, 735-747.
- Hemmerlin, A., and Bach, T.J.** (2000). Farnesol-induced cell death and stimulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in tobacco cv bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* **123**, 1257-1268.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., and Bach, T.J.** (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem* **278**, 26666-26676.
- 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.
- Herman, E.M.** (2008). Endoplasmic reticulum bodies: solving the insoluble. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 672-679.
- Herman, E.M., and Larkins, B.A.** (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* **11**, 601-614.
- Holmberg, N., Harker, M., Gibbard, C.L., Wallace, A.D., Clayton, J.C., Rawlins, S., Hellyer, A., and Safford, R.** (2002). Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. *Plant Physiol* **130**, 303-311.
- Hughes, M.A., Brown, K., Pancoro, A., Murray, B.S., Oxtoby, E., and Hughes, J.** (1992). A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). *Arch Biochem Biophys* **295**, 273-279.
- Istvan, E.S., and Deisenhofer, J.** (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **292**, 1160-1164.
- Iversen, T.-H.** (1970). The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the *Cruciferae* **71**, 467-477.

- 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**, 417-439.
- Jingami, H., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., and Luskey, K.L.** (1987). Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalline endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **104**, 1693-1704.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 45188-45194.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sakakibara, H.** (2004). Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**, 14049-14054.
- Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horvath, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E., and Ane, J.M.** (2007). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **19**, 3974-3989.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1995). The sequence and expression of the gamma-VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **36**, 1555-1562.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* **19**, 43-53.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K.** (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**, 175-182.
- Kölher, R.H.** (1998). GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends Plant Sci.* **3**.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.

- Kondo, K., and Oba, K.** (1986). Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from potato tubers. *J Biochem* **100**, 967-974.
- 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**, 507-516.
- Korth, K.L., Stermer, B.A., Bhattacharyya, M.K., and Dixon, R.A.** (1997). HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Mol Biol* **33**, 545-551.
- 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**, 925-948.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R.** (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13172-13177.
- Learned, R.M.** (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**, 645-655.
- 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**, 499-511.
- Leivar, P.** (2003). Anàlisi funcional de la regió N-terminal de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis*. Tesi Doctoral.
- Leivar, P., Gonzalez, V.M., Castel, S., Trelease, R.N., Lopez-Iglesias, C., Arro, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., and Fernandez-Busquets, X.** (2005). Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol* **137**, 57-69.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 47-65.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., and Schwender, J.** (1997a). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* **101**, 643-652.

- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., and Rohmer, M.** (1997b). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**, 271-274.
- Luan, S.** (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 63-92.
- 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**, 541-549.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Burnett, R.J., and Nessler, C.L.** (1992). Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **100**, 1613-1614.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Vincent, R.M., and Nessler, C.L.** (1997). Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Mol Biol* **34**, 781-790.
- Manzano, D., Fernandez-Busquets, X., Schaller, H., Gonzalez, V., Boronat, A., Arro, M., and Ferrer, A.** (2004). The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* **219**, 982-992.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003b). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J* **33**, 493-502.
- Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2004). NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* **16**, 1536-1549.
- 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**, 1807-1814.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003a). The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **44**, 661-666.

- Mayer-Jaekel, R.E., and Hemmings, B.A.** (1994). Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol* **4**, 287-291.
- McCaskill, D., and Croteau, R.** (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *TIBTECH* **16**, 349-355.
- McGarvey, D.J., and Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.
- McGee, T.P., Cheng, H.H., Kumagai, H., Omura, S., and Simoni, R.D.** (1996). Degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in endoplasmic reticulum membranes is accelerated as a result of increased susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* **271**, 25630-25638.
- Menges, M., and Murray, J.A.** (2004). Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures. *Plant J* **37**, 635-644.
- Moore, K.B., and Oishi, K.K.** (1993). Characterization of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity during Maize Seed Development, Germination, and Seedling Emergence. *Plant Physiol* **101**, 485-491.
- Moore, K.B., and Oishi, K.K.** (1994). 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in the Endosperm of Maize vivipary Mutants. *Plant Physiol* **105**, 119-125.
- Moriyama, T., Sather, S.K., McGee, T.P., and Simoni, R.D.** (1998). Degradation of HMG-CoA reductase in vitro. Cleavage in the membrane domain by a membrane-bound cysteine protease. *J Biol Chem* **273**, 22037-22043.
- Mullen, R.T., Lisenbee, C.S., Flynn, C.R., and Trelease, R.N.** (2001). Stable and transient expression of chimeric peroxisomal membrane proteins induces an independent "zippering" of peroxisomes and an endoplasmic reticulum subdomain. *Planta* **213**, 849-863.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Nagano, A.J., Matsushima, R., and Hara-Nishimura, I.** (2005). Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **46**, 1140-1148.
- Nagano, A.J., Fukao, Y., Fujiwara, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2008). Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **49**, 969-980.

- Nagano, A.J., Maekawa, A., Nakano, R.T., Miyahara, M., Higaki, T., Kutsuna, N., Hasezawa, S., and Hara-Nishimura, I.** (2009). Quantitative analysis of ER body morphology in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell Physiol* **50**, 2015-2022.
- Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., and Muranaka, T.** (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in Arabidopsis lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* **216**, 345-350.
- Narita, J.O., and Gruissem, W.** (1989). Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1**, 181-190.
- Nieto, B., Fores, O., Arro, M., and Ferrer, A.** (2009). Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry* **70**, 53-59.
- Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J.T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2009). Constitutive and inducible ER bodies of Arabidopsis thaliana accumulate distinct beta-glucosidases. *Plant Cell Physiol* **50**, 480-488.
- Okita, T.W., and Rogers, J.C.** (1996). Compartmentation of Proteins in the Endomembrane System of Plant Cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 327-350.
- 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**, 4223-4235.
- Oxtoby, E., Dunn, M.A., Pancoro, A., and Hughes, M.A.** (1991). Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Mol Biol* **17**, 209-219.
- Parrish, M.L., Sengstag, C., Rine, J.D., and Wright, R.L.** (1995). Identification of the sequences in HMG-CoA reductase required for karmellae assembly. *Mol Biol Cell* **6**, 1535-1547.
- Pathak, R.K., Luskey, K.L., and Anderson, R.G.** (1986). Biogenesis of the crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells: evidence that newly formed endoplasmic reticulum emerges from the nuclear envelope. *J Cell Biol* **102**, 2158-2168.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Camacho, A., Gallego, C., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D.** (1997). A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **324 ( Pt 2)**, 619-626.



- Perez-Callejon, E., Casamayor, A., Pujol, G., Camps, M., Ferrer, A., and Arino, J.** (1998). Molecular cloning and characterization of two phosphatase 2A catalytic subunit genes from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**, 105-112.
- Poulton, J.E.** (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol* **94**, 401-405.
- Profant, D.A., Roberts, C.J., and Wright, R.L.** (2000). Mutational analysis of the karmellae-inducing signal in Hmg1p, a yeast HMG-CoA reductase isozyme. *Yeast* **16**, 811-827.
- Profant, D.A., Roberts, C.J., Koning, A.J., and Wright, R.L.** (1999). The role of the 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase cytosolic domain in karmellae biogenesis. *Mol Biol Cell* **10**, 3409-3423.
- Rask, L., Andreasson, E., Ekbohm, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., and Meijer, J.** (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**, 93-113.
- 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**, 443-459.
- Ridge, R.W., Uozumi, Y., Plazinski, J., Hurley, U.A., and Williamson, R.E.** (1999). Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol* **40**, 1253-1261.
- Rodriguez-Concepcion, M., and Gruissem, 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**, 41-48.
- Rodriguez-Concepcion, 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**, 1079-1089.
- Rodriguez-Concepcion, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., and Boronat, A.** (2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* **16**, 144-156.
- Rohmer, M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**, 565-574.

- 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**, 257-266.
- Russell, D., Knight, J.S., and Wilson, T.M.** (1985). Pea seedling HMG-CoA reductases: regulation of activity *in vitro* by phosphorylation and calcium, and posttranslational control *in vivo* by phytochrome and isoprenoid hormones. In *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, T. Kagawa, ed (Missouri: The Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program).
- Sambrook, R., and Russell, D.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor).
- Sauer, M., Paciorek, T., Benkova, E., and Friml, J.** (2006). Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nat Protoc* **1**, 98-103.
- Schmid, M., Simpson, D., and Gietl, C.** (1999). Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14159-14164.
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., and Gietl, C.** (1998). A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**, 466-475.
- Schmid, M., Simpson, D.J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., and Gietl, C.** (2001). The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5353-5358.
- 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**, 1696-1705.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W.** (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**, 4247-4260.
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V.M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F.M., and Oelmuller, R.** (2008). PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J* **54**, 428-439.

- Singer, S.J.** (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 247-296.
- Skalnik, D.G., Brown, D.A., Brown, P.C., Friedman, R.L., Hardeman, E.C., Schimke, R.T., and Simoni, R.D.** (1985). Mechanisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase overaccumulation in three compactin-resistant cell lines. *J Biol Chem* **260**, 1991-1994.
- Slabas, A.R., Fordham-Skelton, A.P., Fletcher, D., Martinez-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**, 1125-1138.
- Slesak, H., and Przywara, L.** (2003). The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia* **45**, 183-190.
- Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J.** (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol* **163**, 257-269.
- Sontag, E.** (2001). Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* **13**, 7-16.
- Staehelein, L.A.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**, 1151-1165.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M., and Korth, K.L.** (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35**, 1133-1140.
- Stermer, B.A., and Bostock, R.M.** (1987). Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol* **84**, 404-408.
- Terol, J., BARGUES, M., Carrasco, P., Perez-Alonso, M., and Paricio, N.** (2002). Molecular characterization and evolution of the protein phosphatase 2A B' regulatory subunit family in plants. *Plant Physiol* **129**, 808-822.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H.** (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.

- Toyooka, K., Okamoto, T., and Minamikawa, T.** (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* **148**, 453-464.
- Tsukaya, H.** (2005). Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *Int J Dev Biol* **49**, 547-555.
- Virshup, D.M.** (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 180-185.
- Weathers, P.J., DeJesus-Gonzalez, L., Kim, Y.J., Souret, F.F., and Towler, M.J.** (2004). Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars. *Plant Cell Rep* **23**, 414-418.
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L., and Rine, J.** (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**, 101-114.
- Wright, R., Keller, G., Gould, S.J., Subramani, S., and Rine, J.** (1990). Cell-type control of membrane biogenesis induced by HMG-CoA reductase. *New Biol* **2**, 915-921.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2008). NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 2529-2540.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Ogasawara, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2009). The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases. *Plant Signal Behav* **4**, 849-852.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N., Jr.** (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y.** (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916.

