



## Anàlisi molecular de la biosíntesi d'isoprenoides a *Arabidopsis*

Albert Cairó Calzada

**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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) 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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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 molecular de la biosíntesi  
d'isoprenoides a *Arabidopsis***

Albert Cairó Calzada

Barcelona, 2009



Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia  
Departament de Biologia i Bioquímica Molecular  
Programa de doctorat de Biotecnologia, Bienni 2003-2005



# **Anàlisi molecular de la biosíntesi d'isoprenoides a *Arabidopsis***

Memòria presentada per Albert Cairó Calzada 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. Albert Boronat i Margosa

Albert Cairó Calzada







## Agraïments

En aquest moment per mí és un plaer poder-te donar les gràcies no només per la oportunitat que em vas donar de realitzar la tesi doctoral, sinó per tot el que m'has ensenyat. Recordo que la primera vegada que et vaig venir a veure jo era un estudiant un pèl impresentable i el meu cap estava ple d'idees absurdes. Després de sis anys de compartir ciència amb tu, després d'hores asseguts inventant-nos hipòtesis impossibles i ideant estratègies increïbles, sé que he canviat, i sé que m'ho he passat bé. Ho trobaré a faltar. Gràcies Albert.

...

Feia poc que havia arribat, i una nit quan ja portàvem hores de vicis diversos, el Pau em va agafar. Em va dir que m'esperàven temps divertits però amb moments difícils, i que em trobaria amb molta gent que estaria al meu costat, que m'ajudaria i amb els que m'ho passaria bé, i amb ells superaria els problemes que vindrien i viuria una època inoblidable. Tenia raó. Us he trobat a tots vosaltres, i no us oblidaré.

A tu Óscar, et recordaré des del primer dia. El laboratori estava buit, jo estava sol i em vas venir a buscar. I de sobte, el laboratori ja estava ple, i jo ja no estava sol. Gràcies per apropar-me al món dels esmorzars a les 10h, de contenidors explotant, de paquets de tabac màgics, de Heavis, de yo sé més que nadie, de Pedros i Gemas, de Patris, de que cojas esta otra cerveza coño, de confidències a la setena, de Meris i de Lorenzos.

Doncs si, hi havia un Heavy. Ara hi ha un amic. Des de les primeres Coca-coles als últims patxarans recordo que hem rigut, hem plorat, que hem volat i també ens hem enfonsat, hem jugat i hem cantat. I recorda que no volem parar. Gràcies Jordi.

I un dia va arribar el Víctor. Tu no sabies on et ficaves, i nosaltres no sabiem el que ens esperava. Gracies pels dies tranquils i per les nits de desquici, pels cigarros silenciosos i els gin-tònics en gots amples. Sense tu mai hauria tumbat aquella estatua, i encara en tumbarem d'altres.

Era un matí assolejat, i en un d'aquells esmorzars de les 10h va venir una bèstia. Era gran, *cachazúa* i *pelúa*, i tenia el poder de crear anècdotes constantment. I no podia veure cervesa passada la mitjanit. I ara me l'estimo un munt. Gracias Lorenzo, por estos boquerones con una caña, por tu apoyo, por el mero con una caña, por tu confianza, por el camarón con una caña, por tu paciencia, por las navajas con una caña, por el Wilson y por el Che. Saludos camarada!

Estic pensant que falten unes nenes. Com estàs Gema? Que aquella nena que hi havia a l'ascensor camí del meu primer esmorzar de les 10h ja s'ha fet gran eh! M'has ajudat durant el dia i m'has alegrat la nit. Gràcies pel teu somriure i pels teus escots.



I tu Silvia, ja saps què penso quan sento els teus tacons apropar-se.... ara no és moment. De fet, sempre m'ha agradat entrar a integrativa i veure la preciositat de la Miriam, la guapa i divertida Susanita i l'espectacular Úrsula. Buscar la meva Marineta, i trobar a la divertida Marisa i a la Marieta de l'ull viu. No sé com hagués sortit aquesta tesi si hagués treballat en aquest laboratori.

Però també he estat ben acompanyat. Al principi, estàveu tu Patri i erem com germans. Sé que no ho llegiràs, però ara et vull donar les gràcies perquè vem aconseguir formar un grup increïble, i durant aquells anys vaig ser molt feliç. La mama era la Susanna, la Meri era la nena bona i la Eva la dolenta (en el fons t'estimava). Tu Antia, la niña pequeña, la mas gruñona y la mas cariñosa. Més tard va venir la nostra Susanita, i amb ella l'alegria. A totes us recordaré i us vull agrair tot el que veu fer per mi.

Habia una vez un pirata honrado. Tenia la veu ronca i fluixa, i navegava sota una bandera vermella. Quan vaig pujar al seu barco em va parlar de la vida i em va donar claretat. I em va obrir les portes del seu harén. Gràcies per estar sempre al meu costat i per ser el meu amic, Pedro.

I en aquell barco hi havia un grumet. I will remember you well, in the BQ Hotel... però trobaré a faltar la teva harmònica i el teu Blues, Vicente, i els teus monòlegs improvisats, al Dr. Slump i al todo es una mierda, el teu traje d'Spiderman i la teva gorra marinera mentre brindem per Irlanda. I pensaré en tú sovint.

I el guia Sergi Ferrero. Amb tu també hem buidat unes quantes Guinness, tot i que recordo que a vegades ens les hem estat a punt de tirar per sobre. Ha sigut molt divertit haver viatjat amb tú, amb Totti, amb l'havemus papam i el Thomas Quetomas, amb el payaso i amb Loquillo. I un dia m'aturaré per parlar amb tú entre jabugos i pamesans, bevent bon vi mentre ens porten un cafè ben curt.

I m'agradaria que l'Edu i l'Aroa s'assegessin amb nosaltres, ell sempre tranquil però atent, i ella sempre guapa. I a la taula del costat, la Marta, l'Anna i l'Emma estaràn fotent crits explicant-se les últimes morbositats que han sentit, mentre el Xico, el Miguel, l'Anna i la Catarina assaboriràn uns *pastéis de Belém*. L'Adri el Santi faràn una partideta al futbolín, el Jose tocarà la seva guitarra per la Iliana i la Elena, i la Nuria i l'Anna s'hi uniràn. I entrarà el Marçal amb la seva colla després de descarregar un 12 de 8 amb mig folre, 3 manilles i 5 anxanetes, mentre el David, en el lavabo, intentarà cagar boles de plata. El sr. Manolo serà feliç amb la seva cerveseta al costat del Karel. La conversa d'aquesta taula s'hauria de gravar. Tu Francesc disfrutars com un nen desde la cuina, preparant el xató mentre se t'escapen els cargols de l'olla, alhora que els canalons comencen a fer olor de gratinat i et demanen una altra ració d'all cremat. Ets un artista. La meva Irini em despentinàrà mentre esperi l'hora del seu primer Jack Daniel's, i el Maxime punxará el nou disc de Tiken Jah. Tu Edu, també voldràs venir.

I més tard, veu venir vosaltres.

Es veu que a Cocentaina la gent és feliç. Viu una tribu que parla un xic extrany, que diuen que saben fer paelles però després mengen arròs bullit amb salsa solís, i tenen una poció màgica que porta alcohol i cafè. N'han begut tant, que si s'els hi donen altres coses es posen com cabres. I no paren de riure. Però molt, i a més, t'ho encomanen. Ets gran Josep.

Tu també, Irma. Estàvem desquiciats i vas venir a estira-nos les orelles. A fer-nos riure i ensenyar les teves cametes de senyoreta de les Corts. Vas fer per molt mi i em vas despertar. Amb tu van venir més nenes i un bufón. Vaya perla que estaves fet Ruben, i va ser divertit descobrir-te. I va venir una nena molt mona que es passejava tota contenta amb les seves faldilletes, llàstima que t'en vas anar a la muntanya massa ràpid Natalia. Però de tant en tant baixaves amb unes pastoretetes que et vas trobar allà dalt. La Inés amb els seus xoriços casolans, i tu Laura, que ets una cabreta boja genial. M'encanta l'empanament mental de la Catalina, però no em puc resistir a la guapíssima Àguila. Totes m'heu alegrat els últims dies.

I gràcies per saltar aquella tanca. Al final resulta que ens hem fotut la òstia, però sempre recordaré un món increïble de prínceps i princeses, de gats grans i plats plens, de comiats i abraçades, d'ecs i cccrrrgggggsss, i de berberetxos amb patates. Un petonàs senyoreta.

...

I vosaltres ho heu vist desde fora, però us he portat a dins desdel principi. Quan he necessitat fugir, sempre se m'han obert les portes del castell de la reina Mairim i el rei Igres, quan he volgut veure les estrelles, el mag Asonipse me les ha ensenyat, quan m'he volgut amagar a la cabana del bosc, en Cram i l'Eric Areric me l'han construït. Amb la petita Aras sempre m'ha agradat jugar i contra el cavaller Dracir ha estat un plaer lluitar. L'Iregorg i el Trebill m'han acompanyat a la taberna, i l'Adnes i la Htebasile m'han divertit per la nit, mentre cantava la Eon. Gràcies per acompanyar-me i per seguir-me. Us estimo.

...

I gràcies a l'Andrés, al Xavi i també al Víctor. Al Carles, al Leo i al Thierry. Mai oblidaré al Juliano, i a tu tampoc Dani. Gràcies a tots vosaltres, gràcies Pep i gràcies Samuel.

...

Finalment, voldria donar les gràcies als meus. Als macarrons de la mama, a les converses del papa, a la divertida Montse i a la lloca de l'Anna. A vosaltres us estimo més.



# ÍNDIX

<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>1 BIOSÍNTESIS D'ISOPRENOIDES: GENERALITATS.....</b>	<b>3</b>
1.1 Els isoprenoides: varietat funcional.....	3
1.2 IPP i DMAPP: Precursors comuns de tots els isoprenoides .....	4
1.3 Dues vies de síntesis d'IPP i DMAPP.....	5
1.4 Elucidació de la ruta del MEP.....	6
1.5 Distribució diferencial de la ruta del MVA i la ruta del MEP.....	8
1.6 Inhibidors de la ruta del MEP.....	10
<b>2 BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES.....</b>	<b>10</b>
2.1 La ruta del MVA en plantes .....	12
2.1.1 Origen dels substrats de la ruta del MVA .....	12
2.1.2 Isoprenoides finals de la ruta del MVA .....	13
2.1.3 Regulació de la ruta del MVA .....	13
2.1.3.1 Control del flux metabòlic .....	13
2.1.3.2 Regulació transcripcional.....	13
2.1.3.3 Regulació postranscripcional .....	14
2.1.3.4 Coordinació amb etapes posteriors a la ruta del MVA.....	14
2.1.3.5 Famílies multigèniques i organització en canals metabòlics.....	14
2.2 La ruta del MEP en plantes.....	15
2.2.1 Origen dels substrats de la ruta del MEP .....	15
2.2.2 Isoprenoides finals de la ruta del MEP .....	17
2.2.3 Regulació de la ruta del MEP .....	17
2.2.3.1 Control del flux metabòlic .....	17
2.2.3.2 Regulació transcripcional.....	18
2.2.3.3 Regulació postranscripcional .....	20
2.2.3.4 Coordinació amb etapes posteriors a la ruta del MEP.....	22

# ÍNDIX

2.2.3.5	Famílies multigèniques .....	23
<b>2.3</b>	<b>Intercanvi de prenil difosfats entre compartiments subcel·lulars .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Bloqueig de la síntesi d'isoprenoides en plàntules d'<i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJECTIUS.....</b>		<b>29</b>
<b>RESULTATS.....</b>		<b>33</b>
<b>1</b>	<b>ANÀLISIS FUNCIONAL DE LA ISOFORMA DXS2 D'ARABIDOPSIS....</b>	<b>35</b>
<b>1.1</b>	<b>Complementació del mutant <i>chs5</i> amb DXS2.....</b>	<b>36</b>
1.1.1	Sobreexpressió i direccionament als cloroplastes de la proteïna DXS2 en el mutant <i>chs5</i> .....	36
1.1.2	La sobreexpressió de DXS2 als cloroplasts no reverteix el fenotip del mutant <i>chs5</i> .....	36
<b>1.2</b>	<b>Estudi de l'activitat de la proteïna DXS2 <i>in vitro</i>. .....</b>	<b>37</b>
1.2.1	Expressió de les proteïnes DXS2 i DXS1 d' <i>Arabidopsis</i> a <i>E. coli</i> .....	37
1.2.2	Purificació de les proteïnes DXS2 i DXS1 d' <i>Arabidopsis</i> .....	41
<b>1.3</b>	<b>Anàlisi del mutant de pèrdua de funció de DXS2.....</b>	<b>41</b>
1.3.1	El mutant <i>dxs2-1</i> no presenta diferències fenotípiques aparents.....	42
<b>2</b>	<b>ESTUDI DEL POSSIBLE PAPER DE LA 1-D-DESOXI-D-XILULOSA (DX) EN LA REGULACIÓ DE SÍNTESI D'ISOPRENOIDES I ALTRES PROCESSOS CEL·LULARS .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1</b>	<b>La DX és tòxica a <i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>44</b>
2.1.1	Efecte de sucres anàlegs a la DX .....	45
2.1.2	La DX necessita ser fosforilada per resultar tòxica a <i>Arabidopsis</i> .....	46
2.1.2.1	Mutant <i>Atxk-2</i> .....	46
2.1.2.2	Toxicitat de la DX en el mutant <i>Atxk-2</i> .....	46
2.1.3	L'efecte tòxic de la DX5P té lloc al citosol de la cèl·lula .....	47
2.1.3.1	Mutant <i>Atxpt-1</i> .....	47
2.1.3.2	Mutant <i>Atxpt-2</i> .....	48
2.1.3.3	Toxicitat de la DX en els mutants <i>Atxpt-1</i> i <i>Atxpt-2</i> .....	48
<b>2.2</b>	<b>Toxicitat de la DX a <i>E. coli</i> .....</b>	<b>50</b>
2.2.1	La DX no afecta el creixement normal d' <i>E. coli</i> en medi ric.....	50
2.2.2	La DX afecta el creixement d' <i>E. coli</i> en medi mínim.....	51
<b>2.3</b>	<b>DX5P i metabolisme glucídic.....</b>	<b>51</b>

<b>3</b>	<b>IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MUTANTS RESISTENTS A LA RUTA DEL MEP.....</b>	<b>54</b>
3.1	<i>Activation tagging a Arabidopsis.</i> .....	54
3.2	<b>Selecció dels mutants.....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Paper de l'enzim DXR en el control del flux de la ruta del MEP en <i>Arabidopsis</i> .....	56
3.2.1.1	L'acúmul de proteïna DXR és proporcional als nivells de pigments acumulats .....	56
3.2.1.2	Generació de línies transgèniques d' <i>Arabidopsis</i> sobreexpresores de DXR.....	56
3.3	<b>Selecció dels mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Obtenció de mutants <i>rif</i> homozigots .....	59
3.4	<b>Resistència dels mutants <i>rif</i> a la FSM.....</b>	<b>60</b>
3.5	<b>Resistència dels mutants <i>rif</i> a la CLM.....</b>	<b>61</b>
3.6	<b>Resistència dels mutants <i>rif</i> a la MEV .....</b>	<b>62</b>
3.7	<b>Nivells de proteïna DXS i DXR dels mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>63</b>
3.8	<b>Anàlisi de l'expressió dels gens <i>DXS</i> i <i>DXR</i> en els mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>65</b>
3.9	<b>Nivells de clorofil·les i carotenoides en els mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>67</b>
3.10	<b>Identificació del lloc d'inserció del T-DNA en els mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>67</b>
3.10.1	Mutants <i>rif</i> amb nivells basals elevats de proteïna DXR: <i>rif27</i> i <i>rif33</i> .....	69
3.10.1.1	<i>rif27</i> .....	69
3.10.1.2	<i>rif33</i> .....	72
3.10.2	Mutants <i>rif</i> amb una elevada capacitat d'inducció dels nivells de DXR en resposta al tractament amb FSM: <i>rif23</i> , <i>rif26</i> i <i>rif31</i> .....	75
3.10.2.1	<i>rif23</i> i <i>rif31</i> .....	76
3.10.2.2	<i>rif26</i> .....	81
3.10.3	Mutants <i>rif</i> afectats en la senyalització per fosfatidilinositols: <i>rif30</i> , <i>rif32</i> i <i>rif45</i> .....	84
3.10.4	Mutants amb nivells elevats de transcrits <i>DXS</i> i <i>DXR</i> .....	92
3.10.4.1	<i>rif34</i> .....	92
3.10.4.2	<i>rif39</i> .....	95
3.10.5	Mutant <i>rif21</i> .....	98
3.10.6	Mutants afectats en altres processos cel·lulars: <i>rif24</i> , <i>rif28</i> , <i>rif35</i> , <i>rif36</i> i <i>rif44</i> .....	103
3.10.6.1	Identificació dels gens afectats en els mutants <i>rif24</i> , <i>rif28</i> , <i>rif35</i> , <i>rif36</i> i <i>rif44</i> .....	111

<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>119</b>
<b>1 ANÀLISI FUNCIONAL DE LA ISOFORMA DXS2 D'ARABIDOPSIS ....</b>	<b>121</b>
<b>2 ESTUDI DE LA TOXICITAT I DEL POSSIBLE PAPER DE LA 1-DESOXI-D-XILULOSA EN LA REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'ISOPRENOIDES I ALTRES PROCESSOS CEL·LULARS.....</b>	<b>123</b>
<b>3 ANÀLISI BIOQUÍMIC I MOLECULAR DE MUTANTS RESISTENTS AL BLOQUEIG DE LA RUTA DEL MEP AMB FOSMIDOMICINA. ....</b>	<b>125</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>141</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>147</b>
<b>1 MATERIAL BIOLÒGIC .....</b>	<b>149</b>
1.1 Material vegetal .....	149
1.2 Soques bacterianes .....	150
1.3 Vectors plasmídics.....	150
<b>2 MEDIS DE CULTIU.....</b>	<b>151</b>
2.1 Medis de cultiu de plantes.....	151
2.1.1 Suplements al medi de cultiu .....	151
2.2 Medis de cultiu de bacteris .....	152
<b>3 CONDICIONS DE CULTIU DE PLANTES D'ARABIDOPSIS .....</b>	<b>153</b>
3.1 Cultiu estèril d' <i>Arabidopsis</i> .....	153
3.1.1 Cultiu en medi sòlid.....	153
3.2 Cultiu en terra. ....	154
<b>4 BIOLOGIA MOLECULAR I BIOQUÍMICA D'ARABIDOPSIS: TÈCNIQUES ESPECÍFIQUES.....</b>	<b>155</b>
4.1 Generació de plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis</i> .....	155
4.1.1 Descripció del vector utilitzat per generar les plantes transgèniques.....	155
4.1.2 Transformació d' <i>Arabidopsis</i> .....	155
4.2 Tècniques específiques d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	158
4.2.1 Transformació d' <i>A. tumefaciens</i> .....	158
4.3 Obtenció d'àcids nucleics a partir de teixits d' <i>Arabidopsis</i> .....	160
4.3.1 Obtenció d'ADN genòmic .....	160

4.3.2	Minipreparació d'ADN genòmic .....	160
4.3.3	Obtenció d'ARN .....	160
<b>4.4</b>	<b>Obtenció de proteïnes a partir de teixits d'<i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>161</b>
<b>4.5</b>	<b>Microbombardeig de teixits d'<i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>162</b>
4.5.1	Descripció de les construccions utilitzades pels experiments de microbombardeig ....	162
4.5.2	Protocol de microbombardeig.....	162
4.5.3	Observació de les mostres microbombardejades .....	166
<b>4.6</b>	<b>Quantificació de pigments fotosintètics a <i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>166</b>
<b>5</b>	<b>TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.....</b>	<b>168</b>
<b>5.1</b>	<b>Tecnologia de l'ADN recombinant.....</b>	<b>168</b>
5.1.1	Construccions utilitzades en aquest treball .....	169
5.1.2	Preparació de cèl·lules competents .....	172
<b>5.2</b>	<b>Tècniques d'hibridació d'àcids nucleics .....</b>	<b>174</b>
5.2.1	Sondes utilitzades en els experiments de <i>northern-blot</i> .....	174
5.2.2	<i>Northern-blot</i> .....	176
<b>5.3</b>	<b>Anàlisi de proteïnes mitjançant <i>Western-blot</i>.....</b>	<b>181</b>
5.3.1	Anticossos utilitzats .....	181
5.3.2	<i>SDS-PAGE</i> .....	181
<b>5.4</b>	<b>Sobreexpressió i purificació de proteïnes recombinants .....</b>	<b>187</b>
5.4.1	Soques utilitzades .....	187
5.4.2	Vectors d'expressió de proteïnes recombinants.....	187
5.4.3	Expressió de proteïnes recombinants.....	187
5.4.4	Obtenció dels extractes cel·lulars.....	188
5.4.5	Purificació.....	190
<b>5.5</b>	<b>Tècniques basades en la utilització d'ADN polimerases termoestables .....</b>	<b>192</b>
5.5.1	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>PCR</i> ).....	192
5.5.2	<i>RT-PCR</i> .....	194
5.5.3	Seqüenciació .....	195
<b>5.6</b>	<b>Identificació del lloc d'inserció del T-DNA dels mutants <i>rif</i>.....</b>	<b>195</b>
5.6.1	PCR inversa .....	196



## ÍNDEX

5.6.2	<i>Walking PCR</i> .....	198
<b>6</b>	<b>INFORMÀTICA</b> .....	<b>201</b>
6.1	Bioinformàtica .....	201
6.2	Ofimàtica.....	202
<b>7</b>	<b>OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS</b> .....	<b>202</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>207</b>

# INTRODUCCIÓ



## 1 Biosíntesis d'isoprenoides: generalitats

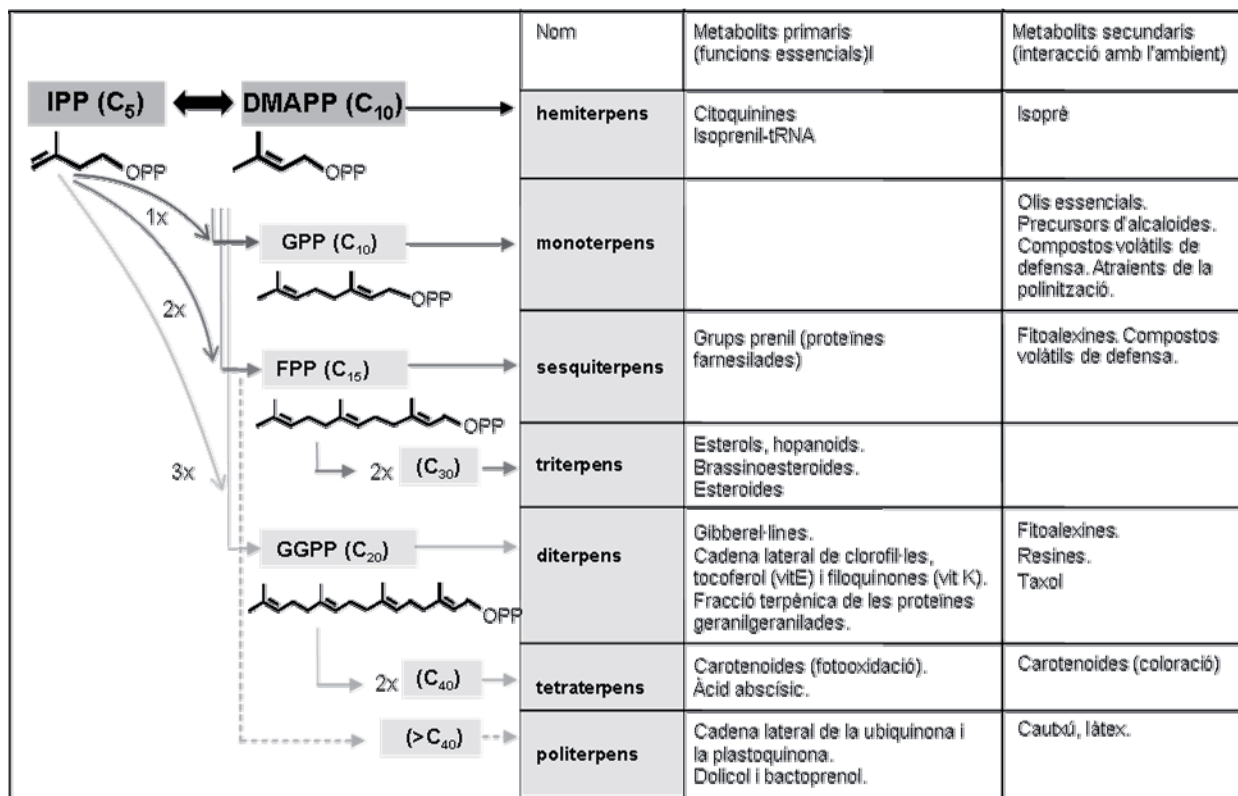
### 1.1 Els isoprenoides: varietat funcional

Els isoprenoides (o terpenoides) constitueixen la major família de productes naturals coneguda amb més de 30.000 compostos diferents identificats en (Croteau i col., 2000; Chapman i Hill 2000).

Els isoprenoides estan presents en tots els éssers vius duent a terme una gran varietat de funcions, moltes d'elles essencials pel creixement, el desenvolupament i la supervivència (McCaskill i Croteau 1998; Rohmer 1999a; Rodríguez-Concepción i Boronat 2002) (figura 1). Com a metabòlits primaris són importants pel manteniment de la fluïdesa de les membranes (funció duta a terme pels esterols en la majoria d'eucariotes i pels hopanoides en alguns eubacteris). També intervenen en processos de modificació posttraduccional de les proteïnes com la prenilació (grups prenil) i la glicosilació (dolicols). A més, formen part de les cadenes de transport electrònic (la cadena lateral dels tocoferols i de les quinones ubiquinona, plastoquinona i filoquinona és d'origen isoprenoide). D'altra banda, components essencials de l'aparell fotosintètic dels organismes fotoautotròfics com els carotenoides i la cadena lateral de les clorofil·les són isoprenoides. El carotenoide  $\beta$ -carotè, el precursor més important de la vitamina A, i altres vitamines com la E (tocoferol) i la K (filoquinona) són de naturalesa isoprenoide. Finalment, hormones importants en la regulació del desenvolupament com les hormones esteroides en els vertebrats, els brassinosteroides (BRs), l'àcid abscísic (ABA), les citoquinines (CKs) i les gibberel·lines (GAs) en les plantes, són també d'origen isoprenoide.

De totes maneres, el grup més abundant i divers d'isoprenoides és sintetitzat per les plantes i desenvolupen funcions com a metabolits secundaris importants per a les interaccions entre les plantes i entre les plantes i el seu entorn (figura 1). Per exemple, alguns mono-, sesqui- i diterpens desenvolupen funcions defensives contra patògens i herbívors, alguns monoterpens volàtils atrauen insectes per afavorir la polinització, i l'acumulació dels pigments carotenoides en flors i fruits atrau a animals per la polinització i la dispersió de les llavors (Croteau i col. 2000; Rodríguez-Concepción i Boronat 2002; Sauret-Gueto i col., 2003). Sovint aquests compostos són sintetitzats en òrgans concrets i en etapes molt determinades del desenvolupament i/o per grups específics de plantes. Molts d'aquests metabòlits secundaris de naturalesa isoprenoide tenen interès comercial com aromes, pigments, fibres, pegues o ceres (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002). D'altra banda, alguns tenen també aplicacions farmacèutiques com el cas concret del taxol, que és un potent antitumoral produït pels arbres de la família dels teixos, o en el seu conjunt els carotenoides i els tocoferols, que per les seves capacitats antioxidants ajuden a prevenir diferents tipus de càncer i malalties cardiovasculars.

Per la seva importància en el metabolisme de tots els éssers vius, i en especial de les plantes, i per les aplicacions comercials derivades de les seves propietats, l'estudi de les rutes biosintètiques dels isoprenoides i la seva regulació constitueix una àrea de gran interès.



**Figura 1.** Classificació estructural dels isoprenoides en funció del número d'àtoms de C necessaris per la seva biosíntesi ( $C_n$ ) i exemples d'isoprenoides amb funcions de metabòlits primaris o secundaris.

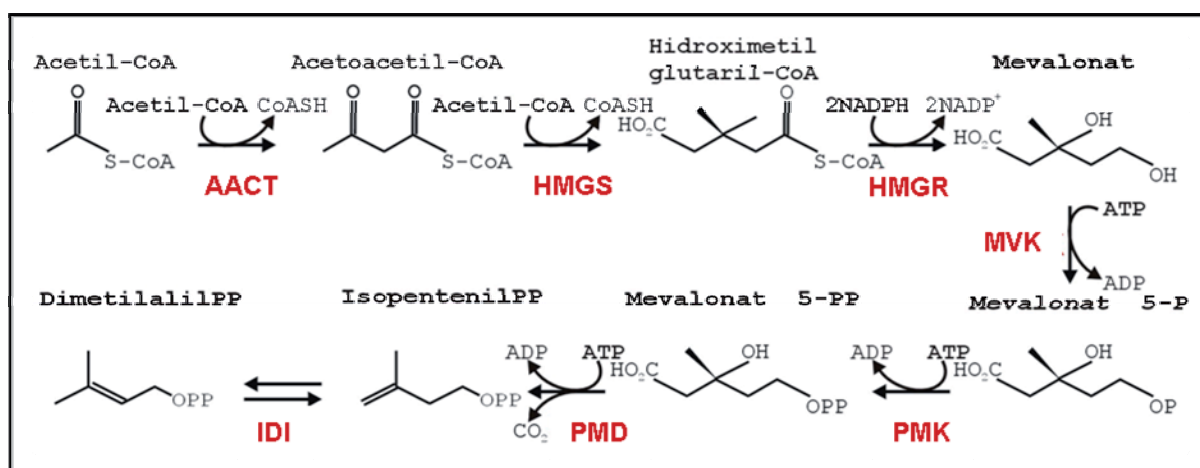
## 1.2 IPP i DMAPP: Precursors comuns de tots els isoprenoides

Tot i la gran diversitat funcional i estructural dels isoprenoides, tots ells deriven de les mateixes unitats de 5 àtoms de carboni ( $C_5$ ), l'isopentenil difosfat (IPP) i del seu isòmer al·lilic dimetilalil difosfat (DMAPP) (figura 1). A partir d'una primera condensació d'IPP amb DMAPP i per successives addicions d'IPP, les preniltansferases generen prenill difosfats de longitud creixent: geranil difosfat (GPP), farnesil difosfat (FPP) i geranilgeranil difosfat (GGPP), de 10, 15 i 20 àtoms de carboni respectivament (figura 1). Aquests prenill difosfats són substrats en reaccions de ciclació, isomerització, oxidació-reducció, substitució i conjugació per tal de generar la gran varietat d'isoprenoides finals, que poden classificar-se en funció del número d'unitats  $C_5$  (isoprè) que conformen l'esquelet bàsic de la molècula. Així, els hemiterpens deriven d'una unitat d'isoprè ( $C_5$ ), els monoterpens de 2 ( $C_{10}$ ), els sesquiterpens de 3 ( $C_{15}$ ), els diterpens de 4 ( $C_{20}$ ), els triterpens de 6 ( $C_{30}$ ) i els tetraterpens de 8 ( $C_{40}$ ). Finalment, els isoprenoides formats per més de 8 unitats isoprè, es denominen, col·lectivament, politerpens (figura 1). Els compostos que només contenen part de la seva molècula de naturalesa isoprenoide, com les clorofil·les, les citoquinines o les proteïnes prenillades, es denominen meroterpens.

### 1.3 Dues vies de síntesis d'IPP i DMAPP.

S'han descrit dues rutes biosintètiques per a la formació d'IPP i DMAPP.

La primera és la ruta clàssica o ruta del mevalonat (MVA) i es coneix des dels anys 50. En aquesta ruta les unitats C<sub>5</sub> es generen a partir d'acetil-CoA (figura 2). Així, la condensació seqüencial de 3 molècules d'acetil-CoA en dos passos enzimàtics forma successivament acetoacetil-CoA i 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA). Aquestes reaccions estan catalitzades pels enzims acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) i HMG-CoA sintasa (HMGS). A continuació, l'enzim HMG-CoA reductasa (HMGR) catalitza la reducció de l'HMG-CoA per tal de formar MVA. El MVA és el primer intermediari específic de la ruta, ja que el HMG-CoA és també intermediari de la ruta de degradació de l'aminoàcid leucina. Posteriorment el MVA és fosforilat per l'enzim MVA quinasa (MVK) a MVA 5-fosfat (MVA-P) i la fosforilació d'aquest per l'enzim MVA-P quinasa (PMK) forma MVA 5-difosfat (MVA-PP). La descarboxilació d'aquest intermediari per l'enzim MVA-PP descarboxilasa (PMD) forma IPP. En la ruta del MVA, el DMAPP es forma a partir d'IPP per l'acció de l'enzim IPP-DMAPP isomerasa (IDI).



**Figura 2.** Esquema de la biosíntesis d'IPP i DMAPP a través de la ruta del MVA. Les abreviatures corresponen als enzims: AACT, acetoacil-CoA tiolasa; HMGS, HMG-CoA sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa; MVK, mevalonat quinasa; PMK, mevalonat 5-fosfat quinasa; PMD, mevalonat 5-difosfat descarboxilasa; IDI, isopentenil difosfat-dimetilalil difosfat isomerasa.

La ruta del MVA es creia ubiqua en tots els organismes fins a principis dels anys 90, quan es va posar de manifest la existència d'una ruta alternativa de síntesis d'IPP i DMAPP en bacteries (Flesch i Rohmer 1988; Rohmer i col., 1993; Broers 1994a; Rohmer i col., 1996), algues verdes (Schwender i col., 1996) i plantes (Schwarz 1994). Aquest descobriment explicava els resultats contradictoris que s'havien obtingut quan s'estudiava la síntesis d'isoprenoides en plantes, la qual es localitza en tres compartiments diferents: el citosol, els mitocondris i els plàstids. Per un costat, no s'aconseguia localitzar els enzims de la ruta del MVA en els plàstids. A més, aquests orgànuls aïllats no eren capaços d'incorporar MVA però

## INTRODUCCIÓ

sí IPP. Per una altra banda, els carotenoides quasi bé no es marcaven al subministrar acetat o MVA marcats. A més, quan es bloquejava la ruta del MVA amb l'inhibidor específic de l'enzim HMGR mevinolina (MEV), s'inhibia la síntesis d'esterols (isoprenoides sintetitzats en el citosol) però no la de carotenoides i clorofil·les (isoprenoides plastídics). Aquests resultats s'interpretaven per una falta de permeabilitat dels plàstids al MVA i a la MEV. En canvi, el CO<sub>2</sub> fotosintètic i el piruvat marcats s'incorporaven ràpidament als isoprenoides plastídics. De totes maneres el descobriment d'aquesta nova ruta es va iniciar en certs eubacteris, al comprovar que en aquests, els hopanoides no se sintetitzaven a partir de la ruta del MVA (Flesch i Rohmer 1988; Rohmer i col. 1993). Així, marcatges clarament inconsistents amb la ruta del MVA, van ser observats també al estudiar la biosíntesi d'ubiquinona a *E. coli* (Broers 1994a) i la biosíntesi de ginkgòlids a *Ginkgo biloba* (Schwarz 1994). El descobriment de la ruta alternativa de síntesis d'IPP i DMAPP està revisat a Rodríguez-Concepción i Boronat (2002), Eisenreich i col.,(2004), Bouvier i col.,(2005) i Rohmer (2008). Aproximadament en 10 anys es va elucidar aquesta nova ruta de síntesi d'IPP que actualment es coneix com a ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP), per ser aquest el seu primer intermediari específic.

### 1.4 Elucidació de la ruta del MEP

La ràpida elucidació de la ruta del MEP es va realitzar fonamentalment gràcies al treball en bacteris (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002).

El primer pas de la ruta es va proposar a partir d'estudis de química orgànica i bioquímica. Els treballs de Rohmer i col. (1993), Broers (1994) i Schwarz (1994) suggerien que els substrats de la nova ruta fossin una unitat C<sub>2</sub> derivada de la descarboxilació del piruvat i una triosa fosfat, que es condensarien en una reacció tipus transcetolasa depenent del cofactor tiamina difosfat (TPP) per tal de formar 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat (DX5P). Posteriors experiments de marcatge van confirmar el piruvat i el gliceraldehid 3-fosfat (GAP) com els precursors de l'IPP en aquesta nova ruta (Rohmer i col. 1996) (figura 3). A més, es va confirmar que la 1-desoxi-D-xilulosa (DX) s'incorporava eficientment a la ubiquinona a *E. coli* (Broers 1994a) així com en isoprenoides de diversos eubacteris, d'algues verdes i de plàstids de les plantes (Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999a; Rodríguez-Concepción i Boronat 2002). A partir de la caracterització de la primera reacció de la ruta, la búsqueda de gens homòlegs a transcetolases va permetre la identificació del gen que codifica per a l'activitat DX5P sintasa (DXS) a *E. coli* (Sprenger i col., 1997; Lois i col., 1998) i a plantes (Lange i col., 1998). Així, el primer enzim de la ruta del MEP, la DXS, catalitza la condensació de hidroxietil-TPP derivat del piruvat amb GAP per formar DX5P, una molècula que també és precursora de les vitamines B1 (tiamina) i B6 (piridoxina) en bacteris i plàstids (Julliard i Douce 1991; Julliard 1992) (figura 3).

Per a la posterior formació d'IPP a partir de DX5P s'havia de produir un reordenament i una reducció de l'esquelet carbonat d'aquesta molècula i es va postular una reacció equivalent a la catalitzada per les reductoisomerases de cetoàcids implicades en la biosíntesi d'aminoàcids de cadena ramificada, que produirien MEP a partir de DX5P (Rohmer i col. 1996). Posteriors experiments van confirmar que el 2-C-metil-D-eritritol (ME) s'incorporava en productes isoprenoides a *E. coli* (Duvold 1997). A partir

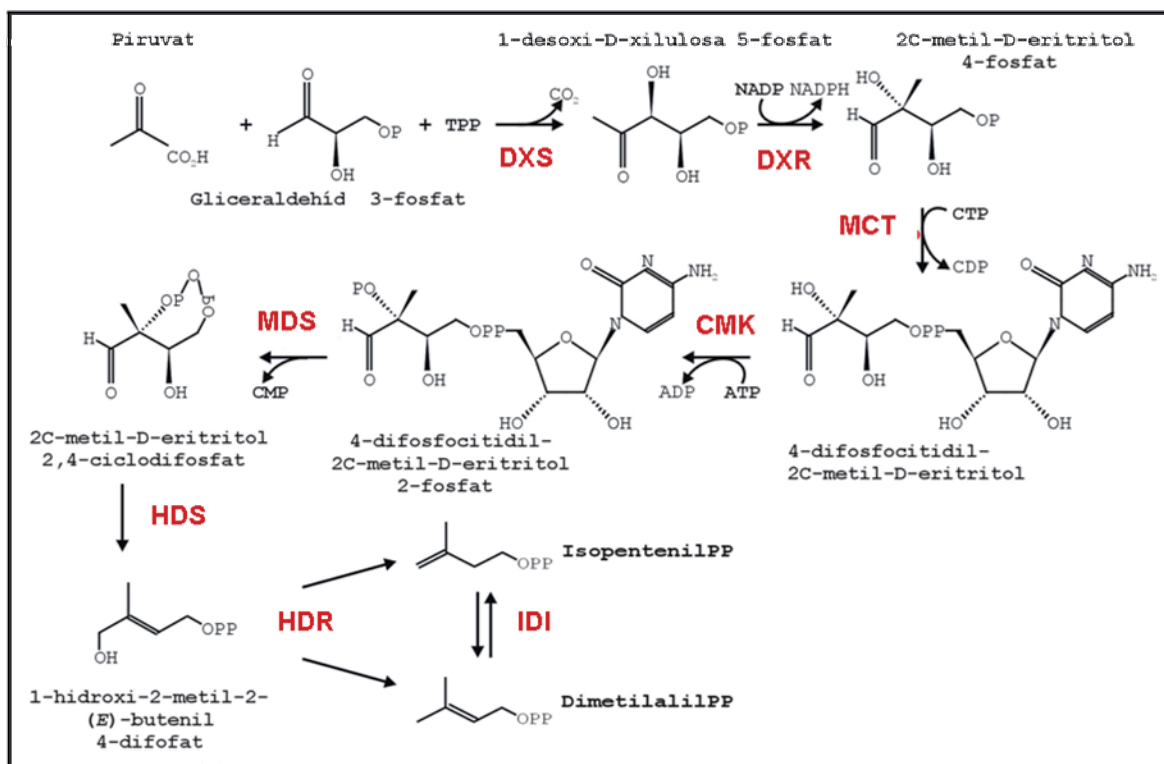
d'aquesta informació es va dissenyar una estratègia basada en soques d'*E. coli* auxotròfiques pel ME, que va permetre identificar el gen que codifica per a l'activitat DX5P reductoisomerasa (DXR). Es va demostrar que la DXR catalitza simultàniament la reorganització intramolecular i la reducció de la DX5P per formar MEP, el primer intermediari específic de la via (Kuzuyama i col., 1998; Takahashi i col., 1998) (figura 3).

Els següents gens candidats de la ruta del MEP es van identificar mitjançant genòmica comparada. La estratègia consistia en identificar gens que estiguessin conservats en organismes que posseïen els gens *DXS* i *DXR* (eubacteris i plantes) i que estiguessin absents en organismes que no posseïen els dos primers gens de la ruta del MEP (arqueobactèris, fongs i animals). A més, els gens candidats de plantes havien de codificar per proteïnes que presentessin una extensió N-terminal amb característiques de pèptid de trànsit a plàstids tal com passava amb la *DXS* i la *DXR* (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002). D'aquesta manera es van identificar els gens *ygbP/ispD*, que codifica per l'enzim 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) sintasa (CMS) que sintetitza CDP-ME a partir de MEP i CTP (Rohdich i col., 1999), *yhbB/ispE* que codifica per una CDP-ME quinasa (CMK) capaç de fosforilar el CDP-ME per tal de produir CDP-ME 2-fosfat (CDP-MEP) (Luttgen i col., 2000), i *ygbB/ispF*, que codifica per l'enzim 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfat (ME-cPP) sintasa (MCS) que converteix el CDP-MEP en ME-cPP (Herz i col., 2000) (figura 3).

A principis del 2001, es van descobrir per anàlisis informàtics i genètics dos nous gens que codificaven per enzims de la ruta del MEP: *gcpE/ispG* (Altincicek i col., 2001b; Campos i col., 2001) i *lytB/ispH* (Cunningham i col., 2000; Altincicek i col., 2001a). Es va demostrar que els enzims codificats per aquests gens eren els últims enzims de la ruta. Així, GcpE transforma el ME-cPP en hidroximetilbutenil 4-difosfat (HMBPP) i correspon a l'enzim HMBPP sintasa (HDS) (Hecht i col., 2001; Seemann i col., 2002b; Seemann i col., 2002c; Wolff i col., 2002), mentre que la proteïna LytB és una HMBPP reductasa (HDR) que transforma l'HMBPP en una mescla d'IPP i DMAPP en una proporció de 5:1 (Hintz i col., 2001; Adam i col., 2002; Altincicek i col., 2002; Rohdich i col., 2002). D'aquesta manera es va completar l'elucidació de la ruta del MEP i la seqüència de reaccions per a la formació simultània d'IPP i DMAPP a partir de piruvat i GAP (figura 3).



## INTRODUCCIÓ

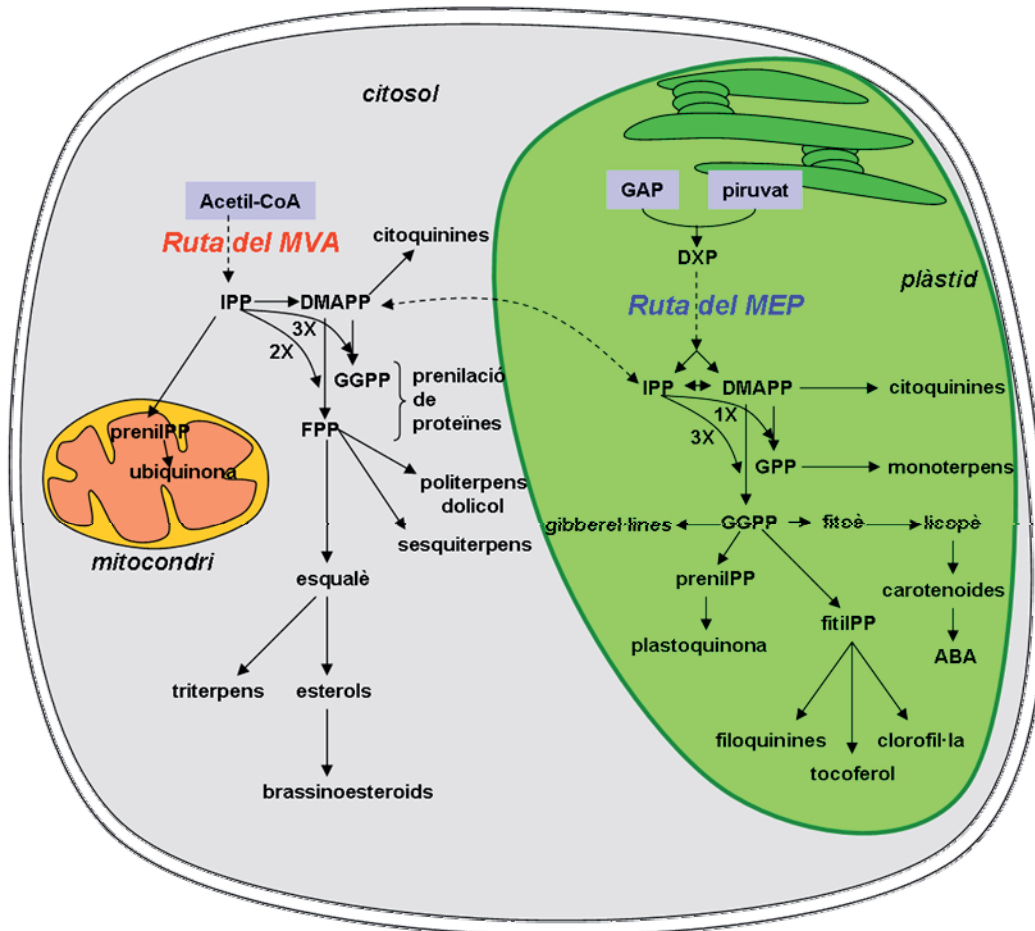


**Figura 3.** Esquema de la biosíntesis d'IPP i DMAPP a través de la ruta del MEP. Les abreviatures corresponen als enzims: DXS, 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfat sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfat reductoisomerasa; MCT, 2-C-Metil-Deritritol 4-fosfat citidiltransferassa; CMK, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa; MDS, 2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfat sintasa; HDS, hidroximetilbutenil 4-difosfat sintasa; HDR, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat reductasa; IDI, isopentenil difosfat-dimetilalil difosfat isomerasa.

### 1.5 Distribució diferencial de la ruta del MVA i la ruta del MEP

El descobriment de la ruta del MEP va obligar a revisar diversos aspectes relacionats amb la biosíntesi d'isoprenoides en els diferents grups d'organismes. Actualment se sap que la ruta del MVA i la ruta del MEP no estan presents en tots els organismes. Les arqueobacteries, alguns protozous, els fongs i els animals presenten la ruta del MVA com a única via de síntesi d'isoprenoides. En les eubacteries, els organismes amb major diversitat metabòlica, algunes presenten únicament la ruta del MVA i d'altres posseeixen les dues rutes. Tanmateix, la gran majoria d'eubacteries sintetitza les molècules isoprenoides exclusivament a partir de la ruta del MEP, com *E. coli* i les cianobacteries, els antecessors dels plàstids (Lichtenthaler i col., 1997; Lichtenthaler 1999; Lichtenthaler 2000; Eisenreich i col., 2001). La ruta del MEP també és l'única present en les algues verdes i en protozous com el paràsit de la malària *Plasmodium falciparum* (Lichtenthaler i col. 1997; Lichtenthaler 1999; Lichtenthaler i col., 2000; Eisenreich i col. 2001). Finalment, algunes algues, les molses, les falgueres i les plantes superiors es caracteritzen per la coexistència de les dues rutes de síntesi d'IPP i DMAPP separades en compartiments subcel·lulars diferents (Lichtenthaler i col. 1997; McCaskill i Croteau 1998; Lichtenthaler 1999; Lichtenthaler i col.

2000; Eisenreich i col. 2001). En aquests organismes, la ruta del MVA opera en el citosol-reticle endoplasmàtic (RE) i genera els precursors del conjunt d'isoprenoides citosòlics i també proporciona IPP per a la síntesi d'isoprenoides mitocondrials (Figura 4). D'altra banda, la ruta del MEP es troba en els plàstids i dona lloc al conjunt d'isoprenoides plastídics (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de les rutes de síntesi dels isoprenoides citosòlics i mitocondrials derivats de la ruta del MVA, i dels isoprenoides plastídics derivats de la ruta del MEP. Les abreviatures corresponen a: DX5P, 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfat; IPP, isopentenil difosfat; DMAPP, dimetilalil difosfat; GPP, geranil difosfat; GGPP, geranilgeranil difosfat; FPP, farnesil difosfat; ABA, àcid abscísic.

### 1.6 Inhibidors de la ruta del MEP

El fet que la ruta del MEP es trobi en la majoria d'eubacteries i en els plàstids de les plantes, i en canvi no es trobi en animals, la converteix en una nova i prometedora diana per al desenvolupament de nous antibiòtics i herbicides (Rodríguez-Concepción 2004). Així, el disseny d'inhibidors específics dels altament conservats enzims de la ruta del MEP, donaria lloc a herbicides i antibiòtics d'ampli espectre sense toxicitat per a l'home. De fet molts bacteris patògens humans com *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* o *Vibrio cholerae* sintetitzen els isoprenoides exclusivament a través de la ruta del MEP (Lichtenthaler i col. 2000; Eisenreich i col. 2001). A més s'ha demostrat que inhibidors de la ruta del MEP tenen activitat antimalàrica i inhibeixen el creixement del protozou *Plasmodium falciparum* en ratolins infectats (Jomaa i col., 1999).

Per al disseny d'inhibidors eficaços que tinguin com a diana la ruta del MEP és essencial conèixer en detall els enzims de la ruta, el seu mecanisme de reacció i els residus aminoacídics essencials per a la seva activitat. Actualment s'ha resolt l'estructura dels enzims DXS (Xiang i col., 2007), DXR (Reuter i col., 2002; Yajima i col., 2002; Steinbacher i col., 2003), MCT (Kemp i col., 2001; Richard i col., 2001; Kemp i col., 2003), CMK (Miallau i col., 2003; Wada i col., 2003) i MDS (Kemp i col., 2002; Lehmann i col., 2002; Richard i col., 2002; Steinbacher i col., 2002; Kishida i col., 2003; Kemp i col., 2005). Tanmateix, encara falta per resoldre l'estructura dels dos últims enzims de la ruta, HDS i HDR. Obtenir l'estructura d'aquestes dues últimes proteïnes és complicat per tractar-se de reductases amb un clúster 4Fe-4S sensibles a l'oxigen (Kollas i col., 2002; Seemann i col., 2002a; Wolff i col. 2002; Wolff i col., 2003; Gräwert i col., 2004; Seemann i col., 2005).

D'altra banda, per al desenvolupament d'antibiòtics eficaços de la ruta del MEP també és necessari conèixer si existeixen activitats que permetin superar un bloqueig enzimàtic de la ruta i en conseqüència permetre la supervivència dels bacteris malgrat la presència d'antibiòtics que la inhibeixin (Urós 2009).

## 2 Biosíntesi d'isoprenoides en plantes

Les plantes sintetitzen la majoria de compostos isoprenoides coneguts i aquests exerceixen funcions importants tant com a metabòlits primaris com a secundaris. Com ja s'ha comentat, a les cèl·lules vegetals coexisteixen la ruta del MVA i la ruta del MEP per a la síntesi d'isoprenoides, el qual és un fet destacable que no té lloc en cap altra ruta metabòlica principal. La raó de la persistència d'ambdues rutes pot deure's a l'enorme varietat d'isoprenoides formats per les plantes, la qual cosa podria requerir dues rutes separades amb enzims i intermediaris completament diferents per facilitar la seva regulació independent. La ruta del MVA opera en el citosol-RE, i proporciona IPP per a la síntesi d'isoprenoides citosòlics i mitocondrials, mentre que la ruta del MEP opera als plàstids i genera els isoprenoides plastídics. Així, es poden esperar mecanismes de regulació específics per a cada ruta i mecanismes de coordinació amb les rutes posteriors de síntesi d'isoprenoides finals de cada compartiment, així com

mecanismes que permetin la coordinació entre la ruta del MVA i la ruta del MEP per a la síntesi global de precursors isoprenoides.

La ràpida identificació de tots els gens de la ruta del MEP, fonamentalment en bacteris, va permetre desenvolupar estratègies de genòmica comparada per buscar els gens ortòlegs en plantes i actualment ja s'han identificat tots els gens en plantes com *Arabidopsis* (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002). En el moment d'iniciar aquesta tesi, els estudis sobre la regulació de la ruta del MEP, específicament els relacionats amb el control del flux metabòlic a través de la ruta i amb la coordinació de l'esmentada ruta amb posteriors rutes de síntesi d'isoprenoides finals eren en el seu conjunt molt escassos. També es desconeixia la regulació de l'intercanvi de prenil difosfats comuns derivats de la ruta del MVA o del MEP entre compartiments subcel·lulars, el qual s'ha descrit en diverses espècies de plantes des del principi del descobriment de la ruta del MEP (Lichtenthaler i col. 1997; McCaskill i Croteau 1998; Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999a; Eisenreich i col. 2001). Actualment s'ha avançat en el coneixement del control del flux d'intermediaris en la via del MEP a *Arabidopsis* i en altres espècies vegetals. A més, a partir de l'estudi de mutants de pèrdua de funció de gens de la ruta del MEP a *Arabidopsis*, s'ha confirmat el paper essencial d'aquesta ruta en el desenvolupament dels plàstids i en el desenvolupament de la planta (Mandel i col., 1996; Estevez i col., 2000; Budziszewski i col., 2001; Gutierrez-Nava i col., 2004). Tanmateix, els estudis dels mecanismes de regulació de l'esmentada ruta i de l'intercanvi de prenil difosfats continuen sent molt escassos.

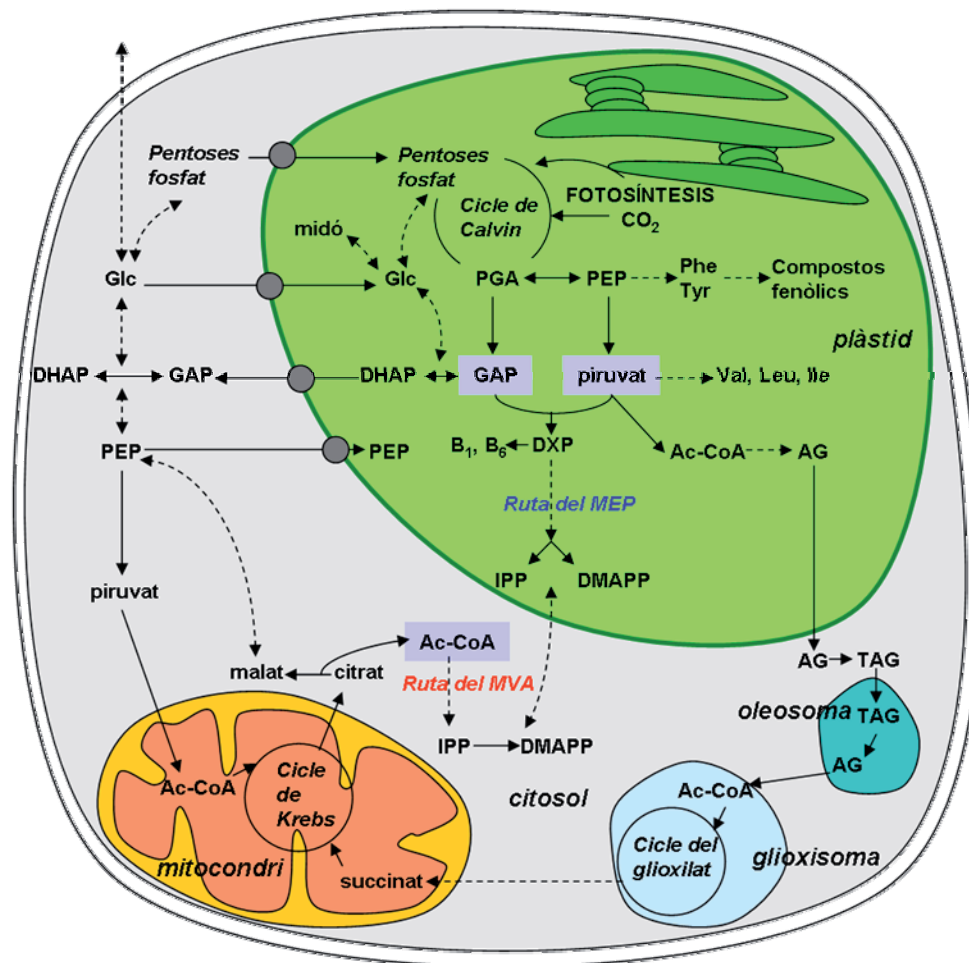
En els següents apartats es contextualitzarà la ruta del MVA i la ruta del MEP en relació amb els seus substrats i els isoprenoides finals que s'en deriven de cada una d'elles. També es resumiran els mecanismes de regulació coneguts de cada ruta, fent especial atenció en la ruta del MEP, objecte d'estudi d'aquesta tesi. Finalment, s'abordarà el coneixement actual sobre l'intercanvi de prenil difosfats entre compartiments subcel·lulars en plantes, i les conseqüències d'un bloqueig de la ruta del MVA o la ruta del MEP en plàntules d'*Arabidopsis*.

# INTRODUCCIÓ

## 2.1 La ruta del MVA en plantes

### 2.1.1 Origen dels substrats de la ruta del MVA

L'acetil-CoA és un intermediari de múltiples rutes metabòliques i en concret l'acetil-CoA citosòlic constitueix el precursor per a la formació de diferents metabòlits, entre els quals es troben els isoprenoides derivats de la ruta del MVA. L'acetil-CoA citosòlic es forma a partir de l'activitat ATP-citrat liasa, la qual sintetitza acetil-CoA i oxalacetat a partir de CoA i citrat provinent del cycle de Krebs al mitocondri (Oliver i col., 2009) (figura 5).



**Figura 5.** Esquema de les rutes metabòliques en les cèl·lules vegetals que es relacionen amb els precursors de la ruta del MVA (acetil-CoA) i de la ruta del MEP (piruvat i GAP). La importància de cada ruta depèn de la espècie vegetal, del tipus cel·lular i del seu estat metabòlic. Les abreviatures corresponen a: **Glc**, glucosa; **DHAP**, dihidroxiacetona 3-fosfat; **GAP**, gliceraldehid 3-fosfat; **PGA**, àcid 3-fosfoglicèric; **PEP**, fosfoenolpiruvat; **Ac-CoA**, acetil-CoA; **DXP**, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfat; **IPP**, isopentenil difosfat; **DMAPP**, dimetilalil difosfat; **AG**, àcids grassos; **TAG**, triacilglicèrids; **Phe**, fenilalanina; **Tyr**, tirosina; **Val**, valina, **Leu**, leucina; **Ile**, isoleucina.

## 2.1.2 Isoprenoides finals de la ruta del MVA

Els isoprenoides citosòlics i mitocondrials es formen a partir de precursors sintetitzats per la ruta del MVA (figura 4). A partir de la ciclació d'FPP es generen el conjunt de sesquiterpens i a partir de la ciclació de l'escualè (C<sub>30</sub>, per dimerització de dues molècules d'FPP), els esterols i els triterpens. Dels esterols deriven les hormones brassinoesteroides (BRs). D'altra banda, l'FPP i el GGPP s'utilitzen en les modificacions postraduccionals de prenilació de proteïnes. Així mateix, a partir de prenil difosfats de cadena llarga (>C<sub>40</sub>) es formen els dolícols (molècules necessàries per a la glicosilació de proteïnes) i els politerpens. Les hormones citoquinines són majoritàriament meroterpens que presenten una cadena lateral (trans-zeatina o cis-zeatina) derivada del DMAPP. L'origen de les unitats d'isoprè per a la síntesi de citoquinines és un tema controvertit però recents estudis apunten que la ruta del MVA genera la cis-zeatina (Kasahara i col., 2004). D'altra banda, l'IPP generat en el citosol és importat als mitocondris, on es generen prenil difosfats que donaran lloc a la cadena lateral de l'ubiquinona.

## 2.1.3 Regulació de la ruta del MVA

### 2.1.3.1 Control del flux metabòlic

El primer nivell de regulació de la ruta del MVA es troba en el control del flux d'intermediaris a través de la regulació de determinades etapes enzimàtiques de la via. En aquest sentit, l'enzim HMGR constitueix l'etapa més important en el control metabòlic de la ruta del MVA en plantes, tal com s'ha demostrat prèviament en animals i llevats (Goldstein i Brown 1990; Stermer i col., 1994; Chappell 1995; Schaller i col., 1995; Benveniste 2002). Segons la concepció clàssica de control metabòlic, l'HMGR correspondria a l'etapa limitant que controlaria el flux en la ruta del MVA (Thomas i Fell 1998). Es tracta d'un enzim que catalitza una reacció irreversible que sintetitza el primer intermediari específic de la ruta i que es troba regulat a múltiples nivells transcripcionals i postrcripcionals (Stermer i col. 1994; Benveniste 2002).

En plantes l'expressió dels gens que codifiquen per als enzims HMGR (gens *HMG*) així com l'activitat HMGR es regulen de forma diferencial en diferents teixits i en diferents estadis del desenvolupament. A més, responen a estímuls externs com la llum, ferida o infeccions, i a estímuls interns com hormones reguladores del creixement.

### 2.1.3.2 Regulació transcripcional

L'expressió dels gens *HMG* respon negativament a la llum. Per exemple, els nivells dels transcripts de *HMG* són significativament més grans en plàntules d'*Arabidopsis* crescudes en foscor que en plàntules crescudes en llum (Enjuto i col., 1994; Learned i Connolly 1997). Així mateix, en diferents teixits i diferents estadis del desenvolupament hi ha marcades diferències d'expressió en els gens que codifiquen per als enzims HMGR. Per exemple, en plantes adultes d'*Arabidopsis* els majors nivells d'expressió es troben en l'arrel (Enjuto i col. 1994). Al llarg del desenvolupament els nivells d'expressió dels gens *HMG* són majors en l'etapa de creixement d'un teixit i menors en el teixit madur (Stermer i col.

## INTRODUCCIÓ

1994). Per exemple, en el cas d'*Arabidopsis* l'expressió del gen *HMG1* en plantes crescudes en foscor és elevada en les fulles joves i disminueix progressivament a mesura que les fulles es desenvolupen (Learned i Connolly 1997). Tanmateix l'esmentada expressió és baixa a totes les fulles de plantes crescudes en llum contínua (Learned i Connolly 1997). Per tant, l'expressió del gen *HMG1* estaria regulada simultàniament per factors relacionats amb el desenvolupament i per condicions ambientals.

La importància de la regulació de l'expressió dels gens *HMG* en el control de la síntesi d'isoprenoides citosòlics s'ha posat de manifest en sobreexpressar el gen *HMG1*, o únicament la part del gen que codifica per al domini catalític de l'HMGR, en plantes transgèniques d'*Arabidopsis*. Comparades amb plantes silvestres, les esmentades plantes presenten major activitat HMGR, una major resistència a MEV, inhibidor de l'HMGR, i una major acumulació d'esterols (Re i col., 1995; González 2002; Manzano i col., 2004; Rodríguez-Concepción i col., 2004).

### 2.1.3.3 Regulació postranscripcional

Els mecanismes de regulació postranscripcional de la HMGR en mamífers inclouen l'estabilitat de l'mRNA, l'eficiència de traducció, la modificació de l'activitat de l'enzim per regulació al·lostèrica i per fosforilació, i la degradació proteolítica (Goldstein i Brown 1990). Entre els mecanismes de regulació postranscripcional de l'HMGR de plantes també s'inclouen la inactivació per fosforilació i la degradació proteolítica (Leivar 2003; Manzano 2004).

A més, també semblen existir mecanismes de *feed-back* en la ruta del MVA, com suggereix l'augment en la quantitat de proteïna i en l'activitat HMGR al tractar cèl·lules de tabac BY-2 amb l'inhibidor MEV (Hemmerlin i col., 2003).

### 2.1.3.4 Coordinació amb etapes posteriors a la ruta del MVA

L'expressió dels gens *HMG* i l'activitat enzimàtica HMGR també es regulen per mecanismes de *feed-back* relacionats amb els canvis en els nivells d'intermediaris de rutes posteriors a la ruta del MVA (Leivar 2003; Manzano 2004). Per exemple, en plantes transgèniques de tabac que sobreexpressen el cDNA de l'esterol metil transferasa (*SMT1*), implicat en la síntesi d'esterols, es redueixen els nivells de cicloartenol, intermediari de la ruta de síntesi d'esterols, i es produeix un augment en els nivells del transcrit de l'*HMG* i una major activitat HMGR (Wentzinger i col., 2002).

### 2.1.3.5 Famílies multigèniques i organització en canals metabòlics

Un altre mecanisme de regulació de la ruta del MVA és l'existència de famílies multigèniques que codifiquen per a diversos isoenzims en diferents passos de la ruta. D'aquesta forma, la síntesi d'isoprenoides pot regular-se a través de l'expressió dels diversos isogens així com de l'activitat i localització subcel·lular dels diferents isoenzims (Carretero-Paulet 2003; Leivar 2003; Manzano 2004). En el cas de l'HMGR d'*Arabidopsis* hi ha 2 gens (*HMG1* i *HMG2*) i 3 isoenzims (HMGR1L, HMGR1S i

HMGR2) (Enjuto i col. 1994; Enjuto 1995; Lumbreras i col., 1995). Mentre els nivells del mRNA que codifica per a l'isoenzim HMGR1S són elevats en totes les parts de la planta, els transcrits que codifiquen per als isoenzims HMGR1L i HMGR2 són baixos i només es detecten en plàntules, arrels i inflorescències (Enjuto i col. 1994; Lumbreras i col. 1995).

L'existència d'isoenzims en diferents passos de la ruta del MVA i l'expressió d'un subgrup d'ells en determinades situacions, va portar a proposar una regulació de la ruta del MVA basada en una organització en canals metabòlics, o metabolons (Chappell 1995). Segons aquest model, en el RE existirien agrupacions d'isoenzims, o metabolons, regulats independentment i dedicats a la síntesi d'un determinat grup d'isoprenoides. En aquest sentit, cal dir que els diferents isoenzims d'HMGR d'*Arabidopsis* presenten diferències en l'extrem N-terminal de la proteïna que determinen una diferent localització subcel·lular en el RE i en estructures associades (Leivar 2003; Leivar i col., 2005). Així, la segregació dels diferents isoenzims de l'HMGR a la membrana del RE podria ser l'origen d'una subcompartimentació en la producció del MVA que es destinaria a la síntesi de diferents grups d'isoprenoides.

## 2.2 La ruta del MEP en plantes

### 2.2.1 Origen dels substrats de la ruta del MEP

Els plàstids, i en especial els cloroplastes, duen a terme funcions essencials i moltes vies metabòliques estan exclusivament localitzades en aquests orgànuls. Per exemple, la fotosíntesi té lloc als cloroplastes. En el sistema endomembranós dels cloroplastes es troba la cadena de transport electrònic i en el lumen el conjunt d'enzims del cicle de Calvin que fixen  $\text{CO}_2$  i produeixen àcid 3-fosfoglicèric (PGA) i GAP, un dels substrats de la ruta del MEP (figura 4).

A més, a partir de GAP i del seu isòmer la dihidroxiacetona 3-fosfat (DHAP) es genera glucosa i, a partir d'aquesta, midó, que és la reserva de carbohidrats als plàstids de les plantes. Aquestes molècules també són exportades al citosol (a través del transportador de trioses fosfat/ fosfat, TPT) (Streatfield i col., 1999) on per la glicòlisis es metabolitzen a acetil-CoA o, per la gluconeogènesis, formen glucosa que s'exportarà a altres cèl·lules (figura 4). La glucosa del citosol també pot entrar als plàstids (a través del transportador de glucosa-6-fosfat/ fosfat, GPT) (Streatfield i col. 1999) per a la formació de midó o per entrar en la ruta de les pentoses fosfat (figura 4). La ruta de les pentoses fosfat als plastids també es pot nodrir directament amb pentoses fosfat del citosol ja que recentment s'ha descrit un transportador de xilulosa 5-fosfat en fulles d'*Arabidopsis* (Eicks i col., 2002).

A partir de PGA format en el cicle de Calvin, per la via de la glicòlisis s'obté fosfoenolpiruvat (PEP). El PEP al cloroplast també pot derivar de la degradació del midó. El PEP és un punt important de ramificació de diverses vies metabòliques (Lichtenthaler 1999) (figura 4). Així el PEP és el substrat de la via del shiquimat (que donarà lloc als aminoàcids aromàtics fenilalanina i tirosina, i composts fenòlics relacionats) i en la via de la glicòlisis genera primer piruvat (substrat per a la síntesi dels aminoàcids



## INTRODUCCIÓ

ramificats, valina, leucina i isoleucina, i substrat de la via del MEP) i a continuació acetyl-CoA (substrat per a la síntesi d'àcids grassos que seran transportats al citosol per generar triacilglicèrids).

El PEP generat en el citosol per la glicòlisis també pot entrar als plastids a través del transportador de PEP/ fosfat (PPT) (figura 4). Les plantes també presenten el cicle del glixilat, en el qual a partir de triacilglicèrids es poden obtenir esquelets carbonats del cicle de Krebs, els quals poden convertir-se en PEP i a través de la gluconeogènesis en glucosa. D'aquesta manera les plantes poden sintetitzar sucres a partir de lípids (figura 4). Això és important just després de la germinació i abans de l'establiment del metabolisme fotosintètic, període en el que la plàntula viu de les reserves acumulades en les llavors (les quals són en un 40% lípids en el cas d'*Arabidopsis*) (Eastmond i Graham 2001).

En resum, el piruvat i el GAP per a la síntesi d'IPP i DMAPP poden procedir o no de la fotosíntesi en funció del metabolisme del tipus cel·lular, de les condicions ambientals i de l'estadi de desenvolupament. Mentre que en els cloroplastes els substrats per a la ruta del MEP deriven de la fixació fotosintètica de CO<sub>2</sub>, en el cas de plàstids no fotosintètics han de derivar necessàriament d'altres precursors de C.

L'acoblament entre la fixació de C en la fotosíntesi i la ruta del MEP s'ha estudiat en relació amb la formació d'isoprè, el qual deriva del DMAPP format en la ruta del MEP i és un hemiterpè produït per les fulles fotosintètiques d'algunes plantes, en particular arbres (Schnitzler i col., 2004). Donat el seu ràpid marcatge a partir de CO<sub>2</sub> marcat, s'ha assumit que la producció d'isoprè està directament acoplada al procés de fotosíntesi (Affek i Yakir 2003) encara que diversos experiments han evidenciat un cert desacoblament entre els dos processos. Aquests experiments van posar de manifest l'existència d'una font alternativa de C a part del CO<sub>2</sub> per a la formació d'IPP i DMAPP, que va representar entre el 10- 30% de l'isoprè format i va ser més important en condicions de fotosíntesi limitada (Karl i col., 2002; Affek i Yakir 2003; Schnitzler i col. 2004). Aquests estudis es van realitzar a *Quercus agrifolia* i *Populus deltoide* (Karl i col. 2002), a *Myrtus communis*, *Rhamnus alaternus* i *Mucuna pruriens* (Affek i Yakir 2003), i a *Populus x canescens* (Schnitzler i col. 2004). En tots ells es va proposar que la font alternativa derivés d'equivalents de piruvat derivats del metabolisme citosòlic de la glucosa i incorporats com a PEP als cloroplastes. A més, Affek i Yakir (2003) van descartar que la font de C citosòlica provingués d'IPP/DMAPP sintetitzat per la ruta del MVA.

En relació amb l'entrada de PEP als plàstids, aquesta s'ha estudiat en el mutant *cue1* d'*Arabidopsis* defectiu pel transportador PPT i que presenta problemes en l'establiment del desenvolupament fotoautotròfic (Streatfield i col. 1999). El primer defecte metabòlic en aquest mutant és la reducció del flux a través de la ruta del shiquimat, la qual cosa provoca un desequilibri en la proporció entre aminoàcids no aromàtics i aromàtics, i una reducció en els compostos fenòlics derivats de la ruta del shiquimat, com les antocianines. A més es veu afectada la síntesi d'isoprenoides plastídics i, per tant, el mutant *cue1* presenta nivells reduïts de clorofil·les i carotenoides.

A part de l'origen divers del piruvat i el GAP per a la síntesi d'isoprenoides per la via del MEP, hi podria haver més substrats alternatius. Encara que en plantes no hi ha estudis que demostrin aquesta possibilitat, estudis amb la cianobacteria *Synechocystis* sp. (soca PCC6803) han posat de manifest que en aquest bacteri la síntesi d'IPP i DMAPP pot tenir lloc a partir de substrats diferents de piruvat i GAP (Ershov i col., 2002; Poliquin i col., 2004). Així, malgrat que *Synechocystis* presenta el conjunt de gens homòlegs de la ruta del MEP i que aquesta es reconeix com a essencial (Eisenreich i col. 2001; Poliquin i col. 2004), en condicions de creixement fotoautotròfic la síntesi d'isoprenoides s'estimula amb substrats de la ruta de les pentoses fosfat i no amb piruvat, DX5P o MEP (Ershov i col. 2002; Poliquin i col. 2004). A més, la síntesi d'isoprenoides no s'inhibeix amb FSM, un inhibidor de la DXR, (Ershov i col. 2002). D'aquesta manera s'ha proposat una ruta paral·lela a la del MEP en aquest organisme que permetria la síntesi d'algun intermediari d'aquesta ruta posterior al MEP (Ershov i col. 2002; Poliquin i col. 2004). Fins al moment aquest és l'únic organisme en el qual s'ha descrit la possibilitat d'entrades alternatives de substrats per a la síntesi d'intermediaris de la ruta del MEP.

## 2.2.2 Isoprenoides finals de la ruta del MEP

Els isoprenoides plastídics es formen a partir de precursors sintetitzats per la ruta del MEP (figura 5). La ciclació del GPP donarà lloc al conjunt de monoterpens i la del GGPP a les hormones gibberel·lines (GAs). La dimerització de dues molècules de GGPP origina el fitoè, a partir del qual es sintetitzen tots els carotenoides i derivats d'aquests, com l'hormona àcid abscísic (ABA). D'altra banda, a partir de GGPP es forma el fitil difosfat que és transferit a substrats de naturalesa no isoprenoide i així passa a formar part de les molècules de clorofil·la, tocoferol (vitamina E) i filoquinona (vitamina K). Així mateix, la plastoquinona presenta una cadena lateral derivada de prenil difosfats. La ruta del MEP també originaria la trans-zeatina de les citoquinines isoprenoides (Kasahara i col. 2004).

## 2.2.3 Regulació de la ruta del MEP

### 2.2.3.1 Control del flux metabòlic

Des del descobriment de la ruta del MEP, s'ha estudiat el paper de diversos enzims de la ruta en el control del flux d'intermediaris i els estudis duts a terme fins al moment apunten a que diferents enzims col·laboren en el control del flux metabòlic en la ruta del MEP (Botella-Pavia i col., 2004). Aquestes observacions estan d'acord amb les noves teories del control metabòlic que assenyalen que el control del flux en una ruta es reparteix en diferent grau entre diversos enzims i que a més, la distribució de l'esmentat control pot variar en diferents condicions (Thomas i Fell 1998).

Des de la identificació dels dos primers enzims de la ruta del MEP, ambdues van ser proposades com a punts potencials de control del flux metabòlic a través de la ruta. Així la DXS és el primer enzim de la ruta i catalitza una reacció irreversible, mentre que el segon enzim, la DXR, sintetitza en una reacció reversible el primer intermediari específic de la ruta del MEP. Tanmateix, els primers treballs en eubacteries van demostrar que l'activitat DXS però no la DXR, era limitant per a la síntesi d'isoprenoides (Harker i Bramley 1999; Kuzuyama i col., 2000; Miller i col., 2000). D'altra banda, una vegada elucidada

## INTRODUCCIÓ

la ruta del MEP, una de les diferències més destacables respecte de la ruta del MVA va resultar ser la síntesi simultània d'IPP i DMAPP en l'última etapa de la ruta, catalitzada per l'enzim HDR. Estudis de sobreexpressió del gen que codifica per a l'esmentat enzim a *E. coli* han evidenciat que també és limitant per a la síntesi d'isoprenoides (Cunningham i col. 2000). Aquests tres enzims de la ruta del MEP (DXS, DXR i HDR) també han estat els més estudiats en plantes pel que fa al seu paper en el control del flux metabòlic de la ruta.

Un abordatge per estudiar el control de DXS, DXR i HDR sobre la síntesi d'isoprenoides plastídics finals, ha consistit en la sobreexpressió dels corresponents cDNAs a *Arabidopsis*. Per a tots ells, els majors nivells d'expressió es van correlacionar amb una major acumulació d'isoprenoides plastídics finals (Estévez i col., 2001; Carretero-Paulet 2003; Botella-Pavia i col. 2004). Al contrari, tant en línies transgèniques antisentit de *DXS* (Estévez i col. 2001) com en línies transgèniques de sobreexpressió de *DXR* cosuprimides (Carretero-Paulet 2003) es va observar una disminució en l'acumulació d'isoprenoides plastídics finals. Així mateix, els fruits de plantes transgèniques de tomàquet que sobreexpressaven la *DXS* de *E. coli* sota un promotor específic de fruit, van acumular majors nivells de carotenoides (Enfissi i col., 2005). Estudis recents han demostrat que la sobreexpressió de *DXS* augmenta la producció de monoterpens en forma d'olis essencials a plantes d'espígol transgèniques (Munoz-Bertomeu i col., 2006) i incrementa els nivells de carotenoides en tubèrcles de patata transgènica (Morris i col., 2006), mentre que en plantes transgèniques de menta que sobreexpressaven la *DXR* es va estimular l'acumulació de monoterpens i en les que sobreexpressaven la versió antisentit es va suprimir l'esmentada acumulació (Mahmoud i Croteau 2001). Pel que fa a la *HDR*, es va observar que plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressaven constitutivament aquest enzim presentaven uns majors nivells de carotenoides, similars als observats amb les plantes transgèniques sobreexpressores de *DXS* (Botella-Pavia i col. 2004).

D'altra banda, quan plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressaven constitutivament la taxadiè sintasa del teix (TXS, primer enzim en la síntesi de taxol que cicla el GGPP per donar taxadiè; Wildung i Croteau 1996) es van creuar amb línies que sobreexpressaven els enzims *DXS*, *DXR* o *HDR*, les plàntules resultants van acumular nivells de taxadiè i de carotenoides significativament més grans que els observats en les plantes creuades amb el parental silvestre (Besumbes 2004; Besumbes i col., 2004; Botella-Pavia i col. 2004). Mentre l'augment de carotenoides va ser similar, les plàntules que sobreexpressaven *HDR*+*TXS* van acumular majors nivells de taxadiè que les *DXS*+*TXS* i aquestes, al seu torn, més que les *DXR*+*TXS*. Aquestes observacions semblaven indicar l'existència de mecanismes reguladors de la síntesi de carotenoides que impedeix avaluar la contribució de cada enzim al control del flux d'intermediaris de la ruta del MEP. Els resultats per al taxadiè, tanmateix, suggerien un paper predominant de la *HDR* en l'esmentat control, almenys en l'estadi de plàntula.

### 2.2.3.2 Regulació transcripcional

És d'esperar que en aquells teixits o etapes del desenvolupament en què es requereixi un major aport de precursors per a la síntesi d'isoprenoides plastídics finals sigui necessària una major activitat de la ruta del MEP, la qual cosa podria aconseguir-se amb una activació de l'expressió dels gens codificants

pels enzims de l'esmentada ruta. Pel que es refereix a l'expressió de gens de la ruta del MEP en diferents teixits, a *Arabidopsis* els gens *DXS* i *DXR* s'expressen en tots els teixits de la planta si bé els majors nivells d'expressió es troben en els teixits joves aeris (Estévez i col. 2001; Carretero-Paulet i col., 2002). A més durant el desenvolupament de les plàntules d'*Arabidopsis* es produeix un augment en l'expressió de tots els gens de la ruta del MEP en paral·lel a l'augment en la quantitat de clorofil·les i carotenoides (Guevara-Garcia i col., 2005). D'altra banda, tant en plantes de tomàquet (Lois i col., 2000) com de *Medicago truncatula* (Walter i col., 2002) el gen *DXS* presenta elevats nivells d'expressió en els teixits aeris, fulles incloses, tiges i inflorescències, i baixos nivells en les arrels, d'acord amb una funció relacionada amb la fotosíntesi de molts dels isoprenoides plastídics.

Un abordatge per a l'estudi del paper de *DXS*, *DXR* i *HDR* en el control del flux metabòlic ha consistit en l'anàlisi de l'expressió dels corresponents gens en processos de desenvolupament associats a una inducció en la síntesi d'isoprenoides plastídics (taula 1). En diferents sistemes, el pic en els nivells de transcrits de *DXS* que precedeix l'acumulació d'isoprenoides es produeix en els tipus cel·lulars encarregats de la síntesi dels esmentats productes. Aquest és el cas de les cèl·lules de les glàndules secretores de monoterpens de les fulles de menta (Lange i col. 1998), la capa externa de cèl·lules del pericarp del fruit de tomàquet, on es produeix la màxima acumulació de carotenoides (Lois i col. 2000), i en les parts de la flor d'*Antirrhinum majus* responsables de l'emissió d'isoprenoides volàtils (Dudareva i col., 2005). D'altra banda, en l'emissió de monoterpens i sesquiterpens volàtils per les flors d'*Antirrhinum majus*, l'expressió de *DXS* segueix un ritme circadià que es correlaciona amb el patró d'emissió dels esmentats isoprenoides (Dudareva i col. 2005). Respecte a l'expressió dels gens de la ruta del MEP en determinats tipus cel·lulars, es pot destacar la síntesi d'alcaloides indol monoterpénics en teixits de *Catharanthus roseus*, en els quals es va detectar l'expressió dels gens de la ruta del MEP, *DXS*, *DXR* i *MCS* en cèl·lules parenquimàtiques del floema intern, mentre que els gens que codifiquen per als següents enzims en la síntesi dels esmentats alcaloides s'expressaven a l'epidermis, fet que implicava la translocació d'intermediaris entre diferents tipus cel·lulars (Burlat i col., 2004).

D'altra banda, s'ha proposat també que l'activació de l'expressió de *DXR* estaria relacionada amb la disminució en els nivells d'algun intermediari de la ruta del MEP o de rutes posteriors, ja que tant en plàntules d'*Arabidopsis* crescudes en presència de FSM (inhibidor de la *DXR*) com en fruits de tomàquet tractats amb aquest inhibidor, es va produir un augment en els nivells del mRNA de la *DXR* (Rodríguez-Concepción i col., 2001; Carretero-Paulet 2003).

## INTRODUCCIÓ

Procés	Isoprenoides acumulats	DXS	DXR	HDR	Referència
Desetiolació ( <i>Arabidopsis</i> )	Clorofil·les i carotenoides	+	+	+	Mandel i col., 1996; Carretero-Paulet i col., 2002; Botella-Pavia i col., 2004.
Maduració del fruit (pebrot)	Carotenoides	+	?	?	Bouvier i col., 1998.
Maduració del fruit (tomàquet)	Carotenoides	+	-	+	Lois i col., 2000; Rodríguez-Compección i col., 2001; Botella-Pavia i col., 2004.
Producció d'olis essencials (menta)	Monoterpens volàtils	+	?	?	Lange i col., 1998.
Producció de volàtils ( <i>Antirrhinum majus</i> )	Monoterpens i sesquiterpens volàtils	+	+	?	Dudareva i col., 2005.
Micorrizació d'arrels (blat, arroç, blat de moro i civada)	Apocarotenoides	+	+	?	Walter i col., 2000; Walter i col., 2002; Hans i col., 2004.
Producció d'alcaloides (cultius de <i>Catharantus roseus</i> )	Alcaloides indol monoterpènics	+	+	?	Veau i col., 2000; Chahed i col., 2000.

**Taula 1.** Acumulació de trànscrips que codifiquen per DXS, DXR i HDR en processos de desenvolupament associats a una inducció en la síntesi d'isoprenoides plastídics

### 2.2.3.3 Regulació postranscripcional

A part del control transcripcional de l'expressió de gens de la ruta del MEP, hi pot haver mecanismes de control postranscripcional que afectin a la quantitat de proteïna o a l'activitat enzimàtica i que determinin el flux d'intermediaris en la ruta. És d'esperar que en aquells teixits amb un major requeriment d'activitat de la ruta del MEP, els nivells de les esmentades proteïnes siguin més elevats. Fins al moment s'ha estudiat l'acumulació de DXS, DXR, CMS, HDS i HDR en diferents treballs realitzats en *Arabidopsis* i que, en el seu conjunt, han mostrat que en la planta adulta les fulles presenten els nivells més elevats de les esmentades proteïnes i, al contrari, les arrels acumulen els nivells més baixos (Estevez i col. 2000; Carretero-Paulet i col. 2002; Gutierrez-Nava i col. 2004; Guevara-Garcia i col. 2005). A més, els nivells de la proteïna DXS en plàntules són elevats en comparació amb els seus nivells en diferents teixits de la planta adulta (Estévez i col. 2001).

Diverses observacions apunten a un control postranscripcional de la ruta del MEP. D'una banda, s'ha estudiat el nivell d'expressió dels gens de les rutes del MVA i del MEP en plàntules d'*Arabidopsis* crescudes en presència dels inhibidors MEV o FSM. La presència dels esmentats inhibidors va comportar canvis en els nivells dels isoprenoides finals clorofil·les, carotenoides i esterols que tanmateix, no es van correlacionar amb canvis d'expressió gènica. Aquest fet va permetre proposar l'existència de mecanismes de regulació postranscripcional tindrien un paper important en el control de la síntesi de precursors isoprenoides (Laule i col., 2003). D'altra banda, en el cas de la DXS, es va produir un augment en l'acumulació d'isoprenoides finals en les plantes transgèniques de sobreexpressió d'aquest enzim que no es correlacionava amb el nivell d'expressió de l'esmentat gen. Per explicar aquestes diferències es van proposar mecanismes de regulació postranscripcional com la regulació de la traducció o la modificació de la proteïna (Estévez i col. 2001).

A més, en plàntules d'*Arabidopsis* crescudes amb FSM (inhibidor de la DXR) al medi de cultiu, es va produir un augment de l'expressió del gen *DXR* i una major acumulació de proteïna DXR. Tanmateix, l'acumulació relativa de proteïna era major, el que suggeria l'existència de mecanismes de control postranscripcional que afectarien a la quantitat de proteïna DXR (Carretero-Paulet i col. 2002). D'altra banda en blat de moro, i per tal d'explicar una expressió del gen *DXR* major en fulles que en arrels micorrizades i en canvi una quantitat de proteïna DXR similar, es va proposar un recanvi de la proteïna DXR major en fulles que en arrels (Hans i col., 2004).

Recentment s'ha estudiat l'acumulació dels transcrits de tots els gens de la ruta del MEP, així com els nivells de les corresponents proteïnes en plàntules d'*Arabidopsis* i s'ha vist que en plàntules mutants nul·les per a l'enzim HDR els nivells de la proteïna DXS augmenten malgrat que els nivells de tots els transcrits de la ruta del MEP disminueixen respecte de les plàntules silvestres (Guevara-Garcia i col. 2005). L'esmentat augment en la quantitat del primer enzim de la ruta del MEP, es va repetir en plàntules mutants nul·les per a DXR, CMS i HDS, però no en plàntules mutants afectades en el desenvolupament plastídic no relacionades amb la ruta del MEP, de manera que l'augment en els nivells de DXS no es podia considerar com una resposta general a un bloqueig en el desenvolupament dels plàstids. També es van estudiar els nivells de transcrits i proteïnes de la ruta del MEP al llarg del desenvolupament de plàntules silvestres, i es va trobar una falta de correlació que va ser especialment evident en el cas de DXS, ja que als 3 dies es produïa la major acumulació de la corresponent proteïna, mentre els transcrits *DXS* presentaven el nivell més baix. Tot això es va interpretar com l'existència de mecanismes de regulació postranscripcional que regularien els nivells de la proteïna DXS al principi del desenvolupament en plàntules d'*Arabidopsis*. L'esmentada regulació postranscripcional també semblava explicar l'augment en els nivells de proteïna DXS sense un augment en els corresponents transcrits quan es traspassaven plàntules d'*Arabidopsis* a un medi amb l'inhibidor FSM (Guevara-Garcia i col. 2005). Tanmateix, en l'esmentat experiment amb FSM no es va detectar un augment en els nivells de la proteïna DXR, contràriament al reportat anteriorment (Carretero-Paulet i col. 2002). Per explicar el conjunt d'observacions, Guevara-García i col., (2005) van proposar que la regulació postranscripcional de la ruta del MEP, o almenys de la DXS, seria deguda a una disminució en els nivells d'IPP i/o DMAPP o de metabolits posteriors de la síntesi d'isoprenoides.

També s'ha posat de manifest l'existència d'un control sobre la ruta del MEP per part dels plàstids a través de proteïnes codificades per gens del plastoma que regularien post-transcripcionalment l'acumulació d'enzims d'aquesta ruta. Així doncs, mutants afectats en la síntesi de proteïnes codificades pel plastoma, mostren una sobreacumulació d'enzims claus de la ruta del MEP com són DXS, DXR, HDS i HDR (Sauret-Gueto i col., 2006). Més concretament, s'ha postulat un important paper del complex plastídic Clp, les subunitats del qual estan codificades pel plastoma, sobre el control de la degradació de les proteïnes DXS i DXR. Una menor activitat d'aquest complex es tradueix en un augment dels nivells de DXS i DXR (Flores-Perez i col., 2008). D'aquesta manera els plastids tindrien la capacitat de modificar el fluxe de la ruta del MEP en funció de les seves necessitats.

## INTRODUCCIÓ

També s'han proposat mecanismes de regulació de l'activitat enzimàtica per a la ruta del MEP. Així, estudis recents sobre la regulació de la ruta del MEP durant l'emissió d'isoprè a *Eucalyptus globulus*, van evidenciar que el subministrament de DX exògena desplaçava la font de carboni endògena (DX5P) per a la síntesi d'isoprè sense incrementar la taxa d'emissió (Wolfertz i col., 2004). Per explicar aquests resultats es va proposar l'existència d'un mecanisme de *feed-back* de control de la DXS a partir de DX5P, DMAPP o altres intermediaris de la ruta del MEP, que modularien l'activitat DXS per mantenir constant l'aport de DMAPP per a la síntesi d'isoprè. Una regulació *feed-back* de la ruta del MEP també s'ha proposat en estudis de cristal·lització de la proteïna MDS d'*E. coli* a partir de l'observació que aquest enzim uneix IPP o DMAPP, GPP i FPP en una proporció 1:4:2, de manera que metabòlits sintetitzats en passos posteriors podrien regular la seva activitat (Kemp i col. 2005).

L'activitat d'alguns enzims de la ruta del MEP com DXR, HDS i HDR, podria estar regulada per la llum a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina (F/T) (Balmer i col., 2003; Lemaire i col., 2004). Els electrons de la ferredoxina reduïda a la cadena de transport electrònic, són transferits a la tiorredoxina a través de l'enzim F/T reductasa. El sistema F/T constitueix un pont entre la llum i l'activació enzimàtica ja que quan té lloc la fotosíntesi, les tiorredoxines es redueixen i regulen l'activitat de proteïnes diana a través de la reducció de determinats ponts disulfur. Entre les proteïnes activades per aquest sistema es troben proteïnes relacionades amb la fotosíntesi com les del cicle de Calvin. En estudis realitzats per trobar possibles noves dianes del sistema F/T es van identificar les proteïnes DXR i HDS a partir de proteïnes de l'estroma de cloroplastes d'espinaç (Balmer i col. 2003) i HDR a partir de proteïnes de cultius de l'alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemaire i col. 2004). Les proteïnes que siguin diana del sistema F/T presenten una sèrie de cisteïnes (Cys) conservades. HDS i HDR presenten Cys conservades tant en plantes com en bacteris (Cunningham i col. 2000; Hecht i col. 2001; Adam i col. 2002; Querol i col., 2002; Botella-Pavia i col. 2004; Seemann i col. 2005). DXR també presenta una sèrie de Cys conservades en plantes (Rodríguez-Concepción i col. 2001; Carretero-Paulet 2003), que tanmateix no estan conservades en bacteris (Takahashi i col. 1998; Lange i Croteau 1999; Schwender i col., 1999; Carretero-Paulet 2003). Aquest fet es podria explicar per l'observació que molts enzims cloroplastídics regulats pel sistema F/T presenten Cys addicionals conservades en comparació als enzims homòlegs d'organismes no fotosintètics (Lemaire i col. 2004). Així, l'activació de la ruta del MEP per reducció a través del sistema F/T seria específica dels organismes fotosintètics i afegiria un punt més de complexitat a la seva regulació, vinculant-la al procés fotosintètic.

### 2.2.3.4 Coordinació amb etapes posteriors a la ruta del MEP

La ruta del MEP s'ha de coordinar amb les posteriors rutes de síntesi d'isoprenoides finals per assegurar el correcte subministrament de precursors quan siguin necessaris en cada ruta.

D'una banda, l'augment del subministrament de precursors sintetitzats per la ruta del MEP ha evidenciat punts de control posteriors que determinen l'augment en els nivells d'isoprenoides finals. Així, en plàntules transgèniques d'*Arabidopsis* de sobreexpressió d'*HDR* semblava produir-se, respecte a plàntules silvestres, un augment relatiu en els nivells d'IPP i DMAPP més gran que el de carotenoides,

indicant l'existència de mecanismes reguladors de la síntesi de carotenoides (Botella-Pavia i col. 2004). A més, la sobreexpressió del gen *DXS* a *Arabidopsis* va resultar en un major augment relatiu en la quantitat d'ABA que en la de carotenoides, indicant una regulació diferencial en funció de l'isoprenoide final (Estévez i col. 2001).

Potser l'exemple més espectacular de l'efecte que pot ocasionar la desregulació entre l'aport de precursors i la síntesi de productes finals és la generació de plantes pàl·lides i nanes de tomàquet per sobreexpressió de l'enzim fitoè sintasa (PSY), el primer enzim específic de la síntesi de carotenoides i el pas limitant d'aquesta ruta. La desviació de precursors cap a la síntesi de carotenoides en aquestes plantes transgèniques va ocasionar un menor aport dels mateixos per a la síntesi de clorofil·les i GAs, fet que va generar els efectes secundaris comentats (Fray i col., 1995). De fet, estudis en tomàquet han demostrat que durant l'acumulació de carotenoides en el procés de maduració del fruit, l'expressió dels gens *DXS* i *PSY* augmenta coordinadament (Lois i col. 2000; Rodríguez-Concepción i col. 2001). En aquesta coordinació entre la ruta del MEP i la ruta de la carotenogènesi podria jugar un paper important el producte de la *DXS*, ja que s'ha observat que un augment en els nivells de *DX* activa el procés de maduració (Lois et al., 2000; Rodríguez-Concepción et al., 2001). Un altre procés en el qual s'ha observat una estreta coordinació entre les rutes de producció i consum d'IPP i DMAPP és la desetiolació, procés en el qual es produeix un gran augment en la síntesi de clorofil·les i carotenoides. De fet, a *Arabidopsis* els promotors dels gens *DXS* (Welsch i col., 2003) i *HDR* (Botella-Pavia i col. 2004) contenen un motiu descrit originalment al gen *PSY*, i que també està present en altres gens que codifiquen per a proteïnes implicades en la fotosíntesi, i que s'associa amb una regulació coordinada dels esmentats gens en el procés de formació dels complexos fotosintètics una vegada les plàntules s'exposen a la llum (Welsch i col. 2003).

### 2.2.3.5 Famílies multigèniques

Pel que es refereix a la possibilitat de regulació de la ruta del MEP per l'existència de diversos isoenzims en diferents passos de la ruta, assenyalar que en contrast amb la ruta del MVA els enzims de la ruta del MEP són codificats per un únic gen, a excepció de *DXS* en algunes espècies de plantes. A *Medicago truncatula*, blat de moro, tomàquet i tabac hi ha dos isogens *DXS* amb una expressió diferencial (Walter i col. 2002). Mentre els isogens de tipus I es relacionarien amb el metabolisme primari i s'expressarien en cloroplasts de teixits verds i en cromoplasts de fruits, els de tipus II es relacionarien amb el metabolisme secundari i s'expressarien en cromoplastes o gerontoplastes d'arrels micorrizades i en leucoplastes de cèl·lules de les glàndules dels tricomes de fulles que produeixen monoterpens i sesquiterpens volàtils (Walter i col. 2002). També pertanyen al grup II la *DXS* de cultius cel·lulars de *C. roseus*, que s'indueix en la síntesi d'alcaloides indol monoterpènics (Chahed i col., 2000), la *DXS* de *Tagetes erecta*, que s'expressa en pètals que produeixen carotenoides (Moehs i col., 2001) i la *DXS* de menta, present en els tricomes glandulars productors de monoterpens (Lange i col. 1998).

A *Arabidopsis* hi ha 3 gens codificants per a proteïnes amb homologia de seqüència a *DXS* (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002): *DXS1* (At4g15560), *DXS2* (At3g21500) i *DXS3* (At5g11380).



## INTRODUCCIÓ

El gen *DXS1* (també anomenat *CLAI*; Mandel i col., 1996) és l'únic pel qual s'ha demostrat la seva funcionalitat com a DXS (Estevez i col. 2000). Encara que els estudis d'homologia no permeten concloure que la proteïna DXS2 tingui activitat DXS (Walter i col. 2002), aquesta proteïna presenta un 73% d'identitat amb DXS1 i per això que es va considerar possible que catalitzés la mateixa reacció que DXS1. Sorprenentment, soques d'*E. coli* deficientes en l'activitat DXS van poder ser rescatades expressant el gen *DXS1* d'*Arabidopsis*, però no el *DXS2* (Carretero-Paulet 2003). De la mateixa manera, el fenotip del mutant d'*Arabidopsis chs5* de pèrdua de funció de DXS1 (Araki i col., 2000), es va poder revertir expressant el transgèn *35S::DXS1* però no el *35S::DXS2* (Carretero-Paulet 2003). Tot i que sembla que DXS2 no mostri activitat DXS, no s'han realitzat estudis exhaustius per confirmar aquest fet. D'altra banda, la divergència en la seqüència DXS3 respecte DXS1 també fa improbable que codifiqui per a una proteïna amb activitat DXS (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002; Carretero-Paulet 2003).

### 2.3 Intercanvi de prenil difosfats entre compartiments subcel·lulars

La ruta del MVA i la ruta del MEP coexisteixen a les cèl·lules vegetals, si bé en compartiments separats. Tanmateix, en algunes espècies s'ha posat de manifest un intercanvi limitat de prenil difosfats comuns entre els dos compartiments. Aquest intercanvi de precursors s'ha estimat per sota de l'1% en plantes intactes i en condicions fisiològiques (Eisenreich i col. 2001). Els primers experiments relacionats amb l'intercanvi estan recollits en les revisions de la síntesi d'isoprenoides de Lichtenthaler i col., (1997), McCaskill i Croteau (1998), Lichtenthaler (1999), Rohmer (1999a) i Eisenreich i col., (2001). Els nivells més elevats d'intercanvi s'han detectat en cultius cel·lulars en presència de DX o MVA exogen (Eisenreich i col. 2001). Tanmateix, concentracions elevades d'aquests precursors, que normalment no s'acumulen a les cèl·lules, podrien alterar les rutes i sobreestimar la seva contribució real en la producció d'un determinat isoprenoide (Rohmer 1999a). En aquest tipus d'estudi és preferible utilitzar precursors més "neutres" com la glucosa, ja que és un intermediari general que pot direccionar-se a tots els compartiments metabòlics de la cèl·lula (Schuhr i col., 2003). Tanmateix, en condicions de creixement normals, els organismes fotoautòtrofs requeririen CO<sub>2</sub> com a única font de carboni (Rohmer 1999a).

L'intercanvi entre les dues rutes s'ha demostrat, per exemple, en cultius de teixits no fotosintètics de *Ginkgo biloba* utilitzant MVA o glucosa marcats amb <sup>13</sup>C. En aquesta espècie, els derivats diterpènics del metabolisme secundari es van originar majoritàriament a partir de la ruta del MEP però entre 1-2% van tenir un origen mixt, amb 3 unitats derivades de la ruta del MVA i una de la ruta del MEP (Schwarz 1994). Un altre exemple és el dels sesquiterpens sintetitzats en les flors de camamilla. A partir de <sup>13</sup>C-glucosa o <sup>13</sup>C-DX les dues primeres unitats d'isoprè van ser marcades per la ruta del MEP i la tercera per la ruta del MEP o per la ruta del MVA (Adam i Zapp 1998; Adam i col., 1999). També s'ha descrit l'existència d'intercanvi en cultius no fotosintètics de cèl·lules de tabac BY-2 crescudes amb sacarosa (Hemmerlin i col. 2003). En aquest treball es va demostrar que inhibint la ruta del MVA amb MEV, la <sup>13</sup>C-DX s'incorporava en els esterols. De forma recíproca, en inhibir la ruta del MEP amb FSM i afegir <sup>13</sup>C-MVA, aquest s'incorporava a la cadena lateral de la plastoquinona. D'altra banda, en cultius cel·lulars verds de *Catharantus roseus* crescuts en presència de glucosa, la DX marcada amb <sup>13</sup>C es va incorporar eficientment al fitol i als carotenoides i també es va observar en menor percentatge marca en l'esterol

sitoesterol (6% relatiu al marcatge en el fitol i els carotenoides) (Arigoni i col., 1997). Més recentment s'ha quantificat l'intercanvi en aquests cultius cel·lulars, afegint glucosa o MVA marcats amb  $^{13}\text{C}$  i analitzant el marcatge en el sitoesterol, el carotenoide luteína i el fitol present en la clorofil·la (Schuhr i col. 2003). El  $^{13}\text{C}$ -MVA es va incorporar en un 48% a IPP i DMAPP per a la síntesi de sitoesterol i en un 7% per a la síntesi de luteína. En utilitzar  $^{13}\text{C}$ -glucosa, el 95% dels precursors per a la síntesi de sitoesterol van derivar de la ruta del MVA i el 5% de la ruta del MEP, mentre el fitol va derivar en un 40% de la ruta del MVA i en un 60% de la ruta del MEP. D'altra banda, s'ha posat de manifest que tant la ruta del MEP com la del MVA estan implicades en la síntesi de l'IPP utilitzat per produir el dolicol a *C.geoides*, on tindria lloc un transport d'IPP de la ruta del MVA cap a dins dels plàstids, i allà conjuntament amb l'IPP de la ruta del MEP formaria oligoprenilfosfats que posteriorment surtirien al citosol per tal d'acabar de formar la molècula de dolicol amb IPP provinent de la ruta del MVA (Skorupinska-Tudek i col., 2008).

Tenint en compte aquests resultats i els resultats de treballs anteriors, els autors van proposar que la contribució relativa de la ruta del MVA i del MEP depèn dels precursors subministrats i de l'isoprenoide final analitzat de forma que el nivell d'intercanvi dependria en gran manera de les condicions experimentals. S'ha suggerit que els paràmetres del flux metabòlic de cada ruta i de la taxa de transport entre membranes han d'estar subjectes a regulacions complexes que presumiblement es veuen afectades pel subministrament d'intermediaris exògens. Per això es va assenyalar que en una anàlisi quantitativa de l'intercanvi entre la ruta del MVA i la ruta del MEP, un simple model basat en dos compartiments és insuficient i han de tenir-se en compte mecanismes de regulació complexos.

L'intercanvi de precursors també ha estat demostrat a *Arabidopsis*. Així, Kasahara i col., (2002) van créixer el mutant *clal-1* (defectiu en l'activitat DXS; Estévez i col., 2000) en medi líquid suplementat amb sacarosa i van observar que en afegir  $^{13}\text{C}$ -DX al medi de cultiu l'ent-kaurè (precursor de la síntesi de GAs) es va marcar en un 85% i el campesterol en un 5%. De manera que es va produir un cert nivell d'intercanvi en el sentit plàstid-citosol. Per estudiar l'intercanvi en el sentit citosol-plàstid, es van créixer plàntules silvestres en medi líquid amb sacarosa i MEV, inhibidor de la ruta del MVA. En aquestes condicions van observar que en afegir  $^{13}\text{C}$ -MVA el campesterol es va marcar aproximadament en un 80% i l'ent-kaurè en un 5%. En aquests experiments la incorporació de precursors marcats va ser proporcional a la concentració de sacarosa en el medi de creixement.

L'intercanvi també s'ha estimat a partir de la capacitat dels precursors d'una ruta de rescatar el fenotip derivat del bloqueig de l'altra ruta. A Kasahara et al. (2002), el bloqueig del desenvolupament de les plàntules silvestres per la inhibició de la ruta del MVA amb MEV es va rescatar parcialment amb DX. En aquest experiment, també es va observar que altes concentracions de DX afectaven el desenvolupament normal de les plàntules d'*Arabidopsis*, indicant un possible paper tòxic d'aquesta molècula. Tanmateix, l'intercanvi en el sentit citosol-plàstid semblava menys efectiu, ja que mentre la DX exògena va rescatar la síntesi de clorofil·les i carotenoides en el mutant *clal-1*, el fenotip albi no es va poder revertir amb MVA (encara que va acumular una petita quantitat de pigments). Nagata i col., (2002) van estudiar de forma indirecta l'origen de les unitats isoprè a *clal-1* per la síntesi dels escassos

## INTRODUCCIÓ

isoprenoides plastídics que es sintetitzaven en afegir MVA en el medi de creixement. Efectivament, van confirmar que el mutant *clal-1* crescut en medi líquid amb sacarosa i MVA es va recuperar parcialment (mesurat per la recuperació de la fluorescència de la clorofil·la i per la formació de membranes tilacoidals als cloroplastes, i de cossos prolamel·lars i plastoglòbuls en els etioplasts). En canvi, en afegir MEV en el medi de creixement el fenotip de *clal-1* va ser encara més sever. Per això es va proposar que productes derivats del MVA serien els responsables del rescat parcial del fenotip causat pel bloqueig de la ruta del MEP. Un altre treball relacionat amb l'intercanvi de precursors a *Arabidopsis* és el de Laule i col. (2003) en el que s'estudia la interacció entre les dues vies quan aquestes s'inhibeixen amb MEV o amb FSM, a nivell metabòlic i a nivell transcripcional. A nivell metabòlic van quantificar els nivells de clorofil·les, carotenoides i esterols. Els resultats van mostrar que el tractament amb MEV provoca un descens inicial en els nivells d'esterols i un augment en els nivells de clorofil·les i carotenoides, amb una recuperació posterior dels nivells d'esterols. L'efecte en bloquejar la ruta del MEP amb FSM va ser el contrari, un descens inicial dels nivells de clorofil·les i carotenoides i un augment dels nivells d'esterols. Tanmateix, en aquest cas els nivells de clorofil·les i carotenoides no es van recuperar i els nivells de tots els metabòlits van acabar disminuint. Els autors van interpretar que el dèficit en una ruta s'intentava compensar activant el fluxe en l'altra ruta, encara que la capacitat d'intercanviar precursors semblava ser més eficient en el sentit plastid-citosol. Tanmateix, els canvis metabòlics no es traduïen en canvis a nivell transcripcional dels gens corresponents, de manera que es va proposar l'existència de mecanismes de regulació postranscripcional que tindrien un paper important en el control del fluxe de les rutes de síntesi d'isoprenoides.

En relació amb els mecanismes de regulació de l'intercanvi, recentment s'ha proposat que la llum podria regular-lo negativament (Rodríguez-Concepción i col. 2004). Es van estudiar mutants d'*Arabidopsis* hiposensibles a la llum per pèrdua de funció dels fitocroms, els fotoreceptors de llum vermella i vermella llunyana. Aquests mutants presenten un retard en el desenvolupament fotomorfogènic i així, les plàntules crescudes en llum presenten un hipocòtil allargat com les plàntules etiolades (crescudes en foscor) i un retard en la maduració dels cloroplastes. Es va observar que aquests mutants eren resistents a MEV degut a un augment de l'activitat HMGR (regulada negativament per la llum). Degut a que aquests mutants eren resistents a FSM es va proposar que aquesta resistència podria venir donada per l'import de prenil difosfats derivats de la ruta del MVA als plàstids, import que estaria activat en els esmentats mutants. Així, s'ha suggerit que l'intercanvi de precursors en el sentit citosol-plàstids tindria lloc en els etioplastes (plàstids de les plàntules etiolades no desenvolupats en cloroplastes) i es regularia negativament per la llum a partir de la transducció del senyal lluminós percebut pels fitocroms.

D'altra banda assenyalar que en determinades condicions ambientals, etapes del desenvolupament o en determinats tipus cel·lulars una de les dues rutes podria ser l'única responsable de la síntesi d'IPP i DMAPP. Així, en flors d'*Antirrhinum majus* la producció d'isoprenoides volàtils del metabolisme secundari, tant monoterpens (sintetitzats als plàstids) com sesquiterpens (sintetitzats en el citosol), depèn de l'aport de precursors formats per la ruta del MEP, mentre la ruta del MVA està bloquejada al nivell de l'HMGR (Dudareva i col. 2005). De manera que en les parts de les flors

responsables de la síntesi d'isoprenoides volàtils tindria lloc un intercanvi de precursors isoprenoides en el sentit plàstid-citosol (Dudareva i col. 2005).

En relació amb el sistema de transport de prenil difosfats entre el citosol i els plàstids, recentment s'ha descrit l'existència d'un transportador d'aquests precursors en la membrana dels cloroplastes d'espinaç (Bick i Lange, 2003). Sembla ser que es tractaria d'un transport unidireccional d'IPP i GPP en el sentit plàstid-citosol.

## 2.4 Bloqueig de la síntesi d'isoprenoides en plàntules d'*Arabidopsis*

Malgrat que existeixen evidències directes i indirectes sobre l'intercanvi de precursors isoprenoides entre la ruta del MVA i la ruta del MEP, aquest no sembla ser suficient per rescatar la síntesi d'isoprenoides després del bloqueig genètic o farmacològic d'una de les dues rutes en plantes d'*Arabidopsis*.

Aquests bloqueigs posen de manifest el paper essencial dels isoprenoides per al desenvolupament de les plantes. En el cas dels isoprenoides citosòlics i mitocondrials, el mutant *hmg1* de pèrdua de funció del gen *HMG1* presenta un fenotip pleiotròpic de nanisme, senescència prematura, infertilitat, menors nivells d'esterols que les plantes silvestres i una menor resistència a MEV (Suzuki i col., 2004). Els defectes en l'esmentat mutant poden rescatar-se subministrant esqualè, el precursor dels esterols i els triterpens, i no semblen ser deguts a una menor síntesi de les hormones CKs o BRs. En l'estadi de plàntula, el fenotip d'aquest mutant és el mateix que el de plàntules silvestres tractades amb baixes concentracions de l'inhibidor MEV. El fet que aquest mutant no sigui letal en l'estadi de plàntula i es pugui desenvolupar fins a una planta, fa suposar que al llarg del seu desenvolupament existeix una síntesi d'isoprenoides citosòlics derivats de l'expressió d'*HMG2* i/o de l'aport d'intermediaris des de la ruta del MEP (Suzuki i col. 2004). Tanmateix, aquest aport no seria suficient en plàntules silvestres tractades amb elevades concentracions de MEV. Així, quan es bloqueja la síntesi d'isoprenoides citosòlics amb MEV, les plàntules germinen i expandeixen els cotiledons però detenen el seu desenvolupament abans que apareguin el primer parell de fulles vertaderes i moren (Re i col. 1995; Kasahara i col., 2002; Rodríguez-Concepción i col. 2004). Aquest bloqueig se supera afegint MVA en el medi de creixement (Re i col. 1995; Kasahara i col. 2002) o incrementant l'activitat HMGR (Rodríguez-Concepción i col. 2004).

El paper fonamental de la biosíntesi d'isoprenoides plastídics, entre ells els pigments fotosintètics clorofil·les i carotenoides, es posa de relleu en mutants de pèrdua de funció de gens de la ruta del MEP. S'han identificat mutants nuls d'*Arabidopsis* per a DXS (Mandel i col. 1996; Estevez i col. 2000; Budziszewski i col. 2001; Estévez i col. 2001), DXR (Budziszewski i col. 2001), MCT (Budziszewski i col. 2001), HDS (Gutierrez-Nava i col. 2004) i HDR (Gutierrez-Nava i col. 2004; Guevara-Garcia i col. 2005). En tots ells les plàntules presenten un fenotip albi i un bloqueig en el desenvolupament. Així mateix, en tractar plàntules silvestres amb FSM els cotiledons es tornen albins i les plàntules detenen el

## INTRODUCCIÓ

seu desenvolupament (Zeidler i col., 1998; Okada i col., 2002; Laule i col. 2003; Rodríguez-Concepción i col. 2004).

**OBJECTIUS**



## OBJECTIUS

Les plantes sintetitzen la majoria de compostos isoprenoides coneguts i són dels pocs organismes en els que coexisteixen les dues rutes de síntesis d'IPP i DMAPP, la ruta del MVA i la ruta del MEP. Mentre que la ruta del MVA opera en el citosol-RE i genera els precursors dels isoprenoides citosòlics i mitocondrials, la ruta del MEP està localitzada en els plàstids i proporciona els precursors per la síntesi dels isoprenoides plastídics.

Degut al fet que la ruta del MEP vas ser elucidada fa relativament poc temps (menys de deu anys) encara existeix un gran desconeixement del mecanismes que controlen el flux metabòlic a través d'aquesta ruta metabòlica y del seu paper en la regulació de la biosíntesi d'isoprenoides en les plantes. Malgrat que s'han identificat els enzims que catalitzen les diferents etapes de la via del MEP en moltes espècies vegetals, falta demostrar l'activitat i avaluar la possible especialització funcional de les diferents isoformes d'alguns dels enzims d'aquesta ruta metabòlica. Aquest seria el cas de la DXS, un del principals enzims reguladors de la via del MEP. D'altra banda, existèixen evidències que senyalen l'important paper que podrien desenvolupar alguns intermediaris de la ruta del MEP en la regulació d'aquesta via metabòlica. A més, encara queden per conèixer molts dels mecanismes implicats en l'operació i regulació coordinada de les rutes del MEP i del MVA i, molt especialment, de l'intercanvi d'IPP (o altres prenifosfats) entre els plàstids i el citosol.

Per tal d'aprofundir en el coneixement i la comprensió dels diferents aspectes indicats anteriorment, en aquesta tesi s'han plantejat els següents objectius utilitzant la planta *Arabidopsis thaliana* com a sistema model:

1. Estudi de la proteïna DXS2 per determinar si correspon a una segona isoforma de la DXS i evaluar el seu possible paper en el creixement i desenvolupament de la planta.
2. Estudi del possible paper de la 1-Desoxi-D-xilulosa com a molècula senyal en la regulació de la síntesi d'isoprenoides i altres processos cel·lulars.
3. Anàlisi bioquímic i molecular de mutants resistents al bloqueig de la ruta del MEP amb fosmidomicina (un inhibidor específic de la DXR), amb l'interès d'identificar nous mecanismes de regulació de les rutes del MEP i del MVA i de l'intercanvi d'IPP (o altres prenifosfats) entre ambdúes vies metabòliques.





# RESULTATS



## 1 Anàlisi funcional de la isoforma DXS2 d'*Arabidopsis*.

L'enzim DXS catalitza la reacció que produeix DX5P a partir de GAP i piruvat. Un increment en l'activitat DXS a *Arabidopsis* es tradueix en un augment en el contingut d'isoprenoides plastídics, de manera que aquest enzim constitueix un punt clau de regulació de la ruta del MEP. *Arabidopsis* poseeix tres gens codificants per proteïnes amb similitud de seqüència a DXS, *DXS1*, *DXS2* i *DXS3* (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002; Carretero-Paulet 2003). L'existència de diferents isoformes d'un enzim constitueix un grau de complexitat important quan es pretén estudiar la regulació de les rutes metabòliques en les quals estàn implicades.

En el nostre laboratori es va demostrar que el gen *DXS1* codifica per una proteïna amb activitat DXS. La proteïna codificada pel gen *DXS2* presenta un 73% d'identitat amb *DXS1*, i és per aquest motiu que es va pensar que probablement també presentaria activitat DXS. Sorprenentment, resultats obtinguts en el nostre grup semblaven apuntar al contrari. Així doncs, soques d'*E. coli* deficientes en l'activitat DXS, i que poden ser rescatades expressant l'enzim *DXS1* d'*Arabidopsis*, no van poder ser rescatades expressant *DXS2*. Aquest fet indicava que *DXS2* no presenta activitat DXS a *E. coli* (Carretero-Paulet 2003).

Pel què fa a *Arabidopsis*, el mutant de *cla1-1* defectiu en *DXS1* presenta un fenotip albí letal que es pot rescatar afegint desoxixilulosa (DX) al medi de cultiu. Passa el mateix amb el mutant termosensible *chs5*, defectiu en *DXS1* quan creix a 14°C. En els dos casos, l'activitat endògena de l'enzim *DXS2* no pot rescatar la pèrdua de funció de l'enzim *DXS1*. És per això que es va estudiar l'expressió de *DXS2* en els diferents teixits d'*Arabidopsis*. Els resultats obtinguts tant per RT-PCR com per l'anàlisi de l'expressió del gen reporter *GUS* sota el control del promotor del gen *DXS2*, van indicar que *DXS2* s'expressa en tota la planta a uns nivells baixos, siguent més elevats en inflorescències i siliqües. Aquests baixos nivells d'expressió de *DXS2* podrien no ser suficients per rescatar els mutants *cla1-1* i *chs5*. Per tant, es van generar plantes transgèniques que expressessin *DXS2* sota el control del promotor CaMV35S en el mutant *chs5*. En aquest cas tampoc es va poder rescatar la deficiència de l'activitat DXS. Tot semblava indicar que *DXS2* tampoc tenia activitat DXS a *Arabidopsis* (Carretero-Paulet 2003).

Finalment, es va analitzar la localització subcel·lular de la proteïna *DXS2*. Els resultats obtinguts al bombardejar fulles d'*Arabidopsis* amb un plàsmid que expressava la proteïna quimèrica que incloïa el pèptid de trànsit de *DXS2* fusionat a la proteïna fluorescent verda GFP, van mostrar que la proteïna *DXS2* es dirigeix a uns orgànuls pigmentats però més petits que els cloroplastes i que podrien correspondre a plàstids pregranals (Carretero-Paulet 2003).

Davant la possibilitat que *DXS2* tingués activitat DXS a *Arabidopsis*, però no pogués complementar la pèrdua d'activitat de l'enzim *DXS1* pel fet que *DXS1* i *DXS2* es trobessin localitzades en orgànuls diferents, es va continuar amb l'estudi de l'activitat de la proteïna *DXS2*.

## RESULTATS

### 1.1 Complementació del mutant *chs5* amb DXS2

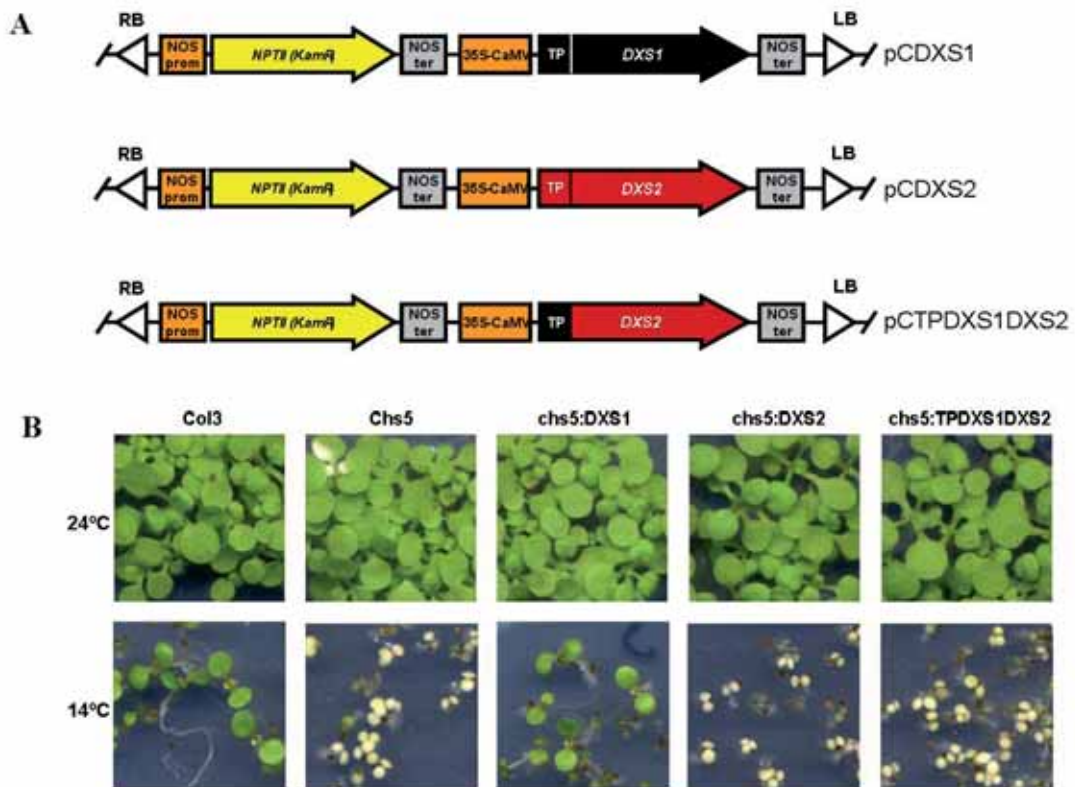
#### 1.1.1 Sobreexpressió i direccionament als cloroplastes de la proteïna DXS2 en el mutant *chs5*

La proteïna DXS2 localitza possiblement en els plàstids pregranals. Per tal de comprovar si la proteïna DXS2 tenia activitat DXS a *Arabidopsis*, es va utilitzar el mutant termosensible *chs5*, defectiu per la DXS1 a 14°C. La sobreexpressió de DXS2 en aquest mutant, no complementa la pèrdua de funció de DXS1 ja que les dues proteïnes podrien localitzar en òrgànuls diferents.

Així doncs, es va expressar el transgen 35S::DXS2 en el mutant *chs5*, però dirigint la proteïna al cloroplast a través de l'ús del pèptid de trànsit de la pròpia DXS1. És per això que en el cDNA de la DXS2 es va canviar la seqüència codificant pel pèptid de trànsit pel de la DXS1, i es va clonar en el vector pCAMBIA-1303 sota el control del promotor CaMV35S. Amb aquesta construcció, denominada pCTPDXS1DXS2 (Figura 1A; Materials i Mètodes, 5.1.1), es va transformar el mutant *chs5*. D'aquesta manera es van obtenir plantes transgèniques que sobreexpressaven i dirigien DXS2 als cloroplasts de la línia mutant.

#### 1.1.2 La sobreexpressió de DXS2 als cloroplasts no reverteix el fenotip del mutant *chs5*

El mutant *chs5* es desenvolupa de forma normal a 22-24°C. És a 14°C, quan l'enzim DXS1 perd l'activitat DXS, que la plàntula desenvolupa uns cotiledons albins i mor sense poder formar fulles verdaderes. La transformació del mutant amb la construcció pCTPDXS1DXS2 mitjançant el mètode d'infiltració *floral dip* (Materials i Mètodes, 4.1.2) va permetre obtenir dues línies transgèniques que es van anomenar *chs5*:TPDXS1DXS2-A i -B. Com es pot veure a la figura 1B, les plàntules es desenvolupen normalment a 24°C, i és a 14°C quan el mutant mostra un fenotip albi letal. Si bé les línies transgèniques que sobreexpressen DXS1 d'*Arabidopsis* poden revertir el fenotip del mutant, no és així en el cas de les línies transgèniques que sobreexpressen el gen *DXS2* d'*Arabidopsis*, ja sigui la versió de la proteïna silvestre, dirigida possiblement als plàstids pregranals o la direccionada als cloroplasts. Es pot concloure, doncs, que el gen *DXS2* d'*Arabidopsis* codifica una proteïna que no presenta activitat DXS a *Arabidopsis*.



**Figura 1.** Assajos de complementació del mutant *chs5* d'Arabidopsis. **(A)** Representació esquemàtica dels transgens utilitzats. **(B)** Plantes de les línies *Col3*, *chs5*, *chs5:DXS1*, *chs5:DXS2* i *chs5:TPDXS1DXS2* van ser crescudes a 24°C i 14°C en medi de germinació durant 10 i 15 dies respectivament.

## 1.2 Estudi de l'activitat de la proteïna DXS2 *in vitro*.

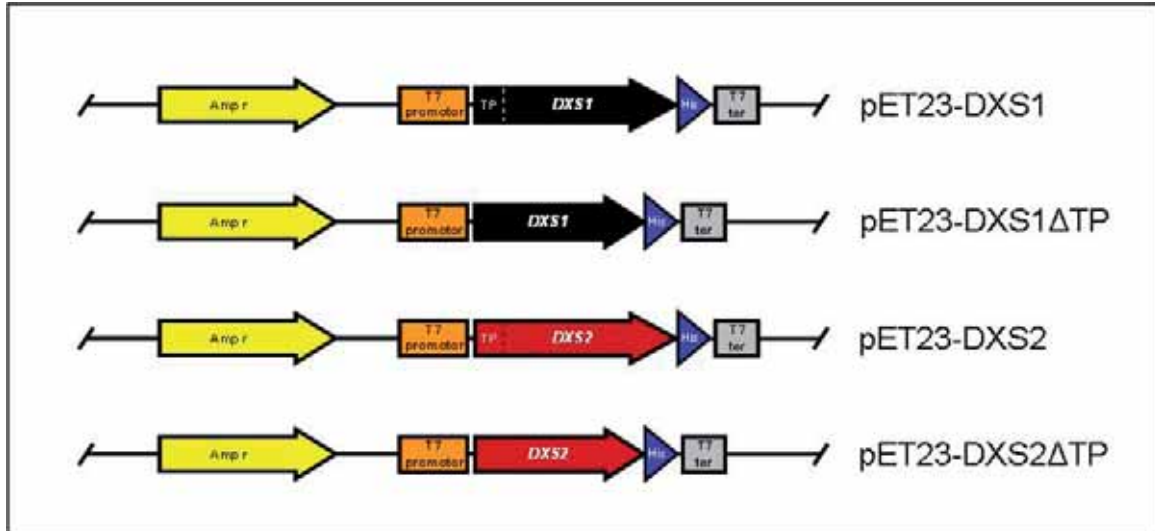
Per tal d'identificar la possible activitat de la proteïna DXS2 es va plantejar l'obtenció de proteïna DXS2 recombinant purificada i realitzar proves d'activitat *in vitro*. A més, tal com indiquen els resultats anteriors, si s'acabava conclouent que la DXS2 no té activitat DXS es podrien realitzar proves addicionals que permetessin identificar la possible activitat d'aquesta proteïna.

### 1.2.1 Expressió de les proteïnes DXS2 i DXS1 d'Arabidopsis a *E. coli*

Així doncs es va abordar l'expressió de la proteïna DXS2 a *E. coli*. Com a control positiu d'activitat DXS, es va expressar i purificar l'enzim DXS1. La regió codificant dels cDNAs de DXS1 i DXS2 es va clonar en el vector d'expressió pET23(+) sota el control del promotor T7. Aquest vector afegeix una cua C-terminal d'histidines (6xHis) que permet la purificació de les proteïnes expressades mitjançant cromatografia d'afinitat. Per cada un dels enzims, es van preparar dues versions, una amb la regió codificant del cDNA sencera, i l'altra que codificava per una versió truncada per l'extrem N-

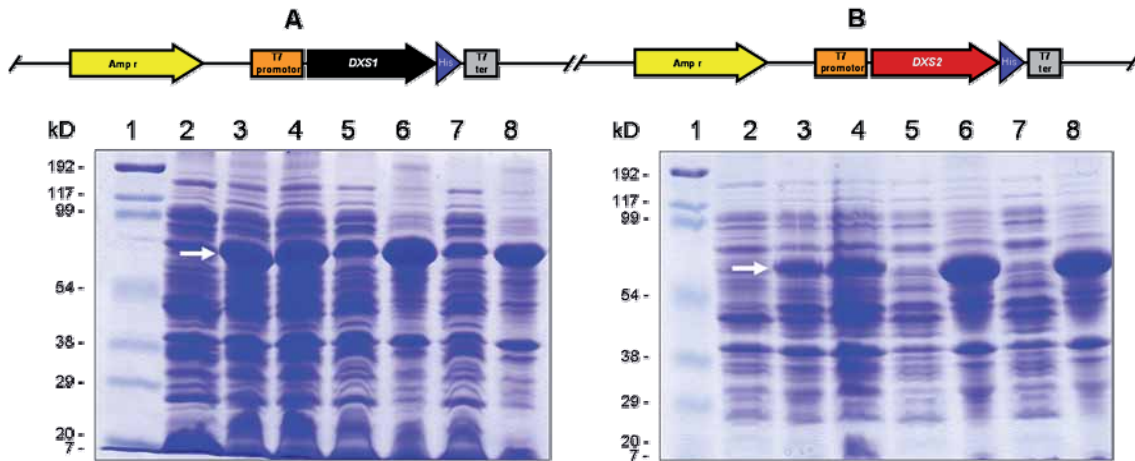
## RESULTATS

terminal que no contenia el pèptid de trànsit als plàstids. Està descrit que la presència del pèptid de trànsit pot disminuir la solubilitat de proteïnes plastídiques a *E. coli*. A més, la versió madura d'aquestes proteïnes no conté el pèptid de trànsit. Les construccions obtingudes es van denominar pET23-DXS1, pET23-DXS1 $\Delta$ TP (versió truncada) (Materials i Mètodes, 5.1.1), pET23-DXS2 i pET23-DXS2 $\Delta$ TP (versió truncada) (Pérez-Gil 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Representació esquemàtica de les construccions utilitzades per a l'expressió de les proteïnes DXS1 i DXS2 d'*Arabidopsis* a *E. coli*.

Aquestes construccions es van introduir a la soca d'*E. coli* BL-21(DE3)pLysS que conté integrat en el seu genoma el gen que codifica per la polimerassa del fag T7 i en la que s'han eliminat moltes proteases endògenes. A més, incorpora el plasmid pLysS que codifica per la lisozima de T7 la qual és inhibidora de l'acció de la T7 ARN polimerassa. Després d'induir amb 0,2 mM d'IPTG es va observar que després de 16h a 22° només la forma truncada de la proteïna DXS2 s'acumulava a nivells detectables (resultats no mostrats). Per tal de millorar els nivells d'expressió, les soques d'interès es van cotransformar amb el plàsmid pUBS520, que codifica per tRNAs inusuals a *E. coli*, ajudant a l'expressió de proteïnes heteròlogues amb codons inusuals. Aquesta modificació va resultar en un augment notable en els nivells d'expressió de les versions truncades però no de les proteïnes senceres. L'expressió d'aquestes proteïnes es va realitzar també en presència de 2,5 mM de tiamina, per afavorir la seva solubilització. Malgrat tot, només es va aconseguir una acumulació significativa de la versió truncada de la proteïna DXS1 en forma soluble (figura 3).

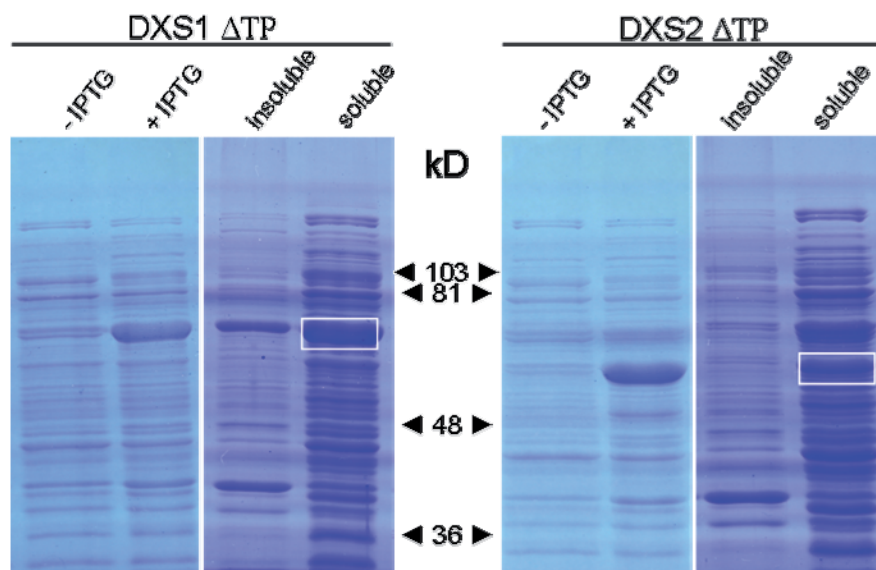


**Figura 3.** Assajos d'expressió de les proteïnes DXS1 i DXS2 d'Arabidopsis en la soca d'E. coli BL21 (DE3)pLys pUBS520. **(A)** Expressió de la versió sense el pèptid de trànsit de la proteïna DXS1. **(B)** Expressió de la versió sense el pèptid de trànsit de la proteïna DXS2. Es mostren els gels d' SDS-PAGE, amb els següents carrils: (1) Marcador de pes molecular; (2) mostra no induïda; (3) mostra induïda; (4) mostra induïda en presència de tiamina; (5) fracció soluble de l'extracció proteica després de la inducció; (6) fracció insoluble de l'extracció proteica després de la inducció; (7) fracció soluble de l'extracció proteica després de la inducció en presència de tiamina; (8) fracció insoluble de l'extracció proteica després de la inducció en presència de tiamina. La fletxa indica la proteïna d'interès.

Per tal d'intentar millorar l'expressió de DXS1 i DXS2 es van realitzar proves d'expressió a diferents temperatures i a diferents concentracions d'IPTG. D'aquesta forma es va establir que les condicions idònies per expressar les versions truncades de DXS1 i DXS2 eren la inducció amb IPTG a 0,01 mM durant 16h a 22°C. En la figura 4 es pot apreciar que en aquestes condicions s'obtenia una major solubilitat de les proteïnes recombinants.

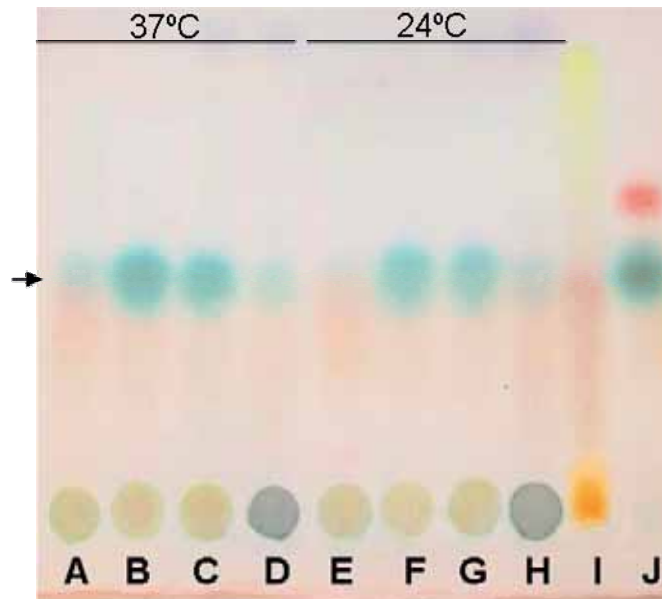


## RESULTATS



**Figura 4.** Optimització de les condicions d'expressió de les versions truncades de les proteïnes DXS1 i DXS2. Gels d' SDS-PAGE on es van carregar mostres proteiques no induïdes, induïdes amb 0,01 mM d'IPTG durant 16h a 22°C, la fracció soluble i la fracció insoluble. Experiments realitzats amb les soques BL21pLys pUBS520 pET23-DXS1ΔTP (DXS1ΔTP) i BL21pLys pUBS520 pET23-DXS2ΔTP (DXS2ΔTP). Els requadres mostren les proteïnes d'interès solubles.

Amb la fracció soluble d'aquests extractes es va procedir a realitzar proves d'activitat DXS *in vitro* normalitzant les diferents fraccions en relació a la quantitat de proteïna recombinant soluble. Després de 3 hores de reacció a 24° i a 37°, el resultat obtingut indica que la fracció que contenia la proteïna DXS1 recombinant era capaç de sintetitzar desoxixilulosa (DX) a partir de piruvat i D-gliceraldehid, mentre que la fracció que contenia DXS2 recombinant no. Tot i que en aquest últim cas, es pot apreciar que apareix una mínima quantitat de DX, aquesta és molt semblant a la que s'aprecia en el cas de l'extracte obtingut de la soca BL-21(DE3)pLysS pUBS520 utilitzada com a control negatiu, i es podria tractar de l'activitat de la DXS endògena d'aquesta soca (Figura 6).



**Figura 5.** Activitat DXS de les fraccions proteiques enriquides amb proteïna *DXS1ΔTP* i *DXS2ΔTP*. En la TLC, s'indica la posició de la DX (fletxa) corresponent a l'activitat DXS. (A, E) *BL21pLys* com a control negatiu; (B, F) *BL21pLys pET23-DXScoli* com a control positiu; (C, G) *BL21pLys pUBS520 pET23-DXS1ΔTP*; (D, H) *BL21pLys pUBS520 pET23-DXS2ΔTP*; (I) Tampó d'assaig de l'activitat DXS; (J), DX estandard.

### 1.2.2 Purificació de les proteïnes DXS2 i DXS1 d'*Arabidopsis*.

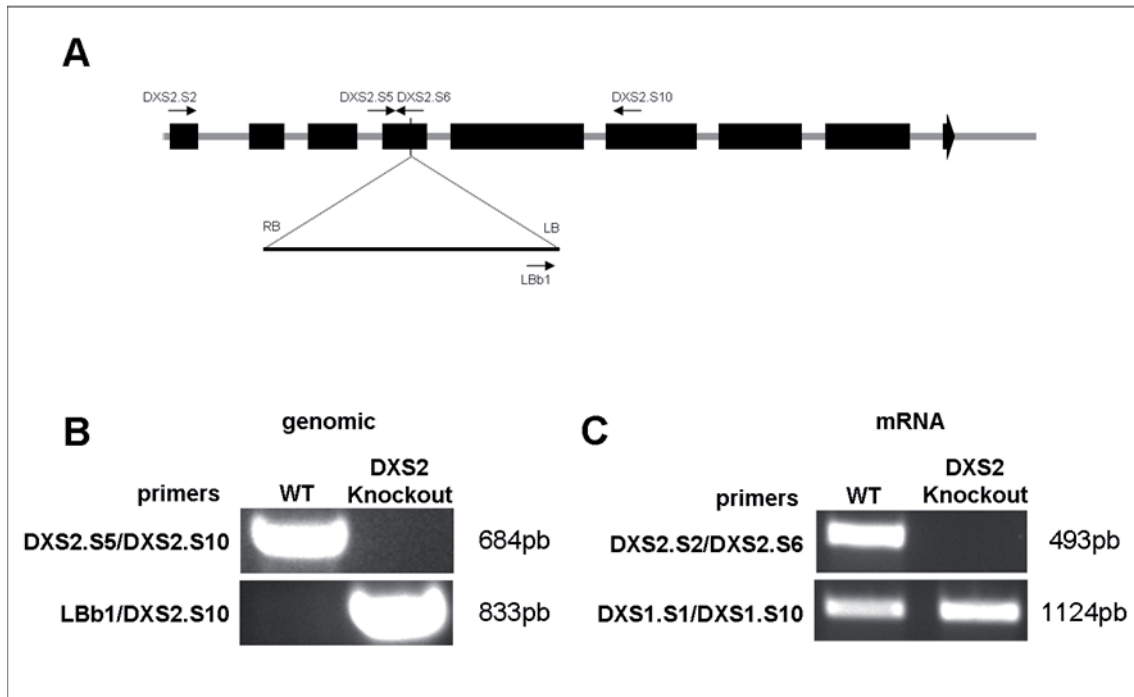
En les condicions d'expressió esmentades anteriorment es va procedir a purificar les dues proteïnes mitjançant cromatografia d'afinitat. Malauradament, només es va aconseguir amb èxit la purificació de la proteïna DXS1 truncada, mentre que la proteïna DXS2 no es va poder purificar i, per tant, no s'han pogut realitzar les proves d'activitat amb la proteïna DXS2 recombinant purificada..

### 1.3 Anàlisi del mutant de pèrdua de funció de DXS2

Els resultats mostrats anteriorment indiquen que el gen *DXS2* codifica per una proteïna que no té activitat DXS tot i presentar un 73% d'identitat amb la proteïna DXS1. D'altra banda posseeix un patró d'expressió ben definit, la qual cosa sembla indicar que podria desenvolupar alguna nova activitat. Per tal d'identificar la possible funció de la proteïna DXS2, es va caracteritzar un mutant de pèrdua de funció del gen que codifica per aquesta proteïna. Primerament es va identificar un mutant insercional del gen *DXS2* (SALK\_112762) a la col·lecció del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso et al., 2003) que es va obtenir a través del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant es va anomenar *dxs2-1*, i presenta una inserció del T-DNA a l'exó 4 del gen *DXS2* (Figura 6A).

## RESULTATS

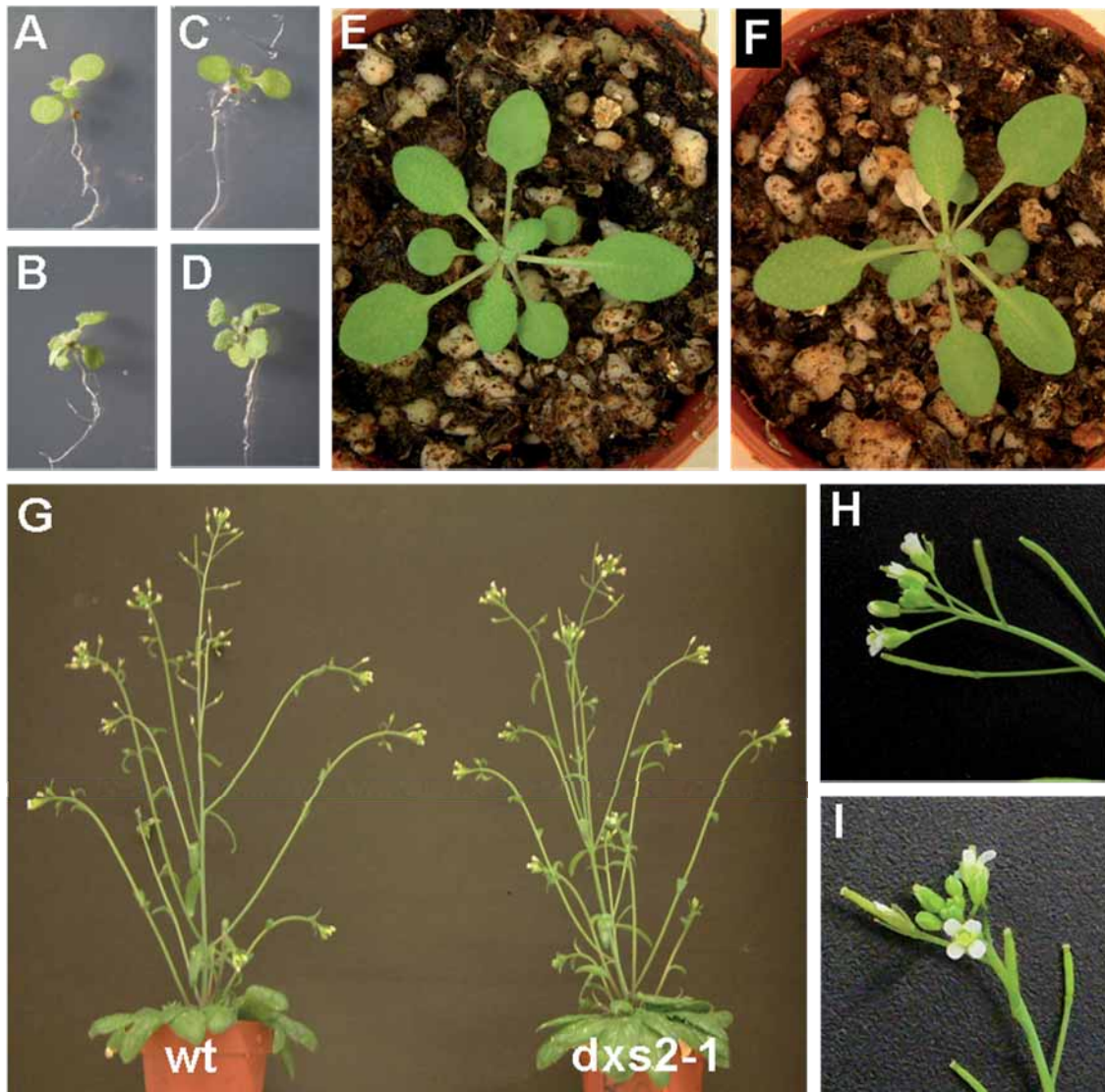
Es van cultivar plantes corresponents a la línia segregant del mutant *dxs2-1*. Aquestes plantes van ser genotipades per PCR, de manera que es van identificar individus que no presentaven la inserció en el gen *DXS2* (azigots), individus que presentaven la inserció en heterozigosi i individus homozigots per la inserció. Es va comprovar per RT-PCR que els individus homozigots no expressaven l'ARNm corresponent del gen *DXS2* (Figura 6B-C) i van ser seleccionats per tal d'estudiar-ne el fenotip.



**Figura 6.** (A) Es mostra el gen *DXS2* i el lloc d'inserció del T-DNA en el mutant *dxs2-1*. També s'ha indicat la posició dels primers usats per l'anàlisi genòmic (B) i d'expressió (C).

### 1.3.1 El mutant *dxs2-1* no presenta diferències fenotípiques aparents

Es van cultivar plantes homozigotes per la mutació *dxs2-1* en condicions normals i no es van apreciar diferències amb els individus azigots (Figura 7). L'anàlisi fenotípic de les inflorescències i siliques es va realitzar de forma especialment minuciosa perquè són els òrgans on *DXS2* s'expressa a uns nivells més elevats i on la seva absència es podria fer més evident. Els resultats obtinguts van indicar que les inflorescències i siliques es desenvolupen normalment en el mutant *dxs2-1*. Aquests resultats indiquen que la funció de *DXS2* no és essencial en condicions normals de creixement.



**Figura 7.** Fenotip del mutant *dxs2-1* comparat amb el fenotip silvestre (*Col0*). *A*, *B*, *E* i *H* corresponen al mutant *dxs2-1*. *C*, *D*, *F* i *I* corresponen a *Col0*. Es mostren els fenotips de les plàntules als 7 dies (*A* i *C*), als 14 dies (*B* i *D*), als 30 dies (*E* i *F*), de la planta totalment desenvolupada (*G*) i el fenotip de les inflorescències (*H* i *I*)

### 2 Estudi del possible paper de la 1-D-desoxi-D-xilulosa (DX) en la regulació de síntesi d'isoprenoides i altres processos cel·lulars

Els isoprenoides plastídics són sintetitzats a través de la ruta del MEP. El primer enzim de la ruta del MEP és la DXS, que sintetitza DX5P a partir de piruvat i gliceraldehid 3-fosfat (GAP). Quan aquest enzim és inhibit, els isoprenoides plastídics poden ser sintetitzats a partir de DX subministrada exògenament, la qual és fosforilada *in vivo*. D'aquesta manera, afegint DX al medi de creixement s'ha rescatat el fenotip albi letal que presenten els mutants d'*Arabidopsis cla1-1* (defectiu per DXS) i *chs5* (defectiu per DXS quan es cultiva a 14°C).

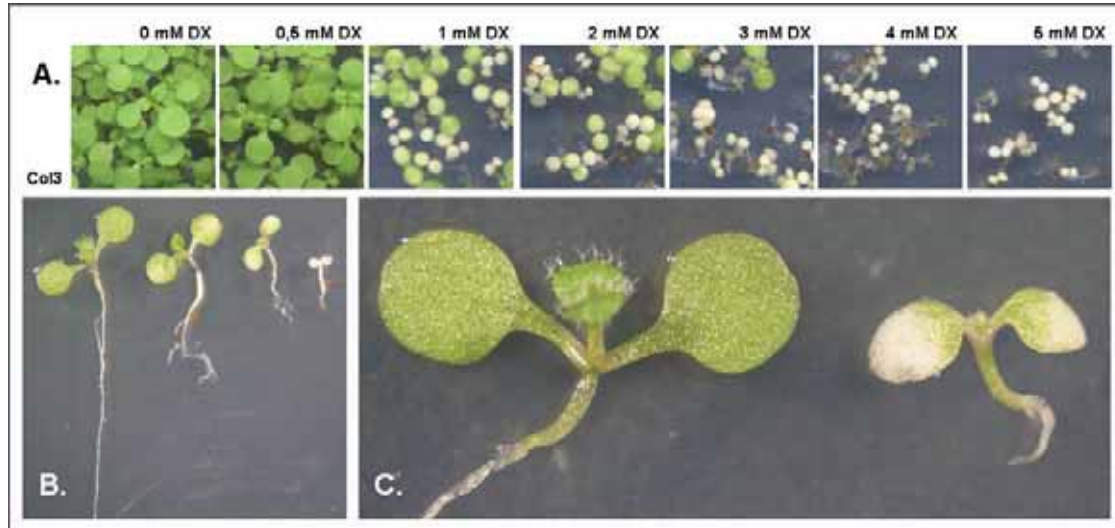
Quan la DX afegida exògenament es marca isotòpicament, es pot comprovar com aquesta marca apareix en els diferents isoprenoides cloroplastídics sintetitzats a partir de l'IPP produït per la ruta del MEP (Broers 1994b; Schwender i col., 1997; Zeidler i col. 1998; Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999a; Rodríguez-Concepción i Boronat 2002; Skorupinska-Tudek i col. 2008). També s'ha vist que l'administració de DX en el fruit del tomàquet és capaç d'accelerar la maduració incrementant la carotenogènesi (Lois i col. 2000). Sorprenentment, experiments d'incorporació de DX marcada amb deuteri, no van mostrar incorporació als carotenoides (resultats no publicats), suggerint un possible paper de la DX com a molècula senyal amb capacitat d'induir la carotenogènesi en el fruit de tomàquet.

La DX també ha estat utilitzada en estudis que han demostrat l'intercanvi d'intermediaris entre les rutes del MEP i del MVA (Arigoni i col. 1997; Adam i col. 1999; Eisenreich i col. 2001; Hemmerlin i col. 2003). Així, de la mateixa manera que al marcar isotòpicament el MVA que es subministra exògenament a la planta apareix marca als isoprenoides citosòlics i una mica també als cloroplastídics, quan es fa el mateix amb DX marcada apareix marca intensa en els isoprenoides cloroplastídics i molt menor en els citosòlics. Això demostra que aquest intercanvi d'intermediaris entre les dues rutes és bidireccional. Malgrat això, cap de les dues rutes és capaç, mitjançant aquest intercanvi d'intermediaris, de fer que la planta superi el bloqueig de l'altra ruta. S'ha observat no obstant que afegint DX exògenament, aquest intercanvi es força fins al punt que la planta pot superar el bloqueig de la ruta del MVA produït per la mevinolina, inhibidor de la HMGR (Kasahara i col. 2002). Així doncs, afegint DX a concentracions creixents en un medi amb mevinolina, les plàntules d'*Arabidopsis* es van recuperant, tot i que a partir d'una determinada concentració de DX el desenvolupament de les plantes sembla ser més lent (Kasahara i col. 2002), suggerint que la DX podria interferir negativament en el creixement. El treball descrit a continuació s'ha centrat en l'estudi d'aquest possible paper regulador de la DX.

#### 2.1 La DX és tòxica a *Arabidopsis*

Per realitzar aquests estudis en primer lloc es va posar a punt un mètode de síntesi de DX (Concia i col., 2009) amb el qual es van obtenir més de 500 mg de DX pura.

Es van preparar plaques amb medi MS i concentracions creixents de DX on es van fer germinar i créixer durant 10 dies plantes d'*Arabidopsis* de la varietat Col3 en condicions de dia llarg. Com es mostra en la figura 8 les plàntules es van desenvolupar normalment fins concentracions de 1mM o superiors de DX, on un nombre important de les plàntules presentaven un fenotip albi en l'estadi de cotiledons, les fulles verdaderes no s'acaben de desenvolupar, les arrels eren molt curtes i la plàntula acabava morint. A una concentració de 4 mM ja van ser totes les plàntules les que van mostrar aquest fenotip. Es pot concloure, per tant, que la DX és tòxica per *Arabidopsis* a concentracions iguals o superiors a 1mM.

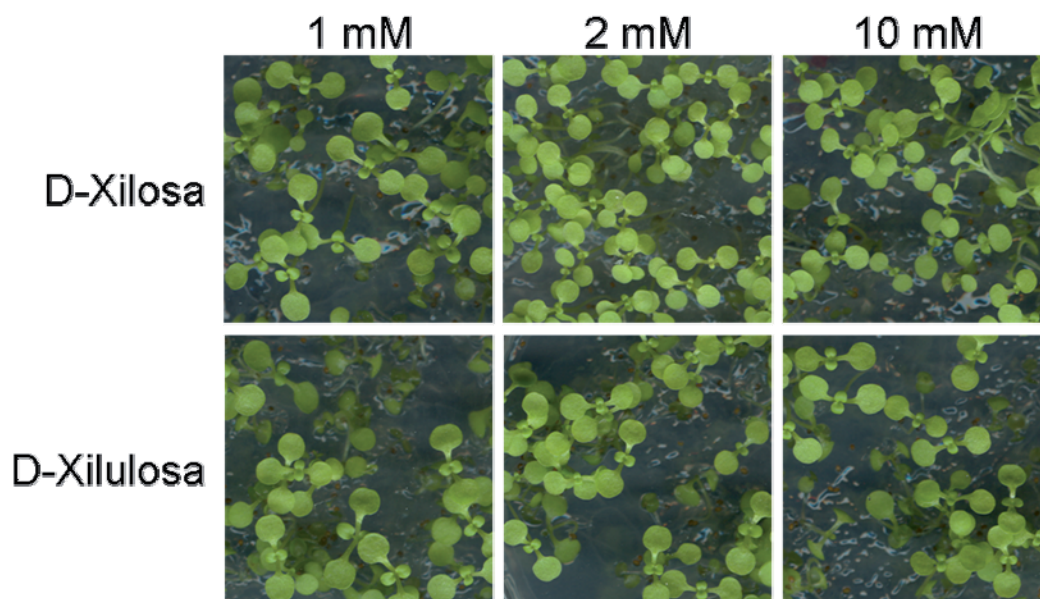


**Figura 8.** Estudi de la toxicitat de la DX a *Arabidopsis*. **(A)** Plàntules d'*Arabidopsis* cultivades durant 10 dies en fotoperíode de dia llarg i amb concentracions creixents de DX. **(B)** Detall de plàntules afectades en diferents graus després de ser cultivades en presència de DX. **(C)** Fenotip dels cotiledons de plàntula crescuda en presència de 2 mM DX.

### 2.1.1 Efecte de sucres anàlegs a la DX

El nostre interès per estudiar l'efecte tòxic de la DX va recaure principalment en la possibilitat que es tractés d'un fenomen regulador de la ruta del MEP. En aquest cas, es va pensar que aquest efecte hauria de ser específic i que altres sucres anàlegs a la DX no el produirien.

Així doncs es va estudiar si la xilosa i la xilulosa produïen toxicitat a *Arabidopsis*. Amb les mateixes condicions descrites anteriorment per la DX les plàntules d'*Arabidopsis* es van desenvolupar normalment en presència de D-xilosa i D-xilulosa (Figura 9), fins i tot utilitzant concentracions 10 vegades superiors a la qual la DX ja resulta tòxica. Es pot concloure per tant, que la toxicitat de la DX és específica.



**Figura 9.** Estudi de l'efecte de la D-xilosa i la D-xilulosa en el creixement d'*Arabidopsis*. Plantules d'*Arabidopsis Col3* cultivades durant 10 dies (fotoperíode de dia llarg) amb xilosa i xilulosa.

### 2.1.2 La DX necessita ser fosforilada per resultar tòxica a *Arabidopsis*.

La DX afegida exògenament ha de ser fosforilada de forma prèvia a la seva incorporació a la ruta del MEP. Per tant, la planta podria estar responent tant a altes concentracions de DX com també a altes concentracions de DX5P o algún producte derivat.

La fosforilació de la DX la duu a terme l'enzim xilulosa quinasa (XK) (Wungsintaweekul i col., 2001). Per saber si la DX necessitava o no fosforilar-se per ser tòxica, es va treballar amb un mutant d'*Arabidopsis* deficient per l'activitat xilulosa quinasa. *Arabidopsis* posseeix un únic enzim amb activitat XK que té una localització citosòlica (Hemmerlin i col., 2006).

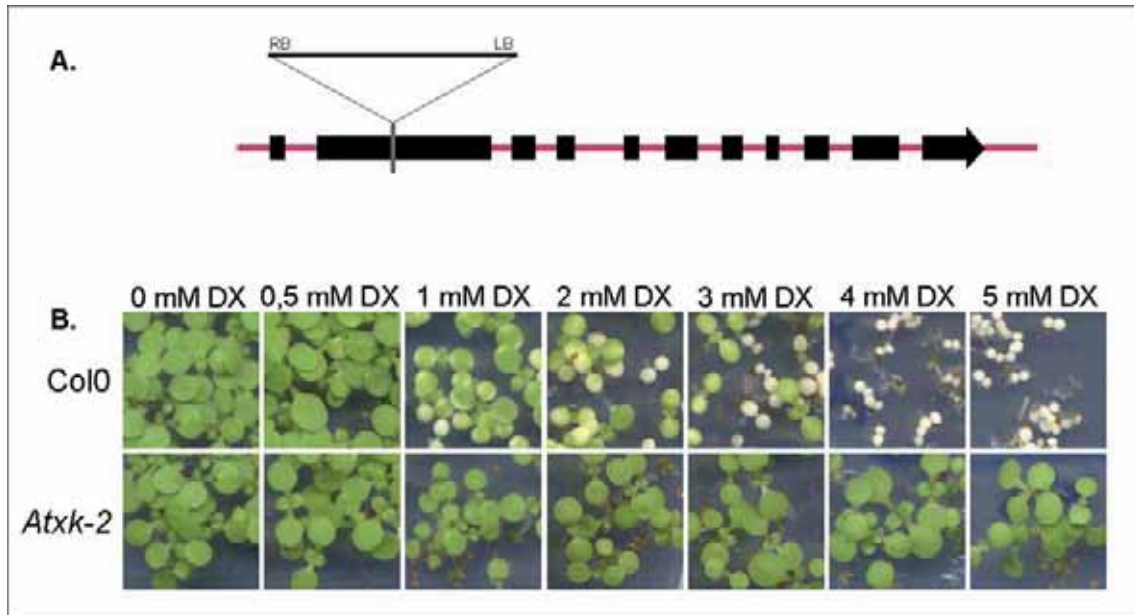
#### 2.1.2.1 Mutant *Atxk-2*.

Es va identificar un mutant insercional del gen *XK* (At5g49650) a la col·lecció de mutants del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso et al., 2003) i es va obtenir a través del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant (SALK\_079018), que ja havia estat descrit i anomenat *Atxk-2*, presenta una inserció a l'exó 2 del gen *XK* (Figura 12A) i no presenta activitat XK (Hemmerlin i col. 2006).

#### 2.1.2.2 Toxicitat de la DX en el mutant *Atxk-2*.

El mutant *Atxk-2* es va germinar en presència de DX. Després de 10 dies en condicions de dia llarg no es va observar cap efecte de la DX en el mutant mentre que la soca parental silvestre Col0 presentava clarament el fenotip causat per la DX (Figura 10B).

Així, la pèrdua d'activitat XK confereix resistència a la toxicitat produïda per la DX i demostra que la DX necessita ser fosforilada per a ser tòxica.



**Figura 10.** Resistència del mutant *Atxk-2* a la DX. (A) Es mostra el gen *XK* i el lloc d'inserció del T-DNA en el mutant *Atxk-2*. (B) Plàntules de la línia mutant *Atxp-2* i del seu parental silvestre *Col0*, crescudes durant 10 dies amb fotoperíode de dia llarg, i en presència de diferents concentracions de DX.

### 2.1.3 L'efecte tòxic de la DX5P té lloc al citosol de la cèl·lula

La DX administrada de forma exògena es fosforila al citosol formant-se DX5P. Si l'efecte tòxic tingués lloc al cloroplast, que és on es localitza la ruta del MEP, la DX5P hauria d'entrar-hi per exercir el seu efecte. Està descrit que la DX5P entra al cloroplast preferencialment a través del transportador de xilulosa 5-fosfat (XPT) (Flügge i Gao 2005). Per tant, plantes d'*Arabidopsis* defectives en aquest transportador haurien de veure reduïda l'entrada de DX5P al cloroplast i alhora, incrementar, els seus nivells al citosol. En conseqüència aquestes plantes podrien presentar un comportament diferencial en resposta a la DX administrada exògenament, i podrien indicar si la DX5P està actuant a nivell citosòlic o plastídic.

#### 2.1.3.1 Mutant *Atxpt-1*

Es va identificar un mutant insercional del gen *XPT* (At5g17630) a la col·lecció de mutants insercionals de l'INRA (Versalles). Aquest mutant (FLAG\_593f05) presenta la inserció d'un T-DNA en la zona codificant del gen *XPT* (Figura 11A). Es van seleccionar els individus homozigots per la inserció genotipant-los per PCR, i el mutant es va anomenar *Atxpt-1*. L'expressió del transcrit del gen *XPT* es va



## RESULTATS

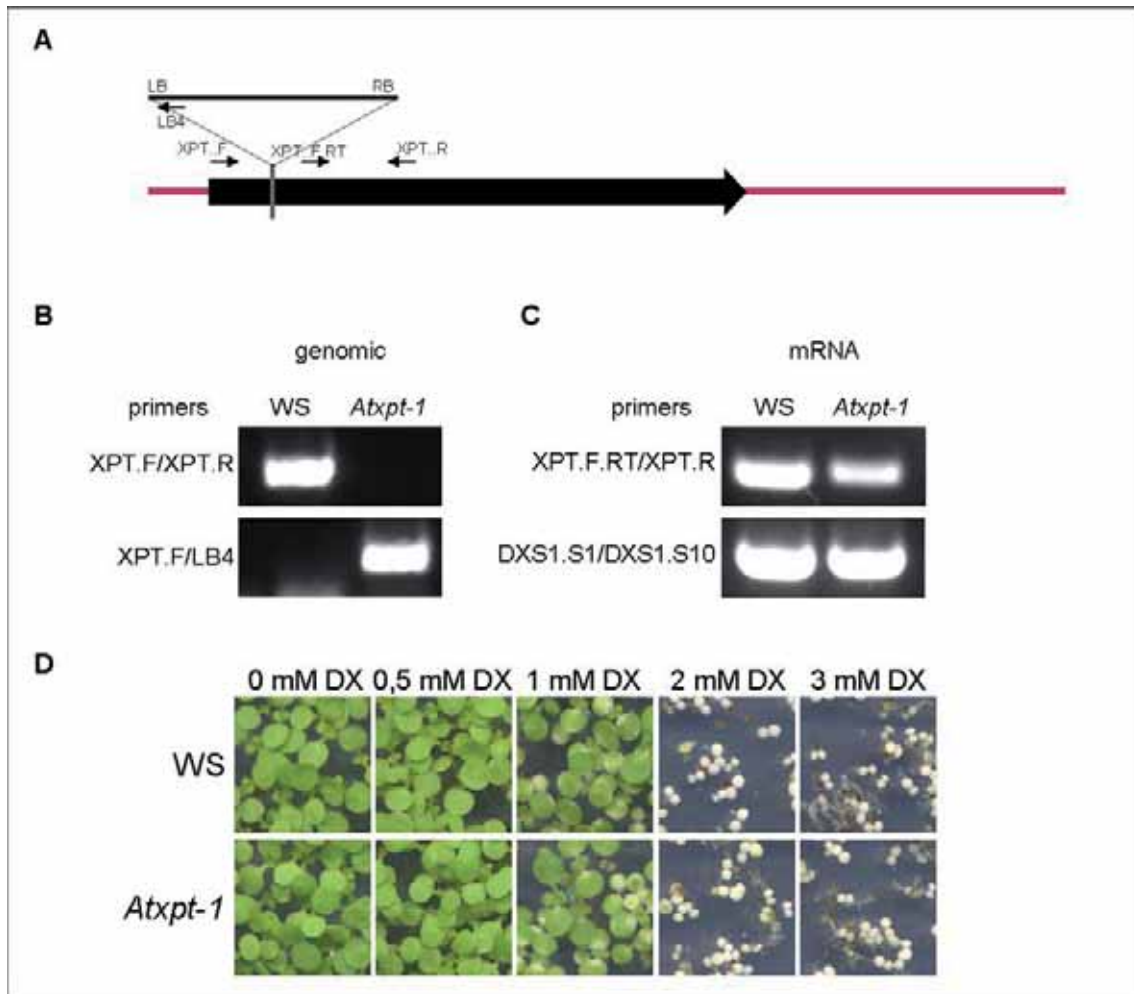
analitzar utilitzant la tècnica de RT-PCR, i el resultat obtingut van indicar que el transcrit continuava expressant-se (Figura 11B).

### 2.1.3.2 Mutant *Atxpt-2*

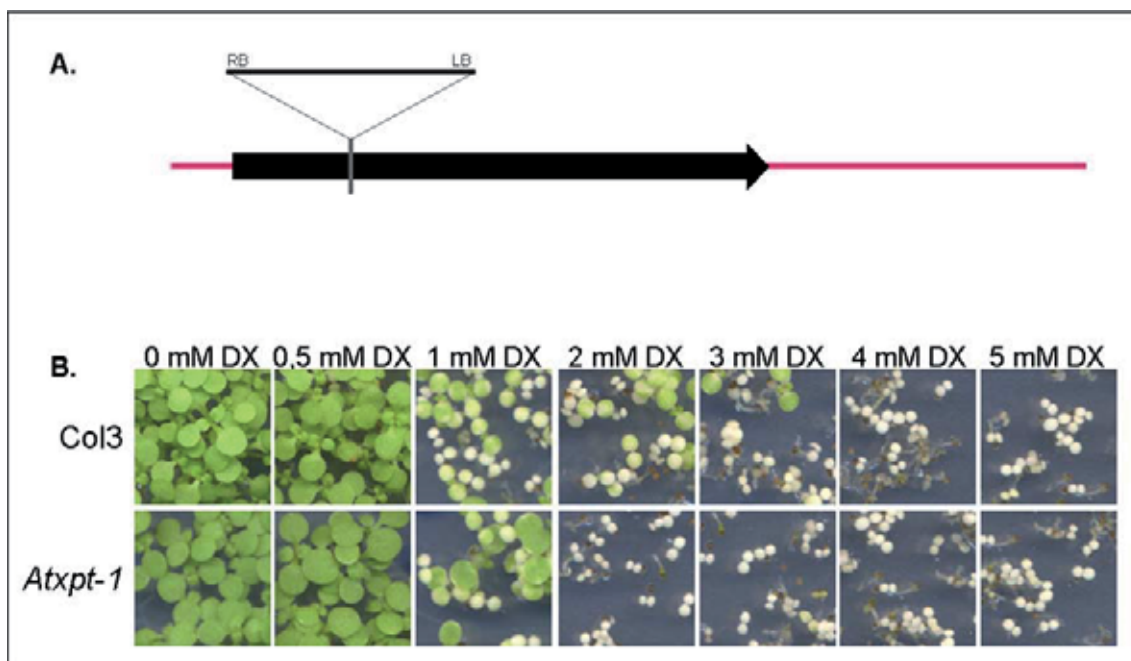
Línies homozigotes del mutant *Atxpt-2*, obtingut de la col·lecció de mutants Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library (SAIL), van ser cedides pel Dr. Michael Phillips. Aquest mutant (SAIL\_378-C01.v1) presenta també una inserció en la regió codificant del gen *XPT* (Figura 12) i no expressa el transcrit corresponent (Michael Phillips, comunicació personal).

### 2.1.3.3 Toxicitat de la DX en els mutants *Atxpt-1* i *Atxpt-2*

Els mutants *Atxpt-1* i *Atxpt-2* i les corresponents línies parentals silvestres (WS i Col3 respectivament) van ser germinats i crescuts en presència de concentracions creixents de DX durant 10 dies. El mutant *Atxpt-1* no presenta diferències de creixement respecte de la línia parental WS (Figura 11C), comportament esperable després de comprovar que continua expressant el gen *XPT*. Per contra, el mutant *Atxpt-2*, es comporta de forma diferent que el parental Col3, mostrant una sensibilitat a la DX lleugerament incrementada (Figura 12C). Aquests resultats estarien d'acord en que l'efecte tòxic de la DX5P té lloc al citosol.



**Figura 11.** Toxicitat de la DX en el mutant *Atxpt-1*. (A) Es mostra el gen XPT i el lloc d'inserció del T-DNA en el mutant *Atxpt-1*, i també s'han indicat els primers usats per l'anàlisi genòmic (B) i d'expressió (C). (D) Plàntules corresponents al mutant *Atxpt-1* i al parental WS crescudes durant 10 dies en condicions de dia llarg i en presència de concentracions creixents de DX.



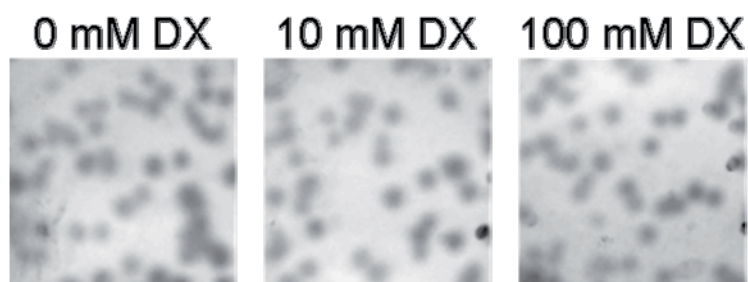
**Figura 12.** Toxicitat de la DX en el mutant *Atxpt-2*. (A) Es mostra el gen XPT i el lloc d'inserció del T-DNA en el mutant *Atxpt-2*. (B) Plàntules corresponents al mutant *Atxpt-2* i al parental *Col3* crescudes durant 10 dies en condicions de dia llarg i en presència de concentracions creixents de DX.

## 2.2 Toxicitat de la DX a *E. coli*

Les bacteries utilitzen la ruta del MEP per a la síntesis d'IPP que donarà lloc als diferents isoprenoides bacterians. Si la DX5P té un paper regulador sobre la ruta del MEP a *Arabidopsis*, és possible que el tingui també en bacteries. És per això que es va estudiar l'efecte de la DX en el creixement d'*E. coli*. D'altra banda, es volia descartar que la toxicitat de la DX fos causada per un excés d'algun isoprenoide plastídic, tenint en compte que aquests no es sintetitzen a *E. coli*.

### 2.2.1 La DX no afecta el creixement normal d'*E. coli* en medi ric

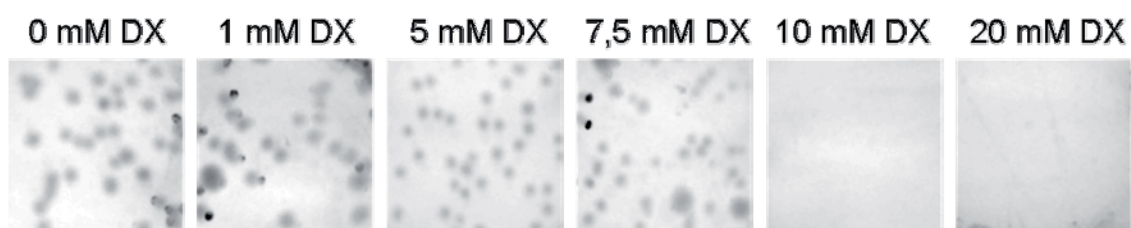
Es va utilitzar la soca JM109 d'*E. coli* per analitzar si la DX afectava el seu creixement. Així, es van preparar plaques amb medi LB i concentracions creixents de DX fins a 100 mM. El creixement d'*E. coli* a 37° durant 24 hores no es va veure afectat per la presència de DX (Figura 13).



**Figura 13.** Creixement d'*E. coli* en medi ric en presència de DX. La soca d'*E. coli* JM109 es va cultivar en medi LB en presència de DX, durant 24 hores a 37°C.

### 2.2.2 La DX afecta el creixement d'*E. coli* en medi mínim

Tenint en compte que la DX és un sucre, és possible que quan *E. coli* creix en medi ric, la toxicitat de la DX quedi enmascarada per la capacitat que tenen els bacteris de seleccionar preferentment l'entrada d'uns sucres envers d'uns altres. Així doncs, es va voler evitar aquest fenomen fent créixer *E. coli* en medi mínim. Es va seleccionar el medi M9 utilitzant glicerol com a font de carboni, i es van preparar plaques amb concentracions creixents de DX. El creixement després de 48 hores va indicar que a partir d'una concentració de 10 mM la DX té un efecte tòxic inhibint el creixement (Figura 14).



**Figura 14.** Creixement d'*E. coli* en medi mínim en presència de DX. La soca d'*E. coli* JM109 es va cultivar en medi mínim M9 suplementat amb glicerol i concentracions creixents de DX durant 48 hores a 37°C.

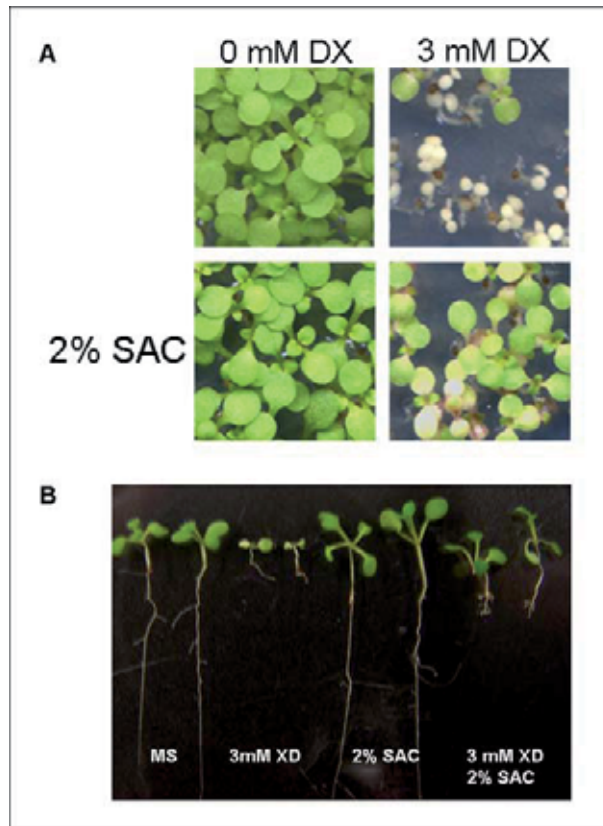
## 2.3 DX5P i metabolisme glucídic.

La DX5P és tòxica a *Arabidopsis* i a *E. coli* i, a més, la toxicitat a *Arabidopsis* té lloc fora del cloroplast. Així doncs, quedava descartada la hipòtesis que la DX5P afectés de forma directa la ruta del MEP, però ho podria estar fent de forma indirecta actuant en algun procés cel·lular citosòlic. Una possibilitat era que l'efecte de la DX al citosol pogués afectar l'aport de substrats per a la ruta del MEP.

Si la DX5P estigués limitant l'aport de piruvat i GAP a la ruta del MEP desde fora del cloroplast, era lògic pensar que la seva diana es podria trobar en algun punt relacionat amb el metabolisme glucídic.

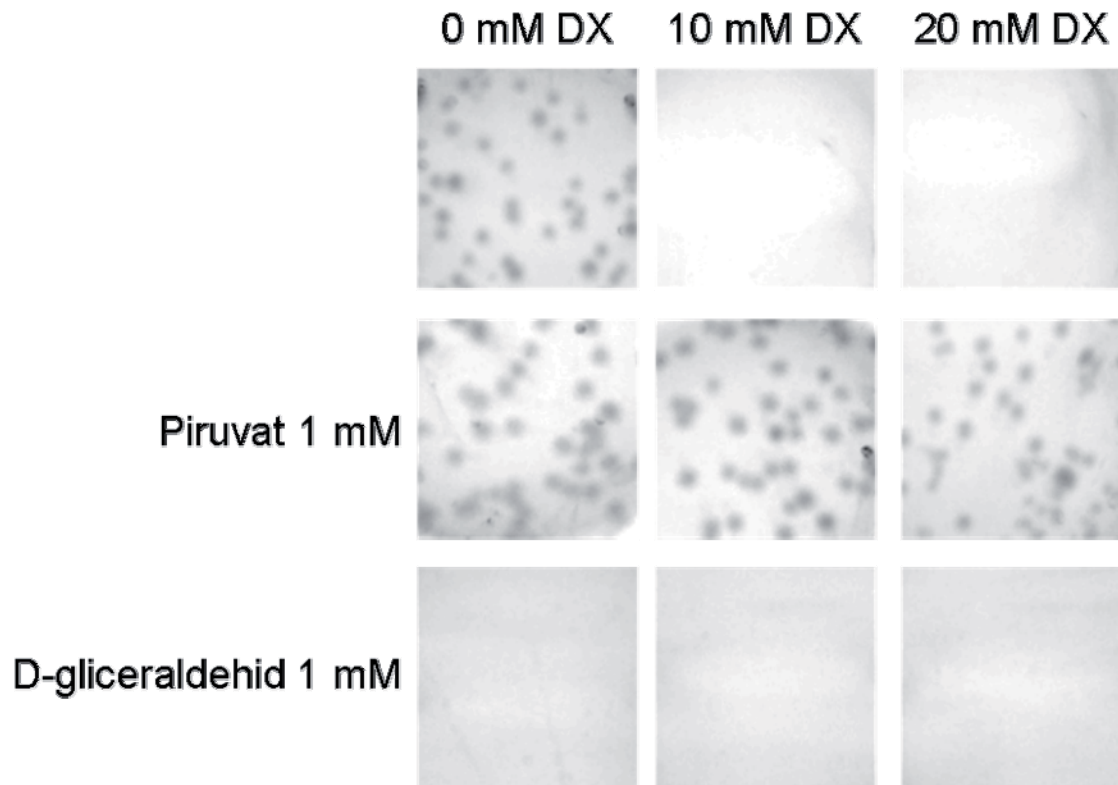
## RESULTATS

Per tant, es va estudiar l'efecte de la DX en el creixement d'*Arabidopsis* en presència de sacarosa. En la figura 15 es mostra com la sacarosa rescata parcialment les plàntules d'*Arabidopsis* de la toxicitat de la DX, malgrat que si bé la part aèria presentava un fenotip normal, l'arrel era incapaç de desenvolupar-se.



**Figura 15.** Toxicitat de la DX a *Arabidopsis* en presència de sacarosa. (A) Plàntules d'*Arabidopsis* Col3 van ser cultivades durant 10 dies en condicions de dia llarg en presència de DX i sacarosa. La sacarosa va ser capaç de rescatar el fenotip albi de la part aèria, però no l'efecte sobre el creixement de les arrels (B).

Si *E. coli* es cultivava en presència de sacarosa la DX tampoc no resultava tòxica. Aquest fet es podria deure simplement al fet que el bacteri no estaria consumint DX del medi. Per tal d'avaluar si la DX estava limitant l'aport de substrats a la ruta del MEP a *E. coli*, es va fer créixer la soca JM109 amb DX i el medi es va suplementar amb piruvat i D-gliceraldehid. Si bé no es va aconseguir creixement en el cas del D-gliceraldehid, pel fet que està descrit que per sí mateix resulta tòxic, sí que es va aconseguir amb piruvat (Figura 16).



**Figura 16.** Toxicitat de la DX a *E. coli* en presència de piruvat i D-gliceraldehid. La soca d'*E. coli* JM109 es va cultivar durant 48 hores a 37°C en medi mínim M9 suplementat amb glicerol, en presència de DX i de piruvat (1 mM) i de D-gliceraldehid (1mM).

En conjunt aquests resultats demostren que la DX5P resulta tòxica pel creixement d'*Arabidopsis* i *E. coli*, i actuaría possiblement afectant el metabolisme glucídic.

### 3 Identificació i caracterització de mutants resistents a la ruta del MEP.

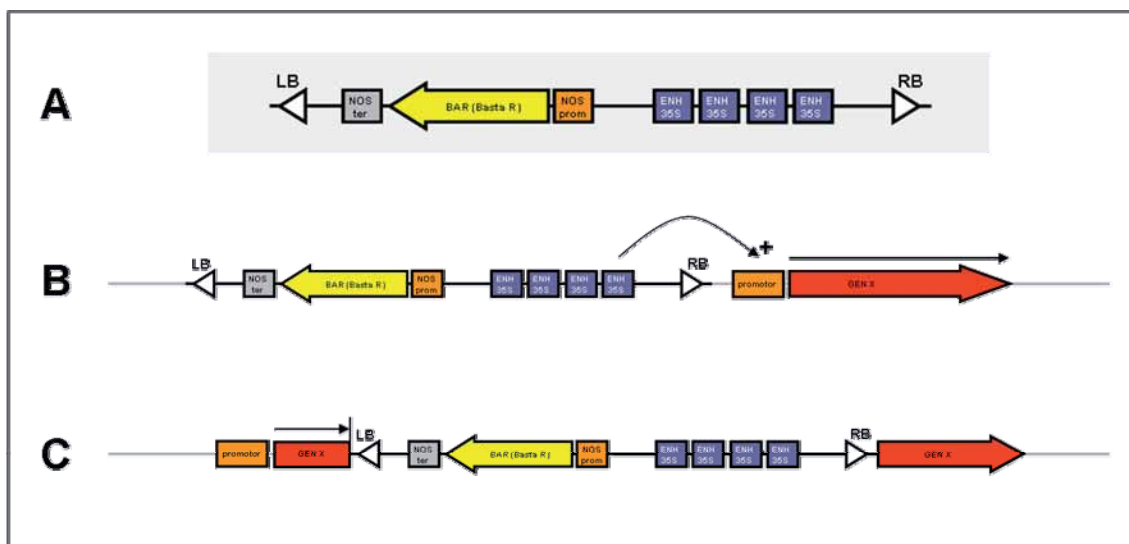
En les plantes alguns isoprenoides tenen funcions essencials en el creixement, desenvolupament i també en la interacció planta-ambient (McCaskill i Croteau 1998; Rohmer 1999a; Rodríguez-Concepción i Boronat 2002). Aquest important paper dels isoprenoides requereix un elevat nivell de regulació de la síntesis d'aquests compostos, el qual ha de proporcionar en alguns casos l'estabilitat de síntesi adequada, i en altres un alt potencial d'adaptació. Tots els isoprenoides deriven del mateix precursor, l'IPP i el seu isòmer al·lilic DMAPP, i per tant es comprèn que les vies específiques de síntesis posteriors a cadascun d'aquests isoprenoides estiguin sotmeses a una regulació específica. De totes maneres és clau el control de les rutes de síntesis d'IPP per a la posterior síntesis d'aquests isoprenoides. Així doncs, l'estudi de la regulació de la ruta del MVA i de la ruta del MEP, així com els mecanismes que les coordinen i els que permeten l'intercanvi d'intermediaris, presenta un gran interès.

Últimament s'estàn dedicant molts esforços per trobar nous factors reguladors de les rutes de síntesis d'IPP en plantes, i les col·leccions de mutants d'*activation tagging* s'han establert com una eina molt eficaç i prometedora al respecte (Rodríguez-Concepción i col. 2004; Sauret-Gueto 2005; Sauret-Gueto i col. 2006; Kobayashi i col., 2007; Flores-Perez i col. 2008).

#### 3.1 *Activation tagging a Arabidopsis.*

Els mutants d'*activation tagging* són creats per la inserció a l'atzar d'un T-DNA en el genoma de la planta. Depenent de la col·lecció, aquest T-DNA pot variar, però com a element comú i diferenciador posseeix quatre enhancers 35S disposats en tàndem que tenen la capacitat d'activar promotors propers al lloc d'inserció induïnt la transcripció dels gens que controlen. La majoria dels gens activats s'han trobat immediatament adjacents als enhancers del T-DNA, a una distància d'entre 380 pb i 3,6 kb (Weigel i col., 2000).

Teòricament es poden obtenir dos tipus de mutants depenent del lloc d'inserció d'aquest T-DNA. Per una part, mutants de pèrdua de funció quan el T-DNA s'inserta en la regió transcrita d'un gen, i per una altra, mutants de guany de funció per l'activació de l'expressió de gens contigus al lloc d'inserció d'aquest T-DNA (figura 17).



**Figura 17.** (A) Representació esquemàtica del T-DNA de la col·lecció de mutants d'activation tagging Scheible-Sommerville. Aquest T-DNA es pot integrar en el genoma aprop d'un gen activant la seva expressió i així obtenint un mutant de guany de funció (B), o es pot integrar en la zona d'un gen obtenint-se un mutant de pèrdua de funció (C).

En aquest treball s'ha utilitzat la col·lecció de Scheible-Sommerville, adquirida en el Nottingham Stock Center (NASC), i que conté unes 63.000 línies de mutants.

### 3.2 Selecció dels mutants.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la identificació de mutants d'activation tagging que estiguessin afectats en algun punt regulador de la ruta del MEP o que ens indiquessin mecanismes pels quals té lloc o es modula l'intercanvi d'intermediaris entre les rutes del MEP i del MVA. El punt clau doncs, va ser el mètode de selecció d'aquests mutants. Per fer-ho, es van utilitzar diferents inhibidors de les rutes de síntesi d'IPP. Aquests inhibidors han estat la clomazona (CLM), inhibidor específic de la DXS de plantes, la fosmidomicina (FSM), inhibidor específic de la DXR, i la mevinolina (MEV), inhibidor específic de l'HMGR.

Altres treballs han utilitzat com a mètode de selecció el bloqueig de la ruta del MVA amb MEV (Rodríguez-Concepción i col. 2004; Kobayashi i col. 2007). En principi, el bloqueig de la ruta del MVA no semblava adequat pel nostre objectiu, ja que teòricament ens proporcionaria més informació de la ruta del MVA que de la ruta del MEP. D'altra banda, el bloqueig de la ruta del MEP inhibint l'enzim DXS amb CLM semblava una opció vàlida. Primer de tot perquè els mutants capaços de superar el bloqueig de la ruta del MEP podrien proporcionar molta informació sobre la regulació d'aquesta, i també perquè s'ha demostrat que la DXS és un enzim regulador de la ruta i, el coneixement dels processos que controlen l'activitat d'aquest enzim són d'un gran interès. No obstant, el problema d'inhibir la DXS és que també es bloquejaria la síntesi de les vitamines B1 (tiamina) i B6 (piridoxol), amb la qual cosa altres processos



## RESULTATS

podrien resultar també afectats, i en conseqüència representaria un inconvenient potencial en la selecció d'aquests mutants.

La selecció del mutant resistent al bloqueig de la ruta del MEP amb FSM, inhibidor de la DXR, semblava doncs una opció apropiada, ja que existien indicis sobre el possible paper regulador que podria tenir aquest enzim en la ruta del MEP. Malgrat tot es va decidir confirmar primàriament la relevància de l'enzim DXR en el control del flux de la ruta del MEP en *Arabidopsis*.

### **3.2.1 Paper de l'enzim DXR en el control del flux de la ruta del MEP en *Arabidopsis***

L'enzim DXR sintetitza el primer intermediari específic de la ruta, el MEP, a partir de DX5P. Com ja s'ha indicat en la introducció (apartat 2.2.3.1), en eubactèries s'ha demostrat que aquest enzim no és limitant en la ruta, però en canvi a *Arabidopsis* s'ha descrit que plantes transgèniques sobreexpressores d'aquest enzim presenten un major acúmul de productes finals (Carretero-Paulet 2003).

#### **3.2.1.1 L'acúmul de proteïna DXR és proporcional als nivells de pigments acumulats**

Amb anterioritat en el laboratori s'havien generat plantes transgèniques dissenyades per sobreexpressar DXR que es van anomenar R-1, R-2 i R-3. La línia R-1 presentava uns nivells de proteïna similars al parental silvestre i acumulava uns nivells de clorofil·les i carotenoides molt semblants a aquest. La línia R-2 era la única que sobreacumulava proteïna DXR, i en aquest cas, els nivells de pigments eren aproximadament un 35% més elevats. Per últim, la línia R-3 mostrava un fenotip variegat, amb zones blanquinoses, i presentava uns nivells de pigments inferiors al parental silvestre. Es tractava d'un fenomen de co-supressió, amb uns nivells de proteïna DXR inferiors al normal (Carretero-Paulet 2003).

Així doncs semblava clara la relació entre els nivells de proteïna DXR i l'acúmul de pigments. De tota manera l'escàs número de línies transgèniques obtingut (només una d'elles sobreexpressava realment DXR) representava una limitació per demostrar aquesta relació. És per aquest motiu que es va decidir generar noves línies transgèniques sobreexpressores de DXR.

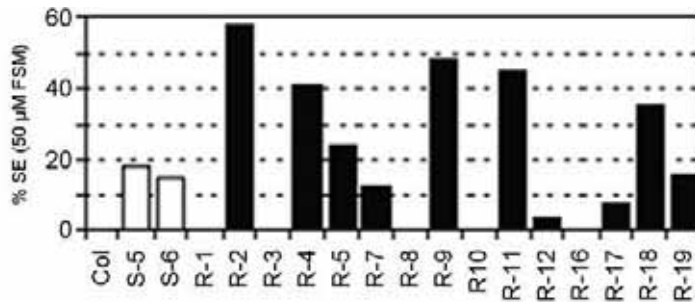
#### **3.2.1.2 Generació de línies transgèniques d'*Arabidopsis* sobreexpressores de DXR**

Es van transformar plantes Col0 amb el transgèn 35S::DXR utilitzant el vector pLBIDXR10 (Carretero-Paulet 2003) mitjançant infiltració amb *Agrobacterium* (Materials i Mètodes, 4.1.2). Es van obtenir 12 línies transgèniques (R-4, R-5, R-7, R-8, R-9, R-10, R-11, R-12, R-16, R-17, R-18 i R-19) que contenien el transgèn i es va procedir al seu anàlisi molecular.

Per tal de mesurar els nivells d'activitat DXR en aquestes plantes d'una manera senzilla i ràpida es va analitzar la seva capacitat de resistir la inhibició per FSM. La resistència d'*Arabidopsis* a la FSM, i també a altres inhibidors d'enzims de les rutes de síntesis d'IPP, com la CLM i la MEV, és poblacional. És a dir, dintre d'una població d'individus genèticament iguals, el comportament d'aquests és diferent. Així, mentre que una proporció dels individus no superen la inhibició, la resta són capaços de

desenvolupar-se i formar fulles. A aquesta capacitat de formar fulles verdaderes se l'anomena *seedling establishment* (SE) (Rodríguez-Concepción i col. 2004), i s'utilitza el valor del percentatge corresponent per mesurar la resistència a l'inhibidor en qüestió.

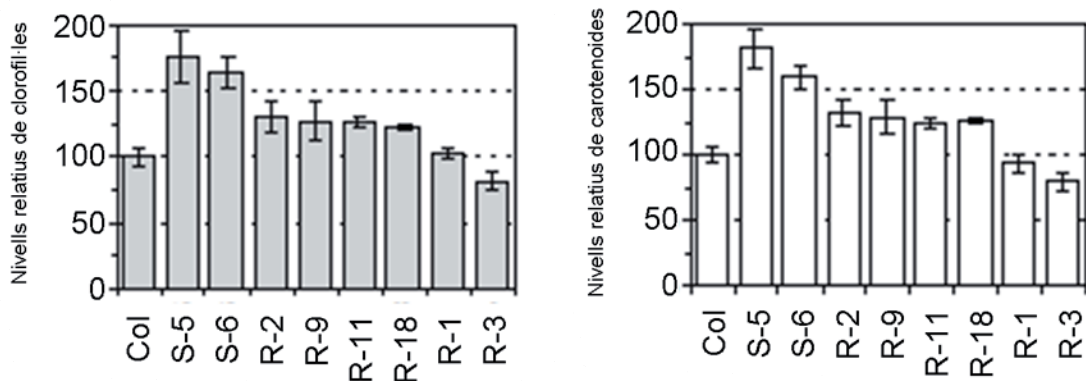
Es van cultivar les línies transgèniques generades amb FSM a 50 µM, mostrant resistència 9 d'aquestes línies (R-4, R-5, R-7, R-9, R-11, R-12, R-17, R-18 i R-19). Els resultats obtinguts es mostren a la figura 18, on s'han afegit les línies R-1, R-2 i R-3, així com les línies S-5 i S-6, sobreexpressores de DXS (Carretero-Paulet 2003).



**Figura 18.** Quantificació de la resistència a la FSM de les línies transgèniques sobreexpressores de DXR i DXS. La resistència a la FSM es va estimar amb poblacions de més de 50 individus utilitzant el percentatge de seedling establishment (SE) després de 15 dies de creixement en condicions de dia llarg.

Com es pot apreciar, el percentatge de SE va ser variable, i correspondria als nivells de proteïna DXR de cada una de les línies transgèniques. Per tal de comprovar si aquesta major activitat DXR es traduïa en un augment del flux de la ruta i, per tant, en un major acúmulo de pigments, aquests es van mesurar en les línies transgèniques que tenien els nivells més elevats de DXR. Així doncs, a la figura 19 es mostren els nivells de clorofil·les i carotenoides de les línies R-9, R-11 i R-18, juntament amb les línies R-1, R-2 i R-3. També s'hi van incloure les línies S-5 i S-6 sobreexpressores de l'enzim DXS. Els resultats indiquen que totes les línies sobreexpressores de DXR acumulaven nivells més elevats de clorofil·les i carotenoides, amb excepció de la línia cosuprimida R-3 i de la línia R-1, molt similar al WT (Figura 19). Es pot concloure per tant que una major activitat de l'enzim DXR es tradueix en un augment del flux de la ruta del MEP, acumulant-se més isoprenoides finals i que, per tant, l'enzim DXR controla en part el flux de la ruta del MEP. També es pot observar com un augment de l'enzim DXS provoca un acúmulo de pigments superior al que provoca l'augment de l'enzim DXR, i consegüentment, es podria concloure també que l'enzim DXS posseeix un major control del flux de la ruta.

## RESULTATS



**Figura 19.** Nivells de clorofil·les i carotenoides de les línies transgèniques sobreexpressores de DXR. Els pigments es van mesurar en plàntules creixudes durant 15 dies en condicions de dia llarg. La mitja i la desviació estàndard corresponen a dos experiments independents amb dues rèpliques cadascun.

Davant aquests resultats, es va escollir la FSM com a l'inhibidor amb el qual es bloquejaria la ruta del MEP per tal de seleccionar els mutants resistents per aquest estudi. Aquests mutants s'anomenarien mutants resistents a la inhibició per fosmidomicina, o mutants *rif*.

### 3.3 Selecció dels mutants *rif*

La col·lecció de mutants Scheible-Sommerville es subministra en forma de llavors representatives de totes les línies de mutants distribuïdes en tubs, cadascun dels quals conté les llavors de 300 d'aquestes línies. Per tal de seleccionar els mutants resistents a la FSM es va seguir l'estratègia que es descriu seguidament i que s'esquematitza a la figura 20.

El conjunt de llavors de la col·lecció es van fer germinar en plaques amb medi MS suplementat amb FSM (50  $\mu$ M). Després de 10 dies en condicions de dia llarg, les plàntules resistents ja es podien distingir de la resta que mostraven un fenotip albi i no desenvolupaven fulles. Les 69 plantes resistents obtingudes (F0) es van transplantar a terra, i es van cultivar fins que s'en van obtenir les llavors.

Seguidament, les llavors de les plantes seleccionades es van fer germinar en plaques amb medi MS suplementat amb FSM (50  $\mu$ M). Al cap de 10 dies, es van seleccionar aquelles línies que següien mostrant resistència (F1) i es van descartar 36 línies que van resultar ser falços resistents. De cadascuna de les 33 línies resistents (F1), es van seleccionar entre 4-8 individus, es van transplantar a terra i s'en van acabar recollint les llavors. Finalment, les llavors obtingudes es van germinar per tercera vegada en presència de FSM, confirmant la resistència de 21 mutants *rif*.

### 3.3.1 Obtenció de mutants *rif* homozigots

Per tal d'obtenir els homozigots dels diferents mutants *rif* seleccionats, es va utilitzar la resistència al herbicida BASTA que confereix el gen BAR inclòs en el T-DNA. Les llavors dels diferents individus obtinguts de cada mutant *rif* de la generació F1, es van fer germinar en plaques amb medi MS suplementat amb BASTA, obtenint-se poblacions segregants, amb una resistència del 75%, i poblacions homozigotes, amb una resistència del 100%. També es van donar 2 casos en que si bé les plàntules eren resistents a la FSM, no mostraven resistència a BASTA. Aquests mutants es van descartar ja que aquest resultat indicava que la resistència a la FSM no estava lligada al T-DNA, sinó que venia causada possiblement per alguna mutació puntual.

Individus corresponents a línies heterozigòtiques (F2) es van cultivar fins acabar obtenint-ne les llavors. Es va analitzar la resistència a BASTA de la següent generació (F3) identificant els homozigots d'aquells mutants que no s'havien aconseguit en la F1. Alhora, es van confirmar els homozigots obtinguts anteriorment. Finalment, es van obtenir les llavors de la generació F3.

Va ser amb aquestes llavors que es van realitzar els experiments corresponents a l'estudi bioquímic i molecular dels 19 mutants *rif* seleccionats.

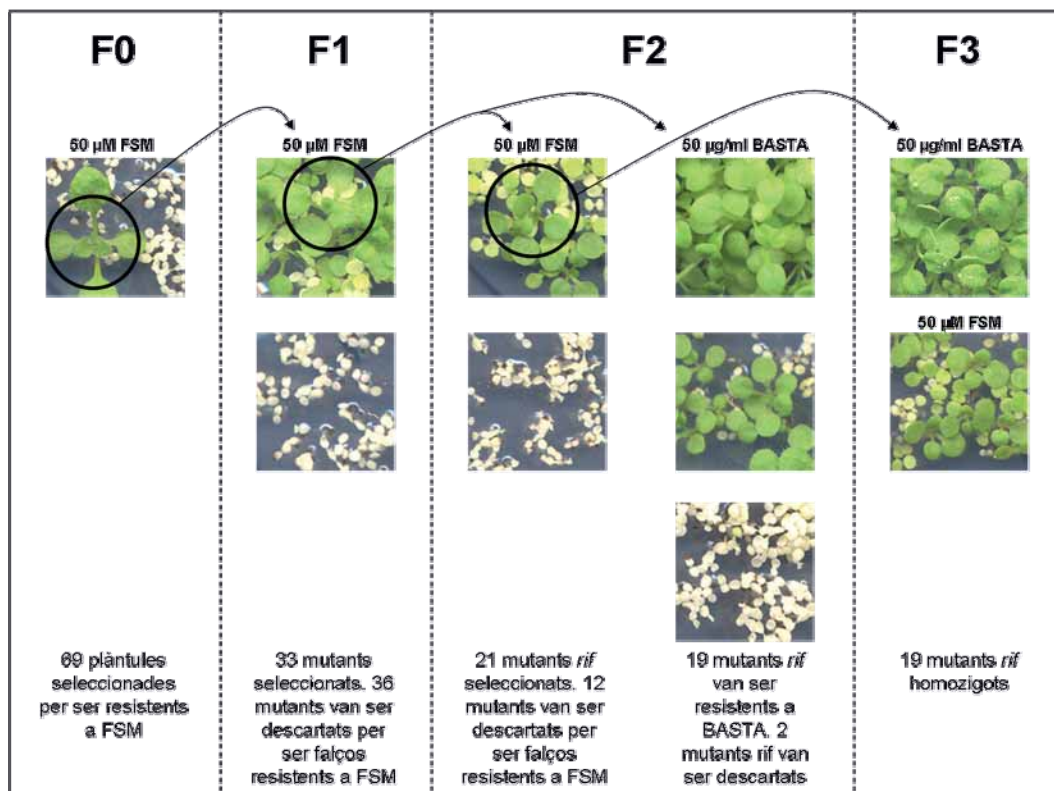


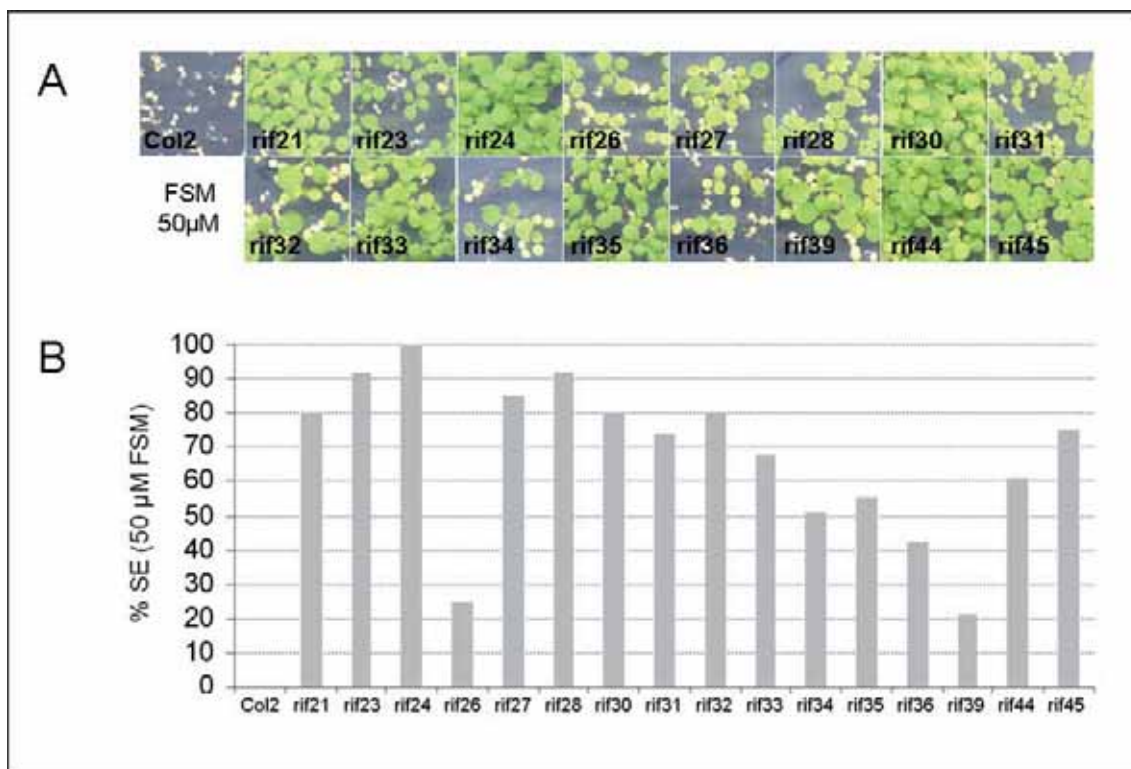
Figura 20. Esquema del procés de selecció dels mutants *rif*.

## RESULTATS

Els estudis realitzats posteriorment han acabat reduïnt el número de mutants *rif* a 16, després de detectar que 3 d'aquests mutants posseïen el T-DNA inserit en el mateix lloc que altres mutants *rif* i, per tant, es tractava de la mateixa línia mutant. Els mutants finalment seleccionats han estat designats com *rif21*, *rif23*, *rif24*, *rif26*, *rif27*, *rif28*, *rif30*, *rif31*, *rif32*, *rif33*, *rif34*, *rif35*, *rif36*, *rif39*, *rif44* i *rif45*.

### 3.4 Resistència dels mutants *rif* a la FSM

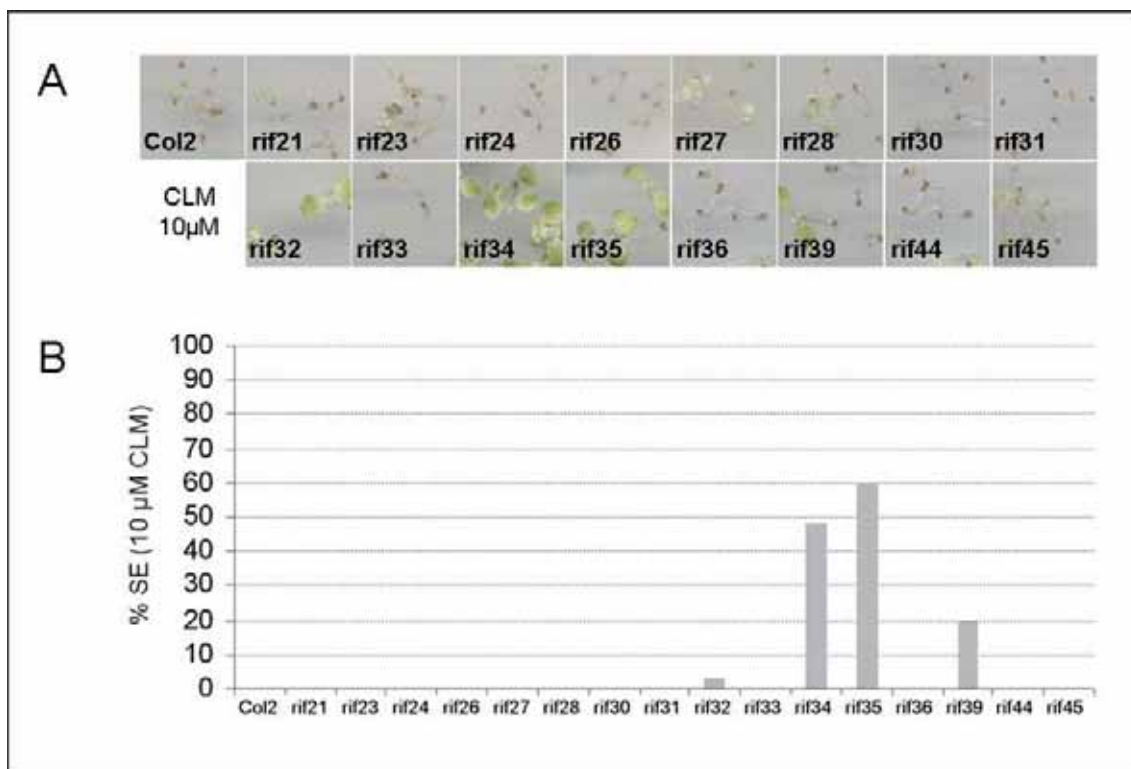
Tots els mutants *rif* són resistents a la FSM. No obstant, tal com ja s'ha indicat anteriorment, es tracta d'una resistència poblacional. Entre els diferents mutants *rif* hi ha una gran varietat en quan al grau de resistència a FSM (Figura 21), però no per ser menys resistents els mutants *rif* perden interès. Un exemple són les línies transgèniques sobreexpresores de DXS d'*Arabidopsis* S-5 i S-6, que són resistents també a FSM tot i que en un grau baix (Figura 18), de manera que si un dels mutants *rif* estigués afectat en l'activitat DXS tindria també un grau baix de resistència a la FSM i alhora també un gran interès. Els mutants *rif26* i *rif39*, amb una resistència d'entre 20 i 25% (SE), en són un exemple. Així mateix, el mutant *rif24* mostra una resistència a la FSM del 100%, la qual cosa el converteix en un mutant molt interessant. Altres mutants també presenten una alta resistència a la FSM, com són *rif21*, *rif23*, *rif27*, *rif28*, *rif30* i *rif32*, amb un SE superior al 80%. La resta de mutants presenten un grau de resistència d'entre el 40 i el 80%.



**Figura 21.** Quantificació de la resistència a la dels mutants rif seleccionats. La resistència a la FSM es va estimar amb poblacions de més de 50 individus utilitzant el percentatge de seedling establishment (SE) després de 10 dies en condicions de dia llarg.

### 3.5 Resistència dels mutants *rif* a la CLM

La resistència a la FSM pot venir donada per diferents causes. La més evident seria un increment en l'activitat DXR. Alternativament, també podria tractar-se d'una inducció generalitzada de la ruta del MEP i, en aquest cas, l'interès del mutant seria òbviament molt gran. Teòricament una activació generalitzada de la ruta provocaria que el mutant *rif* fos també resistent a l'inhibició de la DXS per part de la CLM. És per aquest motiu que es va estudiar si algun dels mutants *rif* seleccionats presentava de forma addicional resistència a la CLM. Al germinar els mutants *rif* en presència de CLM es va comprovar que *rif32*, *rif34*, *rif35* i *rif39* presenten també resistència a la CLM (Figura 22).

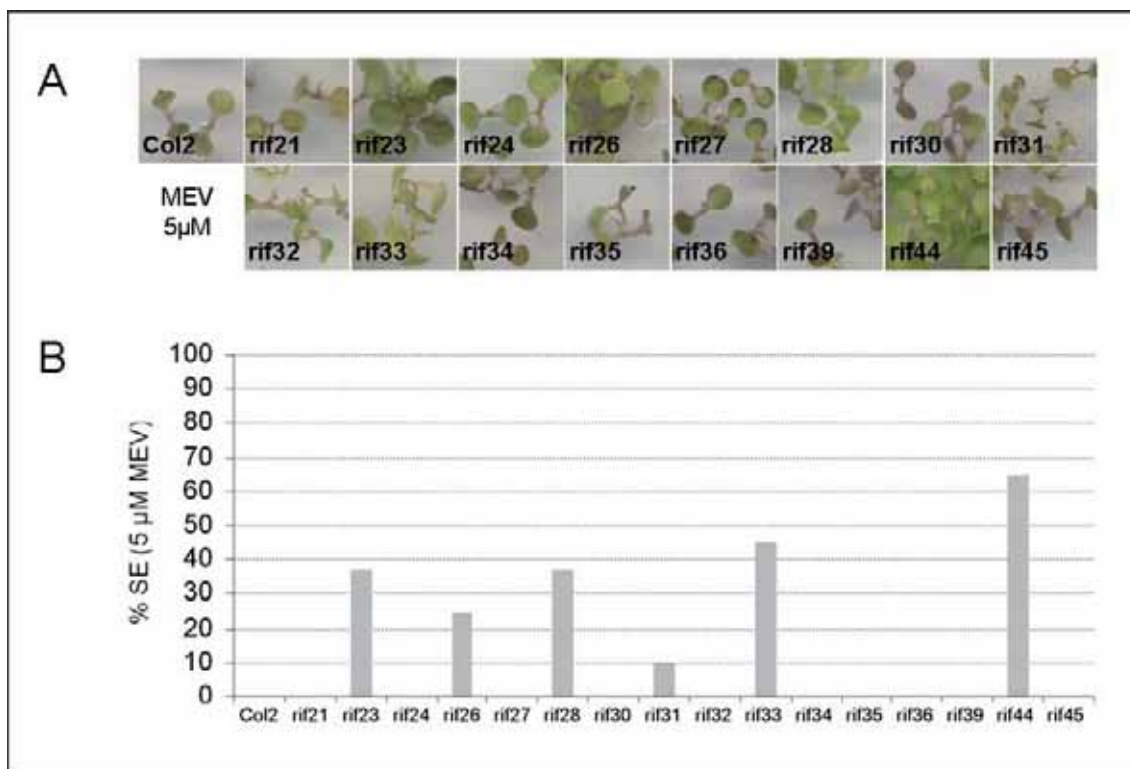


**Figura 22.** Quantificació de la resistència a la CLM dels mutants *rif*. La resistència a la CLM es va estimar amb poblacions de més de 50 individus utilitzant el percentatge de seedling establishment (SE) després de 10 dies en condicions de dia llarg.

### 3.6 Resistència dels mutants *rif* a la MEV

Un altre factor que podria explicar la resistència dels mutants *rif* a la FSM, seria un increment en la capacitat d'intercanviar intermediaris entre la ruta del MEP i la ruta del MVA. En condicions normals, i tot i existir aquest intercanvi, les plantes d'*Arabidopsis* no poden suplir el bloqueig d'una de les rutes amb precursors derivats de l'altra ruta. En realitat, les plantes transgèniques sobreexpressores de DXR tampoc poden superar un bloqueig de la ruta del MVA amb MEV tot i tenir incrementat el flux de la ruta. De la mateixa manera, un bloqueig de la ruta del MEP amb FSM no pot ser superat per les plantes transgèniques sobreexpressores d'*HMGR* i que tenen altament incrementat el flux de la ruta del MVA (Carretero-Paulet 2003). El factor limitant en aquests casos, semblaria ser la capacitat d'intercanviar els intermediaris a través d'un mecanisme que actualment encara no es coneix.

Per saber si els mutants *rif* seleccionats podien ser resistents a la FSM degut a l'activació de l'intercanvi d'intermediaris entre les dues rutes, i fóssin els prenifosfats procedents de la ruta del MVA els responsables de que els mutants poguéssin superar el bloqueig de la ruta del MEP es van cultivar aquests mutants en presència de MEV.. Els mutants *rif23*, *rif26*, *rif28*, *rif31*, *rif33* i *rif44* són capaços de superar aquesta inhibició (figura 23).



**Figura 23.** Quantificació de la resistència a la MEV dels mutants *rif* seleccionats. La resistència a la MEV es va estimar amb poblacions de més de 50 individus utilitzant el percentatge de seedling establishment (SE) després de 10 dies en condicions de dia llarg

### 3.7 Nivells de proteïna DXS i DXR dels mutants *rif*

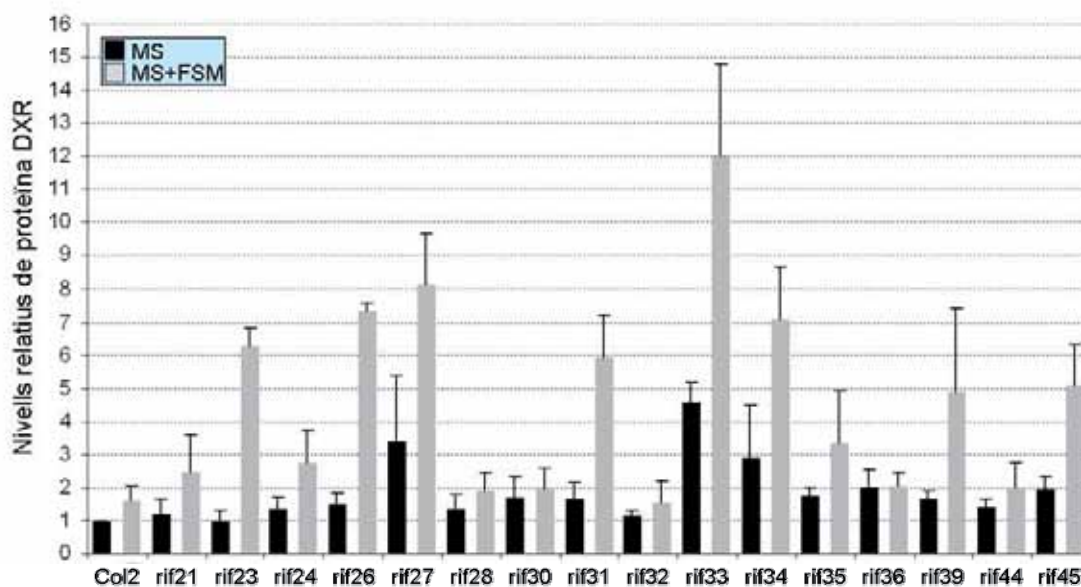
Es coneix que *Arabidopsis* té la capacitat de respondre al bloqueig provocat per la FSM augmentant els seus nivells de proteïna DXR (Carretero-Paulet 2003). Aquest augment, però, no és suficient per superar el bloqueig de la ruta del MEP. El fet que els mutants *rif* puguin superar la inhibició de la DXR per FSM plantejava la qüestió de si tenien uns nivells basals de DXR superiors al parental silvestre, o bé si el que tenien afectat era la seva capacitat d'augmentar els nivells de DXR en resposta al bloqueig per la FSM. És per això que els nivells de proteïna es van mesurar en dues condicions diferents. Es van cultivar plàntules dels diferents mutants a sobre d'un paper de filtre en medi MS durant 5 dies en condicions de dia llarg, moment en el qual el filtre es va traspasar a una altra placa que en un cas contenia medi MS, i en un altre medi MS suplementat amb FSM (100µM). Després de 48 hores es van recollir les mostres. Aquest mètode permet estudiar els nivells de proteïna DXS i DXR en resposta al tractament amb FSM de forma més fiable que si l'inhibidor s'hagués afegit des d'un principi, ja que en aquest cas les plàntules del parental silvestre, que són sensibles a la FSM, estarien massa afectades al final del tractament.

Els resultats obtinguts van revelar que la majoria dels mutants *rif* presentaven uns nivells basals de proteïna DXR més elevats que el parental Col2, sent destacables els nivells mostrats per *rif27* i *rif33*.



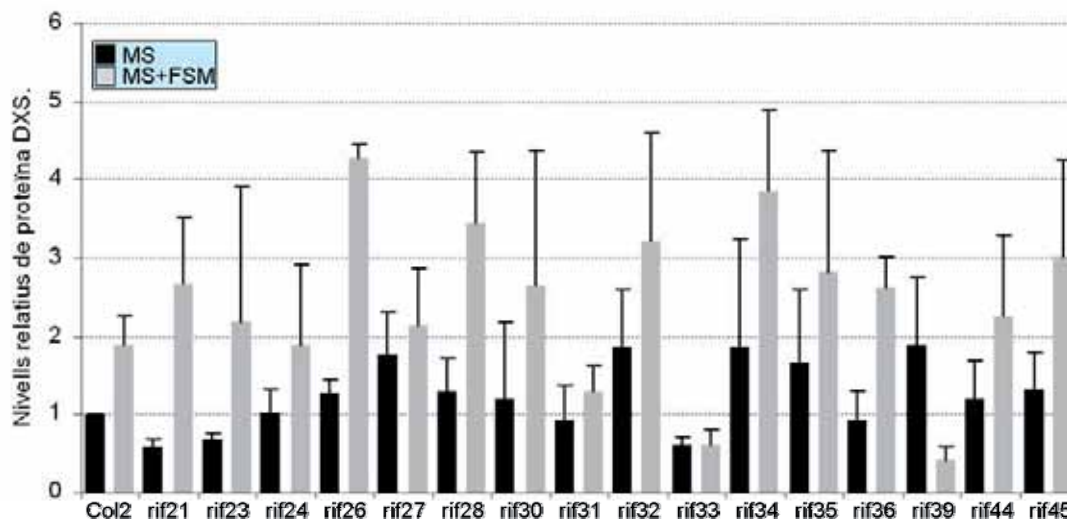
## RESULTATS

Els nivells de DXR són també més elevats després de sotmetre les plantes a la inhibició per FSM, indicant una capacitat de resposta en front aquest inhibidor més elevada en relació a Col2. Alguns mutants presentaven uns nivells basals de proteïna DXR semblants al WT però davant del bloqueig de la ruta mostraven una elevada capacitat d'induir els nivells de DXR. Cal indicar també que alguns mutants *rif* no van mostrar diferències significatives respecte de Col2, indicant que la resistència a la FSM vindria donada per altres factors (Figura 24).



**Figura 24.** Quantificació dels nivells de proteïna DXR dels mutants *rif* seleccionats. Es van cultivar plàntules corresponents als diferents mutants *rif* i al parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a plaques amb presència o absència de FSM (100 $\mu$ M). Al cap de dos dies es van recollir les mostres i es va realitzar l'extracció de proteïna per realitzar l'anàlisi de Western-Blot utilitzant l'anticòs  $\alpha$ DXR (Materials i Mètodes, 5.3). Es mostra la mitja i la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents.

Per mesurar els nivells de proteïna DXS es va seguir el mateix mètode experimental que per la DXR. Els resultats obtinguts van revelar que els nivells de proteïna DXS es trobaven també alterats en la majoria dels mutants *rif*. Alguns mostraven uns nivells basals de proteïna DXS més elevats que en el parental Col2. En el cas de *rif39* aquests nivells disminuïen en resposta a la inhibició per FSM, contràriament al que succeïa a Col2, on els nivells augmentaven fins a 2 vegades. Altres mutants tenien incrementada aquesta inducció, mentre que en els mutants *rif21*, *rif23* i *rif33* els nivells basals de DXS eren inferiors al parental Col2, i de forma més accentuada a *rif33* que no incrementava els nivells de DXS en resposta al tractament amb FSM (Figura 25).

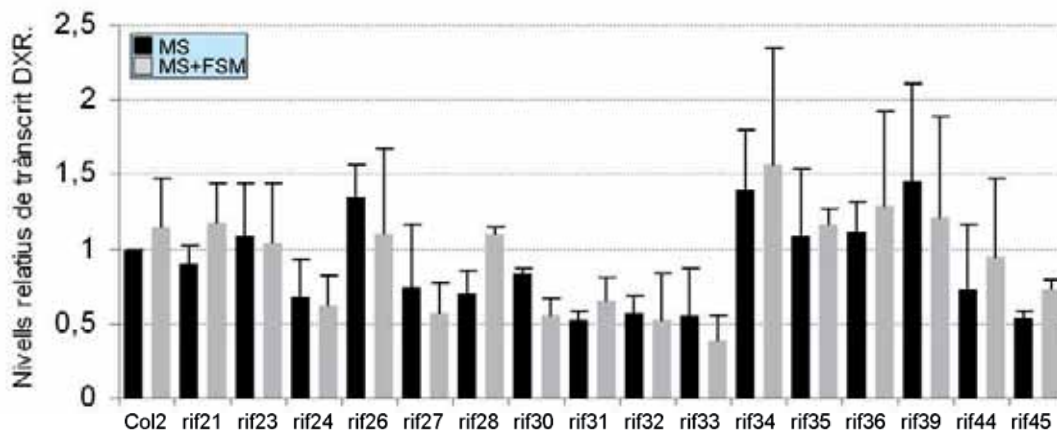


**Figura 25.** Quantificació dels nivells de proteïna DXS dels mutants rif seleccionats. Es van cultivar plàntules corresponents als diferents mutants rif i al parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a plaques amb presència o absència de FSM (100µM). Al cap de dos dies es van recollir les mostres i es va realitzar l'extracció de proteïna per realitzar les anàlisi de Western-Blot utilitzant l'anticòs αDXS (Materials i Mètodes, 5.3). Es mostra la mitja i la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents.

### 3.8 Anàlisi de l'expressió dels gens *DXS* i *DXR* en els mutants *rif*

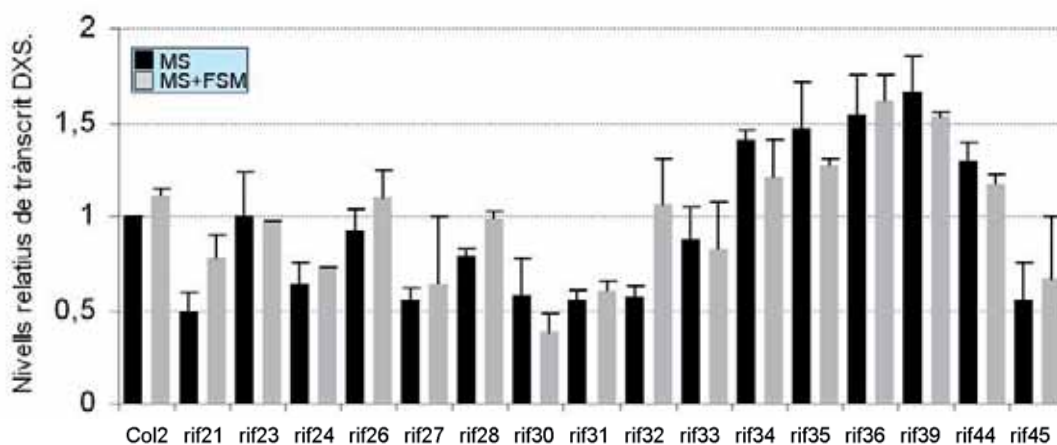
Per tal d'aprofundir en els mecanismes implicats en la resistència a la FSM, es van analitzar els nivells dels transcrits dels gens *DXS* i *DXR*. En aquest cas també es van mesurar els nivells de transcrits de plàntules tractades o no amb FSM. Com es pot apreciar a la figura 26, els nivells dels transcrits de *DXR* no presenten gaires variacions en relació amb el parental Col2, a excepció de *rif34*, pel qual es podria pensar que l'increment observat en els nivells de proteïna *DXR* es correspondria amb l'increment del transcrit corresponent. En el cas de *rif26* i *rif39* també s'observa un increment dels nivells basals de transcrit de *DXR*. Pels altres mutants, els resultats obtinguts estarien d'acord amb l'implicació de mecanismes que actuarien a nivell posttranscripcional.

## RESULTATS



**Figura 26.** Quantificació dels nivells de transcrit DXR dels mutants rif seleccionats. Es van cultivar plàntules corresponents als diferents mutants rif i al parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a plaques amb presència o absència de FSM (100 $\mu$ M). Al cap de dos dies es van recollir les mostres i es va realitzar l'extracció d'RNA per realitzar les anàlisi de Northern-Blot utilitzant la sonda DXR i normalitzant els resultats utilitzant la sonda 25S (Materials i Mètodes, 5.2) Es mostra la mitja i la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents.

Els nivells de transcrit *DXS* observats en la majoria dels mutants tampoc es corresponen amb els nivells de la proteïna *DXS*. Els mutants *rif34*, *rif35*, *rif36* i *rif39* serien els únics en els que semblari produir-se una lleugera activació de l'expressió del gen *DXS*. Per contra, mutants que presentaven nivells incrementats de proteïna *DXS* mostraven una disminució de la transcripció del gen corresponent, com és el cas de *rif24* i *rif32* (Figura 27).

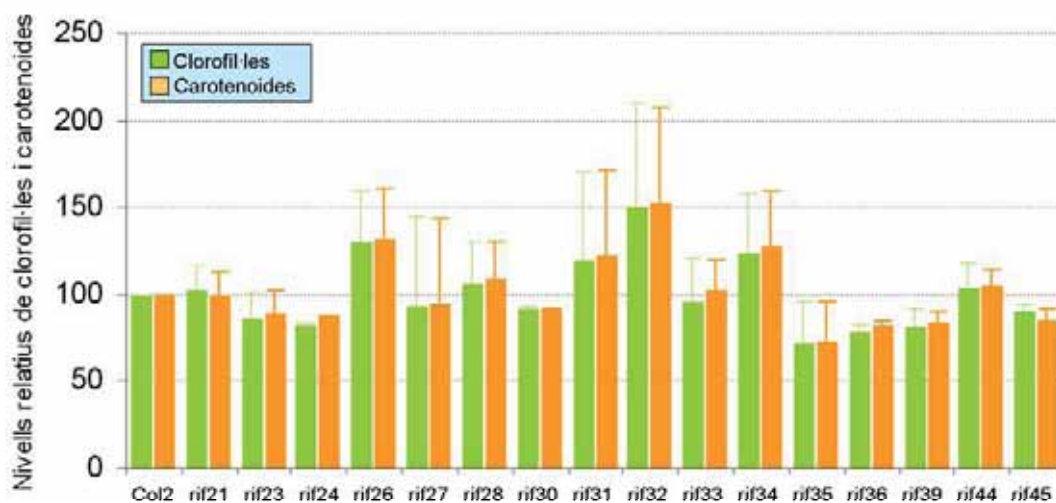


**Figura 27.** Quantificació dels nivells de transcrit DXS dels mutants rif seleccionats. Es van cultivar plàntules corresponents als diferents mutants rif i al parental Col2 en condicions de dia llarg durant

5 dies, moment en el que es van transferir a plaques amb presència o absència de FSM (100 $\mu$ M). Al cap de dos dies es van recollir les mostres i es va realitzar l'extracció d'RNA per realitzar les anàlisi de Northern-Blot utilitzant la sonda DXS i normalitzant els resultats utilitzant la sonda 25S (Materials i Mètodes, 5.2) Es mostra la mitja i la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents..

### 3.9 Nivells de clorofil·les i carotenoides en els mutants *rif*

L'enzim DXR controla el flux de la ruta del MEP de forma compartida amb DXS i HDR. Una major activitat DXR es tradueix en un augment dels productes finals de la via. Per tal de saber si els mutants *rif* sintetitzaven més isoprenoides plastídics, es van mesurar els nivells de clorofil·les i carotenoides. Uns nivells elevats de proteïna DXR, com succeeix en molts dels mutants *rif* seleccionats, feia esperar un increment en l'acúmulo de pigments, i més si es té en compte que alguns mutants també presenten nivells elevats de la proteïna DXS. Els resultats obtinguts, però, van indicar que els mutants *rif* no sobreacumulen pigments d'una forma significativa. De fet, alguns d'ells presenten nivells menors de clorofil·les i carotenoides que el parental silvestre (Figura 28).



**Figura 28.** Nivells de clorofil·les i carotenoides dels mutants *rif* seleccionats. Els pigments es van mesurar en plàntules crescudes durant 10 dies en condicions de dia llarg. La mitja i la desviació estàndard corresponen a dos experiments independents amb dues rèpliques cadascún.

### 3.10 Identificació del lloc d'inserció del T-DNA en els mutants *rif*

El cribatge de la col·lecció de mutants d'*activation tagging* va permetre seleccionar 18 mutants *rif* que presentaven resistència a la FSM. Aquests mutants eren també resistents a l'herbicida BASTA, confirmant la presència del T-DNA. La búsqueda del lloc d'inserció del T-DNA va permetre identificar

## RESULTATS

per cada mutant quin gen (o gens) podria estar alterat, i en conseqüència poder establir quin gen seria el responsable de conferir resistència a la FSM. L'estratègia seguida confirmar quin d'aquest gens era el responsable de la resistència a la FSM, ha consistit en l'anàlisi de mutants de pèrdua de funció en els casos en que el T-DNA estava inserit en un gen. i l'obtenció de línies transgèniques sobreexpressores dels gens candidats que estaven dins del radi d'acció dels enhancers 35S del T-DNA.

Per tal de trobar quin era el lloc d'inserció del T-DNA en els diferents mutants es van utilitzar les tècniques de PCR inversa i *walking PCR* (Materials i Mètodes, 5.6). Aquestes tècniques van ser modificades en alguns casos dificultosos degut a la manera en que s'havia inserit el T-DNA. En alguns mutants *rif* es van trobar més d'un T-DNA, la qual cosa va dificultar la posterior identificació del gen responsable de conferir resistència a la FSM. Per altra banda, es van trobar tres casos en els que el lloc d'inserció del T-DNA era exactament el mateix, indicant que estàvem davant del mateix mutant. És per això, que finalment s'ha acabat treballant amb 16 mutants *rif*. A la figura 29 es mostra un llistat amb els mutants seleccionats i l'estratègia utilitzada per identificar el lloc d'inserció i el gen responsable de la resistència a la FSM.

	<b>Estratègia utilitzada</b>	<b>Identificació del gen responsable de la resistència a FSM</b>	<b>apartat</b>
<i>rif21</i>	walking PCR RB	Anàlisi del mutant knockout del gen candidat	3.10.5
<i>rif23</i>	walking PCR LB	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.1.2
<i>rif24</i>	PCR inversa LB-EcoRI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.6.1
<i>rif25</i>	walking PCR LB	Equival a <i>rif23</i>	
<i>rif26</i>	PCR inversa LB-BamHI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.2.2
<i>rif27</i>	PCR inversa LB-EcoRI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.1.1
<i>rif28</i>	walking PCR LB	Anàlisi del mutant Knockout del gen candidat	3.10.6.1
<i>rif29</i>	walking PCR LB	Equival a <i>rif23</i>	
<i>rif30</i>	walking PCR LB	Sobreexpressió del gen candidat / Anàlisi del mutant Knockout del gen candidat	3.10.3
<i>rif31</i>	walking PCR LB	Anàlisi del mutant Knockout del gen candidat	3.10.1.2
<i>rif32</i>	walking PCR RB	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.3
<i>rif33</i>	PCR inversa RB-HindIII	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.1.2
<i>rif34</i>	walking PCR LB	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.4.1
<i>rif35</i>	PCR inversa LB-EcoRI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.6.1
<i>rif36</i>	walking PCR LB	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.6.1
<i>rif39</i>	PCR inversa RB-HindIII	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.4.2
<i>rif41</i>	PCR inversa LB-EcoRI	Equival a <i>rif35</i>	
<i>rif44</i>	PCR inversa LB-BamHI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.6.1
<i>rif45</i>	PCR inversa LB-BamHI	Sobreexpressió del gen candidat	3.10.3

**Figura 29.** Taula resum dels experiments d'identificació del lloc d'inserció del T-DNA en els mutants *rif* seleccionats.

Els resultats detallats de l'anàlisi bioquímica *rif* de cada mutant, juntament amb el fenotip i la identificació dels gens implicats es detallen amb més profunditat en els apartats següents. Per a la seva descripció s'ha intentat agrupar-los en funció de les seves característiques bioquímiques en alguns casos i, en d'altres en funció dels possibles mecanismes relacionats amb la resistència a la FSM.

### **3.10.1 Mutants *rif* amb nivells basals elevats de proteïna DXR: *rif27* i *rif33*.**

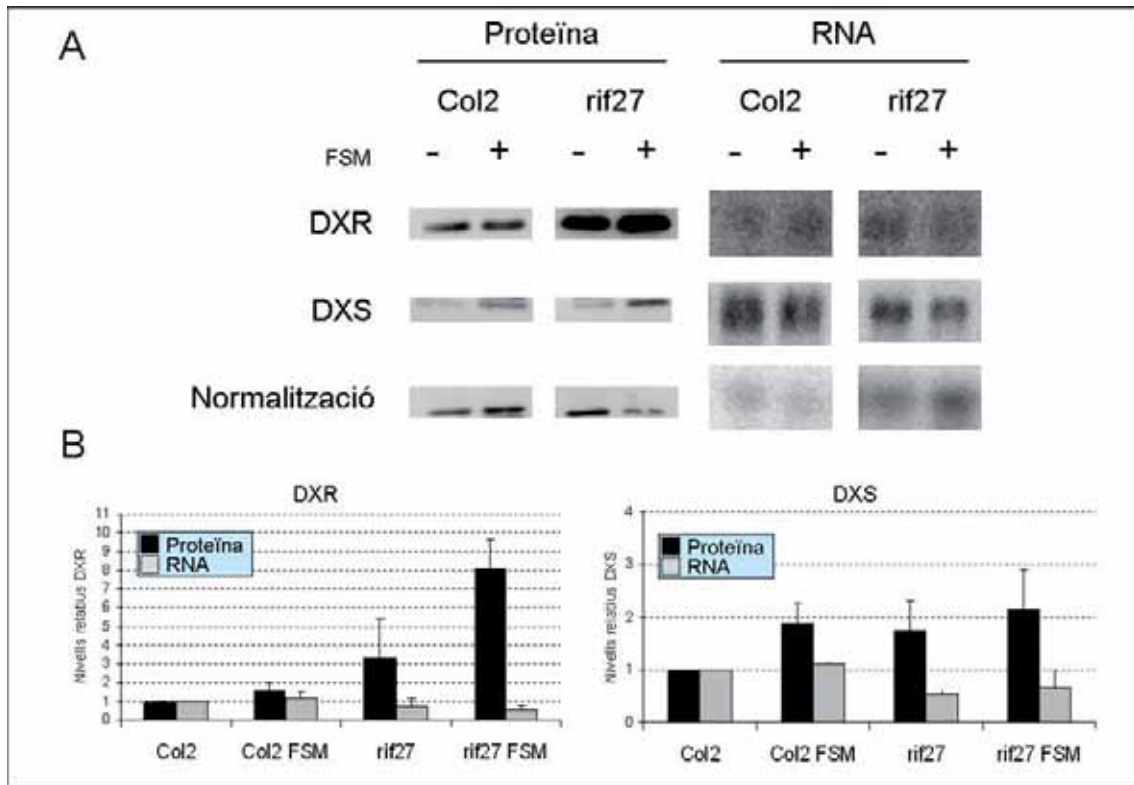
L'estratègia de selecció dels mutants *rif* estava orientada en bona mesura a la identificació de processos reguladors de la biosíntesis d'isoprenoides, i més concretament de la ruta del MEP. Entre aquests processos, resultaven interessants aquells capaços d'incrementar els nivells de la proteïna DXR.

Els mutants *rif27* i *rif33* van mostrar uns nivells basals de proteïna DXR més elevats que el parental Col2 (figures 30 i 33). El fet que els nivells de transcrit no mostrassin un increment paral·lel indicava que es tractaria d'un procés postranscripcional. És interessant remarcar que aquests mutants mostren uns nivells d'inducció molt elevats en presència de FSM, tot i que aquest increment mostra una notable proporcionalitat amb els valors basals (figures 30 i 33).

#### **3.10.1.1 *rif27*.**

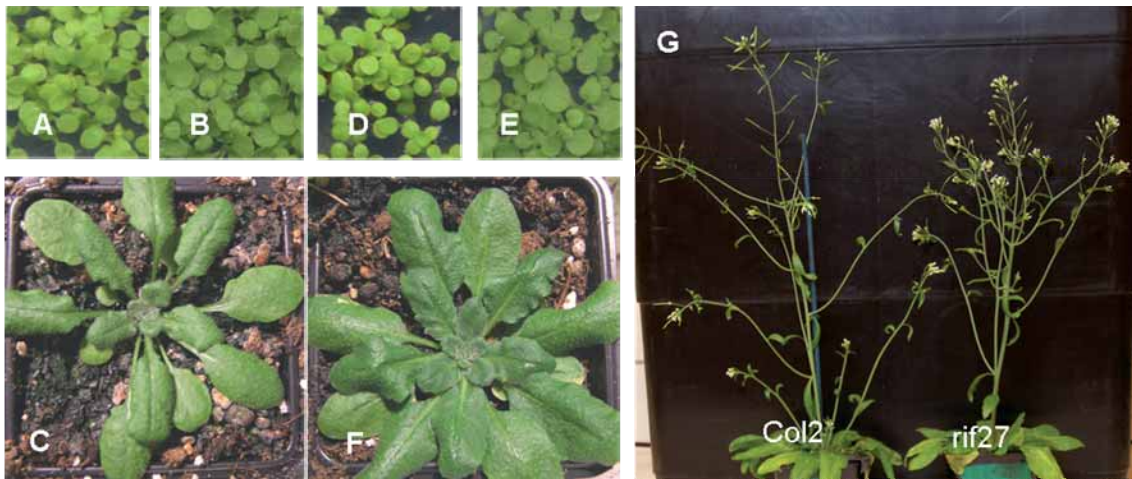
El mutant *rif27* no només presenta uns alts nivells de proteïna DXR, sinó que també té incrementats els nivells de proteïna DXS. En cap dels dos casos s'ha observat un increment del transcrit corresponent, de manera que es tractaria d'un mecanisme postranscripcional que resultaria en un augment simultani dels nivells de proteïna DXS i DXR (figura 30).

## RESULTATS



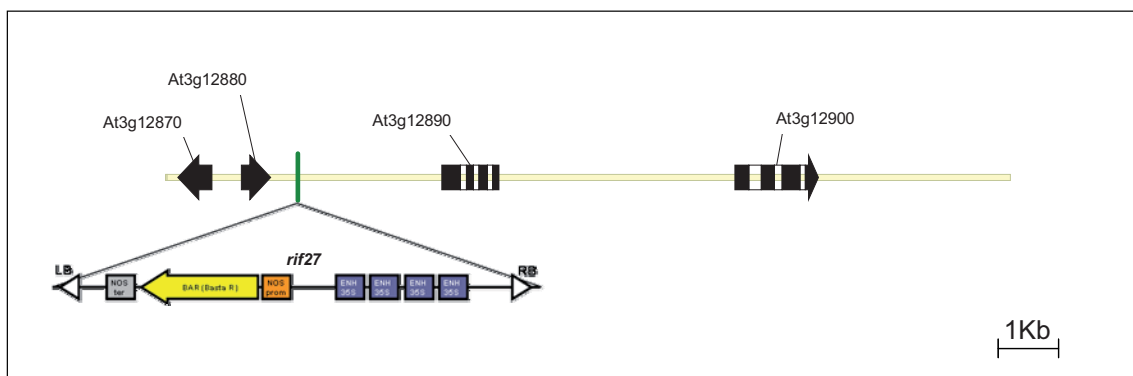
**Figura 30.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant *rif27*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif27* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisis de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

Tal com s'aprecia a la figura 31 aquest mutant mostra un fenotip alterat respecte a *Col2*, amb una roseta formada per fulles més amples i brillants. La planta adulta mostra unes tiges lleugerament més curtes i les inflorescències són més poblades. En els estadis inicials del desenvolupament, no s'observen diferències fenotípiques.



**Figura 31.** Fenotip del mutant *rif27* i del parental *Col2* durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B i C** corresponen a *Col2*. **D, E i F** corresponen a *rif27*. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i D**) i als 10 dies (**B i E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C i F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

Els resultats obtinguts en la búsqueda del lloc d'inserció del T-DNA van mostrar que *rif27* poseeix el T-DNA inserit en una regió intergènica del cromosoma 3 (Figura 32). Degut a que no està interrompent l'expressió de cap gen, es tractaria d'un mutant de guany de funció d'algun dels gens que es troben sota el radi d'acció dels enhancers situats en la regió del *right border* (RB) del T-DNA. Tenint en compte que el T-DNA té un tamany de 6543 pb, el radi d'acció quedaria molt probablement limitat als gens contigus al RB.



**Figura 32.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif27*. (**A**) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa

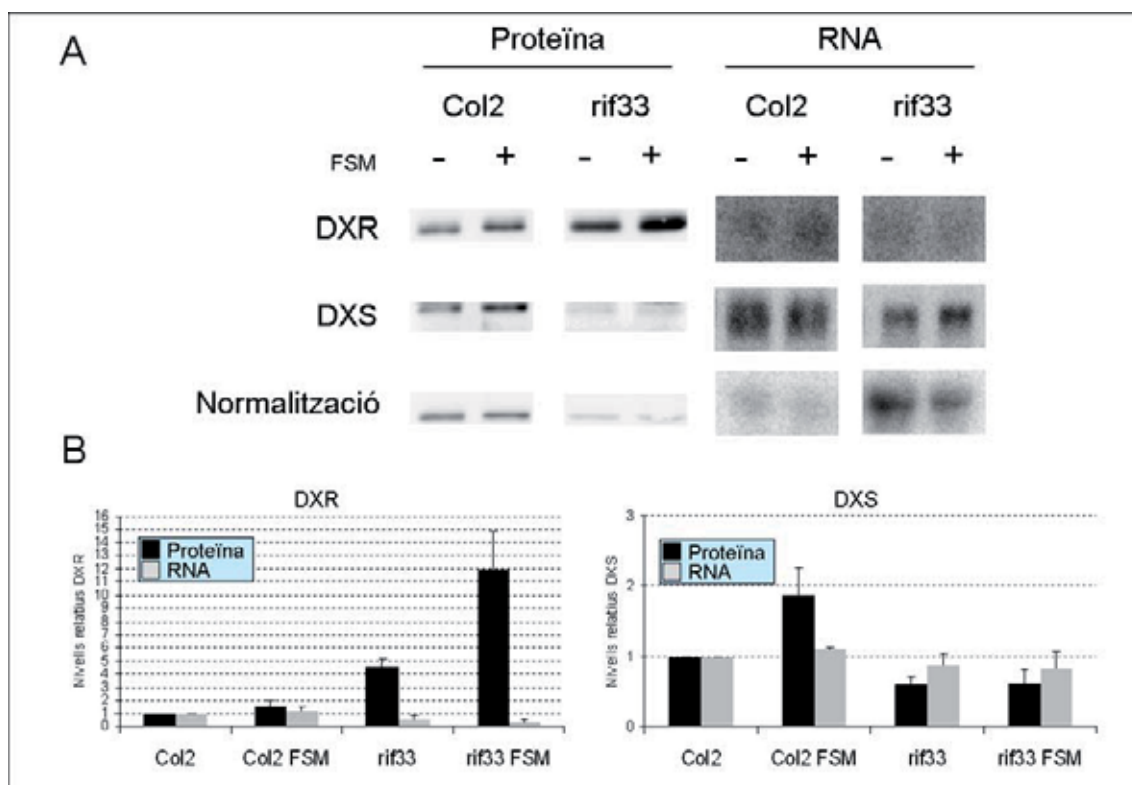


## RESULTATS

És per tot això que es va considerar que el principal gen candidat a ser activat seria el gen At3g12890. Aquest gen codifica per una proteïna que pertany a una classe de proteïnes amb domini CCT (CONSTANS, CONSTANS-like, TOC1). És un activador de la transcripció anomenat *ASML2* i regula l'expressió d'un grup de gens induïbles per sucres (Masaki i col., 2005). Per tal de confirmar si At3g12890 és el gen implicat s'ha iniciat la obtenció de línies transgèniques sobreexpressores del cDNA corresponent a aquest gen. En aquest sentit s'ha generat la construcció pC-RIF27, on el cDNA de At3g12890 s'ha clonat sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes 5.1.1). No s'ha pogut obtenir, però, cap línia transgènica després de dues infiltracions amb *Agrobacterium*.

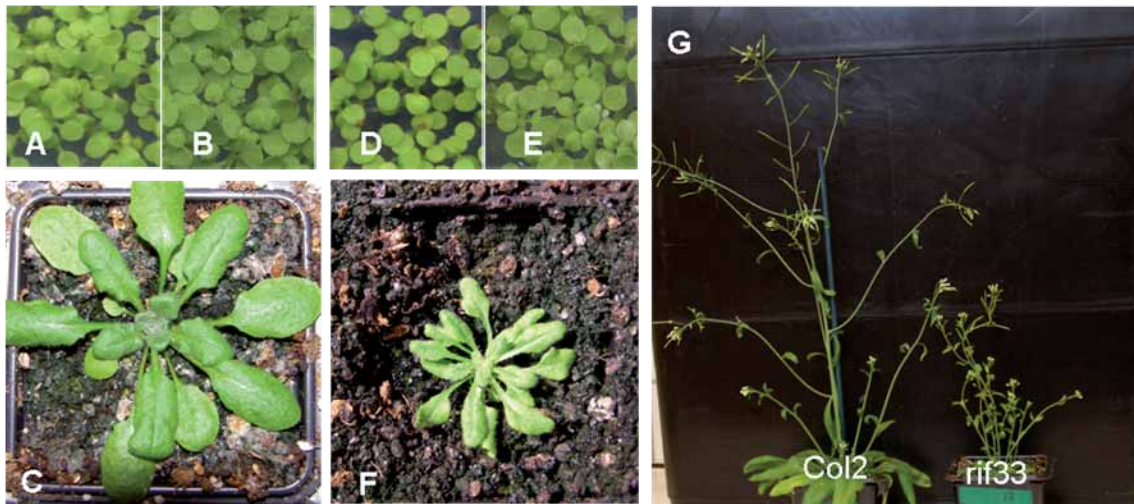
### 3.10.1.2 *rif33*.

El mutant *rif33* és el mutant que presenta uns nivells basals més elevats de proteïna DXR, incrementats amb més de 4 vegades. Aquests alts nivells de proteïna no es corresponen amb un increment del transcrit corresponent, i per tant es tractaria d'un procés postranscripcional. D'altra banda, els nivells de proteïna i de transcrit DXS són inferiors als del parental Col2, i per tant, en aquest mutant no tindria lloc una activació general de la ruta del MEP (Figura 33). *Rif33* és capaç de superar també el bloqueig de la ruta del MVA provocat per la MEV (figura 23).



**Figura 33.** *Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif33. Es van cultivar plàntules del mutant rif33 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.*

El fenotip de *rif33* presenta clares diferències amb el de Col2. En estadi de roseta, s'observen unes fulles més petites i lleugerament curvades, mentre que en la planta adulta, s'observa enanisme. No s'observen diferències significatives en el temps de floració (figura 34).



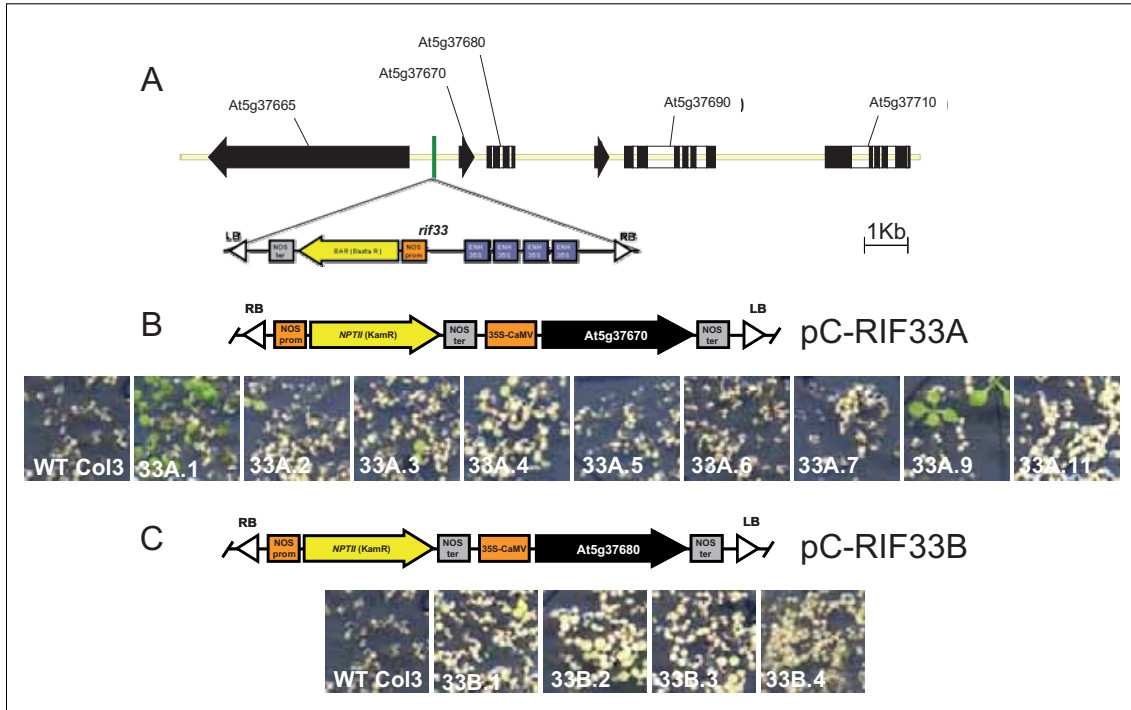
**Figura 34.** *Fenotip del mutant rif33 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. A, B i C corresponen a Col2. D, E i F corresponen a rif33. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (A i D) i als 10 dies (B i E) de creixement en condicions de dia llarg. C i F corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. A G es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.*

El T-DNA en aquest mutant es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 5, i per la posició dels enhancers 35S, els gens més probables de ser activats eren At5g37670 i At5g37680 (Figura 35A). És per això que es van generar línies transgèniques de sobreexpressió dels cDNAs corresponents a aquests gens, obtenint-se primer les construccions pC-RIF33A i pCRIF33B on els cDNAs de At5g37670 i At5g37680 es troben sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes 5.1.1).

Es van aconseguir 9 línies de sobreexpressió d'At5g37670, de les quals, 4 van presentar resistència a la FSM. Així, les línies 33A.1 i 33A.9, són clarament resistents, mentre que s'observa una

## RESULTATS

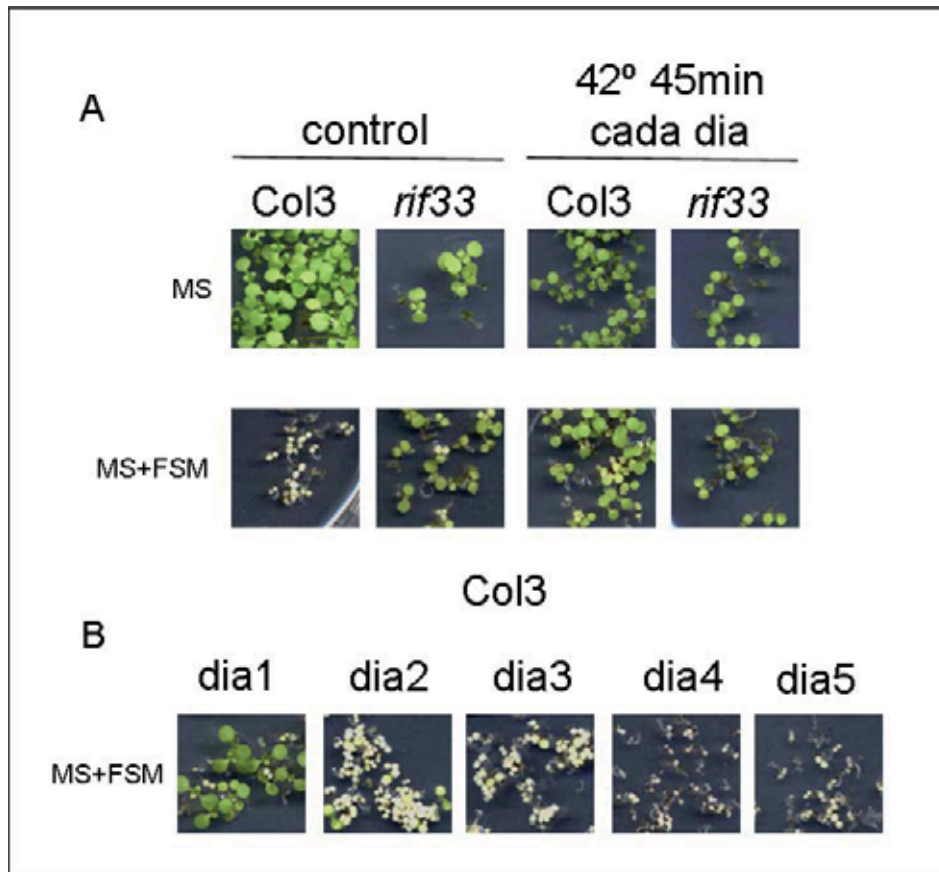
lleugera resistència en les línies 33A.2 i 33A.3 (Figura 35B). D'altra banda, cap de les 4 línies obtingudes de sobreexpressió d'At5g37680 (33B.1-33B.4) presenta resistència a la FSM (Figura 35C). Així doncs, es pot concloure que és un guany de funció del gen At5g37670 el responsable de la resistència a FSM de *rif33*.



**Figura 35.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif33*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g37670* (B) i *At5g37680* (C), i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

El gen *At5g37670* codifica una *small heat shock protein* (HSP15.7-CI) localitzada en els peroxisomes. Aquesta proteïna s'indueix en resposta a estrès per calor, i s'ha descrit que té funció de xaperona ATP-independent, donant estabilitat a altres proteïnes (Ma i col., 2006).

Es va realitzar un experiment de *heat shock* per comprovar si les plàntules silvestres d'*Arabidopsis* adquirien resistència a la FSM. Com s'observa en la figura 36, després de realitzar un tractament a 42° durant 45 minuts un cop cada dia, després de 7 dies les plàntules mostraven resistència a la FSM. De fet, només calia un tractament tèrmic el primer dia després de la germinació per tal que les plàntules adquirissin resistència. Cal indicar però, que si aquest tractament es feia per primera vegada el segon dia o més endavant, les plàntules ja no podien superar la inhibició per la FSM (Figura 36B).



**Figura 36.** Resistència de les plàntules d'*Arabidopsis* després del tractament de heat shock (42°C, 45 min). Les plantes van ser crescudes durant 7 dies en condicions de dia llarg, amb presència i absència de FSM a 50 µM. El tractament de heat shock es va realitzar col·locant les plàntules en una cambra de germinació a 42°C, durant 45 min els 5 dies posteriors a la germinació de les llavors (A), i també fent el mateix tractament però només un dia (B). En aquest últim cas, unes plàntules van ser sotmeses al tractament el primer dia després de la germinació, altres al segon dia, i així fins al cinquè dia.

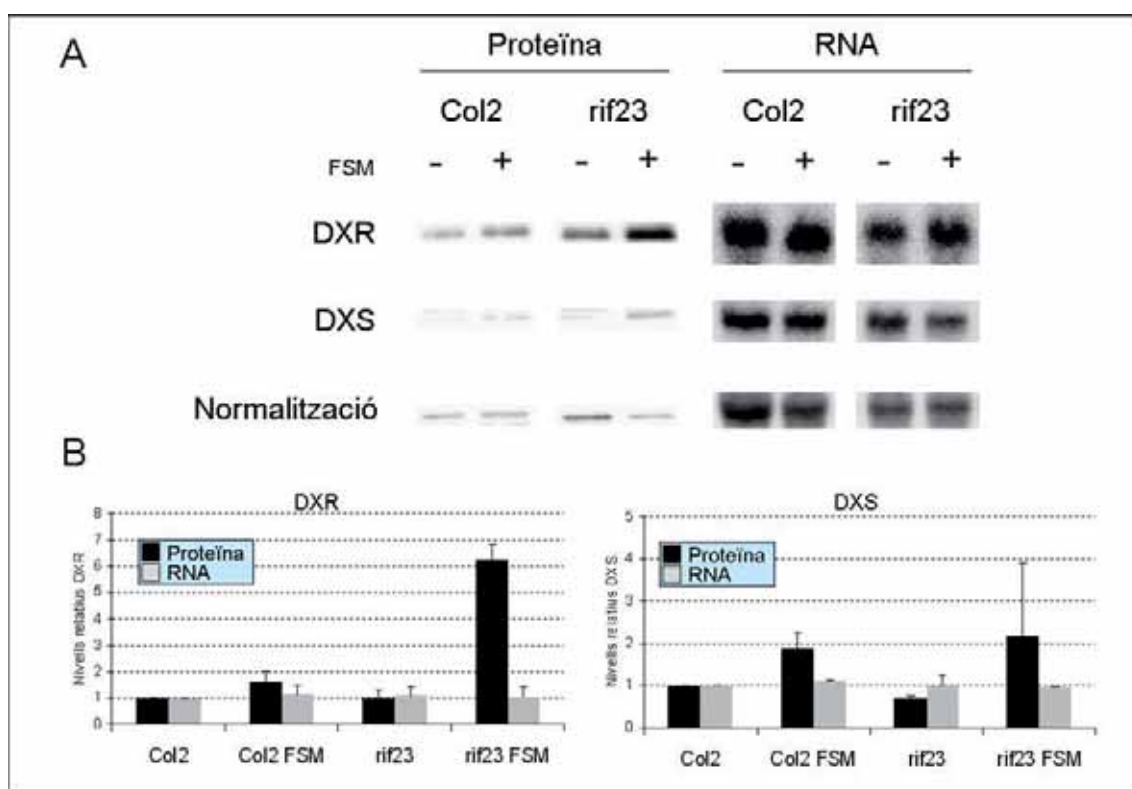
### 3.10.2 Mutants *rif* amb una elevada capacitat d'inducció dels nivells de DXR en resposta al tractament amb FSM: *rif23*, *rif26* i *rif31*

Les plantes d'*Arabidopsis* tenen la capacitat d'incrementar els nivells de proteïna DXR quan es bloqueja la ruta del MEP. Així doncs, quan es cultiven en presència de FSM, els nivells de DXR augmenten, tot i que no de forma suficient com per superar el bloqueig de la via del MEP. Aquesta resposta està altament incrementada en els mutants *rif23*, *rif26* i *rif31* i és un procés postranscripcional ja que no va acompanyada d'un increment en els nivells del transcrit de *DXR*.

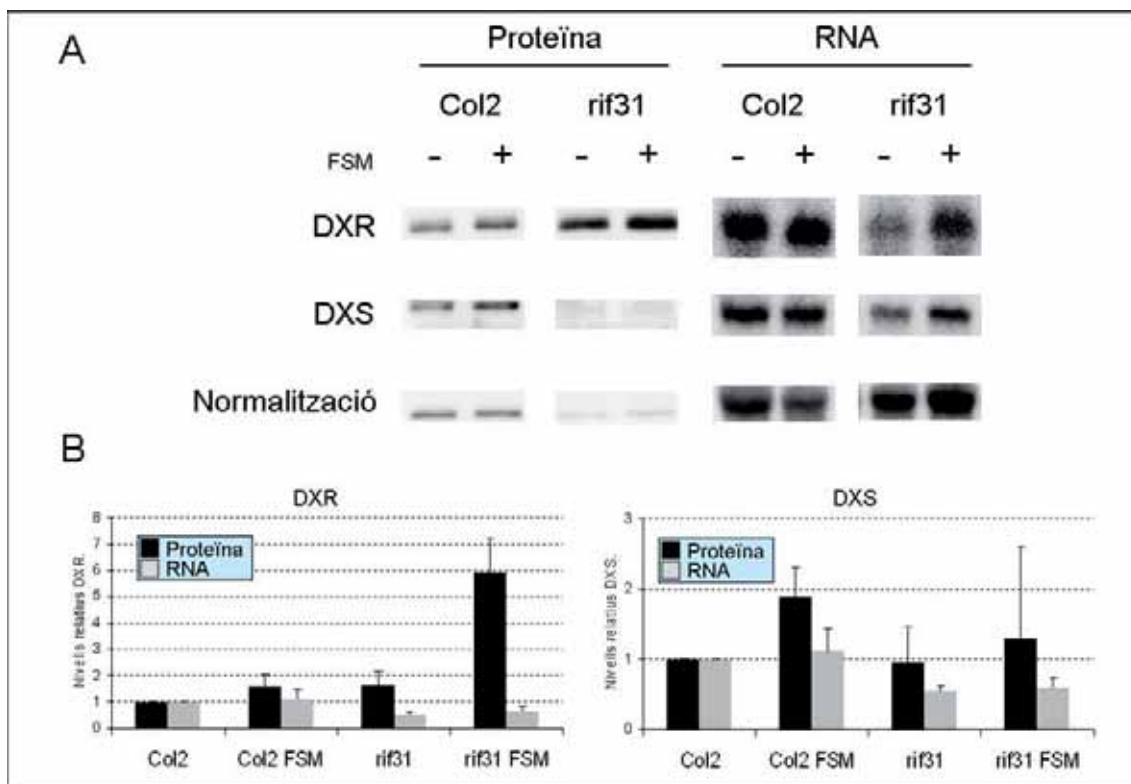
## RESULTATS

### 3.10.2.1 *rif23* i *rif31*.

Degut a que els mutants *rif23* i *rif31* són molt similars en la seva resposta a la FSM, la seva descripció es fa de forma conjunta. Els dos mutants mostren una elevada capacitat d'induir els nivells de proteïna DXR en resposta al tractament amb FSM, arribant a valors d'unes 6 vegades més elevats que els valors basals que presenta la soca parental en condicions normals, en la que només incrementen aproximadament 1,5 vegades (Figures 37 i 38). Els nivells del transcrit *DXR* no es veuen modificats, indicant que es tracta d'un procés postranscripcional. D'altra banda, els nivells de proteïna i transcrit *DXS* són semblants o fins i tot inferiors als de Col2 (figura 37 i 38)



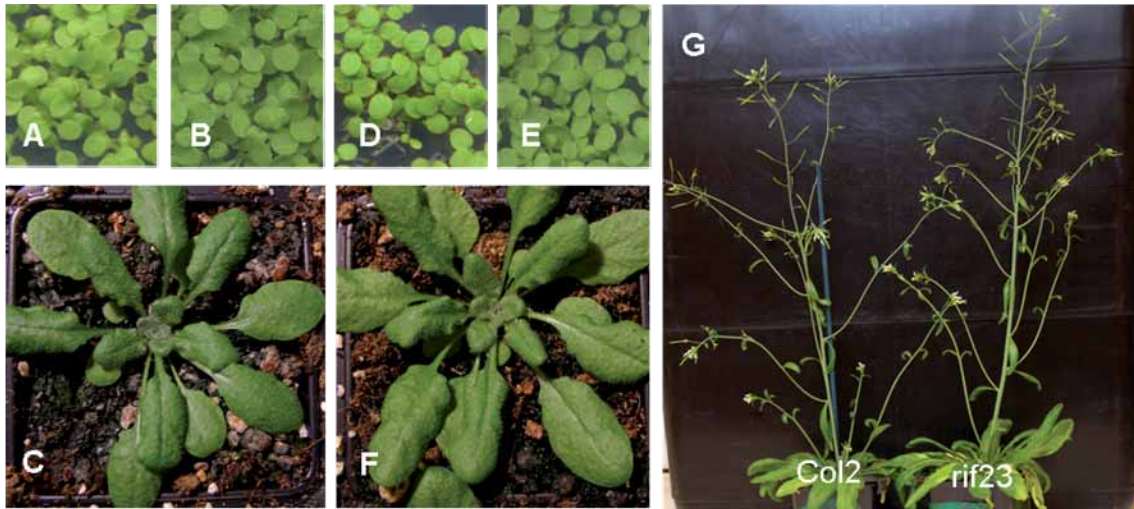
**Figura 37.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit *DXR* i *DXS* en el mutant *rif23*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif23* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits *DXR* i *DXS* i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.



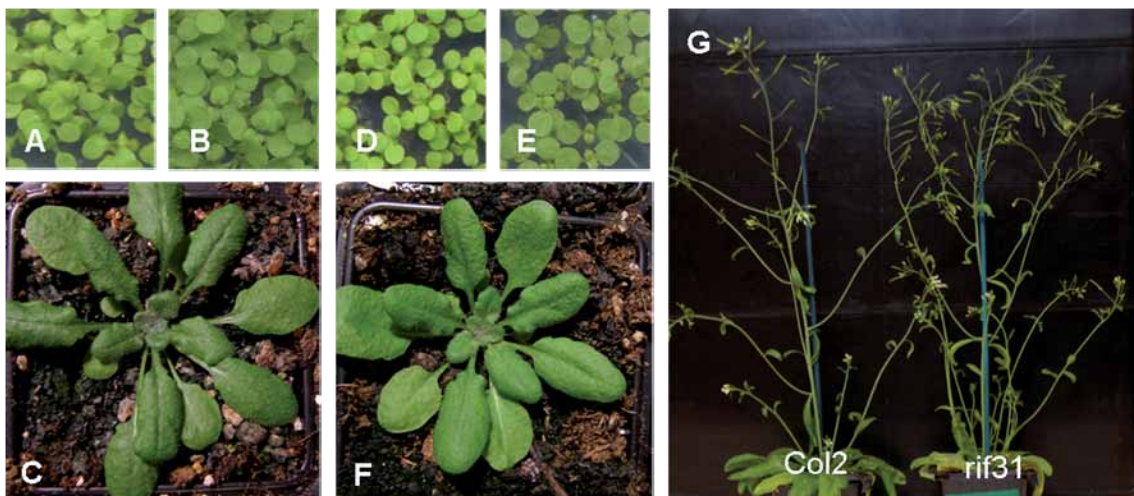
**Figura 38.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif31. Es van cultivar plàntules del mutant rif31 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

En les figures 39 i 40 es mostra el fenotip que presenten els mutants rif23 i rif31 al llarg del desenvolupament. No s'observen diferències respecte el parental Col2.

## RESULTATS



**Figura 39.** Fenotip del mutant *rif23* i del parental *Col2* durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A**, **B** i **C** corresponen a *Col2*. **D**, **E** i **F** corresponen a *rif23*. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A** i **D**) i als 10 dies (**B** i **E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C** i **F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A** **G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.



**Figura 40.** Fenotip del mutant *rif31* i del parental *Col2* durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A**, **B** i **C** corresponen a *Col2*. **D**, **E** i **F** corresponen a *rif31*. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A** i **D**) i als 10 dies (**B** i **E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C** i **F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A** **G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

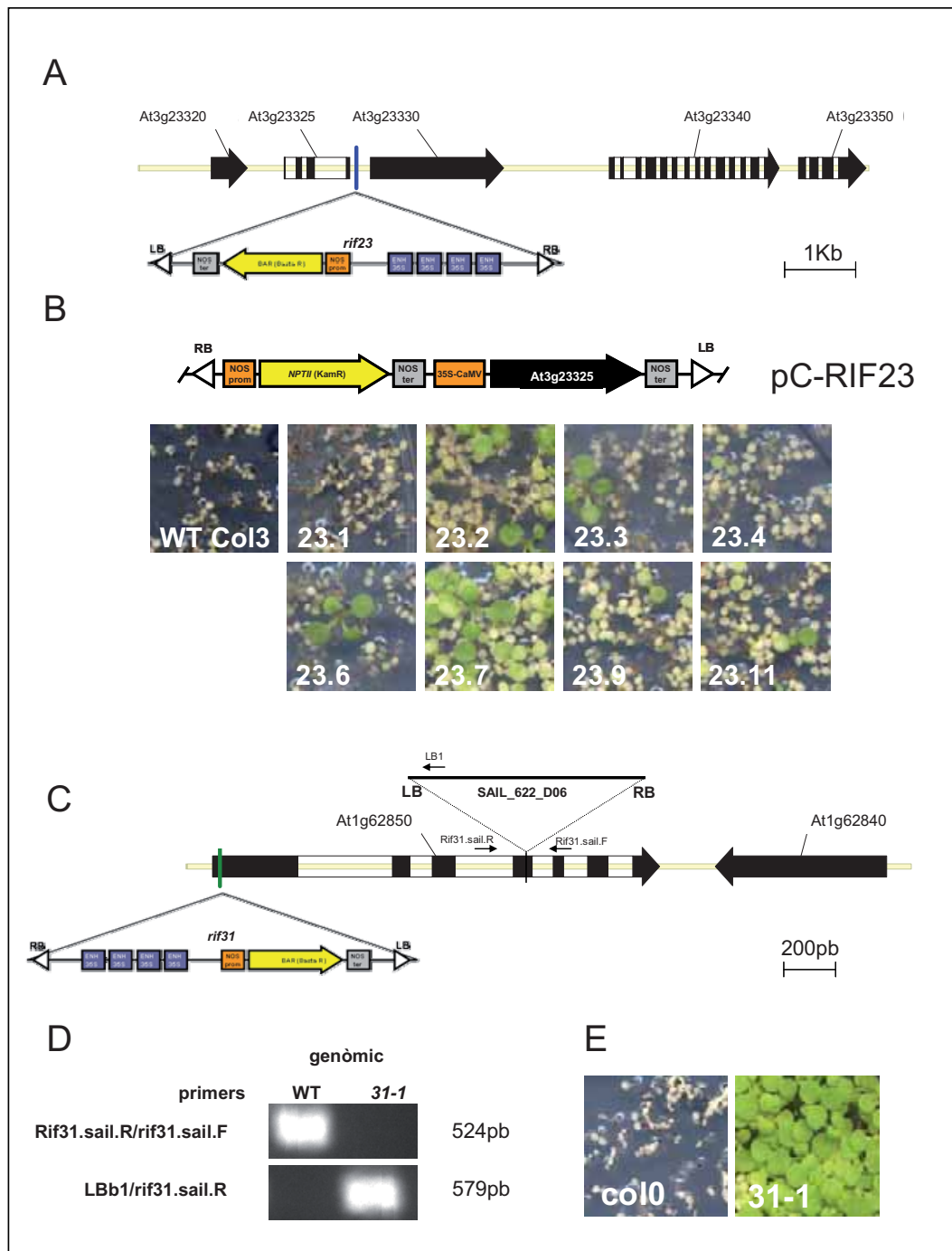
En el mutant *rif23* el T-DNA està inserit en una regió intergènica del cromosoma 3 i, per tant, es tractaria d'un mutant de guany de funció d'un dels gens flanquejants (Figura 41A). Fins a quatre gens

podrien estar activats per l'acció dels *enhancers* del T-DNA: At3g23330, At3g23340 i At3g23350, situats a regió contigua al RB, i At3g23325, situat a la regió contigua al LB. Per tal de comprovar si la sobreexpressió del gen At3g23325 conferia resistència a la FSM, es va generar la construcció pC-RIF23 on el cDNA d'aquest gen es troba clonat sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes, 5.1.1) i es van generar plantes transgèniques, obtenint-se 8 línies, de les quals 6 d'elles mostraven resistència a FSM (Figura **41B**).

Pel que fa a *rif31*, la inserció es troba localitzada interrompent la pauta de lectura del gen At1g62850 (Figura **41C**). Es va identificar un mutant de pèrdua de funció d'aquest gen en la col·lecció Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL) que es va obtenir del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant (SAIL\_622\_D06) es va anomenar *rif31-1*, i presenta una inserció del T-DNA a l'exó 4 (Figura **41C**). Es van seleccionar línies homozigòtiques d'aquest mutant mitjançant PCR (Figura **41D**), les quals van mostrar una clara resistència a la FSM (Figura **41D**).

El gen At3g23325, que confereix resistència al mutant *rif23* codifica per un factor d'splicing (Lorkovic i col., 2005), mentre que At1g62850 codifica per una proteïna que probablement actuarà com a factor alliberador de la traducció. Cap d'aquestes dues proteïnes ha estat caracteritzada a *Arabidopsis*.

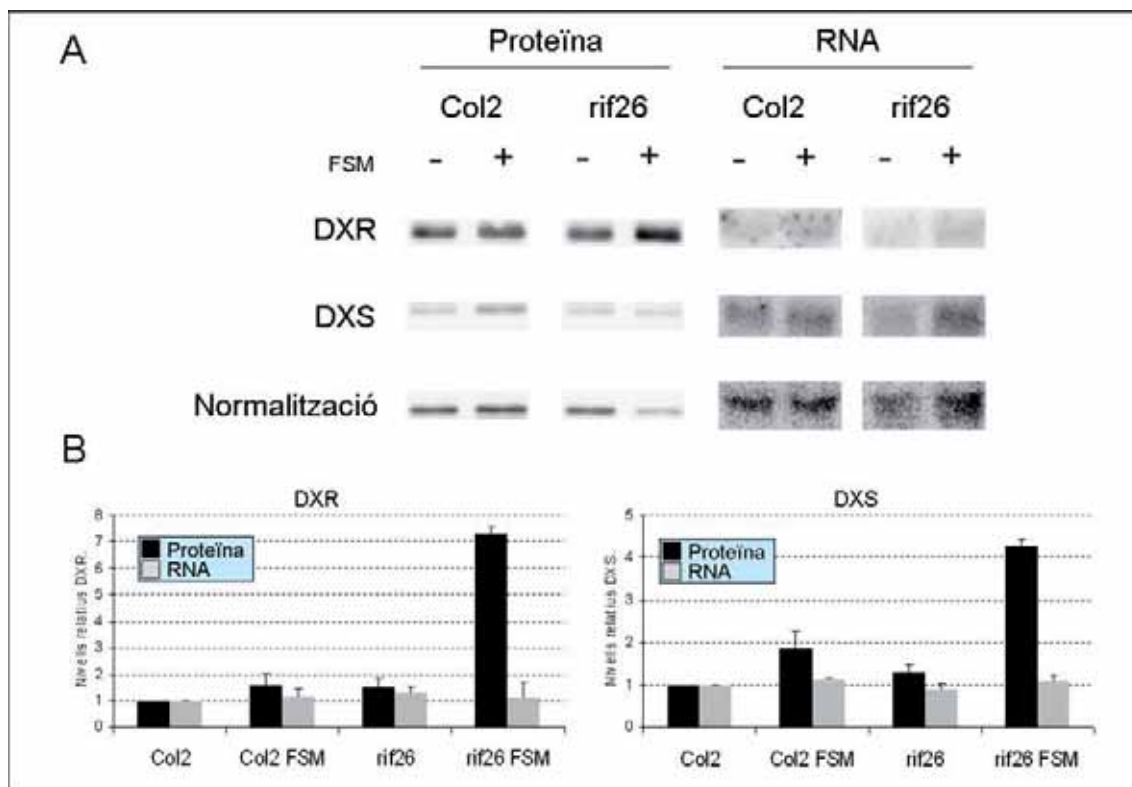




**Figura 41.** Regió genòmica en la que estàn inserits els T-DNAs en els mutant rif23, rif31 i rif31-1. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa en el mutant rif23. (B) S'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar At3g23325 i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM. (C) Es mostren els T-DNAs (no dibuixats a escala) i la seva orientació relativa en els mutants rif31 i rif31-1. També s'ha indicat la posició dels primers usats per l'anàlisi genòmic en el mutant rif31-1 (D) i es mostra el creixement de la línia homozigòtica d'aquest mutant després de cultivar-la durant 10 dies en medi MS suplementat amb FSM (E).

3.10.2.2 *rif26*.

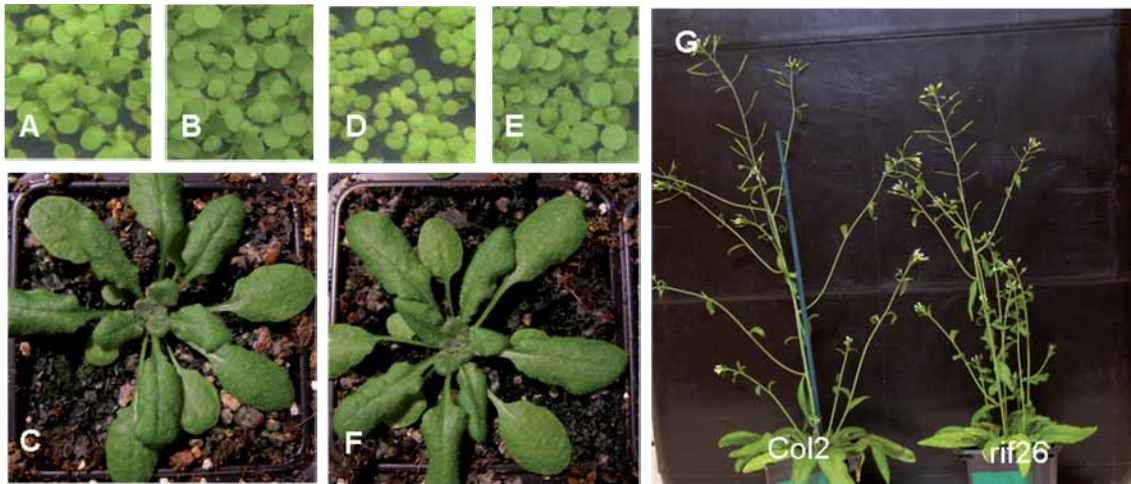
El mutant *rif26* es caracteritza també per tenir un nivell de proteïna DXR molt elevat en resposta al tractament amb FSM, i que està acompanyat d'un increment també elevat de la proteïna DXS. En ambdós casos, aquest increment no es correlaciona amb l'increment dels transcrits corresponents (Figura 42). Aquest mutant també mostra resistència a la MEV (Figura 23).



**Figura 42.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant *rif26*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif26* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

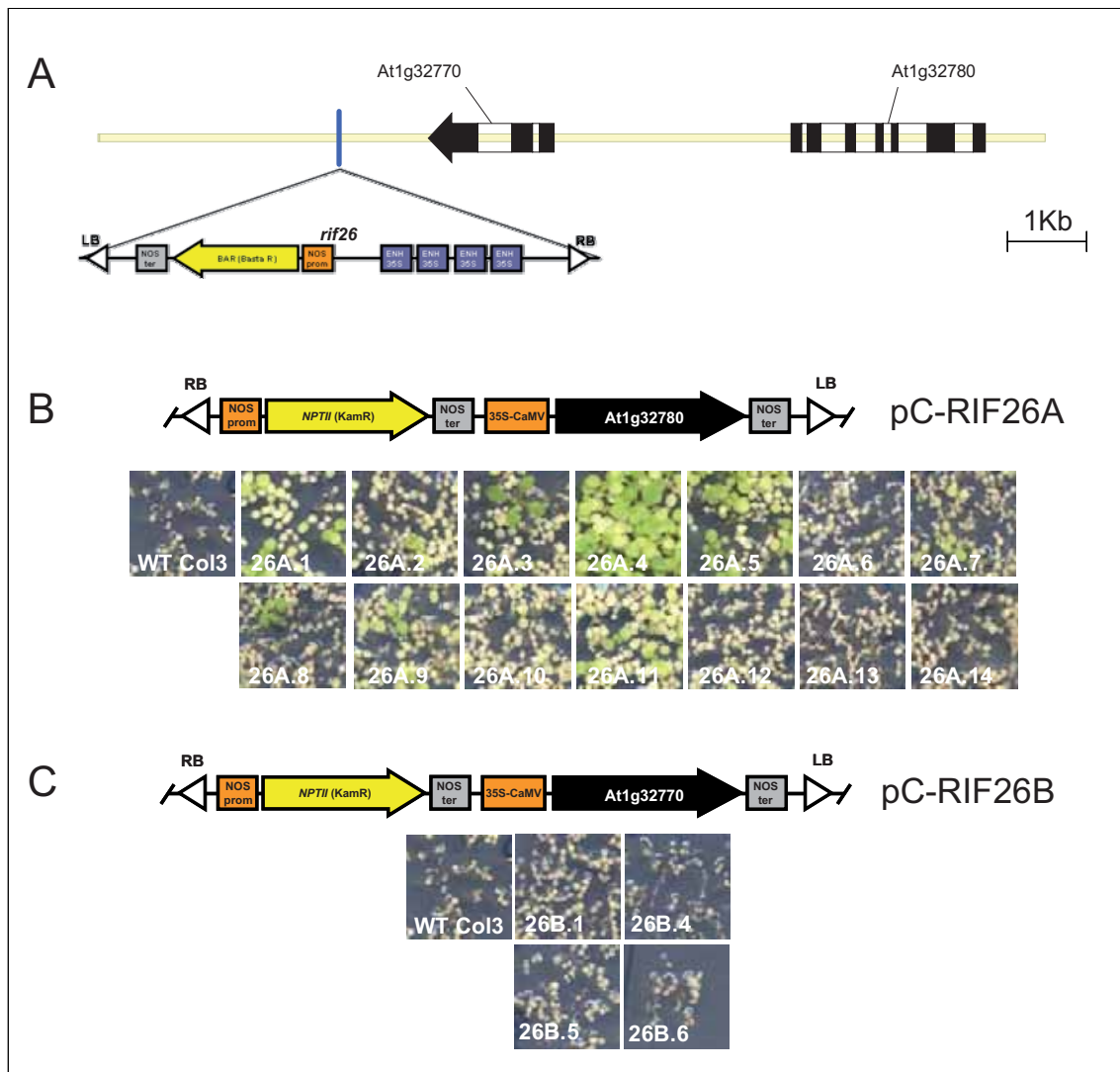
L'estudi fenotípic del mutant *rif26* revela un aspecte groguenc durant els primers estadis de desenvolupament (5 dies), indicant una possible alteració en la diferenciació o funcionalitat dels cloroplastes. En estadi de roseta, però, no presenta diferències respecte al parental *Col2* (Figura 43).

## RESULTATS



**Figura 43.** Fenotip del mutant rif26 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A**, **B** i **C** corresponen a Col2. **D**, **E** i **F** corresponen a rif26. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A** i **D**) i als 10 dies (**B** i **E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C** i **F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A** **G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

En aquest mutant el T-DNA es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 1, indicant que es tractaria d'un mutant de guany de funció d'un dels dos gens flanquejants (Figura 44A). Per tal d'identificar el gen responsable es van generar plantes transgèniques sobreexpressores d'aquests dos gens utilitzant les construccions pC-RIF26A i pC-RIF26B, en les que es van clonar els cDNAs dels gens At1g32780 i At1g32770, respectivament, sota el control del promotor CaMV35S (Material i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir 14 línies transgèniques en el cas del gen At1g32780 (26A.1-14) i 4 línies en el cas d'At1g32770 (26B.1, 26B.4, 26B.5 i 26B.6). Amb diferents graus, s'ha observat resistència a la FSM en 8 línies sobreexpressores del gen At1g32780 (Figura 44B), mentre que cap de les 4 línies de sobreexpressió del gen At1g32770 mostra resistència (Figura 44C).



**Figura 44.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif26*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At1g32780* (B) i *At1g32770* (C), i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

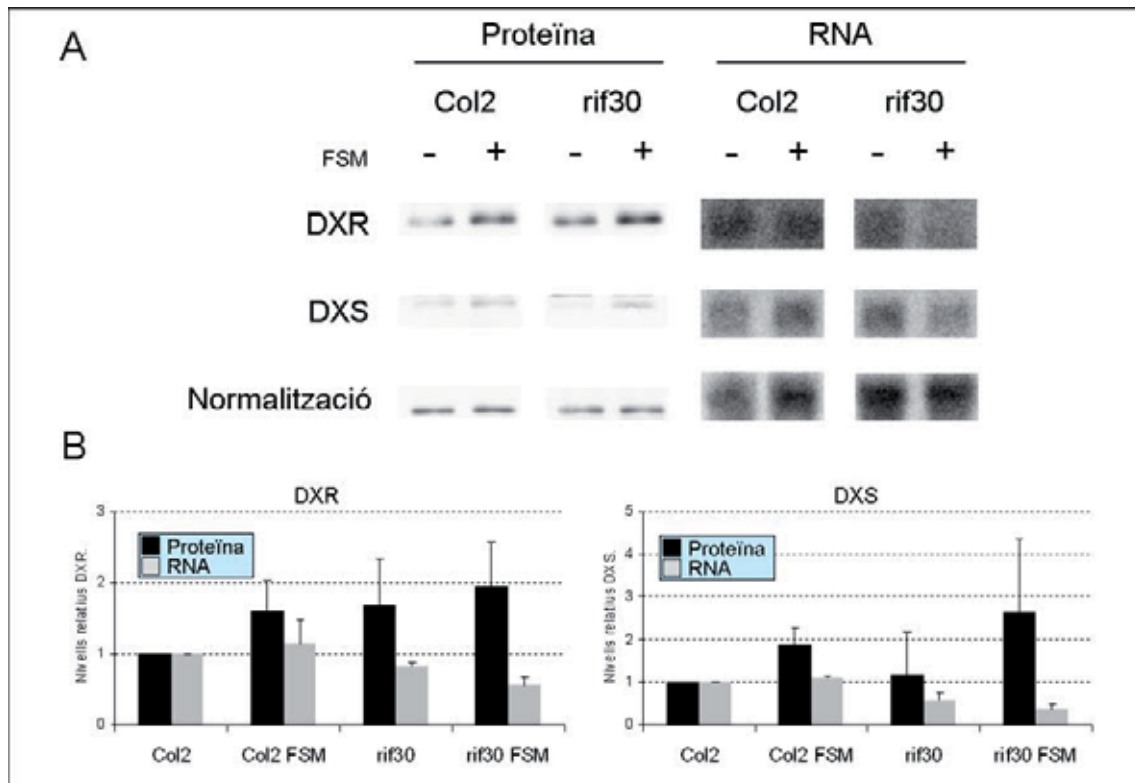
Així doncs, es pot concloure que l'activació del gen *At1g32780* és la responsable de la resistència a la FSM en el mutant *rif26*. Aquest gen codifica una proteïna amb possible activitat alcohol deshidrogenasa.

## RESULTATS

### 3.10.3 Mutants *rif* afectats en la senyalització per fosfatidilinositols: *rif30*, *rif32* i *rif45*.

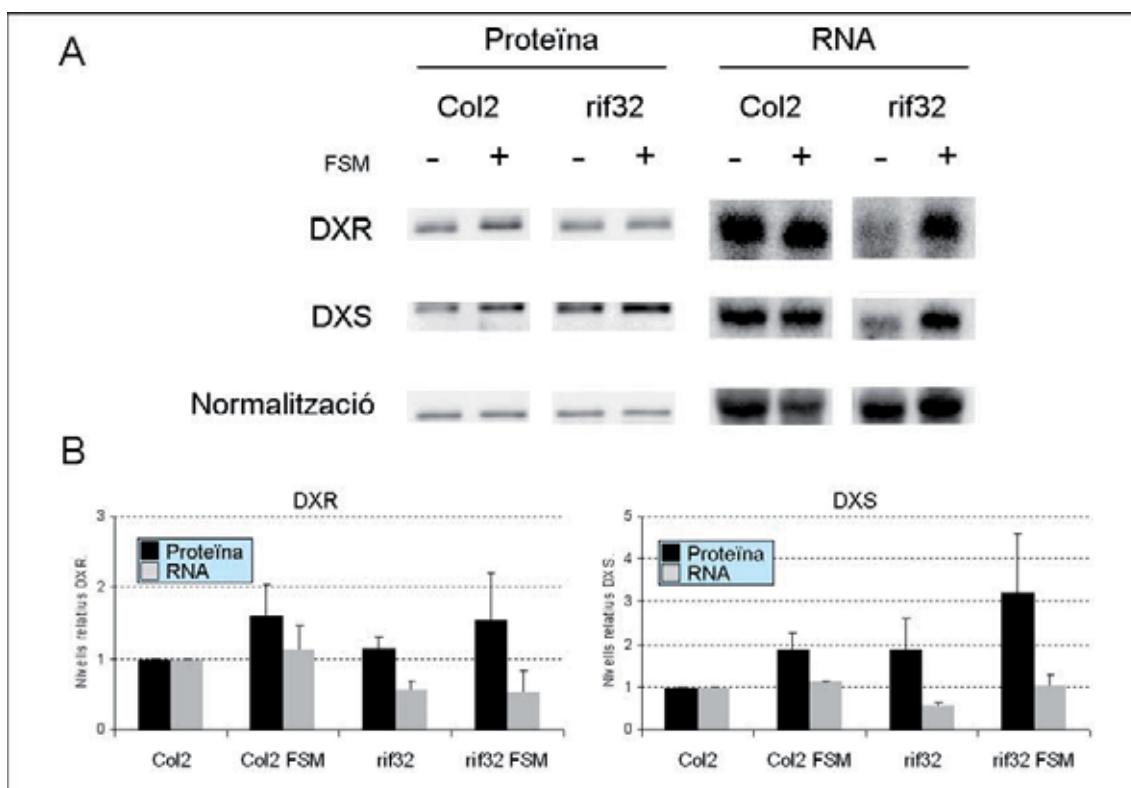
Degut a que, com es mostra més endavant, els mutants *rif30*, *rif32* i *rif45* mostren resistència a la FSM per una activació transcripcional de gens que codifiquen per proteïnes relacionades en la senyalització per fosfatidilinositols, aquests mutants es descriuen de forma conjunta.

L'anàlisi bioquímic d'aquests mutants, tot i confirmar un comportament semblant, va mostrar certes diferències en quant als nivells de proteïna DXR i DXS. Així, *rif32* presentava uns nivells de proteïna DXR similars al parental Col2 però, per altra banda, mostrava nivells de proteïna DXS més elevats (Figura 46), la qual cosa correlacionaria amb la lleugera resistència a CLM detectada en aquest mutant (Figura 22). Els mutants *rif30* i *rif45* presentaven uns nivells basals de proteïna DXR més elevats, però mentre que *rif45* incrementava molt aquests nivells en resposta a la FSM, *rif30* no presentava aquest comportament (Figures 45 i 47). L'expressió dels gens *DXR* i *DXS* en aquests mutants es trobava lleugerament disminuïda respecte al parental Col2 (Figures 45, 46 i 47).



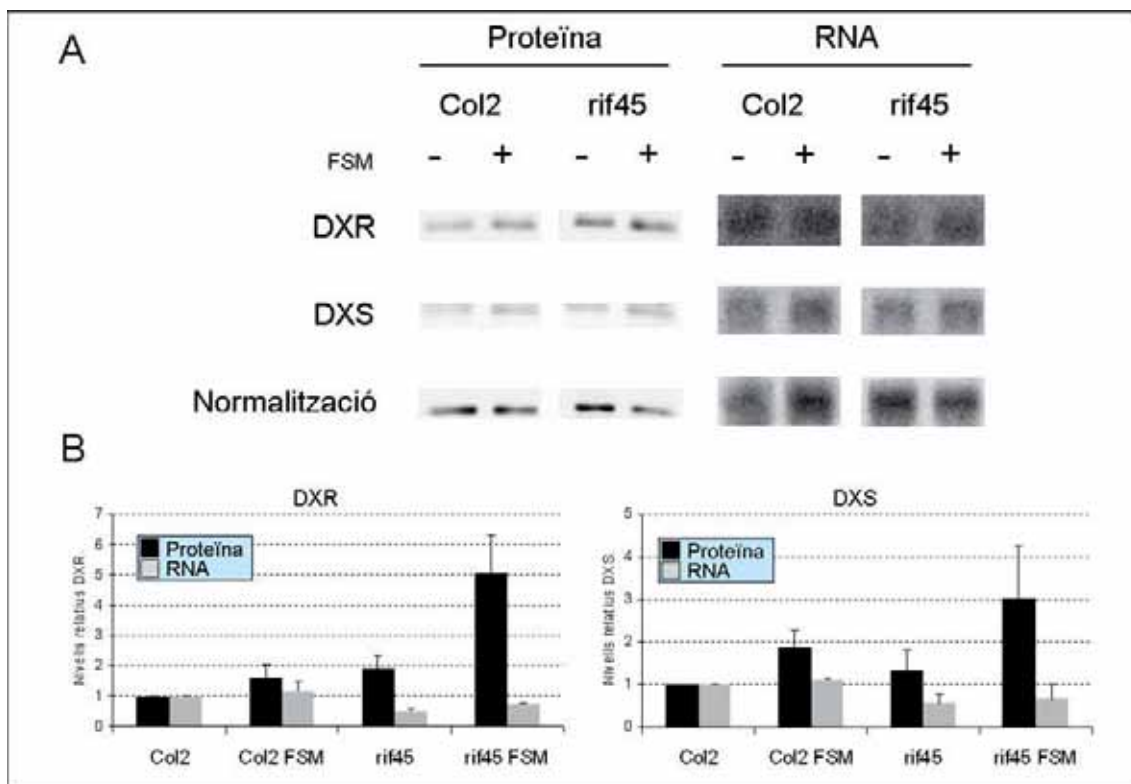
**Figura 45.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit *DXR* i *DXS* en el mutant *rif30*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif30* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les

proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.



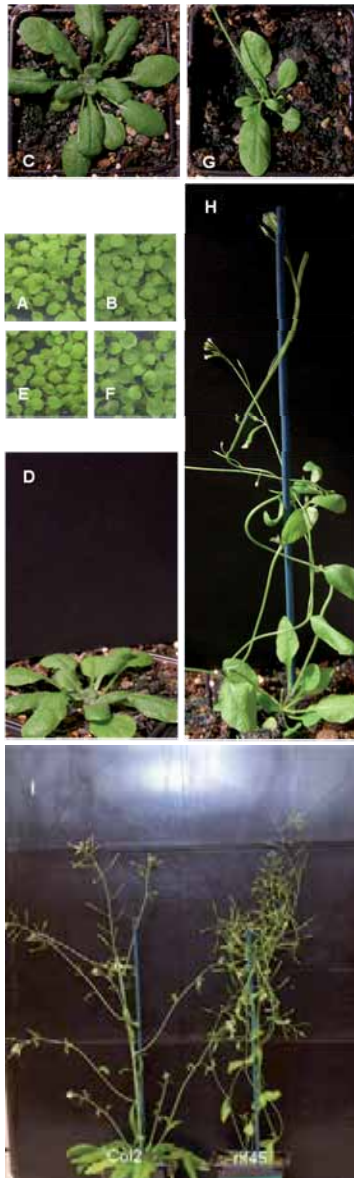
**Figura 46.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif32. Es van cultivar plàntules del mutant rif32 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

## RESULTATS

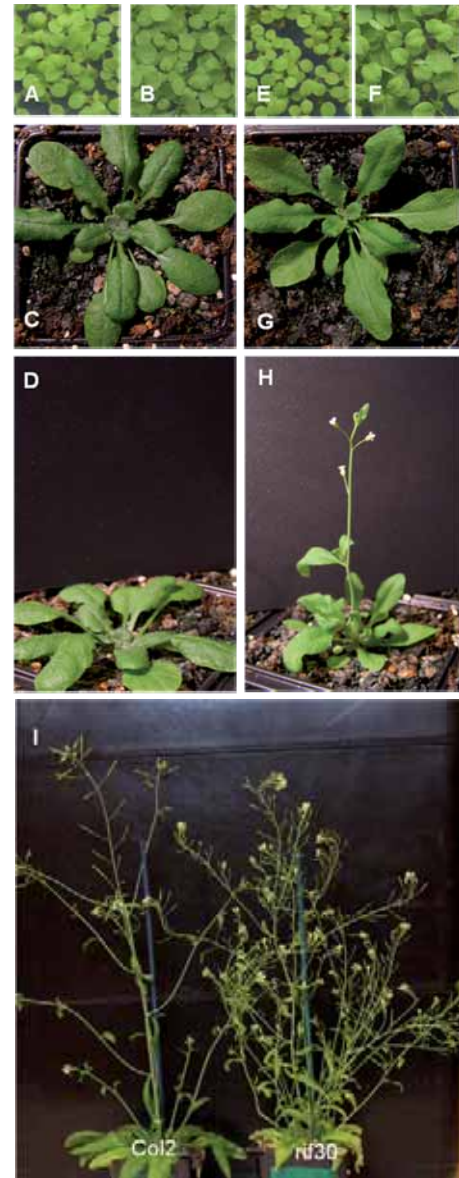


**Figura 47.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant *rif45*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif45* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

Fenotípicament, aquests mutants presenten certes diferències respecte al parental *Col2*. El mutant *rif45* mostra floració avançada, i desenvolupa la tija quan la roseta és molt petita, generant una planta adulta poc vigorosa (Figura 48). La roseta del mutant *rif30* està formada per fulles més fines que les observades en el parental *Col2*, i també presenta una floració avançada (Figura 49). Finalment, en el mutant *rif32*, les fulles de la roseta no mostren les típiques ondulacions marginals que presenta *Col2*, sinó que són completament llises. Més endavant, d'aquesta roseta surgeixen un nombre molt elevat de tijes (Figura 50).



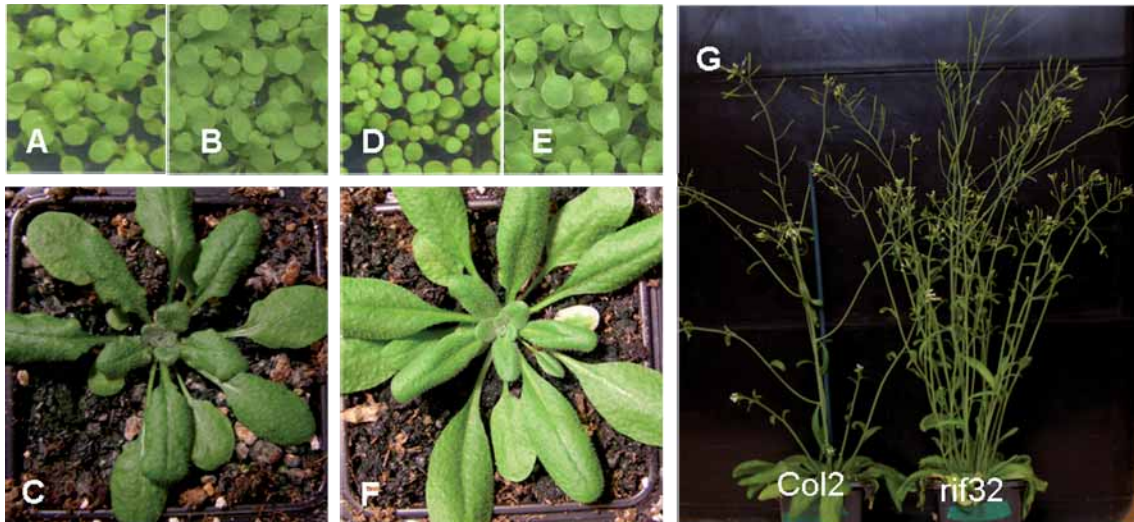
**Figura 48.** Fenotip del mutant rif45 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B, C i D** corresponen a Col2. **E, F, G i H** corresponen a rif45. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i E**) i als 10 dies (**B i F**) de creixement en condicions de dia llarg. **C, D, G i H** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A i I** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.



**Figura 49.** Fenotip del mutant rif30 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B, C i D** corresponen a Col2. **E, F, G i H** corresponen a rif30. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i E**) i als 10 dies (**B i F**) de creixement en condicions de dia llarg. **C, D, G i H** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A i I** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

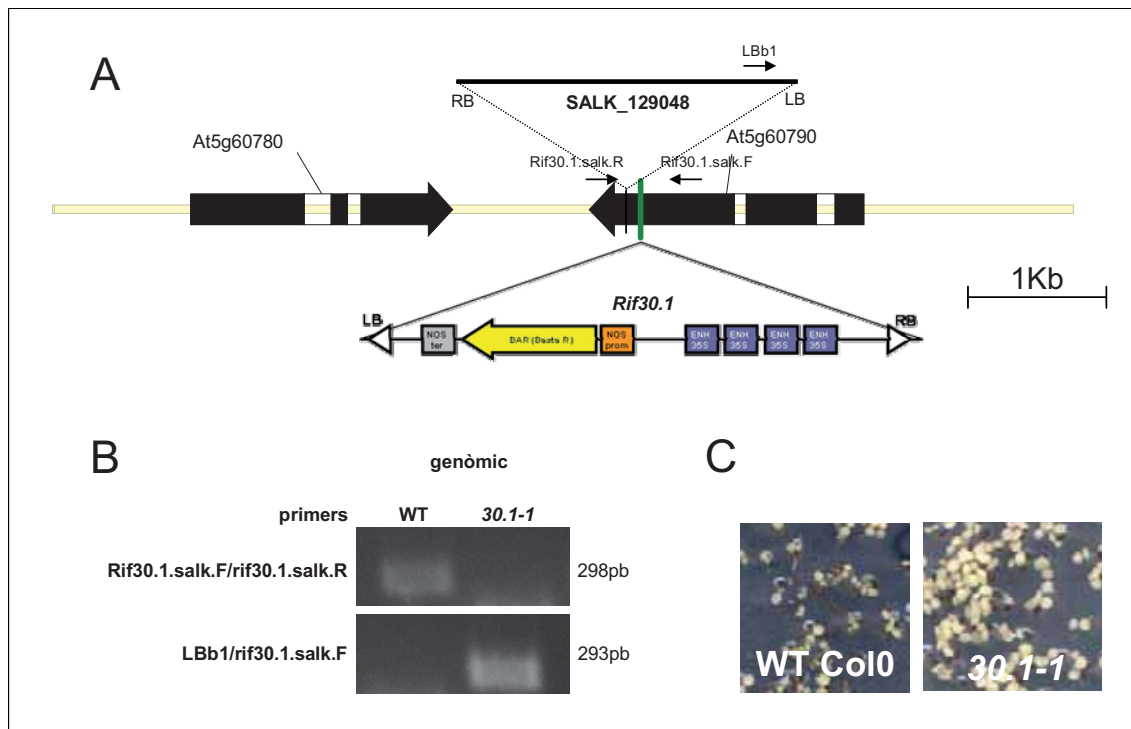


## RESULTATS



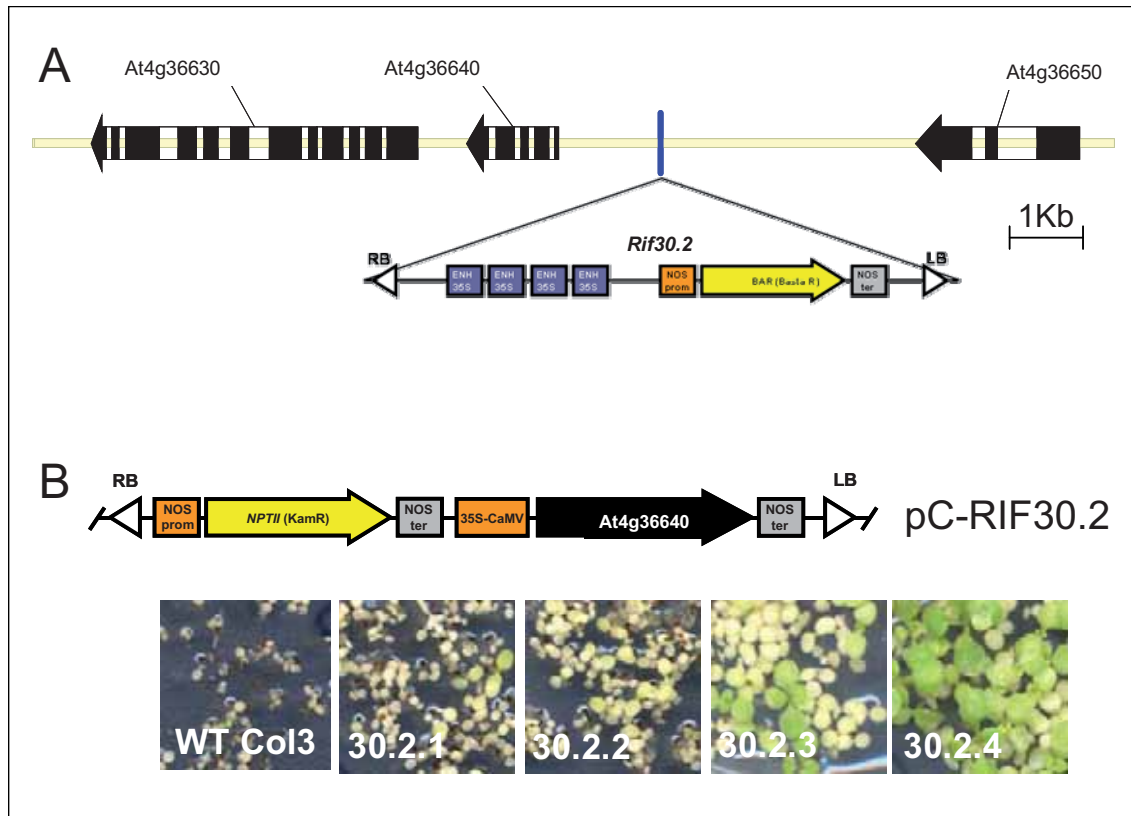
**Figura 50.** Fenotip del mutant rif32 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B i C** corresponen a Col2. **D, E i F** corresponen a rif32. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i D**) i als 10 dies (**B i E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C i F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

En el mutant rif30 s'han identificat dos T-DNAs inserits en el seu genoma. El primer d'ells està inserit interrompent la pauta de lectura del gen *At5g60790* (Figura 51A). Es va identificar un mutant de pèrdua de funció d'aquest gen a la col·lecció del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso et al., 2003) que es va obtenir del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant (SALK\_129048) es va anomenar rif30.1-1, i presenta una inserció del T-DNA a l'exó 4 (Figura 51A). Es van seleccionar línies homozigòtiques d'aquest mutant per PCR (Figura 51B) les quals van ser cultivades en presència de FSM, sense mostrar resistència a aquest inhibidor (Figura 51C).



**Figura 51.** Regió genòmica en la que està inserit un dels T-DNAs trobats en el mutant rif30 i el T-DNA en el mutant rif30-1. (A) Es mostren els T-DNAs (no dibuixats a escala) i la seva orientació relativa en els mutants rif30 i rif30-1. També s'ha indicat la posició dels primers usats per l'anàlisi genòmic en el mutant rif30-1 (B) i es mostra el creixement de la línia homozigòtica d'aquest mutant després de cultivar-la durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM (C).

El segon T-DNA del mutant *rif30* està inserit en una regió intergènica del cromosoma 4 (Figura 52A). Per tal d'identificar el gen responsable de la resistència a la FSM es van generar plantes transgèniques sobreexpressores del gen At4g36640, contigu a la regió del RB del T-DNA, utilitzant la construcció pC-RIF30.2 en la que es va clonar el cDNA d'aquest gen sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir sis línies transgèniques i es va observar resistència a la FSM en les línies 30.2.3 i 30.2.4 (Figura 52B). Aquest gen codifica una proteïna anomenada factor citosòlic SEC14, també anomenada proteïna transportadora de fosfatidilinositols (PITP).

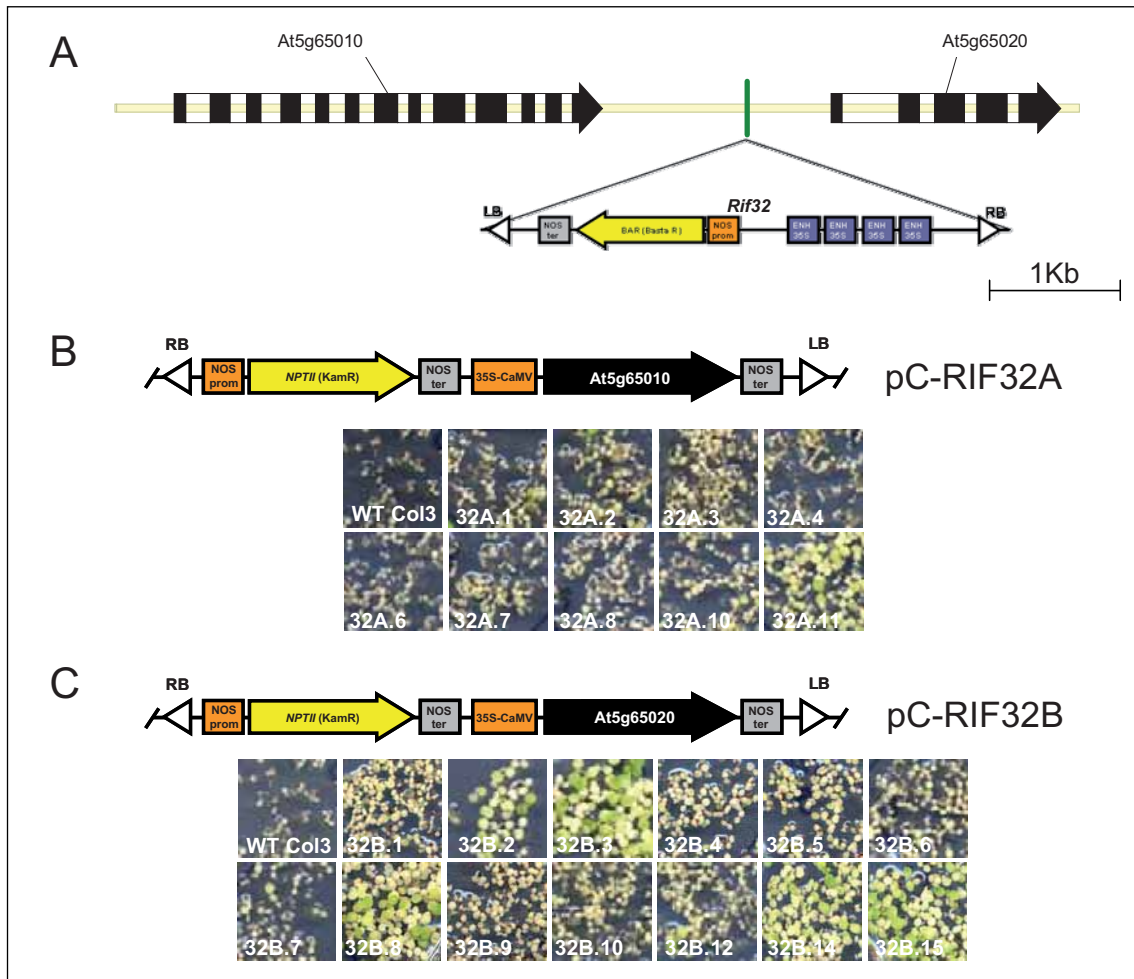


**Figura 52.** Regió genòmica en la que està inserit un dels dos T-DNAs trobats en el mutant *rif30*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At4g36640* (B) i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

El T-DNA de *rif32* està inserit en una regió intergènica del cromosoma 5 (Figura 53A), indicant que es tractaria d'un mutant de guany de funció. En aquest sentit, l'activació d'un dels gens més propers a la regió del RB del T-DNA, *At5g65010* i *At5g65020*, podria ser la causa de la resistència a la FSM. Es van generar plantes transgèniques utilitzant les construccions pC-RIF32A i pC-RIF32B, en les que es van clonar els cDNAs dels gens *At5g65010* i *At5g65020*, respectivament (Materials i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir 9 línies transgèniques sobreexpressores del cDNA del gen *At5g65010*, i cap d'elles mostrava resistència a la FSM a excepció de 32A.11, que presentava una lleugeríssima resistència (Figura 53B). En canvi, de les 13 línies obtingudes pel gen *At5g65020*, 5 eren clarament resistents a la FSM (32B.2, 32B.3, 32B.8, 32B.14 i 32B.15) (Figura 53C).

Es pot concloure que el gen que confereix resistència en el mutant *rif32* és *At5g65020*, que codifica la proteïna anexina 2, localitzada als tilacoides. Està descrit que certes anexines mostren la capacitat de formar canals alliberadors de Calci del RE cap al citosol, i alhora poden d'anclar-se a la

membrana cel·lular a través de calci i unint-se a PI4,5P<sub>2</sub>, formant zones enriquides d'aquesta molècula (Clark i col., 2001; Gokhale i col., 2005).

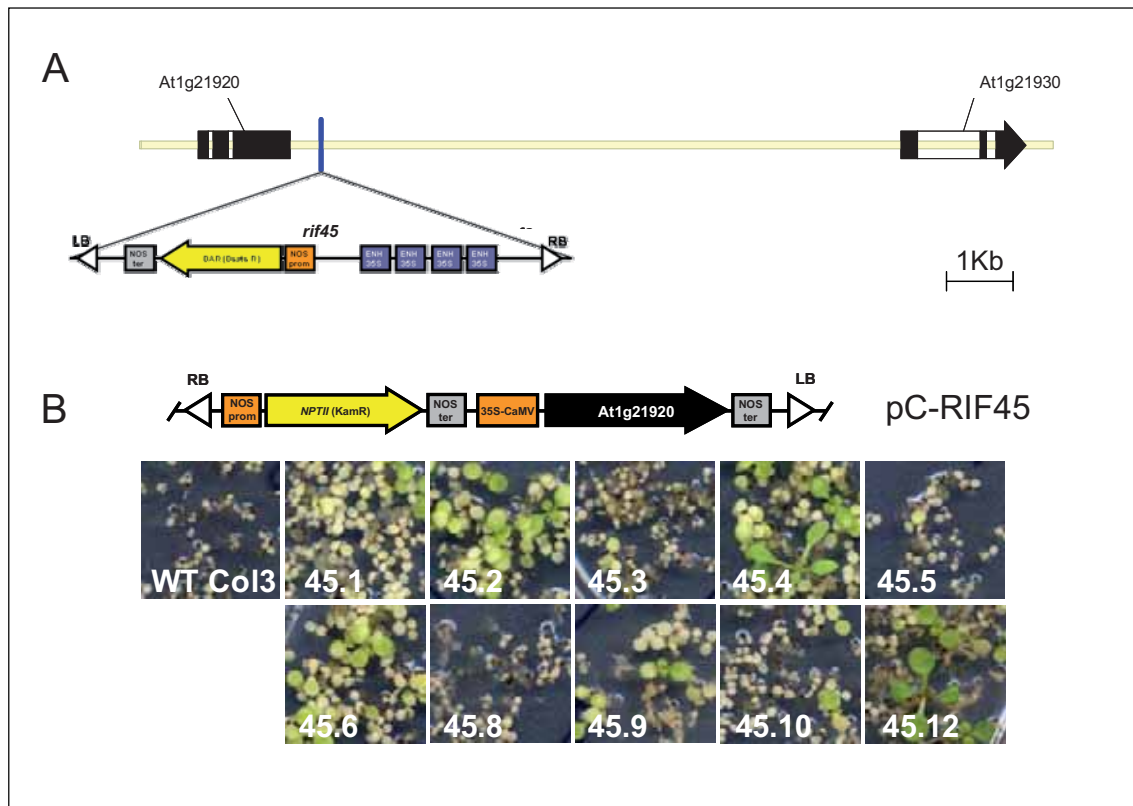


**Figura 53.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif32*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g65010* (B) i *At5g65020* (C), i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

En el mutant *rif45* el T-DNA es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 1 (Figura 54A). Degut a que l'expressió del gen *At1g21920* està probablement activada es van generar plantes transgèniques sobreexpressores d'aquest gen. Utilitzant la construcció pC-RIF45, on es va clonar el cDNA del gen *At1g21920* sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes, 5.1.1), es van generar 8 línies transgèniques, de les quals 6 (45.1, 45.2, 45.4, 45.6, 45.9 i 45.10) presentaven resistència a la FSM (Figura 54B).

## RESULTATS

Per tant *rif45* és resistent a la FSM degut a l'activació del gen *At1g21920*, que codifica per una fosfatidilinositol 4-fosfat 5-kinasa (PI4P5K), que catalitza la fosforilació de fosfatidilinositol 4-fosfat, rendint fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PI4,5P<sub>2</sub>) (Mueller-Roeber i Pical 2002).



**Figura 54.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif45*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. (B) S'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At1g21920*, i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

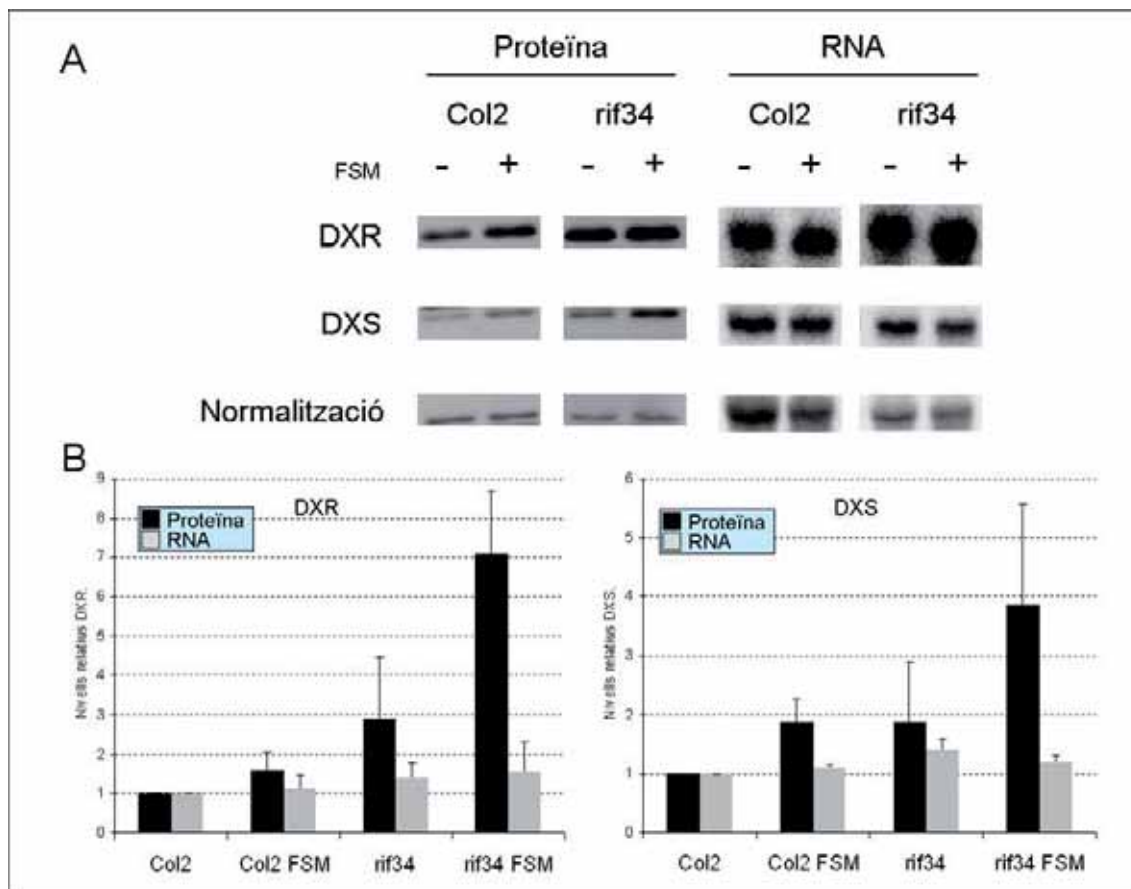
### 3.10.4 Mutants amb nivells elevats de transcrits *DXS* i *DXR*

Els nivells de proteïna DXR es troben incrementats en la majoria dels mutants *rif* seleccionats com a conseqüència de processos postranscripcionals. Els mutants *rif34* i *rif39* van mostrar uns nivells de proteïna DXR i DXS més elevats que el parental Col2 que es podien correlacionar amb una activació de l'expressió dels gens corresponents.

#### 3.10.4.1 *rif34*

Com s'observa a la figura 55 el mutant *rif34* presenta nivells lleugerament elevats de l'expressió dels gens *DXS* i *DXR*, que es correlacionen amb els corresponents augments dels nivells de proteïna.

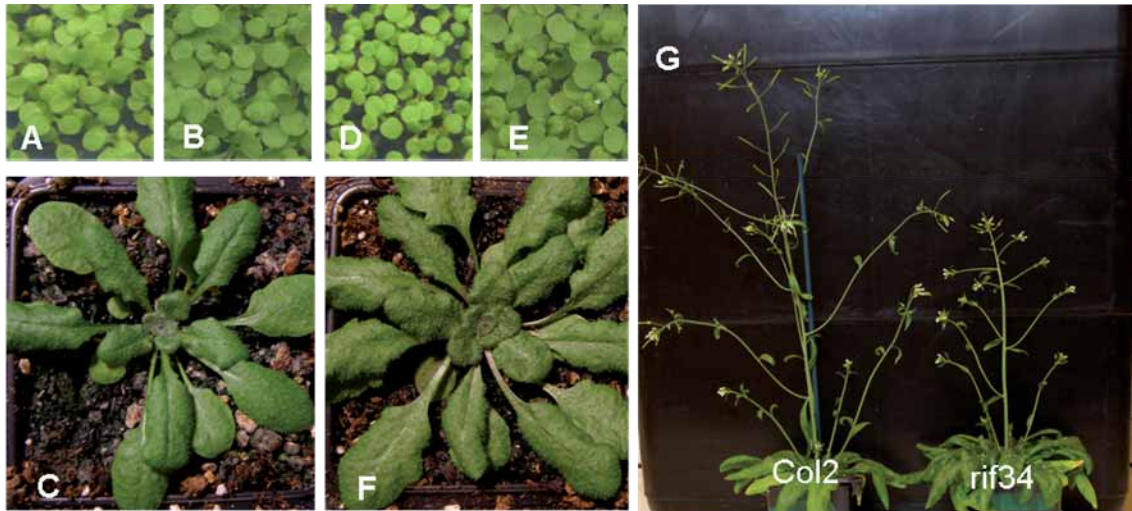
Aquest resultat estaria d'acord amb la resistència mostrada també per aquest mutant a la CLM (Figura 22).



**Figura 55.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit *DXR* i *DXS* en el mutant *rif34*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif34* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits *DXR* i *DXS* i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

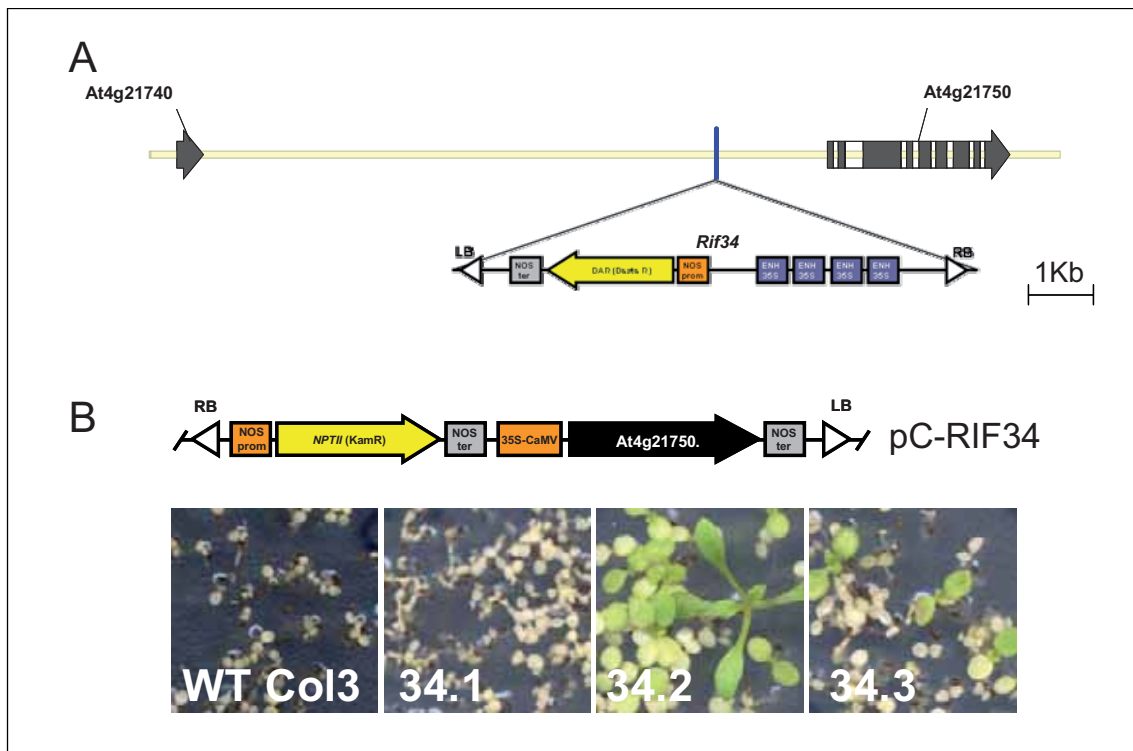
L'anàlisi fenotípic d'aquest mutant va mostrar un desenvolupament peculiar de la planta en estadi de roseta (Figura 56). Les fulles eren més grans, i conferien a la roseta un aspecte més tupit. D'altra banda, també es va observar una floració tardana.

## RESULTATS



**Figura 56.** Fenotip del mutant rif34 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A**, **B** i **C** corresponen a Col2. **D**, **E** i **F** corresponen a rif34. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A** i **D**) i als 10 dies (**B** i **E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C** i **F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A** **G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

En aquest mutant, el T-DNA es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 4 (Figura 57A). Per estudiar si l'activació de l'únic gen que es trobava sota el radi d'acció dels *enhancers* del T-DNA, At4g21750 estava implicada en la resistència a la FSM es van generar plantes transgèniques per tal de sobreexpressar-lo. Així, es va clonar el cDNA d'aquest gen sota el control del promotor CaMV35S, obtenint la construcció pC-RIF34 (Materials i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir tres línies transgèniques (34.1, 34.2 i 34.3) dues de les quals van ser clarament resistents a la FSM (figura 57B).



**Figura 57.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif34*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. (B) S'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At4g21750*, i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

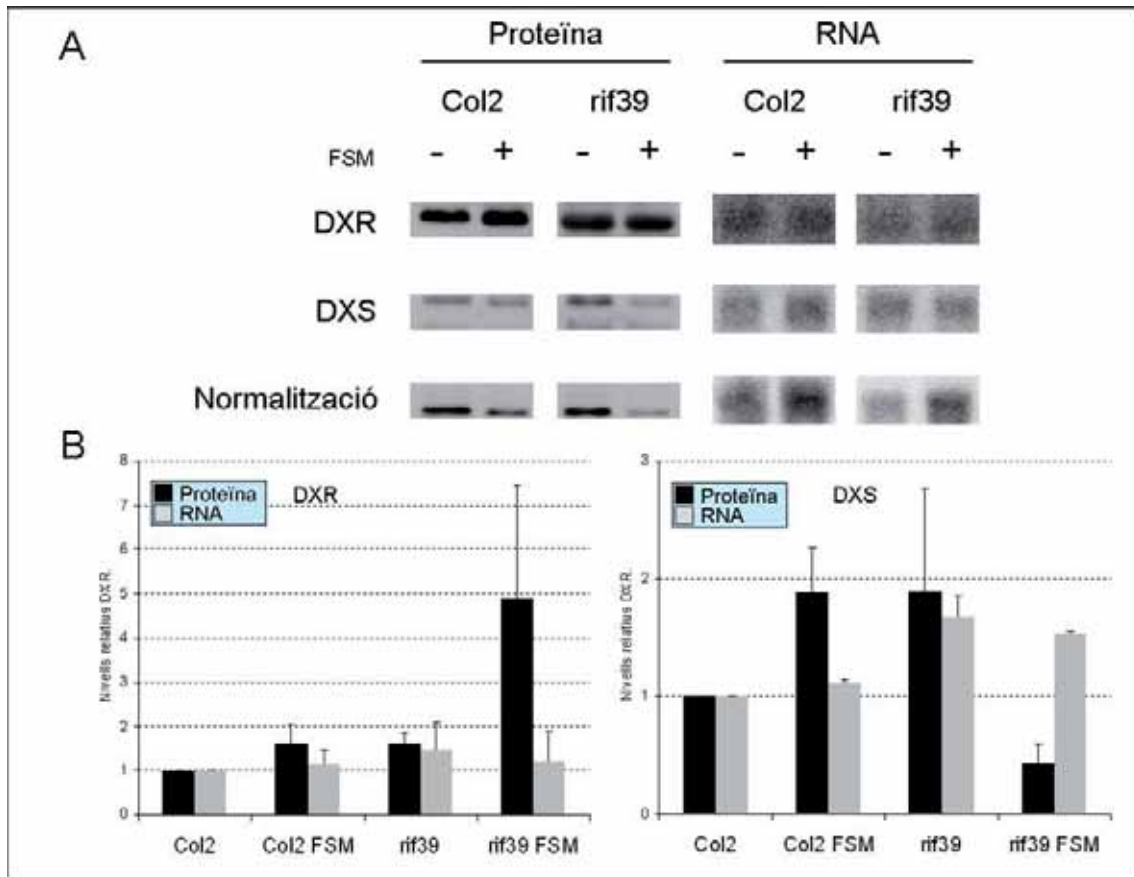
Es pot concloure, per tant, que l'activació del gen *At4g21750* provoca resistència a la FSM en el mutant *rif34*. Aquest gen codifica pel factor de transcripció ATML2, que s'expressa preferentment durant el desenvolupament embrionari i de la tija (Lu i col., 1996; Abe i col., 2003).

### 3.10.4.2 *rif39*.

Aquest mutant presentava uns nivells basals de proteïna DXR més elevats que el parental Col2 i una alta capacitat d'incrementar-los després del tractament amb FSM. Els estudis d'expressió van posar de manifest que els nivells basals de proteïna DXR podrien ser conseqüència d'un augment en l'expressió del gen, mentre que la posterior inducció de la proteïna DXR després del tractament amb FSM implicaria un mecanisme postranscripcional. D'altra banda, els valors basals de proteïna DXS també eren superiors als de Col2, i es correspondrien també amb la implicació d'un mecanisme transcripcional ja que l'augment dels nivells de proteïna es poden correlacionar amb els de transcrit (figura 58). Aquests nivells incrementats de DXS van acompanyats de la resistència a CLM (figura 23).

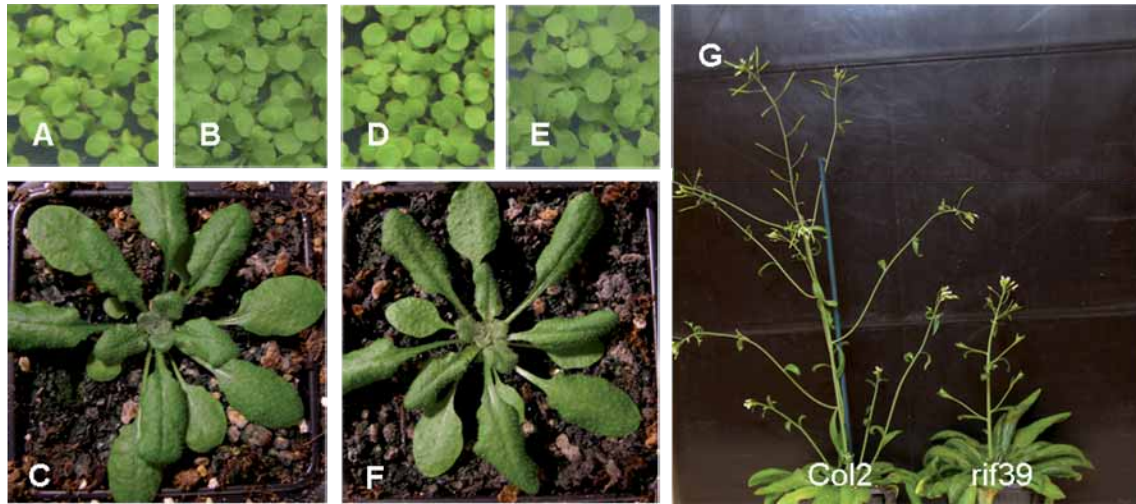


## RESULTATS



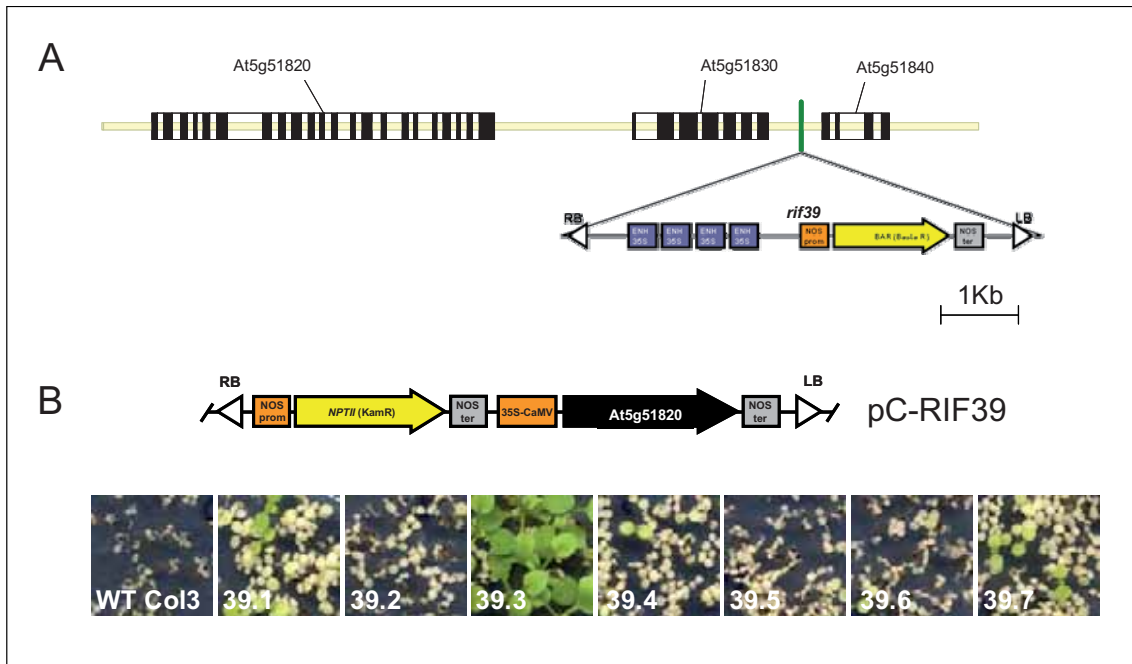
**Figura 58.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant *rif39*. Es van cultivar plàntules del mutant *rif39* i del parental *Col2* en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

En la figura 59 es pot apreciar que el mutant *rif39* no presenta diferències fenotípiques respecte del parental *Col2* durant les primeres etapes de desenvolupament i la formació de la roseta basal. Malgrat que presenta floració tardana, la planta és capaç de completar el seu creixement de forma normal.



**Figura 59.** Fenotip del mutant rif39 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B i C** corresponen a Col2. **D, E i F** corresponen a rif39. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i D**) i als 10 dies (**B i E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C i F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

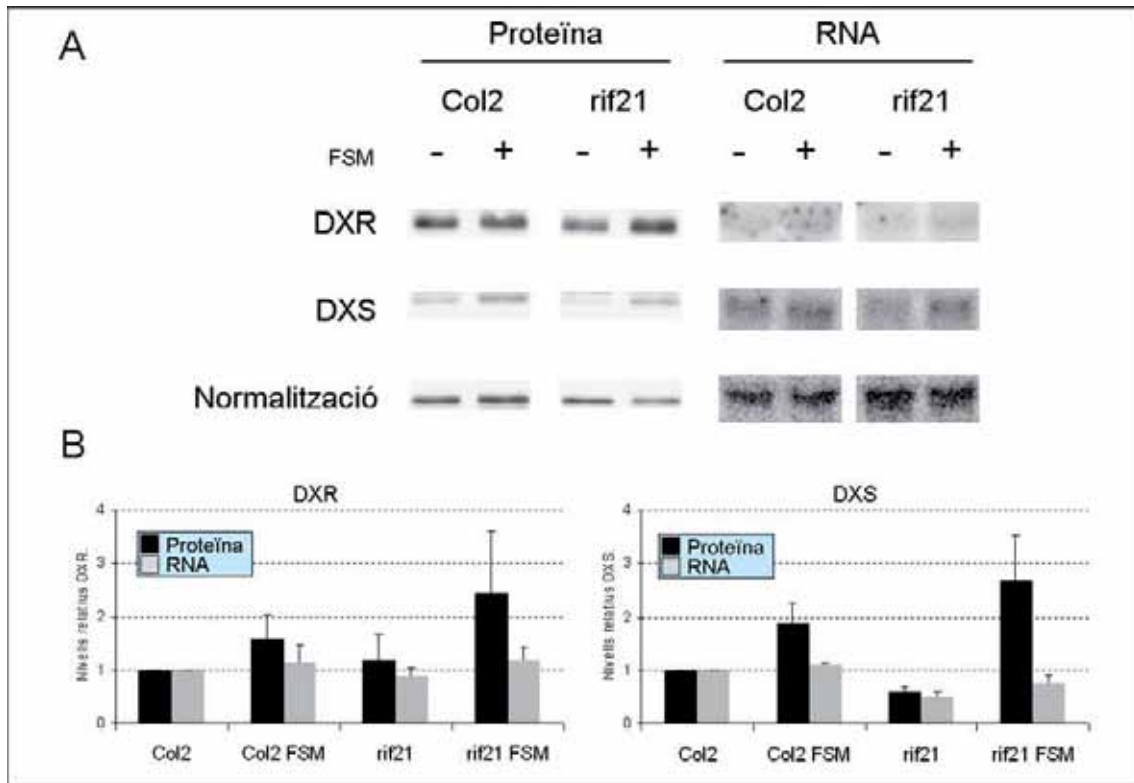
El T-DNA de rif39 està inserit en una regió intergènica del cromsoma 5 en l'entorn de 3 gens, *At5g51820*, *At5g51830* i *At5g51840*, que podrien veure's afectats transcripcionalment per l'acció dels enhancers presents en el T-DNA (Figura 60A). Es va clonar el cDNA del gen *At5g51820* en el vector *pCAMBIA1303* generant la construcció *pC-RIF39* (Materials i Mètodes, 5.1.1), i es van generar plantes transgèniques. De les 7 línies obtingudes (39.1-7), 3 mostren resistència a la FSM (39.1, 39.3 i 39.7) (Figura 60B). El gen *At5g51820* codifica una fosfoglucomutasa localitzada a l'estroma del cloroplast implicada en el control del flux del carboni fotosintètic (Periappuram i col., 2000).



**Figura 60.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif39*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. (B) S'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g51820*, i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

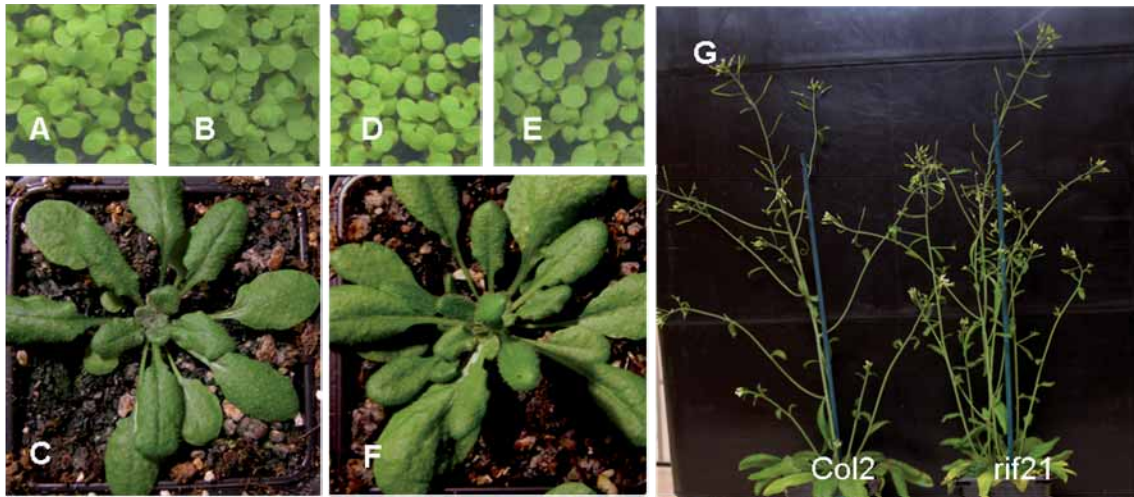
### 3.10.5 Mutant *rif21*

*Rif21* és un mutant que no presenta diferències importants respecte al parental Col2 tant pel que fa als nivells basals de proteïna DXR com del transcrit corresponent (Figura 61). En relació amb la DXS, s'observa una lleugera disminució dels nivells basals de proteïna i de transcrit. Malgrat això, després del tractament amb FSM, els nivells de DXR i DXS mostren un clar increment respecte de Col2. A nivell fenotípic no es va observar cap diferència significativa respecte de Col2 (figura 62).



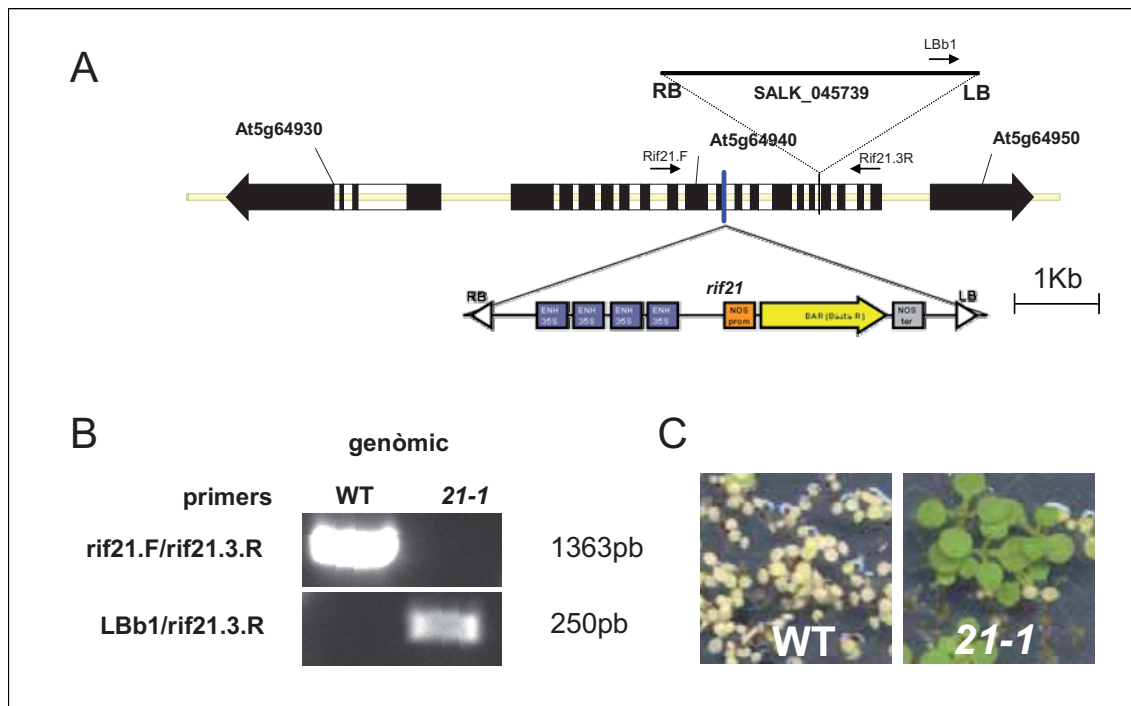
**Figura 61.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif21. Es van cultivar plàntules del mutant rif21 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

## RESULTATS



**Figura 62.** Fenotip del mutant rif21 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A**, **B** i **C** corresponen a Col2. **D**, **E** i **F** corresponen a rif21. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A** i **D**) i als 10 dies (**B** i **E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C** i **F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A** **G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

En aquest mutant el T-DNA s'ha localitzat en el cromosoma 5 trencant la pauta de lectura del gen At5g64940 (Figura 63A). Es va identificar un mutant d'inserció d'aquest gen en la col·lecció del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso et al., 2003) i es va obtenir del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant (SALK\_045739) es va anomenar rif21-1, i presenta la inserció del T-DNA a l'exó 4 (Figura 63A). Es van obtenir línies homozigòtiques d'aquest mutant per PCR (Figura 63B) i es van cultivar en presència de FSM, confirmant la resistència de les plàntules d'Arabidopsis a la FSM quan aquest gen es troba inactivat (figura 63C).

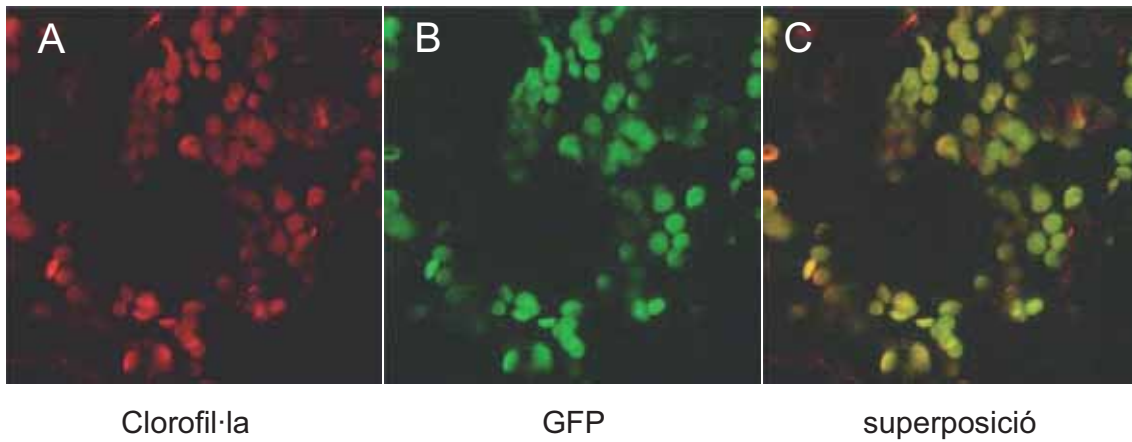


**Figura 63.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif21* i *rif21-1*. (A) Es mostren els T-DNAs (no dibuixats a escala) i la seva orientació relativa en els mutants *rif21* i *rif21-1*. També s'ha indicat la posició dels primers usats per l'anàlisi genòmic en el mutant *rif21-1* (B) i es mostra el creixement de la línia homozigòtica d'aquest mutant després de cultivar-la durant 10 dies en medi MS suplementat amb FSM (C).

El gen At5g64940 codifica per una proteïna inicialment anotada com un transportador ABC cloroplastídic (Sánchez-Fernández i col., 2001). El fet que el mutant *rif21* estigués afectat en un possible translocador plastídic potencialment implicat en el transport d'algun compost (intermediari) de les rutes del MEP o del MVA va estimular la comprovació cloroplastídica d'aquesta proteïna.

Així, es va generar la construcció pGFP-TPRIF21 (Materials i Mètodes, 5.1.1) que va permetre expressar transitòriament una versió de la proteïna GFP fusionada pel seu extrem N-terminal amb el pèptid de trànsit de la proteïna codificada pel gen At5g64940. Tal i com s'observa en la figura 64, es va confirmar la localització cloroplastídica d'aquesta proteïna.

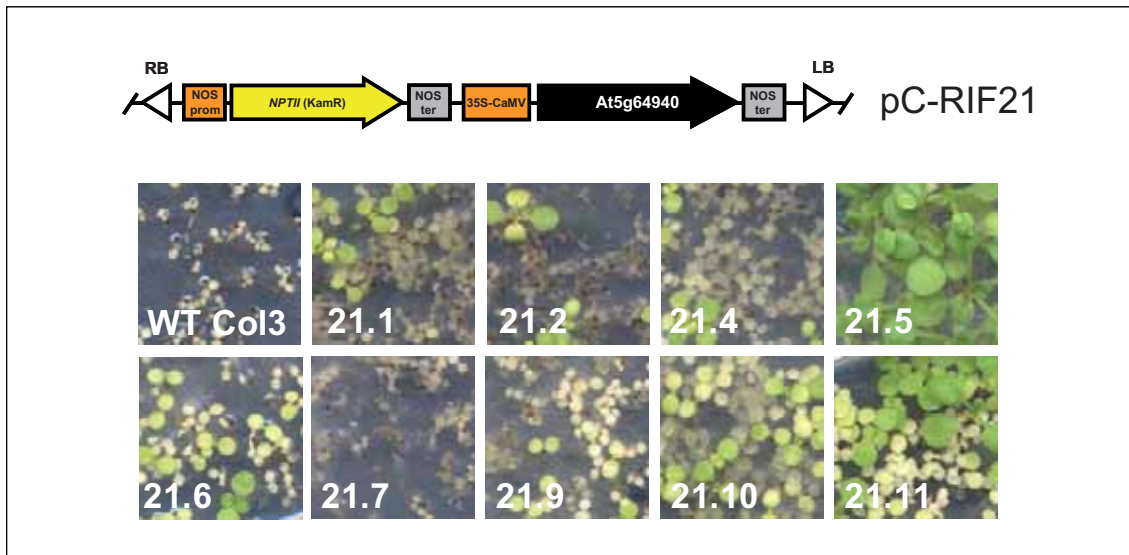
## RESULTATS



**Figura 64.** Localització subcel·lular de la proteïna codificada pel gen *At5g64940*. La construcció *pC-TPRIF21* va ser bombardejada sobre fulles de roseta d'*Arabidopsis* de 30 dies. Es mostra l'autoflorescència de la clorofil·la (A), la florescència de la GFP (B), i la superposició d'ambdues (C).

Malgrat l'interès inicial despertat per aquest mutant, era difícil d'explicar com aquest possible transportador podria participar en l'intercanvi d'IPP o prenillfosfats entre el citosol i els plàstids, ja que es tractava d'un mutant de pèrdua de funció.

Per tal de tenir informació addicional sobre aquesta proteïna, es va decidir generar línies transgèniques sobreexpressores d'aquest gen, utilitzant la construcció *pC-RIF21*, en la qual s'havia clonat el cDNA corresponent al gen *At5g64940* sota el control del promotor *CaMV35S* (Materials i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir nou línies transgèniques de les quals vuit van mostrar resistència a la FSM (Figura 65).



**Figura 65.** Representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g64940*. També es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

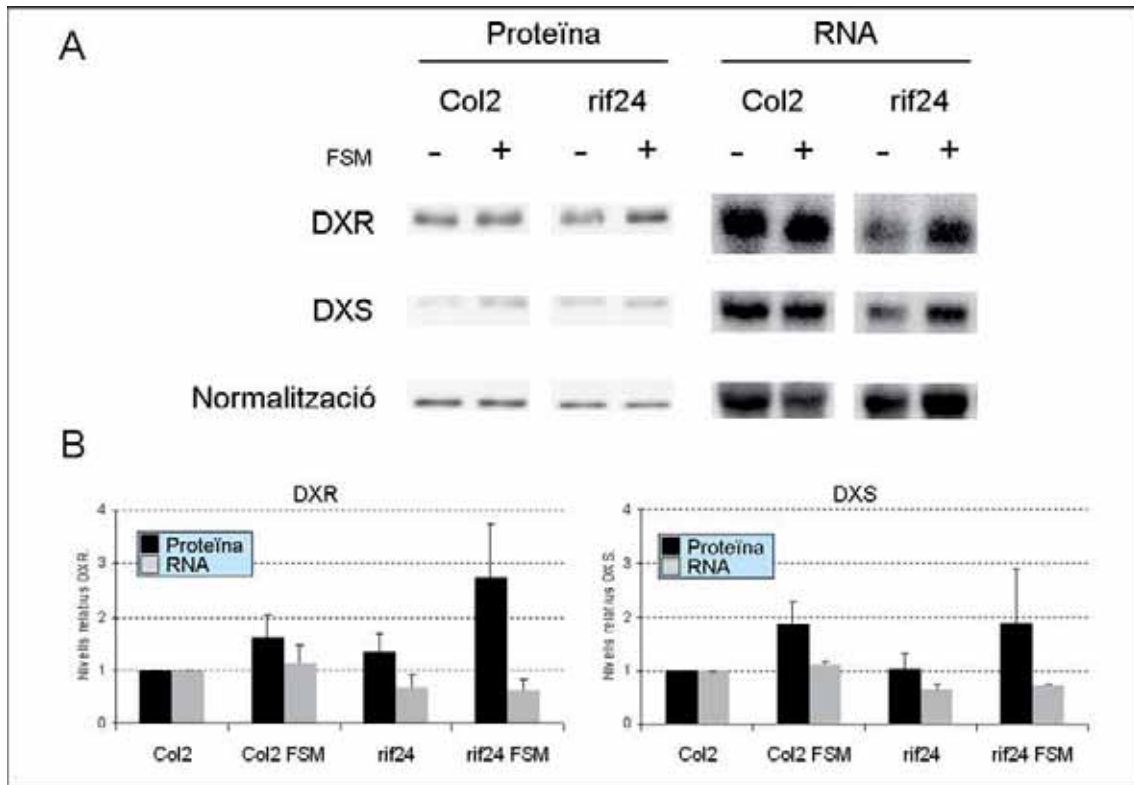
Aquest resultat va ser sorprenent i realment resultava difícil d'entendre quin era l'efecte de la proteïna codificada per aquest gen. Posteriorment a l'obtenció d'aquests resultats van ser publicats nous treballs sobre aquesta proteïna, que si bé confirmaven la seva localització cloroplastídica, i més concretament, en la membrana del cloroplast, descartaven la seva funcionalitat com a transportador i apuntaven més aviat a un paper com a proteïna quinasa implicada en el balanç de l'estrés oxidatiu (Jasinski i col., 2008).

### 3.10.6 Mutants afectats en altres processos cel·lulars: *rif24*, *rif28*, *rif35*, *rif36* i *rif44*.

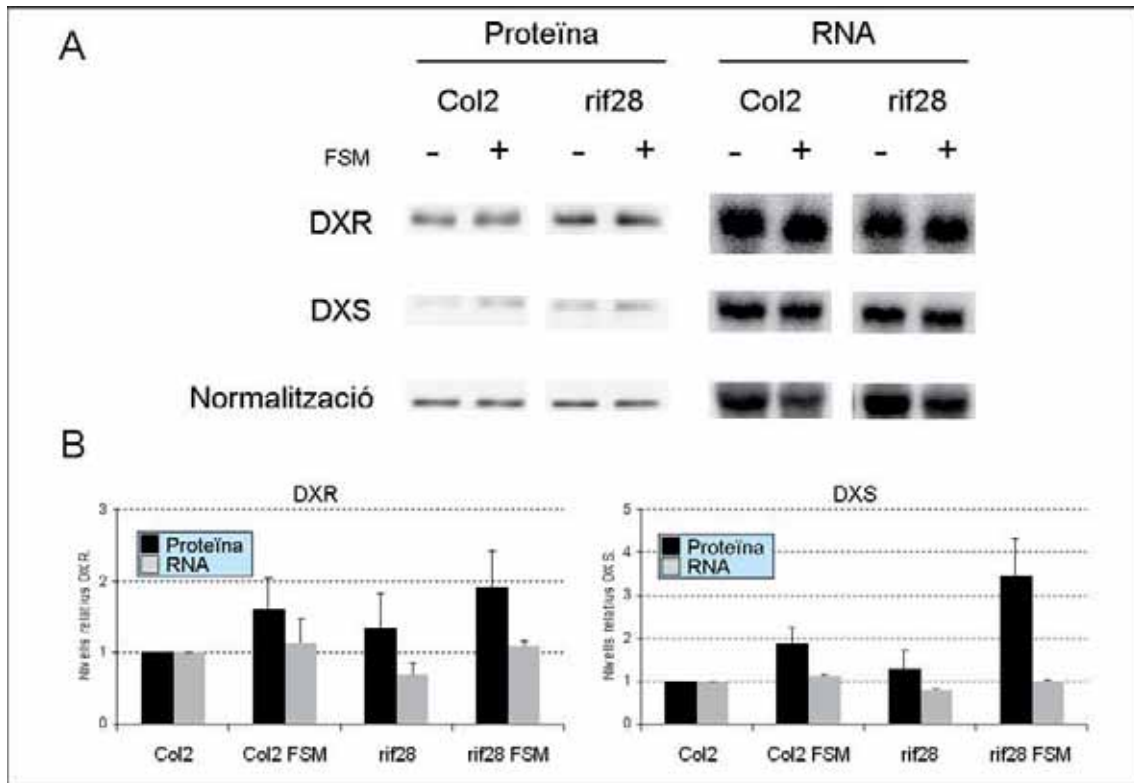
La major part dels mutants *rif* descrits en aquest apartat es caracteritzen per tenir nivells basals i induïbles de proteïna DXR i DXS semblants als del parental silvestre Col2. Com es mostra a les figures 66, 67, 68, 69 i 70, els nivells de proteïna DXR i DXS d'aquests mutants són en general lleugerament més alts que els de Col2, i potser insuficients com per explicar la resistència a la FSM. Tanmateix, els nivells de transcrits *DXR* i *DXS* tampoc mostren diferències significatives respecte del parental Col2. Potser l'únic mutant destacable d'aquest grup seria *rif35*, que mostra nivells basals més elevats de proteïna DXR i DXS, tot i que inferiors als descrits en els apartats anteriors (Figura 68).

Els mutants *rif28* i *rif44* mostren resistència a la MEV, mentre que *rif35* és resistent a la CLM (Figures 22 i 23).

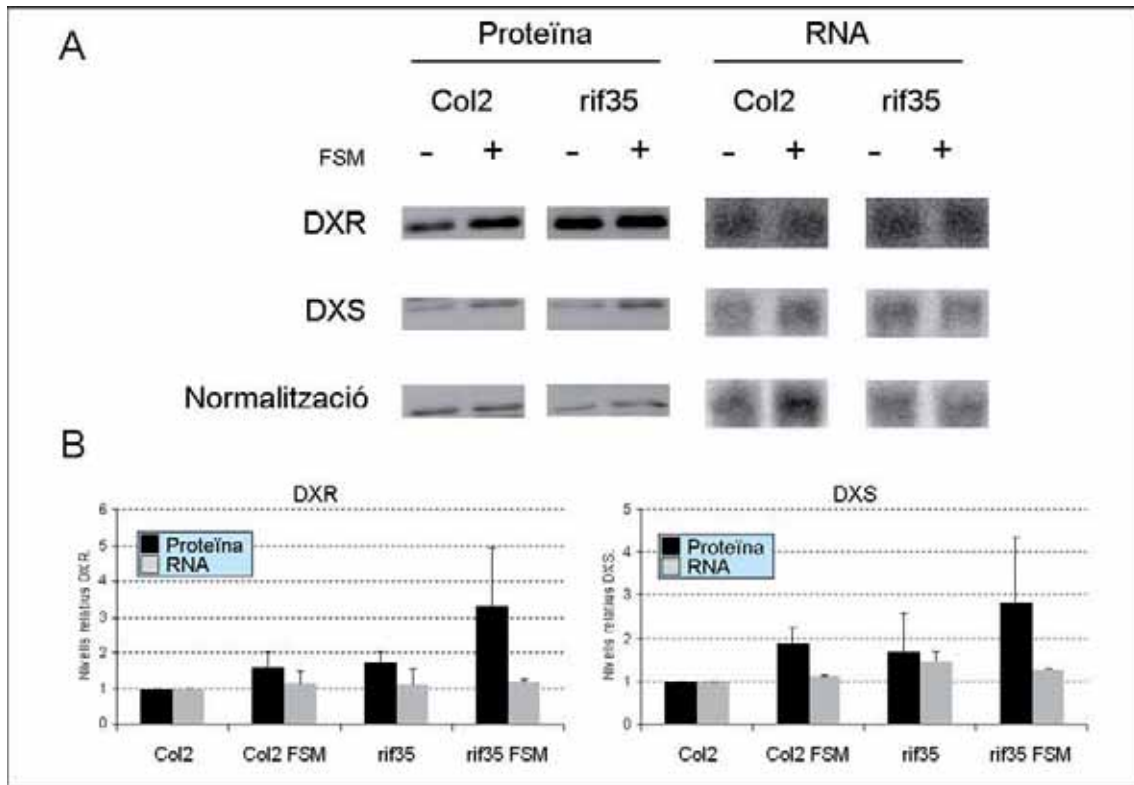




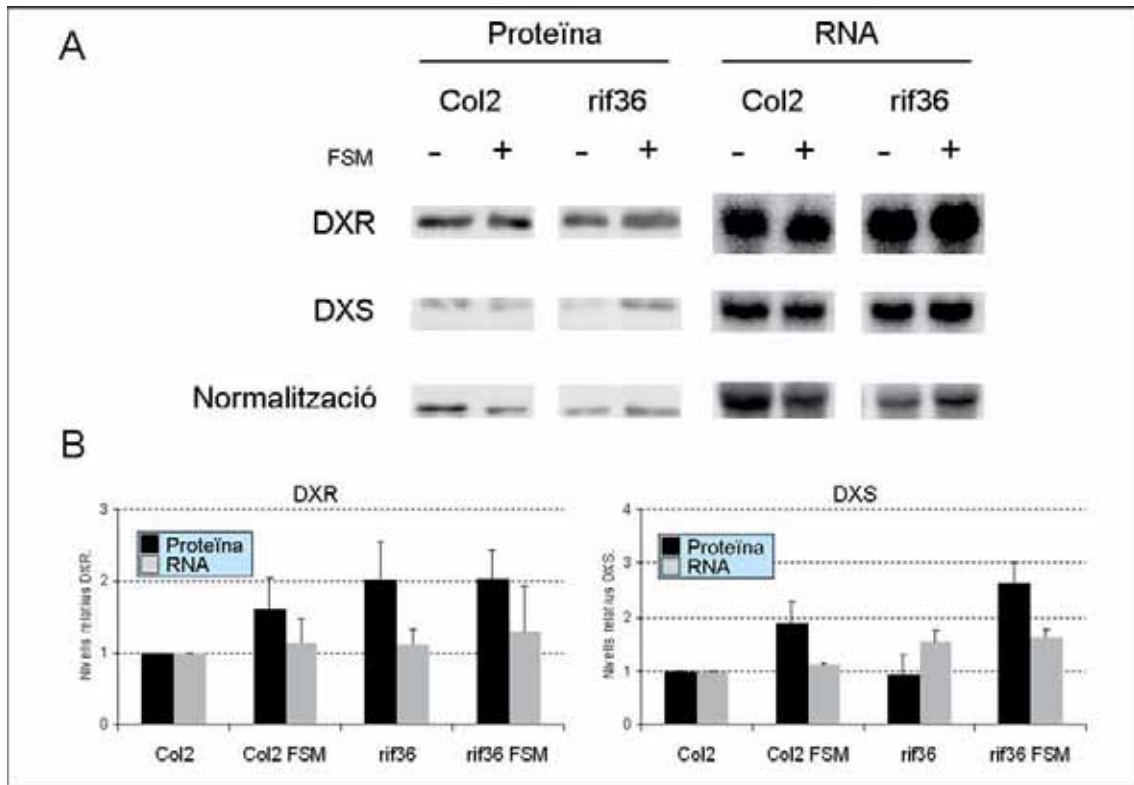
**Figura 66.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif24. Es van cultivar plàntules del mutant rif24 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.



**Figura 67.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif28. Es van cultivar plàntules del mutant rif28 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

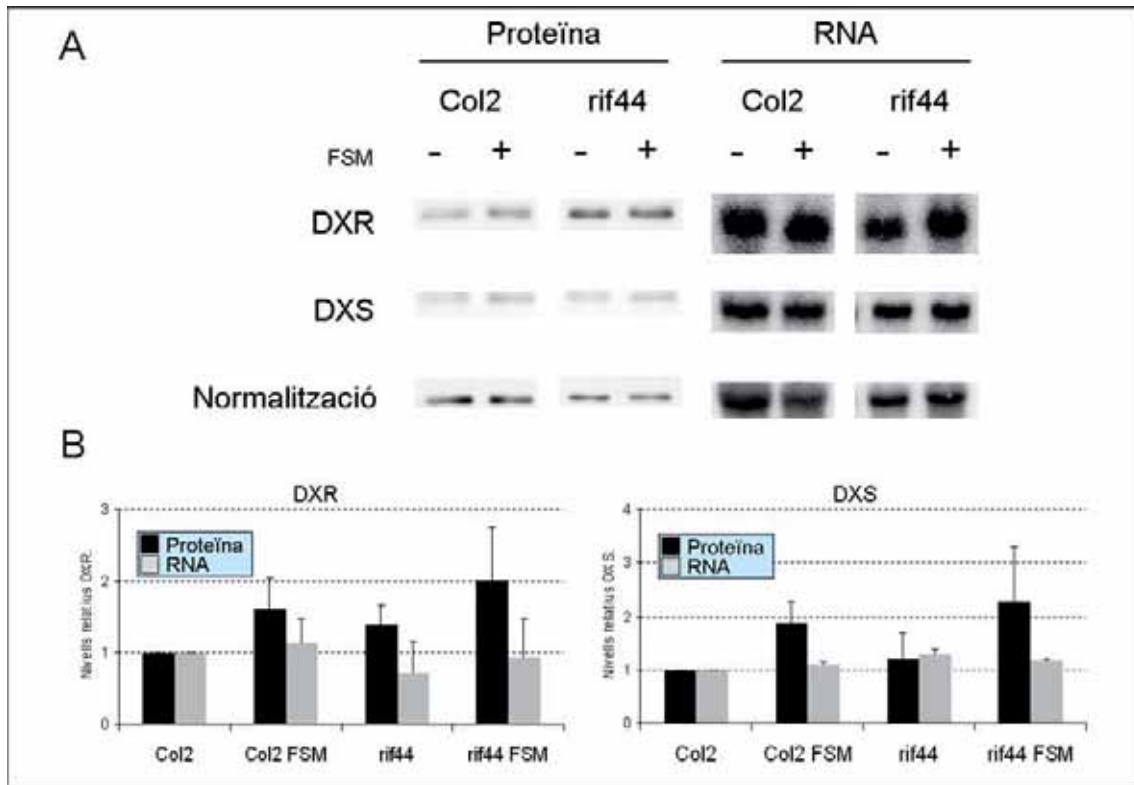


**Figura 68.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif35. Es van cultivar plàntules del mutant rif35 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100 µM). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.



**Figura 69.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif36. Es van cultivar plàntules del mutant rif36 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

## RESULTATS



**Figura 70.** Quantificació dels nivells de proteïna i transcrit DXR i DXS en el mutant rif44. Es van cultivar plàntules del mutant rif44 i del parental Col2 en condicions de dia llarg durant 5 dies, moment en el que es van transferir a medi MS amb presència o absència de FSM (100  $\mu$ M). Les mostres es van recollir al cap de dos dies i es van realitzar les extraccions de proteïna i RNA per realitzar les anàlisi de Western-blot i Northern-blot. (A) Les imatges mostren la detecció de les proteïnes i transcrits DXR i DXS i la normalització corresponent (Materials i Mètodes 5.2 i 5.3). (B) Es mostra la mitja i la desviació estandar corresponent a 3 experiments independents.

En les figures 71 a 75 es mostren els fenotips d'aquests mutants *rif* durant el desenvolupament de la planta. Pel que fa a rif24 es pot observar que les fulles de la roseta són més arrodonides que les de Col2, i també s'observa una floració avançada (Figura 71). En el mutant *rif28*, s'observa una coloració groguenca de les fulles de la roseta i també floració avançada (Figura 72). *Rif35* és el mutant que mostra un fenotip més sever, amb un aspecte groguenc durant tot el seu desenvolupament i una roseta més petita (Figura 73). El fenotip de *rif36* és molt semblant al de Col2, i només es pot apreciar una lleugera palidesa a les fulles joves de la roseta (Figura 74). El mutant *rif44* mostra una floració avançada molt acusada, amb una roseta poc formada i l'aparició de multitud de tiges d'aspecte molt feble (Figura 75).

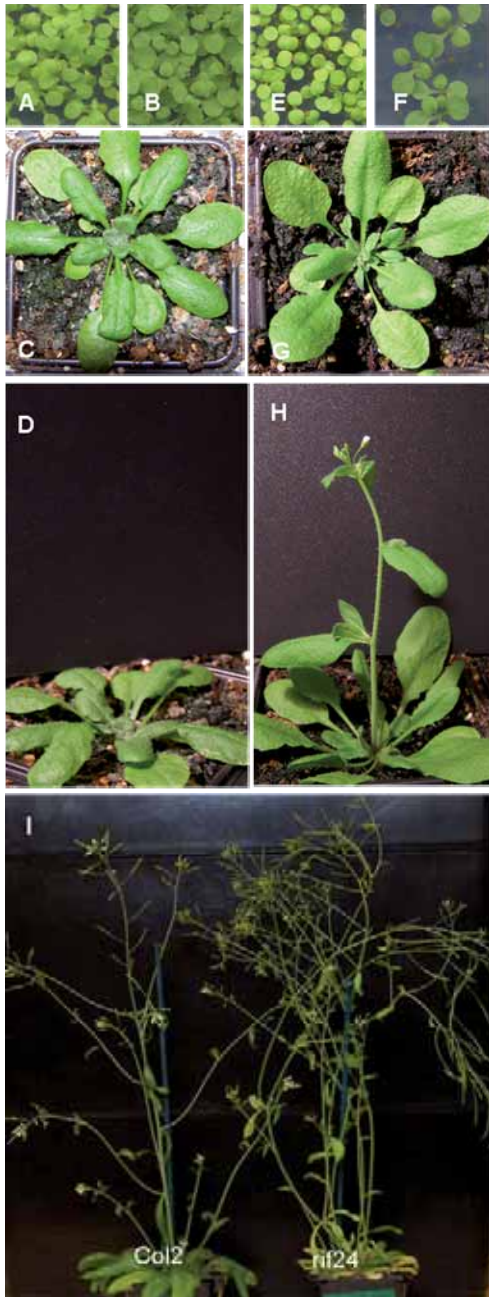


Figura 71. Fenotip del mutant rif24 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. A, B, C i D corresponen a Col2. E, F, G i H corresponen a rif24. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (A i E) i als 10 dies (B i F) de creixement en condicions de dia llarg. C, D, G i H corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. A I es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

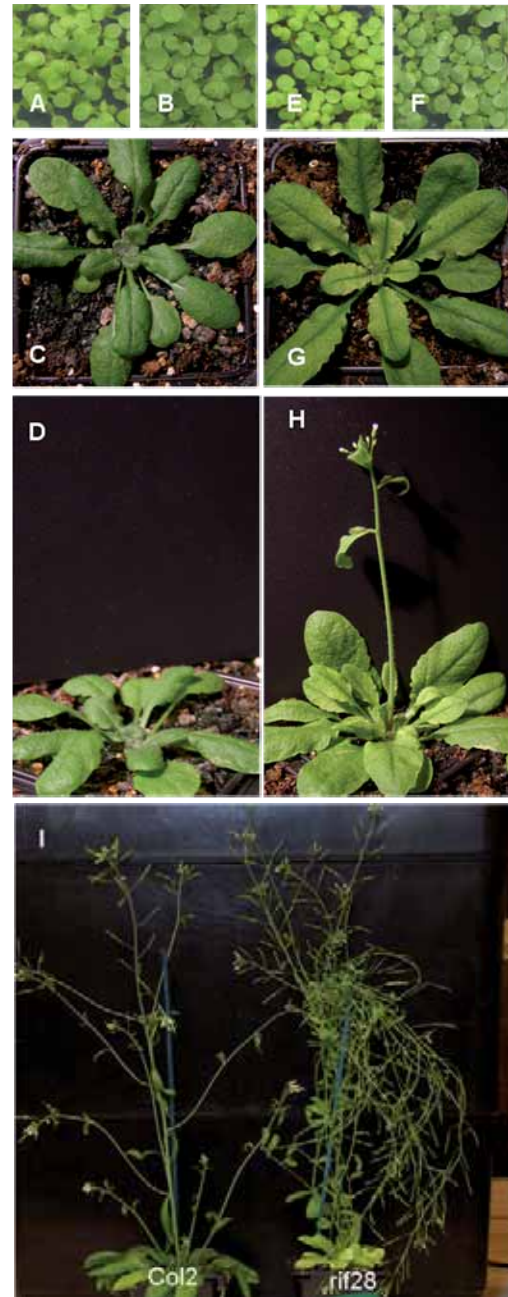
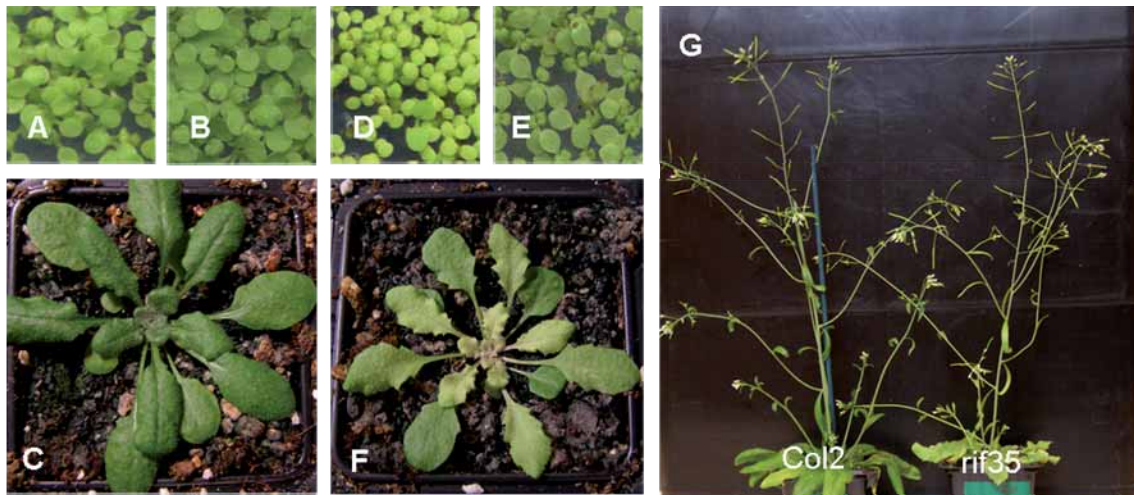
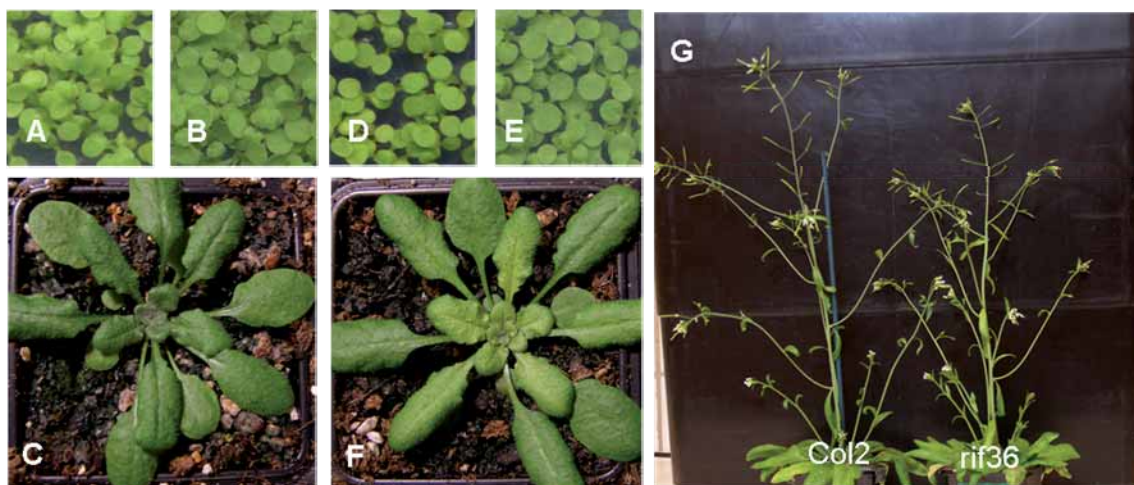


Figura 72. Fenotip del mutant rif28 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. A, B, C i D corresponen a Col2. E, F, G i H corresponen a rif28. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (A i E) i als 10 dies (B i F) de creixement en condicions de dia llarg. C, D, G i H corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. A I es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.

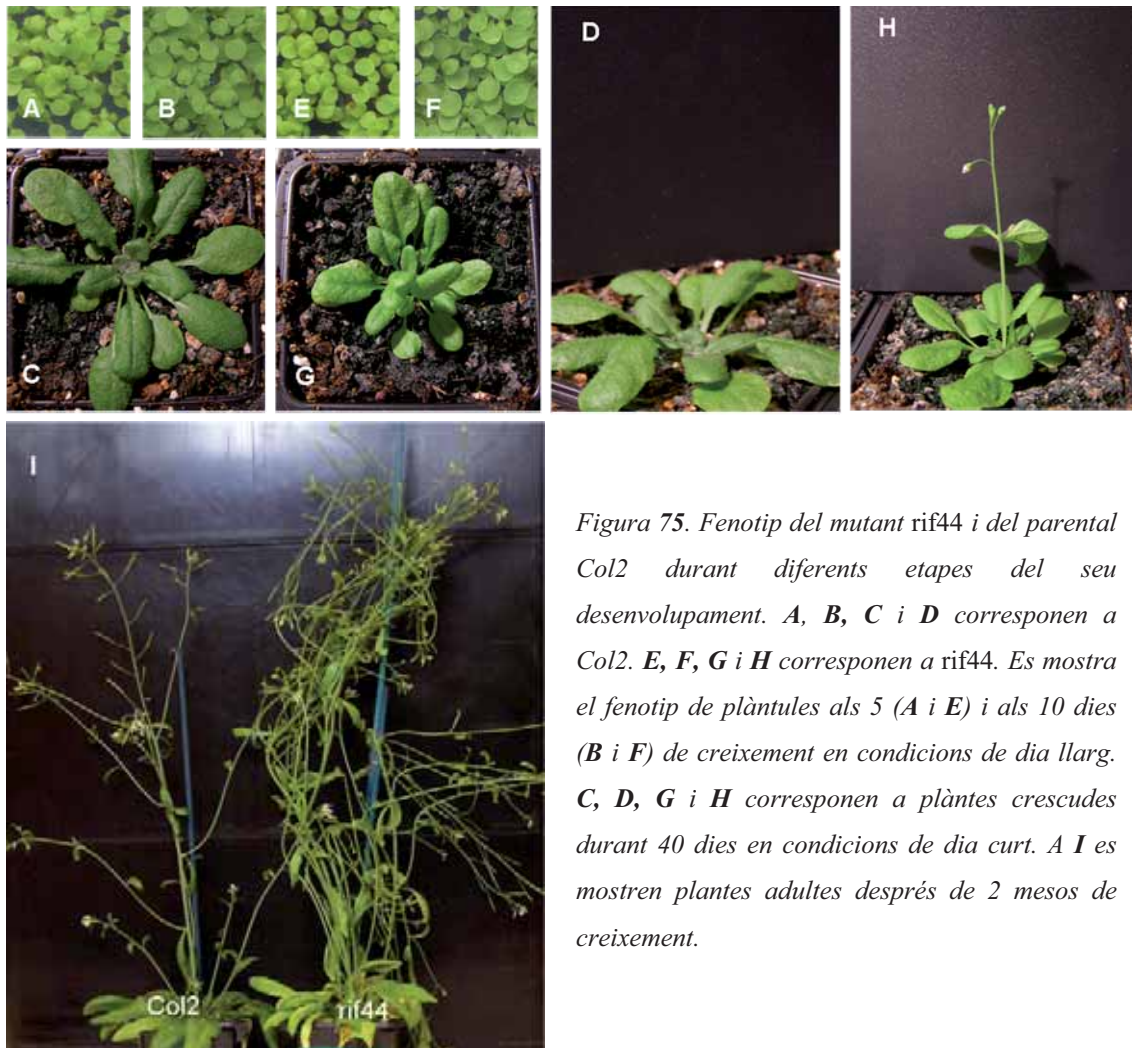
## RESULTATS



**Figura 73.** Fenotip del mutant rif35 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B i C** corresponen a Col2. **D, E i F** corresponen a rif35. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i D**) i als 10 dies (**B i E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C i F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.



**Figura 74.** Fenotip del mutant rif36 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. **A, B i C** corresponen a Col2. **D, E i F** corresponen a rif36. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (**A i D**) i als 10 dies (**B i E**) de creixement en condicions de dia llarg. **C i F** corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. **A G** es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.



*Figura 75. Fenotip del mutant rif44 i del parental Col2 durant diferents etapes del seu desenvolupament. A, B, C i D corresponen a Col2. E, F, G i H corresponen a rif44. Es mostra el fenotip de plàntules als 5 (A i E) i als 10 dies (B i F) de creixement en condicions de dia llarg. C, D, G i H corresponen a plàntes crescudes durant 40 dies en condicions de dia curt. A I es mostren plantes adultes després de 2 mesos de creixement.*

### **3.10.6.1 Identificació dels gens afectats en els mutants *rif24*, *rif28*, *rif35*, *rif36* i *rif44***

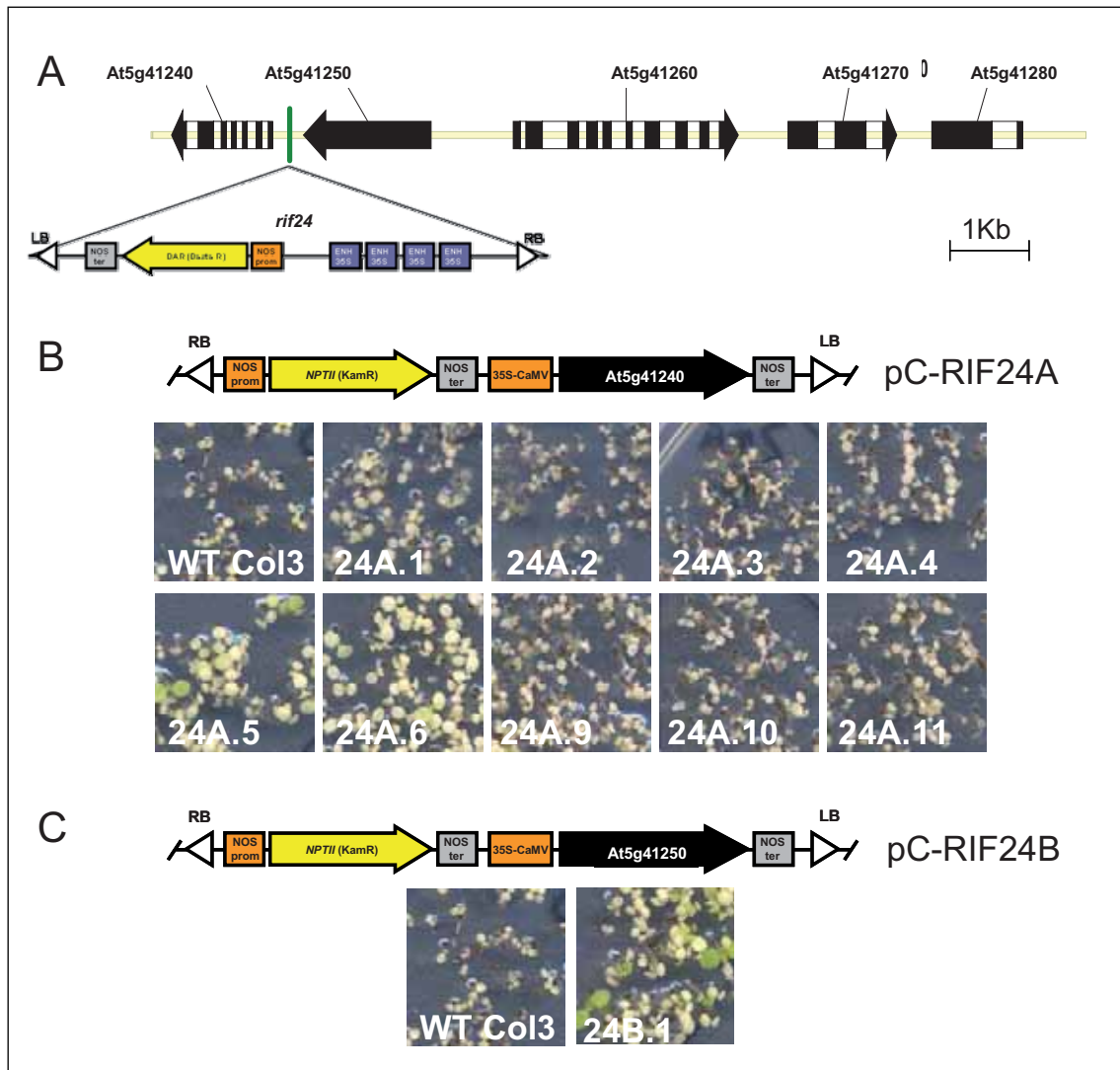
En el mutant *rif24* el T-DNA està inserit en una regió intergènica del cromosoma 5 (Figura 76A) molt aprop de l'inici de transcripció del gen At5g41240, de manera que tant podria estar afectant negativament la transcripció d'aquest gen com activant-la. Els *enhancers* del T-DNA queden molt aprop també del gen At5g41250, l'expressió del qual es podria veure activada. Es va procedir a generar plantes transgèniques utilitzant les construccions pC-RIF24A i pC-RIF24B, on es van clonar els cDNAs dels gens At5g41240 i At5g41250 respectivament, sota el control del promotor CaMV35S (Materials i Mètodes, 5.1.1). Les línies transgèniques obtingudes es van cultivar en presència de FSM (Figura 76B-C), i només es va observar resistència en l'única línia sobreexpressora del gen At5g41250 obtinguda.

Una única línia transgènica pot ser insuficient per demostrar que l'activació del gen At5g41250 és el responsable de la resistència a FSM, però tot apunta a que pugui ser així tenint en compte que aquesta línia és clarament resistent, i que la disposició dels *enhancers* del T-DNA el converteix en el



## RESULTATS

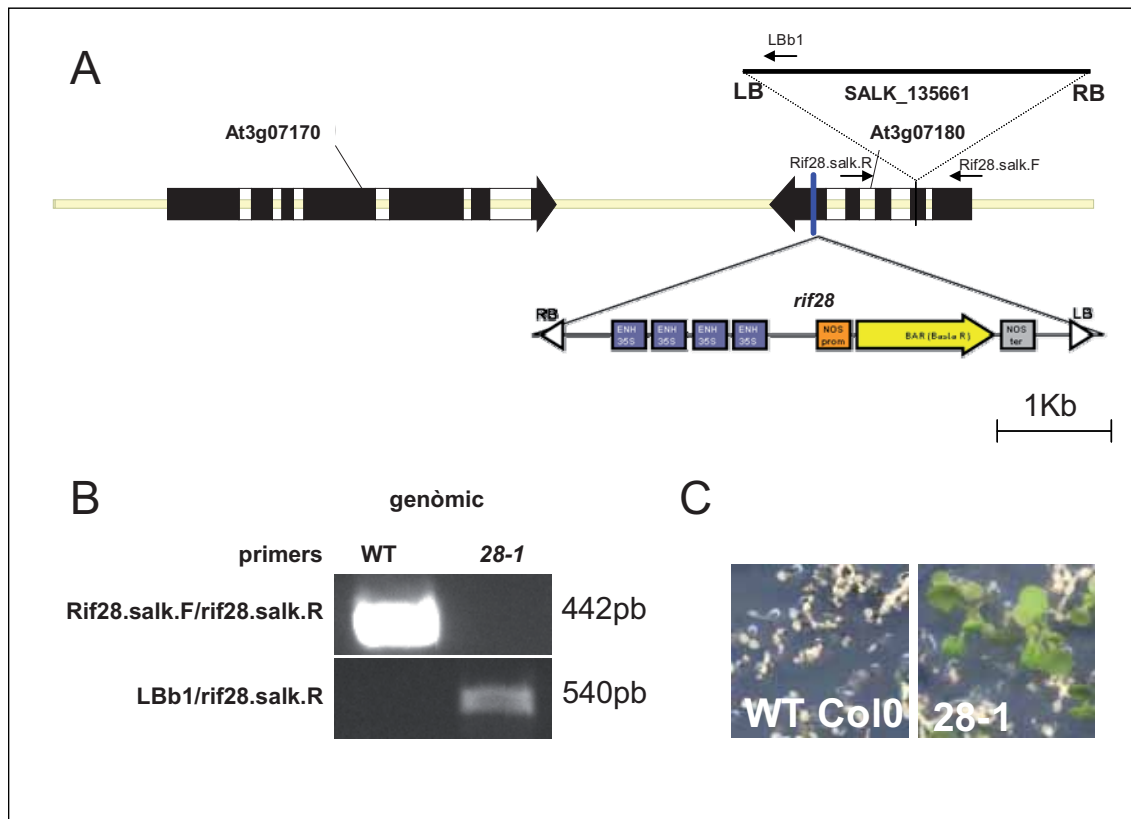
principal candidat. Aquest gen codifica una proteïna de la família de les exostosines localitzada en la membrana cel·lular.



**Figura 76.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif24*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g41240* (B) i *At5g41250* (C), i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

El T-DNA en el mutant *rif28* es troba inserit en l'exó 5 del gen *At2g07180* (Figura 77A). Es va identificar un mutant de pèrdua de funció d'aquest gen a la col·lecció del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso et al., 2003) i es va obtenir del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (<http://Arabidopsis.info/>). Aquest mutant (SALK\_135661) es va anomenar *rif28-1*, i presenta una inserció a l'exó 2 del gen *At2g07180* (Figura 77A). Plàntules homozigòtiques d'aquest mutant van ser seleccionades per PCR (Figura 77B) i es van cultivar en presència de FSM. En la Figura 77C es pot

observar com aquest mutant és clarament resistent a la FSM. Es pot concloure, per tant, que la pèrdua de funció del gen At2g07180 provoca resistència al bloqueig de la ruta del MEP en el mutant *rif28*. Aquest gen codifica una proteïna anotada com a proteïna quinasa, amb un domini N-terminal de miristoilació.

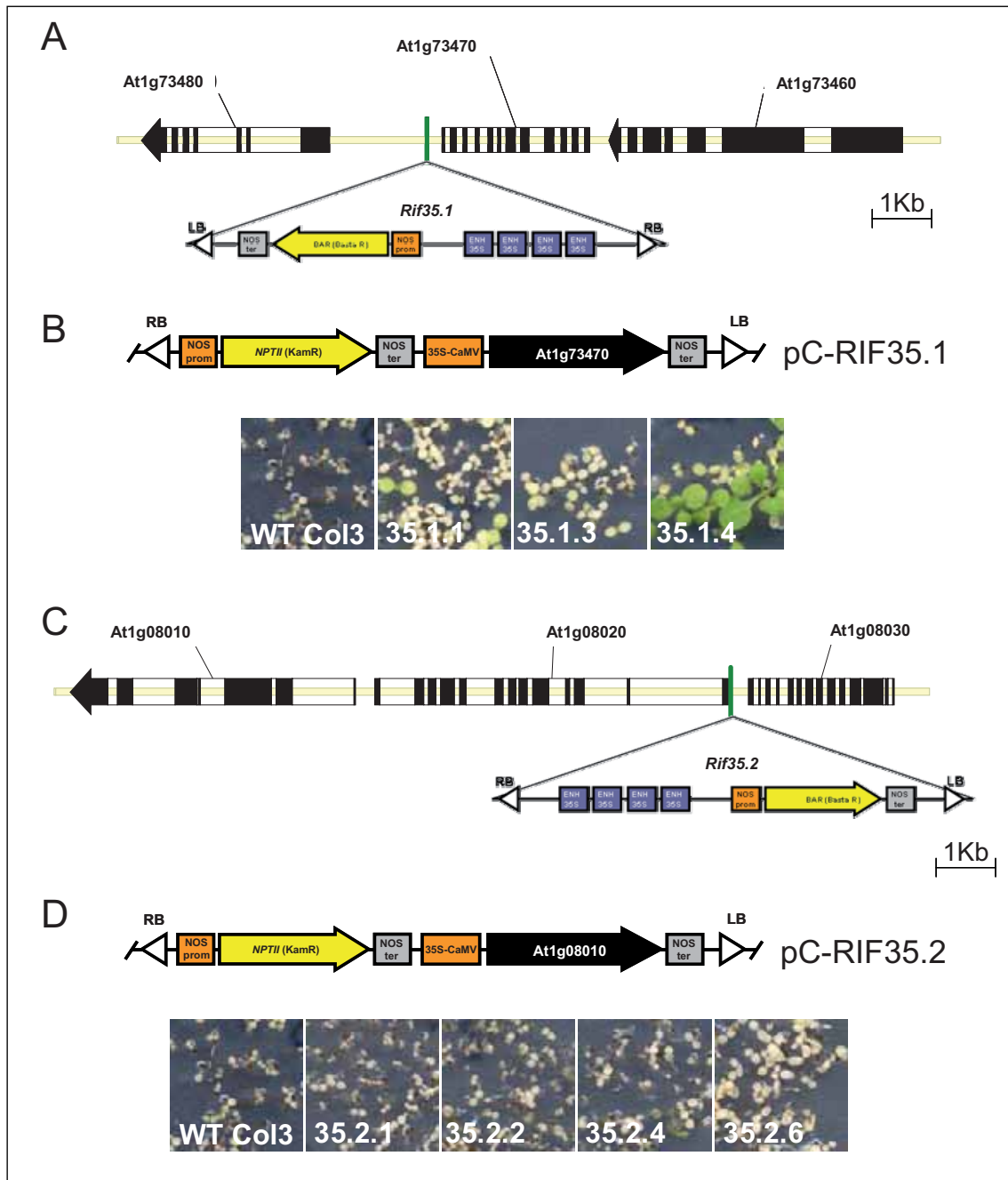


**Figura 77.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en els mutants *rif28* i *rif28-1*. (A) Es mostren els T-DNAs (no dibuixats a escala) i la seva orientació relativa en els mutants *rif28* i *rif28-1*. També s'ha indicat la posició dels primers usats per l'anàlisi genòmic en el mutant *rif28-1* (B) i es mostra el creixement de la línia homocigòtica d'aquest mutant després de cultivar-la durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM (C).

En el mutant *rif35* s'han trobat dues insercions de T-DNA. Un dels T-DNAs es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 1 (Figura 78A) fent possible que el gen At1g73470 estigüés activat. Per comprovar la possible implicació d'aquest gen es va procedir a la generació de la construcció pC-RIF35.1 (Materials i Mètodes, 5.1.1) i a l'obtenció de línies transgèniques de sobreexpressió. De les tres línies obtingudes, dues van mostrar resistència a la FSM (Figura 78B). L'altre T-DNA es va localitzar en una regió intergènica del cromosoma 1 (Figura 78C), de forma que la disposició dels enhancers podria estar activant el gen At1g08010. Es van generar 4 línies transgèniques de sobreexpressió d'aquest gen utilitzant la construcció pC-RIF35.2 (Materials i Mètodes, 5.1.1), però cap d'elles mostra resistència a la FSM (Figura 78D). Per tant, es pot concloure que en el mutant *rif35* és una activació del gen At1g73470

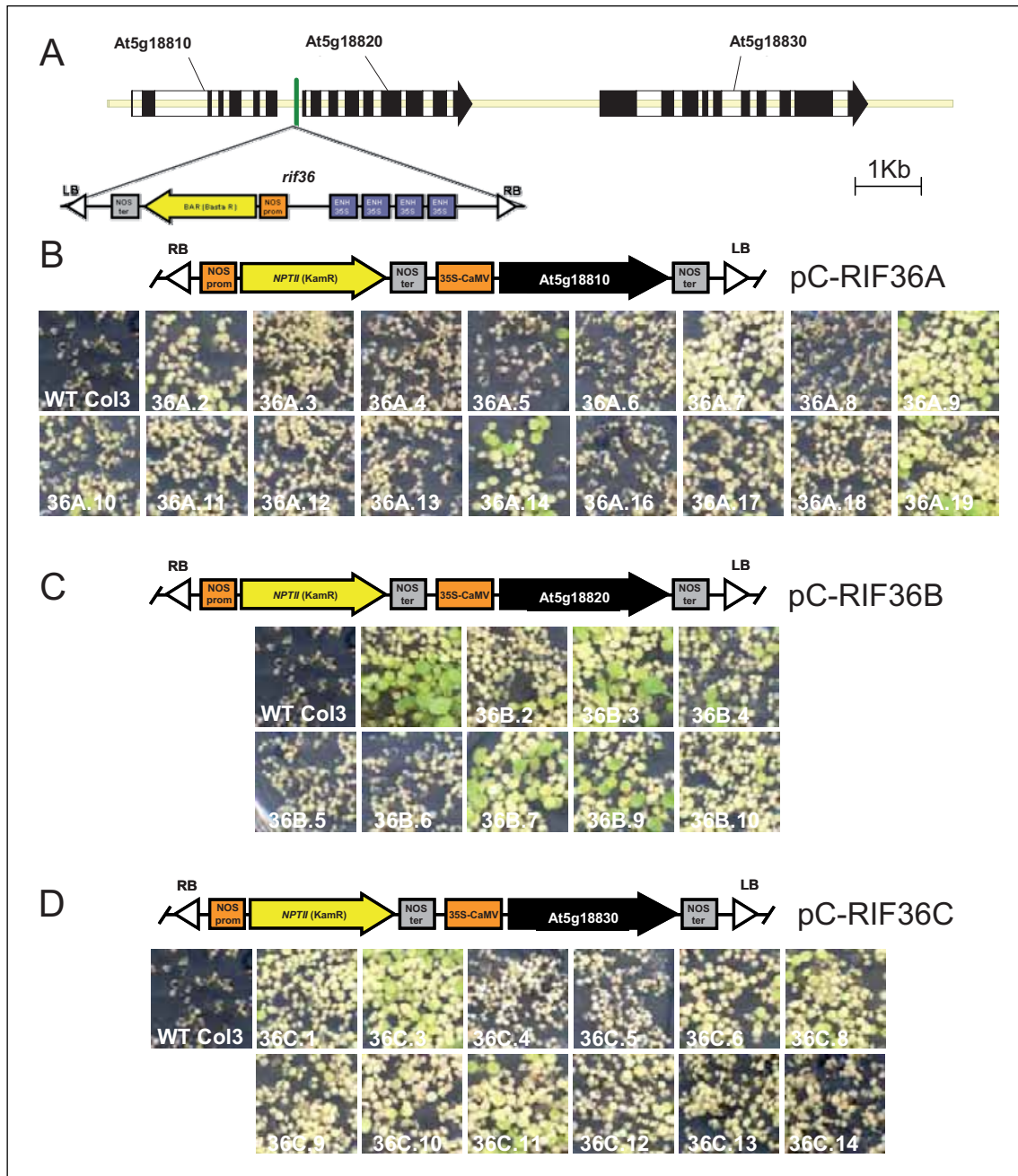
## RESULTATS

la que confereix resistència a la FSM. Aquest gen codifica per una proteïna amb funció desconeguda localitzada en els cloroplastes.



**Figura 78.** Regió genòmica en la que està inserits els dos T-DNAs trobats en el mutant *rif35*. (A i C) Es mostren els T-DNAs (no dibuixats a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At1g73470* (B) i *At1g08010* (D), i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

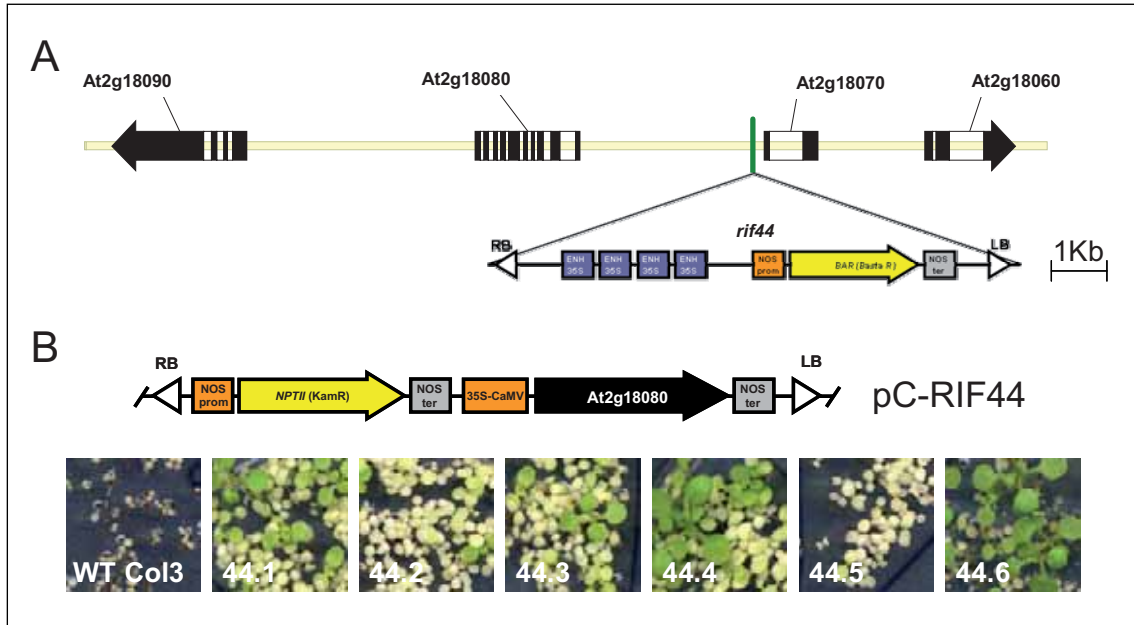
En el mutant *rif36*, el T-DNA està inserit en una regió intergènica del cromosoma 5 (Figura 79A) de forma que hi haurien tres gens que podrien estar sota la influència dels enhancers del T-DNA, At5g18810, At5g18820 i At5g18830. Es van clonar els cDNAs d'aquests gens sota el control del promotor CaMV35S, obtenint-se les construccions pC.RIF36A, pC-RIF36B i pC-RIF36C (Materials i Mètodes, 5.1.1) amb les quals es van generar plantes transgèniques de sobreexpressió. Es van obtenir 17 línies pel gen At5g18810, 9 línies pel gen At5g18820 i 12 línies pel gen At5g18830. La resistència d'aquestes línies a la FSM es mostra en la figura 79. Aquí es va obtenir un resultat inesperat al observar certa resistència en línies sobreexpressores de cadascun dels tres gens. Clarament, però, el grau més alt de resistència, es va trobar en el cas de les línies sobreexpressores del gen At5g18820 (Figura 79C). Aquest gen codifica per una proteïna anotada com a proteïna d'unió a ATP i a altres proteïnes, amb funció de xaperona, que localitza als cloroplastes.



**Figura 79.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif36*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. També s'inclouen les representacions esquemàtiques dels T-DNAs amb els quals s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At5g18810* (B), *At5g18820* (C) i *At5g18830* (D) i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.

El T-DNA a *rif44* es troba inserit en una regió intergènica del cromosoma 2 (Figura 80A). Es van generar plantes transgèniques sobreexpressores del gen més proper als enhancers, *At2g18080*, utilitzant la construcció pC-RIF44 on el cDNA d'aquest gen es va clonar sota el control del promotor

CaMV35S (Materials i Mètodes, 5.1.1). Es van obtenir sis línies, de les quals cinc van mostrar resistència a la FSM (Figura 80B). Tot indica, per tant, que l'activació del gen *At2g18080* confereix resistència a la FSM en el mutant *rif44*. Aquest gen codifica per la proteïna EDA2, associada amb una activitat peptidasa del tipus serina (Pagnussat i col., 2005).



**Figura 80.** Regió genòmica en la que està inserit el T-DNA en el mutant *rif44*. (A) Es mostra el T-DNA (no dibuixat a escala) i la seva orientació relativa. (B) S'inclou la representació esquemàtica del T-DNA amb el qual s'han generat les plantes transgèniques per sobreexpressar *At2g18080*, i es mostra el creixement de les diferents línies obtingudes després de cultivar-les durant 10 dies en en medi MS suplementat amb FSM.



# DISCUSSIÓ





## 1 Anàlisi funcional de la isoforma DXS2 d'*Arabidopsis*

En les plantes, la presència de diferents isoformes d'una proteïna proporciona una major capacitat per regular els múltiples processos necessaris pel seu creixement, desenvolupament i interacció amb l'entorn. Per exemple, diferents isogens poden presentar una expressió diferencial durant el desenvolupament, en diferents teixits i tipus cel·lulars o en resposta a diferents estímuls externs. Tamateix, les diferents isoformes proteiques poden presentar la mateixa activitat i, alhora, estar regulades diferencialment.

En relació amb la DXS, el primer enzim de la via del MEP i considerat un important enzim regulador del flux d'aquesta ruta metabòlica, es coneix que està codificat per diferents isogens en totes les plantes en que s'ha estudiat. Diferents estudis han mostrat que les DXS de les plantes es poden agrupar en dues subfamílies filogenèticament ben definides que representarien dos grups enzimàtics funcionalment especialitzats (Walter i col. 2002). Mentre la subfamília I estaria constituïda per DXSs relacionades amb processos de creixement i desenvolupament de la planta, les DXS de la subfamília II estarien relacionades amb la biosíntesi d'un ampli ventall de metabòlits secundaris de naturalesa isoprenoide involucrats en les interaccions de la planta amb el seu entorn (Walter i col. 2002).

Tal com s'ha indicat en la Introducció (apartat 2.2.3.5), a *Arabidopsis thaliana* s'han identificat 3 gens que codifiquen proteïnes amb elevada similitud a les DXS de microorgansimes i plantes, DXS1, DXS2 i DXS3. Fins al moment, però, només s'ha demostrat activitat DXS per la DXS1 (codificada pel gen *DXS1*, At4g15560), mentre que per DXS2 i DXS3 (codificades pels gens At3g21500 i At5g11380 respectivament) no hi havia treballs que ho confirmessin. Filogenèticament, DXS1 pertany a la subfamília I. DXS2 presenta un alt grau de similitud amb DXS1, i també es pot incloure dins de la subfamília I (Carretero-Paulet i Boronat, resultats no publicats). D'altra banda, DXS3 no s'encadra en cap de les subfamílies i l'anàlisi de la seva seqüència mostra importants diferències amb les altres DXS, entre elles la manca de certs residus aminoacídics i dominis funcionals necessaris per la seva activitat. En conseqüència, s'ha descartat que DXS3 tingi activitat DXS (Carretero-Paulet i Boronat, resultats no publicats).

A l'inici d'aquest treball, en el nostre laboratori s'havia estudiat la proteïna DXS2 d'*Arabidopsis* i els resultats obtinguts no havien pogut demostrar activitat DXS per aquesta proteïna (Carretero-Paulet 2003). Així, per una part s'havia comprovat que l'expressió de DXS2 a *E.coli* no era capaç de complementar un mutant defectiu en activitat DXS. Per altra part, en *Arabidopsis*, l'expressió de DXS2 tampoc havia rescatat la deficiència de la DXS1 en el mutant termosensible *chs5* (Carretero-Paulet 2003).

D'altra banda, l'existència d'ESTs en les bases de dades mostraven que el gen *DXS2* s'expressava en diferents teixits de la planta, tot i que a nivells inferiors als de *DXS1*. Estudis d'expressió en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* van demostrar que *DXS2* té un patró d'expressió ben definit i diferent al de *DXS1*. Mentre que *DXS1* s'expressa de forma generalitzada, mostrant alts nivells

## DISCUSSIÓ

d'expressió en teixits fotosintètics i una activació en resposta a la llum, l'expressió de *DXS2* es va detectar majoritàriament en flors i fruits, i no era activada per la llum (Carretero-Paulet 2003).

La localització intracel·lular de *DXS2* és peculiar en comparació amb la de *DXS1*. Mentre que estudis prèvis havien mostrat que la proteïna *DXS1* es localitza en els cloroplastes, la *DXS2* es va localitzar en petits plàstids amb clorofil·la (possiblement proplàstids). Aquest fet va suggerir un cert tipus d'especialització funcional per la proteïna *DXS2* (Carretero-Paulet 2003). De fet, el pèptid de trànsit predit per la *DXS2* és més curt que el de la *DXS1* degut a dues delecions que afecten l'exó 1 del gen *DXS2* (Carretero-Paulet 2003).

Va ser justament aquesta possible localització subcel·lular diferencial, la que va fer pensar en la possibilitat que la proteïna *DXS2* tingués activitat DXS a *Arabidopsis*, però no pogués complementar la deficiència en la *DXS1* al estar direccionada a un subcompartiment diferent. Per tal de clarificar aquest aspecte, en aquest treball s'han generat plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que expressen una versió modificada de la proteïna *DXS2* en la que el seu pèptid de transit s'ha reemplaçat pel pèptid de transit de la *DXS1*, assegurant d'aquesta manera la correcta direccionalització de la *DXS2* als cloroplastes. En aquest cas tampoc s'ha pogut complementar la pèrdua d'activitat de la proteïna *DXS1* en el mutant termosensible *chs5* (Resultats, 1.1.2). Aquest resultat recolzaria les observacions prèvies que indicaven que la proteïna *DXS2* no té activitat DXS.

En un intent conèixer la possible funció de *DXS2*, aquesta proteïna s'ha expressat a *E. coli* en forma d'una versió que contenia una cua d'histidines a l'extrem C-terminal per tal d'abordar la seva posterior purificació mitjançant cromatografia de bescambi iònic. Tot i obtenir un bon nivell d'expressió i solubilitat, la proteïna *DXS2* no ha pogut ser purificada i, per tant, no s'han pogut realitzar els assajos per estudiar la seva possible activitat. El que sí s'han realitzat son estudis d'activitat DXS en extractes proteics totals enriquits amb aquest enzim, no havent-se detectat activitat DXS aparent (Resultats, 1.2)). Aquest resultat estarien d'acord amb les observacions prèvies que indicaven que *DXS2* no té activitat DXS.

Per tal de tenir alguna indicació que permetés conèixer el possible paper funcional de la *DXS2* s'ha estudiat un mutant de pèrdua de funció del gen *DXS2*. Després de comprobar que el mutant no expressava el transcrit corresponent al gen *DXS2*, els resultats obtinguts no han permès constatar cap diferència fenotípica entre el mutant i la varietat silvestre (Resultats, 1.3 Fig 7). Aquest resultat indica que independentment de la possible funció que pugui tenir *DXS2*, aquesta no és essencial pel creixement i el desenvolupament de la planta.

Anàlisis evolutius realitzats recentment en el nostre grup (Carretero-Paulet i col., manuscrit en preparació) han mostrat que *DXS1* i *DXS2* provenen d'una duplicació que s'estima relativament recent en la història evolutiva d'*Arabidopsis*. Si es té en compte el destí evolutiu dels gens duplicats, està àmpliament acceptat que un dels gens acostuma a mantenir la funció ancestral mentre que l'altre pot evolucionar neutralment, lliure de pressió selectiva o funcional. El nou gen duplicat acumularà mutacions deleteres,

més probablement que mutacions avantatjoses, i ràpidament es convertirà en un pseudogen que serà inactivat o inclús eliminat del genoma (Lynch i Conery 2000; Conant i Wolfe 2008). En alguns casos, ambdós gens es mantenen en el genoma després d'una duplicació (Blanc i Wolfe 2004; Moore i Purugganan 2005). Això passa quan la conservació de la funció ancestral per part dels gens duplicats resulta avantatjosa. Un exemple d'aquest cas és quan la dosi dels RNAs o proteïnes produïdes és beneficiós (Conant i Wolfe 2008). De forma alternativa, els dos gens duplicats es poden mantenir en el genoma i s'especialitzen funcionalment, ja sigui perquè els dos gens s'especialitzen en un conjunt de funcions del gen ancestral, o bé per que adquireixen noves funcions (Lynch i Conery 2000; Moore i Purugganan 2005; Conant i Wolfe 2008). En el cas de la DXS2, si bé les altes taxes evolutives observades serien compatibles amb el fet que estigués evolucionant com un pseudogen no processat, les anàlisi evolutives refusen clarament una evolució neutra per la DXS2, i són concluent al indicar que es tracta d'una seqüència codificant evolucionant sota pressions de selecció funcional (Carretero-Paulet i col., manuscrit en preparació).

En resum, es podria considerar que DXS2 ha evolucionat (o està evolucionant) cap a una nova funció biològica. En absència d'informació sobre la seva possible activitat enzimàtica i basant-nos en l'absència d'un fenotip visible en les plantes d'*Arabidopsis* defectives en el gen *DXS2*, el paper biològic de DXS2 sembla no ser essencial pel funcionament normal de la planta i podria, per tant, estar relacionat amb alguna nova ruta del metabolisme secundari de la planta. El fet que DXS2 no presenti activitat DXS indicaria també que *Arabidopsis* conté un únic gen (*DXS1*) codificant per DXS.

## **2 Estudi de la toxicitat i del possible paper de la 1-desoxi-D-xilulosa en la regulació de la síntesi d'isoprenoides i altres processos cel·lulars**

El flux de la ruta del MEP no nomé ve definit pel nivell dels enzims que la componen, sinó també per l'aport dels corresponents substrats i cofactors, i del paper regulador que puguessin desenvolupar certs efectors metabòlics, entre ells els propis intermediaris de la via. En aquest sentit, la DX5P s'ha revelat com una molècula potencialment reguladora de la ruta del MEP.

Cal tenir en compte que per tal de subministrar 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat (DX5P) a les plantes s'utilitza la seva forma no fosforilada, la 1-desoxi-D-xilulosa (DX), que és posteriorment fosforilada a l'interior de la cèl.lula per l'acció d'una quinasa (veure més endavant). Son justament alguns d'aquests estudis d'incorporació de DX, que han permès per una part avançar en el coneixement de la ruta del MEP, els que han posat de manifest el possible paper regulador de la DX o de la DX5P. Així, per exemple, està descrit que l'administració de DX al fruit de tomàquet resulta en un augment de la carotenogènesi (Lois i col. 2000). No obstant això, estudis posteriors han demostrat que la DX no necessita ser incorporada a la ruta del MEP per tal d'induir la síntesi de carotenoides (Rohmer M.,

## DISCUSSIÓ

comunicació personal), suggerint un possible paper de la DX o d'algún metabolit relacionat (per exemple DX5P) com a molècula senyal. Per altra part, plantes d'*Arabidopsis* crescudes en un medi que contenia DX per tal de rescatar la inibició de la via del MV van mostrar un retard en el creixement a concentracions de DX superiors a 1,5 mM (Kasahara i col. 2002). Els resultats obtinguts en aquesta tesi han mostrat que concentracions de DX superiors a 1mM son tòxiques per les plàntules d'*Arabidopsis*, que mostren un fenotip albi letal i no desenvolupen les arrels (Resultats, 2.1 Fig 8).

En un primer moment, i tenint en compte els experiments previs realitzats en tomàquet en els que l'administració de DX induïa la carotenogènesi en el fruit, es va pensar en la possibilitat que la DX incorporada per les plàntules d'*Arabidopsis* pogués estar activant la ruta del MEP i/o les posteriors rutes de síntesis d'isoprenoides plastídics i que, en coseqüència, les plàntules no es poguéssin desenvolupar degut de l'acumul d'algún intermediari o producte final. Per exemple, una producció incrementada d'àcid abscísic(ABA) podria ser el causant d'aquest efecte sobre el creixement, tal com s'observa al cultivar plantes d'*Arabidopsis* en presència d'aquesta hormona (Lopez-Molina i col., 2002).

En el present treball s'ha comprovat que la DX exerceix també un efecte tòxic a *E. coli*, un bacteri que utilitza la via del MEP per la síntesi d'isoprenoides. Aquests estudis en bacteris s'han realitzat per ser aparentment més senzills i considerant també la possibilitat que el mecanisme pel qual la DX és tòxica a *Arabidopsis* pogués ser el mateix en bacteris. Si aquesta hipòtesi fos certa, es descartaria el fet que la toxicitat de la DX fos deguda a l'acumulació d'algún isoprenoide plastídic en *Arabidopsis*, ja que els productes finals de la via del MEP en plantes i microorganismes són molt diferents.

Els primers estudis de toxicitat a la DX obtinguts en *E. coli* utilitzant medi ric no van mostrar cap efecte sobre el creixement, fins i tots a una concentració de 100 mM, suggerint que aquest bacteri no es veuria afectat per aquest compost. No obstant això, i tenint en compte la capacitat que tenen els bacteris per seleccionar les fonts de carboni del medi, es va considerar la possibilitat que la DX present en el medi ric no estigués sent assimilada pel bacteri. És per això que es van realitzar nous experiments utilitzant medi mínim. En aquest cas es va observar que la DX era tòxica per *E. coli* a partir d'una concentració 10 mM, lleugerament superior a la observada per *Arabidopsis* (Resultats, 2.2.2 Fig 14).

Tam com s'ha indicat anteriorment, la DX necessita ser fosforilada a DX5P per poder-se incorporar a la via del MEP. Tant en bacteris com en plantes s'ha identificat l'existència d'enzims amb activitat quinasa capaços de fosforilar la DX. En el cas d'*Arabidopsis* esta ben documentada l'existència d'un únic enzim amb activitat xilulosa quinasa (XK) de localització citosòlica (Hemmerlin i col. 2006).

Estudis realitzats en el mutant d'*Arabidopsis Atxk-2*, defectiu per l'activitat xilulosa quinasa, han evidenciat que la DX necessita ser fosforilada per tal d'exercir el seu efecte tòxic (Resultats, 2.1.2). Per tant, resulta evident que la toxicitat a la DX es causada per la DX5P o per algun producte derivat de la metabolització de la DX5P. Malgrat que la fosforilació de la DX tindria lloc al citosol (on esta localitzada la xilulosa quinasa) els resultats obtinguts no permetien identificar si la toxicitat de la DX5P (o del possible metabolit derivat) s'exercia al citosol y/o als plàstids. Per tal d'elucidar aquest aspecte es van

realitzar estudis de toxicitat a la DX en un mutant d'*Arabidopsis* defectiu en el translocador de les pentoses fosfat (XPT). El translocador XPT s'ha descrit com el principal punt d'entrada de la DX5P als cloroplastes (Flügge i Gao 2005). Els experiments realitzats en el mutant *Atxpt-2*, defectiu en el translocador XPT, indiquen que el grau de toxicitat a la DX observat és superior al de la varietat silvestre (Resultats, 2.1.3), suggerint que la DX5P (o el possible metabolit derivat) actuaria en el citosol, fet que descartaria un possible efecte sobre els enzims de la ruta MEP.

Es podrien considerar dos mecanismes principals per explicar la toxicitat de la DX i que haurien de ser equivalents (o si més no semblants) en *Arabidopsis* i en *E. coli*. Un d'ells, seria que la propia DX5P, o algun sucre fosfat derivat, s'acumulés en quantitats suficients per a resultar tòxica. En aquest sentit està ben documentat que l'acumulació de sucres fosfat es tòxica en *E. coli* (Fraenkel 1968). L'altre mecanisme podria consistir en la metabolització de la DX5P a través d'una ruta metabòlica no relacionada per donar un producte amb capacitat inhibidòria d'algun procés metabòlic essencial. El fet que la sacarosa rescati el desenvolupament d'*Arabidopsis* i que *E. coli* pugui créixer quan s'afegeix piruvat al medi de cultiu estarien d'acord amb l'operació d'aquest tipus de mecanisme i apuntaria, a més, al bloqueig d'alguna etapa del metabolisme glucídic. En aquest sentit, una de les hipòtesis més atractives seria l'existència d'una interacció entre la DX5P i la ruta de les pentoses fosfat. En aquesta ruta metabòlica, l'enzim transcetolasa converteix inicialment la D-ribosa 5-fosfat i la D-xilulosa 5-fosfat en sedoheptulosa 7-fosfat i GAP, que són posteriorment transformats en D-fructosa 6-fosfat y D-eritrosa 4-fosfat per acció de l'enzim transaldolasa. L'alta similitud estructural que presenta la D-xilulosa 5-fosfat i la DX5P podria possibilitar la seva metabolització en la reacció de la transcetolasa, amb la corresponent formació de desoxisedoheptulosa 7-fosfat i GAP. La posterior metabolització de la desoxisedoheptulosa 7-fosfat per la transaldolasa, acabaria formant 1-desoxifrufructosa 6-fosfat i D-eritrosa 4-fosfat. En aquest context és important indicar que la 1-desoxifrufructosa 6-fosfat és un potent inhibidor de la fosfoglucoisomerasa i la fosfofructoquinasa, dos importants enzims reguladors de la glucòlisi i la gulconeogènesi (Bar-Tana i Cleland 1974; W L Dills 1976). En l'actualitat es deconeix si la transcetolasa i la transaldolasa poden catalitzar les reaccions indicades. Malgrat tot, si es confirmés aquesta hipòtesi i tenint en compte que la via del MEP i la de les pentoses fosfat coexisteixen tant en els plàstids com en els bacteris, es podria estar davant d'un nou mecanisme de regulació coordinada d'aquestes dues vies metabòliques modulada pels nivells de DX5P.

### **3 Anàlisi bioquímico i molecular de mutants resistents al bloqueig de la ruta del MEP amb fosmidomicina.**

L'estudi de la regulació de les rutes del MEP i del MVA i dels mecanismes implicats en l'intercanvi d'intermediaris entre elles ha esdevingut un aspecte de gran interès en els últims anys. Les dades disponibles actualment indiquen que aquests processos són molt complexes i que poden estar relacionats amb una gran varietat de fenòmens cel·lulars.

## DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha confirmat que l'enzim DXR desenvolupa un paper rellevant en el control del flux de la ruta MEP a *Arabidopsis*. Així, s'ha demostrat que nivells elevats de l'enzim DXR es correlacionen amb un augment del contingut de clorofil·les i carotenoides de la planta (Resultats, 3.2.1). Aquest resultat, conjuntament amb resultats prèvis que demostraven que el flux de la via del MEP també està controlat pels enzims DXS i HDS (Estévez i col. 2001; Carretero-Paulet 2003; Besumbes i col. 2004; Botella-Pavia i col. 2004) dona suport a la idea que el control del flux d'aquesta via metabòlica és compartit per diferents enzims. Si bé aquesta observació té l'interès de poder abordar la modificació del flux de la ruta a nivell de diferents etapes enzimàtiques, té d'inconvenient de que la manipulació de només una d'aquestes activitats pugui tenir un efecte limitat, tal com s'ha observat en l'actualitat.

Per tal d'aprofundir e identificar nous mecanismes pels quals *Arabidopsis* pot regular els nivells de DXR i/o altres enzims de la ruta MEP i els mecanismes potencialment implicats en l'intercanvi d'IPP o prenildifosfats entre el citosol i el cloroplast, en aquest treball s'ha procedit a la identificació i caracterització de mutants d'*Arabidopsis* resistents a la FSM, anomenats mutants *rif*, a partir d'una col·lecció de mutants d'*activation tagging*. Entre els diferents mecanismes que podrien conferir resistència a la FSM en aquests mutants, cal esmentar aquells que al nostre entendre podrien ser els més interessants. Per una part, la resistència a la FSM podria venir donada per un augment de l'activitat DXR (la diana de l'inhibidor) com a conseqüència tant de l'increment en els nivells de transcripció del gen *DXR* (individualment o conjuntament amb altres gens de la via del MEP) o de l'activació d'algun mecanisme que actués a nivell postranscripcional o postraduccional i que resultés en un increment en els nivells de proteïna o activitat de la DXR. Per altra part, la resistència a la FSM podria també venir donada per un increment en la taxa d'import d'IPP (o altres prenildifosfats) derivat de la via del MVA.

Dels 16 mutants *rif* identificats, la majoria semblen presentar resistència a la FSM com a conseqüència de presentar nivells elevats de l'enzim DXR, ja siguin els basals o bé els induïbles en resposta al bloqueig de la via del MEP (Resultats, 3.7). En la majoria de casos, aquest increment en els nivells de DXR és degut a mecanismes que actuaríen a nivell postranscripcional. És de destacar que alguns d'aquests mutants mostren nivells de proteïna DXR més elevats que els obtingut en les plantes transgèniques dissenyades per sobreexpressar la DXR sota el control del promotor constitutiu CaMV35S (Carretero-Paulet i col., 2006). En aquest sentit es vol destacar que les línies transgèniques sobreexpressores de DXR, presenten uns nivells molt elevats de transcrit DXR que no es corresponen amb els nivells de proteïna detectats (Carretero-Paulet 2003), evidenciant d'aquesta manera la importància dels mecanismes postranscripcionals en el control dels nivells de l'enzim.

Està descrit però que en determinades etapes del desenvolupament, les plantes incrementen l'expressió del gen de la DXR per tal d'augmentar el flux de la ruta MEP (Carretero-Paulet i col. 2002; Guevara-Garcia i col. 2005). Així doncs, els nivells de transcrit de la DXR són més elevats en els teixits joves aeris, durant el procés de desetiolació i en aquells processos en que la planta ha d'augmentar els nivells de clorofil·les i carotenoides. És per això que no s'ha de descartar la relevància que puguin tenir els mecanismes de control transcripcional en la regulació dels nivells de DXR en particular i de la via del MEP en general.

Per tal de facilitar la presentació i la discussió dels resultats derivats de la caracterització dels diferents mutans *rif* identificats, aquests s'han agrupat en funció del tipus de resposta observada i/o del tipus de procés biològic que poden tenir alterats.

### **Mutants *rif* que presenten nivells basals elevats de proteïna DXR i una elevada capacitat d'inducció en resposta al bloqueig de la ruta del MEP amb FSM**

L'enzim DXR mostra nivells relativament elevats en els mutants *rif27* i *rif33*, on s'assoleixen uns nivells de més de 3 i més de 4 vegades més elevats que el parental silvestre, respectivament. En aquests mutants, els nivells del transcrit de la DXR no estan incrementats i, per tant, tot sembla indicar que l'augment de proteïna DXR és conseqüència de l'activació d'algun mecanisme regulador que actuarà a nivell postranscripcional. A més, quan es bloqueja la ruta del MEP amb FSM, aquests mutants mostren la capacitat d'incrementar encara més els nivells de proteïna DXR en relació amb els nivells basals de la soca silvestre, amb valors de 8 vegades per a *rif27* i de 12 vegades per a *rif33* (Resultats, 3.10.1 Fig 30 i 33). Sembla clar, doncs, que aquests mutants no només presenten nivells basals més elevats de proteïna DXR sinó també una capacitat molt incrementada d'inducció de la DXR en resposta al bloqueig de la ruta del MEP amb FSM.

Aquests resultats obren també una nova qüestió, que introdueix un grau més de complexitat, derivada del fet que malgrat tenir nivells basals elevats de proteïna DXR aquests mutants no presenten nivells incrementats de clorofil·les i carotenoides (Resultats, 3.9). Les plantes transgèniques que sobreexpressen DXR mostren una major acumulació de pigments malgrat tenir increments menors de proteïna DXR. Sembla, doncs, que els elevats nivells de proteïna DXR observats en els mutants *rif27* i *rif33* no es traduirien en un augment d'activitat DXR. Altrament, queda oberta la possibilitat que existeixin altres factors que estiguin limitant el flux de la ruta en els mutants *rif27* i *rif33*.

No s'ha pogut identificar encara el gen responsable de la resistència a FSM en el mutant *rif27*. No obstant això, la opció més probable és que sigui el resultat de l'activació del gen *ASML2*, (*Activator of  $Spo^{min}::LUC2$* ) que codifica per un factor de transcripció que regula l'expressió d'un grup de gens induïbles per sucres (Masaki i col. 2005) (Resultats, 3.10.1.1 Fig 32). Està descrit que quan hi ha una elevada disponibilitat de sucres a la planta s'activa la transcripció de gens relacionats amb activitats d'assimilació, com gens que codifiquen per proteïnes d'acumulació i enzims involucrats en la síntesi de midó (Rolland i col., 2002), alhora que s'inhibeix l'expressió de gens fotosintètics. Els sucres han estat relacionats amb la fotosíntesi i amb el control hídric de la planta, més concretament amb l'obertura d'estomes i l'ABA (Rook i col., 2006). L'ABA reprimeix aquesta obertura per tal que la planta no perdi aigua, la qual cosa és convenient quan hi ha un alt contingut de sucres i no és necessària l'entrada de diòxid de carboni. Així doncs, sembla existir una integració entre els senyals derivats de la llum, els nivells de sucres i l'ABA. S'ha proposat un model segons el qual uns elevats nivells de sucres regularien negativament per una banda la fotosíntesi (menys necessària en aquestes condicions), i per l'altra



## DISCUSSIÓ

induirien la resposta de l'ABA per tal de disminuir l'entrada de CO<sub>2</sub> a la planta a través del tancament dels estomes (Arenas-Huertero i col., 2000).

És possible que pugui existir una relació entre aquests fenòmens i la funcionalitat de la ruta del MEP. En el mutant *rif27*, els elevats nivells de proteïna DXR podrien ser la conseqüència indirecta de l'activació del factor de transcripció *ASML2*. Es podria proposar un model en el qual, davant la presència d'alts nivells de sucres la planta, a través d'*ASML2* i de forma més o menys directa, acabés incrementant els nivells de proteïna DXR en resposta a la demanda d'una major producció d'ABA relacionada amb el tancament estomàtic de la planta.

Pel que fa a *rif33* és l'expressió de la *small heat shock protein* HSP15.7-CI la que s'ha relacionat amb la resistència a la FSM (Resultats, 3.10.1.2 Fig 35). Aquesta proteïna s'ha localitzat en els peroxisomes, on s'ha suggerit que desenvolupa una activitat chaperona ATP-independent relacionada amb la protecció enfront a l'estrés oxidatiu (Ma i col. 2006). En el present treball hem comprovat que *Arabidopsis* adquireix resistència a la FSM en resposta a un tractament de xoc tèrmic (Resultats, 3.10.1.2 Fig 36), fet que permet relacionar l'increment postranscripcional dels nivells de la DXR amb processos de resposta a estrès. A més, el fet que el mutant *rif33* també mostri resistència a la MEV suggereix que tant la via del MEP com la del MVA podrien respondre a estímuls derivats de diferents tipus d'estrès.

De fet, davant d'un estrés per calor, les plantes s'han de protegir dissipant l'excés d'energia i fer front a un estrés oxidatiu (Peñuelas i Munné-Bosch 2005). És ben conegut que alguns isoprenoides mostren propietats protectores relacionades amb la seva estructura molecular. En particular, els doble enllaços presents en molts compostos isoprenoides poden participar en la desactivació de les espècies reactives d'oxigen (ROS). Per exemple, l'estructura de doble enllaç dels conjugats d'isoprè poden segrestar els radicals lliures d'oxigen facilitant la transferència d'energia i la dissipació calòrica (Velikova i col., 2004). Els carotenoides també són bons agents antioxidants per la presència de dobles enllaços conjugats en la seva molècula (Havaux 1998). A més, la presència de grups hidroxils en alguns isoprenoides com els tocoferols, la zeaxantina i l'àcid carnòsic (un diterpè) permet la desactivació de ROS (Havaux 1998; Munné-Bosch i Alegre 2002; Munne-Bosch i Alegre 2003). A més, alguns isoprenoides són petites molècules lipofíliques que poden proporcionar interaccions hidrofòbiques implicades en l'estabilització de les membranes (Peñuelas i Munné-Bosch 2005).

D'altra banda, està descrit que l'expressió del gen *HSP15.7-CI* s'indueix fortament en resposta a una combinació d'estrés tèrmic i sequera (Rizhsky i col., 2004). En aquestes condicions, està descrit que disminueix l'activitat fotosintètica de la planta, i alhora augmenten els nivells de certs sucres com la sacarosa, la maltosa o la gulosa, probablement derivats de la degradació del midó (Rizhsky i col. 2004). D'aquesta manera, la resposta observada en els mutants *rif27* i *rif33* podria estar més relacionada del que es podria pensar en un principi.

## Mutants *rif* amb un elevada inducció dels nivells de proteïna DXR en resposta al bloqueig de la ruta del MEP amb FSM

S'han aïllat tres mutants *rif* (*rif23*, *rif26* i *rif31*) que, si bé presenten uns nivells de proteïna DXR semblants o lleugeraments més elevats que els de la varietat parental, mostren una elevada capacitat d'inducció dels nivells de proteïna DXR després de bloquejar la ruta del MEP amb FSM. Degut a que els nivells de transcrit DXR no estan incrementats, es pot concloure que, en aquest cas també, els mecanismes implicats en la resposta al bloqueig amb FSM estarien actuant a nivell postranscripcional (Resultats, 3.10.2 Fig 37, 38 i 42).

En el mutant *rif23* la resistència a la FSM es relaciona amb una forta inducció dels nivells de proteïna DXR (unes 6 vegades) derivada de l'activació del gen At3g23325, que codifica per una proteïna amb similitud a la Subunitat 5 del Factor d'Splicing 3B (Sf3B5) (Resultats, 3.10.2.1), tot i que aquesta funció se li ha atribuït únicament per similitud de seqüència (Lorkovic i col. 2005). Aquesta proteïna podria formar part del complex de snRNP U2 (*small nuclear ribonucleoprotein particles U2*) que configura l'spliceosoma (Will i col., 1999), complex que participa en l'eliminació dels introns dels pre-mRNAs per generar els mRNAs funcionals i exportables.

El mutant *rif31* presenta una resposta a la FSM semblant a la de *rif23*. Així, els nivells de proteïna augmenten també fins a unes 6 vegades després del bloqueig de la ruta del MEP amb FSM. En aquest mutant la inducció de la DXR està relacionada amb la pèrdua de funció del gen At1g62850, que codifica per una proteïna amb similitud a un factor alliberador de la traducció (Resultats, 3.10.2.1 Fig 41). En aquest cas també la possible funció de la proteïna implicada ha estat assignada per similitud de seqüència, i no hi ha dades experimentals que confirmen la seva participació en el procés de traducció de les proteïnes.

Tot i que tant *rif23* com *rif31* podrien estar afectats en l'expressió de proteïnes amb funcions relacionades amb processos postranscripcionals (maduració i traducció dels mRNAs, respectivament) no resulta evident establir la possible relació existent entre els gens afectats i el fenotip observat, a menys que aquest afectés a la DXR d'una forma específica i ara com ara desconeguda.

En el mutant *rif26* la resistència a la FSM s'ha relacionat amb l'activació del gen At1g32780, que codifica per una proteïna que mostra similitud de seqüència amb alcohol deshidrogenases (Resultats, 3.10.2.2 Fig 44). Cal indicar però que en l'actualitat no es tenen dades que confirmen si aquesta proteïna té realment activitat alcohol deshidrogenasa. Les alcohol deshidrogenases catalitzen de forma reversible la reacció que transforma un alcohol en un aldehyd o una cetona, utilitzant  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  com a cofactor. Degut a que no es coneix el(s) substrat(s) d'aquesta hipotètica alcohol deshidrogenasa és difícil establir la possible relació entre l'activació d'aquesta proteïna i la resistència a la FSM observada en el mutant *rif26*. El fet però que el gen At1g32780 s'expressi essencialment en els pètals (<https://www.genevestigator.com>) podria fer pensar en alguna relació amb la síntesis d'isoprenoides volàtils. Si aquest fos el cas, es podria

## DISCUSSIÓ

considerar que els baixos nivells de pigments detectats en l'estadi de plàntula (veure més endavant) fossin conseqüència del redireccionament d'algun precursor cap a la síntesi de terpens volàtils.

### **Mutants *rif* afectats en la senyalització per fosfatidilinositols**

Després d'analitzar els gens implicats en la resistència a la FSM en els mutants *rif30*, *rif32* i *rif45* es va posar de manifest que la senyalització per fosfatidilinositols podria tenir un paper rellevant en la regulació de la ruta del MEP. Així, els gens activats en aquests mutants codifiquen per proteïnes que podrien contribuir directa o indirectament a modificar nivells de fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PI4,5P<sub>2</sub>), una molècula amb reconeguda activitat senyalitzadora en diferents organismes.

El mutant *rif45* mostra l'activació del gen At1g21920 que codifica una proteïna amb activitat fosfatidilinositol 4-fosfat 5-quinasa (PI4P5K) (Resultats, 3.10.3 Fig 54). Aquesta proteïna, que està involucrada en el metabolisme dels fosfoinositols, fosforila fosfatidilinositol 4-fosfat per formar PI4,5P<sub>2</sub> (Mueller-Roeber i Pical 2002). Mitjançant l'acció d'una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositols (PI-PLC) el PI4,5P<sub>2</sub> es pot convertir en inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG), fet que resulta en una activació de la proteïna quinasa C i l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> desde reserves intracel·lulars (Berridge 1993). Alhora, el PI4,5P<sub>2</sub> està involucrat també en la regulació d'altres processos cel·lulars, com és la dinàmica del citoesquelet d'actina o el tràfic de vesícules (Takenawa i Itoh 2001). Estudis de localització del PI4,5P<sub>2</sub> han indicat que en les plantes aquesta molècula es troba localitzada principalment en el citosol i que en determinades condicions, com per exemple en resposta a estrés salí, es concentra a la membrana cel·lular (van Leeuwen i col., 2007). D'altra banda, s'ha descrit que els nivells de PI4P5K incrementen en resposta a determinats tipus d'estrés nutricional, com són el de sacarosa (Contento i col., 2004) i el de fosfat (Wu i col., 2003). També s'ha demostrat que el gen que codifica per una altra isoforma de la PI4P5K també s'indueix en resposta a estrés hídric i a ABA (Mikami i col., 1998). Malgrat que no s'han mesurat els nivells de PI4,5P<sub>2</sub> en el mutant *rif45* és raonable pensar que aquests podrien ser més elevats. Així, és possible que la ruta del MEP estigui activada per l'activitat senyalitzadora del PI4,5P<sub>2</sub> (o bé de l'IP3 o DAG), a través o no de l'alliberament de Ca<sup>2+</sup>, provocant l'augment de proteïna DXR observat en aquest mutant.

En el cas del mutant *rif30* s'ha demostrat que la resistència a la FSM és deguda a l'activació del gen At4g36640 (Resultats, 3.10.3 Fig 52). Aquest gen codifica pel factor citosòlic SEC14, també conegut com proteïna transportadora de fosfatidilinositols (PITP). Les PITPs són proteïnes d'uns 35kD que faciliten la transferència de fosfatidilinositol (i també de fosfatidilcolina) entre membranes en un procés independent d'energia (Phillips i col., 2006). A més, aquestes proteïnes tenen la capacitat d'estimular la síntesi de fosfatidilinositols. Desafortunadament, en les plantes pràcticament no hi ha estudis funcionals sobre aquestes proteïnes. Els coneixements que existeixen actualment sobre les PITPs d'*Arabidopsis* deriven d'extrapolacions de resultats obtinguts en altres organismes, com el llevat, o bé de l'estudi de la PITP AtSfh1p, la funció de la qual és essencial pel correcte desenvolupament dels pèls de les arrels a

*Arabidopsis* (Vincent i col., 2005). La proteïna AtSfh1p mostra activitat transferidora de fosfatidilinositol i fosfatidilcolina i és capaç d'estimular la síntesi de fosfatidilinositols, particularment la de PI4P i la de PI4,5P<sub>2</sub>. Aquesta proteïna es localitza en els compartiments intracel·lulars de les últimes etapes de les vies secretores i en la membrana plasmàtica. La seva expressió és arrel-específica i es correlaciona amb l'enriquiment de PI4,5P<sub>2</sub> en dominis de la membrana cel·lular dels pèls radiculars i en compartiments de secreció. Es creu que AtSfh1p regula les zones d'alta concentració de fosfatidilinositols intracel·lulars i de la superfície cel·lular que dirigeixen el tràfic de membranes, la senyalització per calci i el citoesquelet (Vincent i col. 2005). El mutant *rif30* presenta uns nivells basals de DXR un 60% més elevats que el parental Col2 i podrien ser deguts a uns nivells intracel·lulars augmentats de PI4,5P<sub>2</sub>, o d'una redistribució d'aquesta molècula en determinades zones de la membrana.

El mutant *rif32* és resistent a la FSM degut a l'activació del gen At5g65020 que codifica per annexina 2 (Resultats, 3.10.3 Fig 53), una proteïna localitzada en el lumen dels tilacoides i que té capacitat d'unir calci (Peltier i col., 2002). Les annexines han estat àmpliament estudiades en cèl·lules animals i s'han revelat com unes proteïnes multifuncionals capaçes de participar en processos cel·lulars essencials tals com el tràfic de membranes, el transport de ions, la senyalització mitòtica, l'organització del citoesquelet i la replicació del DNA (Gerke i Moss 1997). També s'ha descrit que poden interaccionar amb PI4,5P<sub>2</sub>, de manera que zones enriquides en aquesta molècula tenen la capacitat de reclutar annexines (Rescher i col., 2004). A més, hi ha evidències que indiquen que aquestes proteïnes tenen a la vegada la capacitat de generar zones enriquides de PI4,5P<sub>2</sub> (Gokhale i col. 2005). Les annexines de les plantes són estructuralment molt semblants a les dels animals i tenen en comú la capacitat d'unir-se a la membrana depenent de calci (Clark i Roux 1995; Delmer i Potikha 1997; Clark GB 2001). En les cèl·lules vegetals, les annexines han estat localitzades majoritàriament en la perifèria de cèl·lules altament secretores i s'ha proposat que jugarien un paper important en processos de secreció relacionats amb la síntesi de la membrana plasmàtica i en la formació de la paret cel·lular (Clark i col. 2001). S'han descrit però altres funcions de les annexines en les cèl·lules vegetals. Així, s'ha demostrat activitats fosfodiesterasa nucleotídica en annexines de blat de moro, tomàquet, pebrot i cotó (McClung i col., 1994; Calvert i col., 1996; Lim i col., 1998; Shin i Brown 1999; Hofmann i col., 2000). Altres activitats atribuïdes a les annexines vegetals són la activitat peroxidasa i la seva participació en la biogènesi vacuolar (Gidrol i col., 1996). Les annexines també s'han identificat en el nucli, on podrien participar en la replicació del DNA (Clark i col., 1998; Kovács i col., 1998). Així mateix, també s'ha descrit que poden actuar com a canals de calci (Clark i col. 2001). És interessant destacar que l'expressió de les annexines incrementa en resposta a l'estrés i l'ABA en civada i *Arabidopsis* (Kovács i col. 1998; Lee i col., 2004) i en la maduració dels fruits de maduixa i pebrot (Wilkinson i col., 1995; Proust i col., 1996).

Els resultats obtinguts de la caracterització dels mutants *rif30* i *rif45* relacionen la senyalització per fosfatidilinositols i/o calci amb l'activació de la ruta del MEP. Si bé s'han associat múltiples funcions a les annexines, és raonable pensar que aquestes puguin estar també relacionades amb el PI4,5P<sub>2</sub> i amb el calci, i participin d'aquesta manera en la senyalització que activi els mecanismes que confereixen resistència a la FSM en el mutant *rif32*. En aquest cas, la annexina 2, localitzada en els tilacoides, es troba sobreexpressada de manera que podria estar creant zones enriquides en PI4,5P<sub>2</sub> en els cloroplastes, la qual

## DISCUSSIÓ

cosa podria activar la ruta del MEP de forma més o menys directa. Alhora, també es podria pensar que la seva activitat com a canal de calci permetés incrementar els nivells d'aquest compost, i que fos la senyalització ulterior la que activés la ruta del MEP. És difícil explicar però la raó per la qual en aquest mutant no incrementen els nivells de la DXR sinó els de la DXS.

### **Mutants *rif* amb nivells elevats dels transcrits DXR i DXS**

Un dels tipus de mutants especialment interessants eren aquells que poguessin desenvolupar resistència a la FSM com a conseqüència de l'activació transcripcional del gen de la DXR o del conjunt de gens de la via del MEP. Aquests mutants podrien estar relacionats tant amb al guany de funció d'un activador transcripcional com amb l'inactivació d'un repressor transcripcional. L'identificació d'elements reguladors de la transcripció amb capacitat d'induir l'expressió dels gens de la ruta del MEP suposaria un avenç realment important en aquest camp, doncs es tractaria del primers que es descriuen com a tals. En aquesta tesi s'han identificat i caracteritzat dos mutants, *rif34* i *rif39*, amb nivells significativament elevats del transcrits DXS i DXR (Resultats, 3.10.3 Fig 46).

En el mutant *rif34* la resistència a la FSM està associada a l'activació del gen At4g21750, que codifica per una proteïna homeobox anomenada ATML1 (*Arabidopsis thaliana* meristem L1 layer) (Lu i col. 1996) (Resultats, 3.10.4.1 Fig 57). Els gens homeobox són gens reguladors que especifiquen el pla morfogènic i controlen el desenvolupament de molts organismes eucariotes. En les plantes és durant l'embriogènesi que s'estableix el pla apical-basal i es generen els tres sistemes tissulars primaris. Aquesta propietat embriogènica, també es troba posteriorment en el meristem apical (Lu i col. 1996). Els gens homeobox controlen les decisions que guiaràn l'especificació cel·lular i el patró de formació, i posseeixen una seqüència comuna de 180 pb, l'homeobox, que conté una regió d'unió al DNA. *ATML1* s'expressa específicament a la capa L1 del meristem des d'etapes molt primerenques i durant el desenvolupament de la tija. S'ha suggerit que *ATML1* està implicat en la regulació de la formació del patró apical-basal i del radial (Lu i col. 1996).

*ATML1* pertany concretament a la família de gens *class IV homeodomain-Leucine zipper*, on s'hi inclouen 16 gens. Entre ells es troben *GLABRA2*, *ANTHOCYANINLESS2*, *FWA*, *ATML1*, *PDF2* i els 12 *HDG* (de *HDG1* a *HDG12*) (Nakamura i col., 2006). S'ha demostrat que la funció d'*ATML1* és redundant amb la proteïna *PDF2* (*Protodermal Factor2*). Així, mentre que els mutants *atml1* i *pdf2*, deficientes per cada una d'aquestes proteïnes, es desenvolupen normalment, el doble mutant mostra defectes severes en la diferenciació de les cèl·lules epidèrmiques apicals (Abe i col. 2003). A més, les plantes sobreexpressores de *PDF2* mostren un fenotip de floració tardana, tal com s'ha observat també en el mutant *rif34*. Tanmateix, els dobles mutants *atml1-hdg3* i *pdf2-hdg3*, són defectius en el desenvolupament dels cotiledons, indicant també una redundància funcional en diversos aspectes de la diferenciació cel·lular entre altres membres de la família (Nakamura i col. 2006).

Tal com s'ha descrit en la caracterització bioquímica de *rif34* (Resultats, 3.10.4.1 Fig 55), l'activació de l'expressió d'*ATML1* resulta un un increment d'unes 3 vegades en els nivells de proteïna DXR en relació amb la varietat parental Col2 i que pot arribar a ser de fins a 7 vegades després del bloqueig amb FSM. Aquestes dades es podrien correlacionar amb els nivells basals de transcrit, que estan lleugerament augmentats (x1.4 vegades) i que després del tractament amb FSM augmenten fins a 1,6 vegades. Pel que fa a DXS, *rif34* mostra uns nivells de proteïna augmentats (1,9 vegades respecte de Col2), i que després del tractament amb FSM poden arribar a incrementar casi 4 vegades. En aquest mutant, els nivells basals de transcrit DXS són també més elevats (1,4 vegades respecte de Col2) i sorprenentment, no es modifiquen després del tractament amb FSM. L'increment en els nivells de proteïna DXS es poden correlacionar amb la resistència a la CLM observada en aquest mutant. Tot sembla indicar per tant que l'activació del factor de transcripció ATML1 promou l'expressió del gens *DXR* i *DXS*. Malgrat tot, són necessaris més estudis per tal de definir si ATML1 activa de forma general la ruta del MEP o si només actúa sobre l'expressió de la DXR i la DXS.

L'anàlisi bioquímic del mutant *rif39* (Resultats, 3.10.4.2 Fig 58) ha mostrat uns nivells més elevats de proteïna DXR que Col2 (1,6 vegades) que es correlacionen amb un augment de 1,4 vegades en els nivells del transcrit corresponent. Els nivells de proteïna DXR incrementen fins a 5 vegades en resposta al tractament amb FSM, tot i que en aquest cas no es produeix un augment paral·lel en els nivells de transcrit. També s'observa un increment en els nivells basals de proteïna i de transcrit DXS que es poden correlacionar amb la resistència a la CLM observada en aquest mutant. Sorprenentment, els nivells de proteïna DXS cauen fins aproximadament la meitat dels valors basals després del tractament amb FSM.

En aquest cas, la resistència a la FSM es deguda a l'activació del gen At5g51820, que codifica per una fosfoglucomutasa (PGM) plastídica (Periappuram i col. 2000) (Resultats, 3.10.4.2 Fig 60). La PGM és un enzim que catalitza la interconversió entre la glucosa 6-fosfat i la glucosa 1-fosfat. En les plantes, existeixen dues PGMs, una citosòlica i l'altra plastídica (Mühlbach i Schnarrenberger 1978). Ambdues necessiten glucosa 1,6-bisfosfat (Glc-1,6-bisP) com a cofactor i s'ha descrit que són fosfoproteïnes *in vivo* (Salvucci i col., 1990). La isoforma citosòlica està involucrada en el catabolisme de la sacarosa per tal de subministrar intermediaris de la glucòlisi i substrats per a la síntesi de constituents cel·lulars (Manjunath i col., 1998). La PGM plastídica és essencial per a la síntesi de midó i així emmagatzemar productes fotosintètics en les fulles durant el dia. La PGM plastídica també juga un paper essencial en la degradació del midó assimilat (Hattenbach i Heineke 1999). A més, la PGM plastídica té un impacte significatiu en el diposit de productes d'emmagatzematge (midó i àcids grassos) en les llavors (Periappuram i col. 2000). Estudis en cloroplastes d'espinaç han mostrat que l'activitat PGM podria estar regulada per llum, el pH de l'estroma i la concentració de Glc-1,6-bisP (Sicher 1989). Si bé la naturalesa reversible de la reacció catalitzada per la PGM podria indicar que no està involucrada en el control metabòlic, s'ha demostrat que l'equilibri de la reacció pot ser modificat en determinades circumstàncies, de forma que es considera que la PGM és crucial en la distribució del carboni entre la síntesi del midó i la oxidació dels carbohidrats en els teixits heterotròfics (Tetlow i col., 1997). La PGM plastídica està involucrada en casi bé totes les fases del creixement i desenvolupament de la planta, incloent

## DISCUSSIÓ

l'acoblament del cicle de Calvin en teixits biosintètics, la canalització de carbohidrats en els teixits d'emmagatzematge, i contribueix també en la sedimentació plastídica en les respostes gravitròpiques a les arrels (Vitha i col., 1998). El mutant d'*Arabidopsis pgm1*, defectiu en la PGM plastídica, presenta nivells baixos de midó i àcids grassos en les llavors (Periappuram i col. 2000) i altes concentracions de glucosa, sacarosa, rafinosa i glucosa 6-fosfat en les fulles (Antonio i col., 2008).

En l'actualitat no s'ha descrit cap treball que descriu el comportament de plantes d'*Arabidopsis* amb una activitat PGM incrementada, tal com succeeix en el mutant *rif39*. Pel que fa a la ruta del MEP, s'observa un comportament molt diferenciat entre DXR i DXS si les plantes són cultivades en condicions normals o bé en presència de FSM. Així, en condicions normals de creixement s'observa una activació transcripcional de DXR i DXS que podria venir donada per una possible activitat senyalitzadora de la PGM per sí mateixa, o bé per la senyalització promoguda pel metabolisme glucídic que aquest enzim controla i ja comentada anteriorment. Per altra banda, aquest mutant posseeix una capacitat de reacció molt elevada davant del bloqueig de la ruta del MEP i per tant requereix d'una major disponibilitat de substrats. En aquest sentit, una major activitat PGM podria repercutir en una major acumulació de midó en les llavors, que al germinar en presència de FSM, reaccionarien senyalitzant una deficiència d'isoprenoides plastídics a la qual la planta reaccionaria incrementant els nivells de proteïna DXR. Aquesta resposta podria ser més intensa en el cas d'estar acompanyada d'un major aport de piruvat i GAP derivat d'una elevada disponibilitat de midó i de activació de la PGM que ara desplaçaria l'equilibri de la reacció cap a la producció de Glc-6-P, un precursor de piruvat i GAP. És possible que l'augment en els nivells de transcrit *DXR* estigui potenciat per una major disponibilitat dels precursors biosintètics. Així mateix, i tal com s'ha hipotetitzat pel mutant *rif27*, un augment en els nivells de sucres disponibles podria també desencadenar una resposta d'activació de la ruta del MEP.

### **Mutants *rif* afectats en altres processos cel·lulars**

En aquest grup s'inclouen els mutants *rif21*, *rif24*, *rif28*, *rif35*, *rif36* i *rif44*. Si bé en el cas de *rif35* i *rif36* els nivells basals i/o induïbles de DXR i DXS podrien explicar la resistència a la FSM, els altres mutants es caracteritzen per tenir aquests nivells semblants als de la soca parental Col2 o amb increments poc significatius. Tot indicaria per tant que la resistència a la FSM hauria de venir donada per mecanismes que no afectarien els nivells de la proteïna diana. En aquests casos es podria pensar en mecanismes relacionats amb la modulació de l'activitat de la DXS o la DXR, amb un augment de l'intercanvi d'intermediaris entre la via del MVA i la del MEP o amb una menor capacitat de captació de la FSM o en la seva inactivació.

En el mutant *rif21* la resistència a FSM és deguda a la pèrdua de funció del gen At5g64940 que codifica per una proteïna cloroplastídica que en un principi s'havia inclòs com a membre de la família dels transportadors ABC (Sánchez-Fernández i col. 2001) (Resultats, 3.10.5 Fig 63). Aquest mutant va despertar un gran interès pels nostres objectius ja que *a priori* podia correspondre a un hipotètic

transportador cloroplastídic involucrat amb l'intercanvi de prenifosfats entre el citosol i el cloroplast. Malgrat tot, resultava difícil d'explicar com la pèrdua de funció d'un transportador podria induir la resistència a la FSM, ja que el més raonable era pensar en una mutació de guany de funció.

Per tal d'aprofundir més en l'estudi d'aquest hipotètic transportador es van generar plantes transgèniques dissenyades per a sobreexpressar aquesta proteïna. Els resultats obtinguts van mostrar que les plantes de les línies transgèniques obtingudes eren també resistents a la FSM (Resultats, 3.10.5 Fig 65). Si bé aquest resultat donava suport a la teoria que aquest hipotètic transportador estigués involucrat en l'intercanvi d'IPP i/o prenildifosfats, afegia la dificultat d'explicar com tant la pèrdua de funció com l'augment dels seus nivells podien conferir resistència a la FSM.

Amb l'objectiu de confirmar que aquest hipotètic translocador estava localitzat en els cloroplastes es van realitzar estudis de localització mitjançant microscopia confocal. Els resultats obtinguts van mostrar sense cap tipus de dubte la localització plastídica d'aquesta proteïna (Resultats, 3.10.5 Fig 64). A més, treballs d'altres laboratoris, algun publicat recentment, no només han validat aquests resultats sino que apunten a més a una localització de la proteïna en la membrana interna dels cloroplastes (Koo i Ohlrogge 2002; Jasinski i col. 2008).

Es important ressaltar que estudis recents han demostrat que aquesta proteïna no és en realitat un transportador ABC sinó una proteïna que ha estat anomenada AtOSA1 (*A. thaliana oxidative stress-related Abc1-like protein*) i que està relacionada amb la resposta a l'estrés oxidatiu i per cadmi (Jasinski i col. 2008). S'ha demostrat que la transcripció d'AtOSA1 respòn a la presència de cadmi, però d'una forma complexa, sent regulada negativament a baixes concentracions de cadmi (0,2  $\mu$ M) i positivament a concentracions més elevades (1  $\mu$ M). Mutants d'inserció de T-DNA en el gen AtOSA1, anomenats *atosal-1* i *atosal-2*, també van mostrar comportaments inesperats. Així, al ser tractats amb cadmi desenvolupen arrels més llargues i acumulen menys cadmi, suggerint una menor captació d'aquest compost. Per altra part, en les plantes tractades les fulles mostren un fenotip cloròtic que no apareix en les plantes control. Aquests mutants també mostren una menor tolerància a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a la llum. Els nivells de clorofil·les i carotenoides són més elevats que en la varietat parental silvestre, malgrat que en condicions d'alta irradiància mostren un fenotip pàlid que es correlaciona amb una baixada en els nivells d'aquests pigments. Cal indicar que malgrat que no s'ha establert l'activitat d'aquesta proteïna s'especula que pugui tenir activitat proteïna quinasa (Jasinski i col. 2008).

La resistència a la FSM que confereix tant l'activació com el dèficit d'AtOSA1 podria correlacionar-se amb el complex comportament que mostra aquesta proteïna en resposta a l'estrès per cadmi. A més, també s'ha posat de manifest la relació entre AtOSA1 i la síntesi de pigments. Malgrat que es desconeix a través de quin mecanisme AtOSA1 acabaria afectant la ruta del MEP en el mutant *rif21*, es considera rellevant la relació que, una vegada més, es pot establir entre l'activació de la ruta del MEP i la resposta als processos d'estrés.



## DISCUSSIÓ

En el mutant *rif24* el T-DNA promou l'activació del gen At5g41250 que codifica per una proteïna anotada com exostosina i localitzada en la membrana plasmàtica (Resultats, 3.10.6.1 Fig 76). Cal ressaltar que aquesta anotació reflecteix únicament la seva similitud respecte a exostosines animals. De fet, no s'ha caracteritzat cap proteïna d'aquest tipus en les plantes. En els animals, les exostosines són unes glicosiltransferases que catalitzen la síntesi d'heparàn sulfat, un glucosaminoglicà amb diversos rols en la diferenciació i el desenvolupament cel·lular (Madson i col., 2003). En base a aquests coneixements, no es pot proposar cap mecanisme raonable per explicar el mecanisme subjacent a la resistència a la FSM en el mutant *rif24*.

El T-DNA identificat en el mutant *rif28* es troba inserit en el gen At2g07180 (Resultats, 3.10.6.1 Fig 77). Aquest gen codifica per una proteïna amb possible activitat quinasa ja que mostra alta similitud amb la proteïna APK1 (*Arabidopsis Protein Kinase 1*) que presenta activitat serina-treonina quinasa i tirosina quinasa (Pierre i col., 2007). La proteïna quinasa defectiva en el mutant *rif28* mostra un motiu de miristoilació en la regió N-terminal, fet pel qual podria correspondre a una proteïna localitzada en la membrana plasmàtica (Pierre i col. 2007). L'expressió del gen At2g07180 sembla estar restringida al pol·len (<https://www.genevestigator.com>).

El mutant *rif35* presenta uns nivells de proteïna DXR 1,7 vegades superiors als de Col2 i que augmenten fins a 3 vegades després del tractament amb FSM. L'enzim DXS mostra un comportament semblant que podria explicar la resistència d'aquest mutant a la CLM. La resistència a la FSM en el mutant *rif35* és conseqüència de l'activació del gen At1g73470, que codifica per una proteïna plastídica de funció desconeguda (Resultats, 3.10.6.1 Fig 73). El mutant *rif35* mostra un baix contingut de clorofil·les i carotenoides.

El mutant *rif36* presenta uns nivells de proteïna DXR que doblen als del parental Col2, i aquests nivells es mantenen estables després del tractament amb FSM (Resultats, 3.10.6 Fig 69). La resistència a la FSM la confereix l'activació del gen *EMB3007* (*Embryo Defective 3007*) (At5g18820) (Resultats, 3.10.6.1 Fig 79), la mutació del qual provoca un desenvolupament defectiu de l'embrió. El gen *EMB3007* codifica per una proteïna que es localitza en els cloroplastes, amb dominis d'unió a ATP i amb activitat xaperonina. Alhora, aquest gen s'expressa en resposta a l'estrés per calor i per sequera, però sobretot per la combinació d'ambdós tipus d'estrés (Rizhsky i col. 2004), tal i com ja s'ha descrit per la proteïna HSP15.7-CI en el mutant *rif33*. L'expressió del gen *EMB3007* també s'activa en resposta al tractament amb citoquinines, hormones relacionades amb diversos processos cel·lulars com la divisió cel·lular, la proliferació cel·lular, la diferenciació de l'arrel i de les fulles, la biogènesi dels cloroplasts i la inhibició de la senescència foliar (Lee i col., 2007). Seria interessant per tant estudiar si aquesta xaperonina cloroplàstica tindria la capacitat de regular la proteïna DXR, evitant-ne per exemple la seva degradació.

En el mutant *rif44*, els nivells de proteïna DXR es troben lleugerament elevats respecte del parental Col2, tant en condicions normals de creixement com en resposta al tractament amb FSM. Pel que respecta a la DXS, els nivells de proteïna i transcrit són semblants als de Col2 (Resultats, 3.10.6. Fig 70). En aquest cas la resistència a la FSM és deguda a l'activació del gen At2g18080, anomenat *EDA2*

(*Embryo Sac Development Arrest 2*) (Resultats, 3.10.6.1 Fig 80). Els mutants defectius en aquest gen mostren un bloqueig en el desenvolupament del gametòfit (Pagnussat i col. 2005). Aquest gen s'expressa principalment en pol·len (Becker i col., 2003) i codificaria per una proteïna amb activitat serin proteasa. Les serin proteases són enzims proteolítics involucrats en un gran nombre de processos reguladors. Catalitzen la hidròlisi d'enllaços peptídics específics en els seus substrats i aquesta activitat depèn d'un conjunt d'aminoàcids en el centre actiu de l'enzim, un dels quals sempre és una serina. En les plantes, les serin proteases s'han relacionat amb diversos processos implicats en la regulació del desenvolupament i de respostes de defensa (Tripathi i Sowdhamini 2006). Es podria pensar, doncs, que EDA2 podria estar involucrada en la degradació d'algun factor inhibidor de l'enzim DXR. Així mateix, la resistència a la MEV que mostra *rif44* podria indicar un efecte semblant pel que fa a l'enzim HMGR.

### **Alteracions fenotípiques dels mutants *rif***

Del 16 mutants *rif* seleccionats, 13 mostren alteracions en el seu creixement i desenvolupament. En alguns casos, els fenotips observats permeten relacionar-los amb possibles anomalies bioquímiques o cel·lulars. Així, *rif26*, *rif28*, *rif35* i *rif36* mostren fenotips pàlids en diferents etapes del seu desenvolupament (Figures 43, 72, 73 i 74, respectivament). Mentre que *rif35* mostra un aspecte groguenc durant totes les etapes del desenvolupament, *rif26* ho és principalment en l'estadi de cotiledons, *rif36* presenta tan sols les fulles joves de la roseta més pàlides, i *rif28* mostra una coloració més clara en la zona internerval de les fulles de la roseta. En aquests casos, els fenotips observats podrien estar relacionats amb alteracions cloroplastídiques, com succeeix en el mutant *rif1*, mutant afectat en la proteasa plastídica Clp (Flores-Perez i col. 2008). Seria convenient per tant utilitzar tècniques de microscopia electrònica per tal de confirmar si els mutants esmentats estan afectats en el desenvolupament dels cloroplastes.

Cal remarcar però que l'alteració en el correcte desenvolupament dels plàstids no repercuteix en un augment de les proteïnes de la ruta del MEP tal com s'ha descrit en estudis previs. Així, si bé els mutants afectats en la ruta del MEP poden presentar alteracions plastídiques com a conseqüència d'un bloqueig de la ruta que comporta un increment de les proteïnes d'aquesta, altres mutants que estarien afectats també en el desenvolupament plastídic per l'alteració d'altres processos, no mostren aquest increment (Guevara-Garcia i col. 2005).

Altres mutants *rif* mostren alteracions en el procés de floració. Així, *rif34* i *rif39*, els dos mutants que presenten un increment en els nivells dels mRNAs dels gens *DXR* i *DXS*, mostren un retard en la floració, suggerint l'afectació d'algun procés comú (Figures 56 i 59, respectivament). Tenint en compte els gens afectats en aquests mutants es podria hipotetitzar un procés d'activació transcripcional a través d'un mateix mecanisme que inclouria la fosfoglucomutasa plastídica (activada a *rif39*) i el factor de transcripció *ATML2* (activat a *rif34*). Així doncs, es podria considerar que l'activació de la fosfoglucomutasa podria desencadenar un senyal, possiblement mediat per sucres, que resultés en un augment dels nivells de transcrit *DXR* i *DXS* a través de l'activació de l'expressió d'*ATML2*. És

## DISCUSSIÓ

interessant remarcar que el gen *FWA*, un gen homeobox de la mateixa família que *ATML2*, s'ha relacionat amb la floració tardana en *Arabidopsis* (Abe i col. 2003). En contrast amb *rif34* i *rif39*, els mutants *rif24*, *rif28*, *rif30*, *rif44* i *rif45* mostren floració avançada (Figures 71, 72, 49, 75 i 48, respectivament). Aquest fenotip està altament accentuat a *rif44* i *rif45*, on l'aparició de les tiges es produeix abans del desenvolupament complet de la roseta. En relació amb productes finals derivats de la ruta del MEP es podria hipotetitzar que aquests mutants tinguéssin nivells elevats de gibberel·lines, hormones que indueixen un avançament del temps de floració (Razem i col., 2006).

Els mutants que mostren altres alteracions fenotípiques son *rif24*, *rif27*, *rif32*, *rif33* i *rif34* (Figures 71, 31, 50, 34 i 56, respectivament). Tots ells estan afectats en el desenvolupament de la roseta i/o en la morfologia de les fulles. Malgrat tot, aquests fenotips no permeten establir cap relació amb els processos implicats amb la resistència a la FSM en cadascun d'aquests mutants ni amb altres processos metabòlics o cel·lulars.

### **Possible intercanvi d'intermediaris entre la ruta del MEP i la ruta del MVA en els mutants *rif***

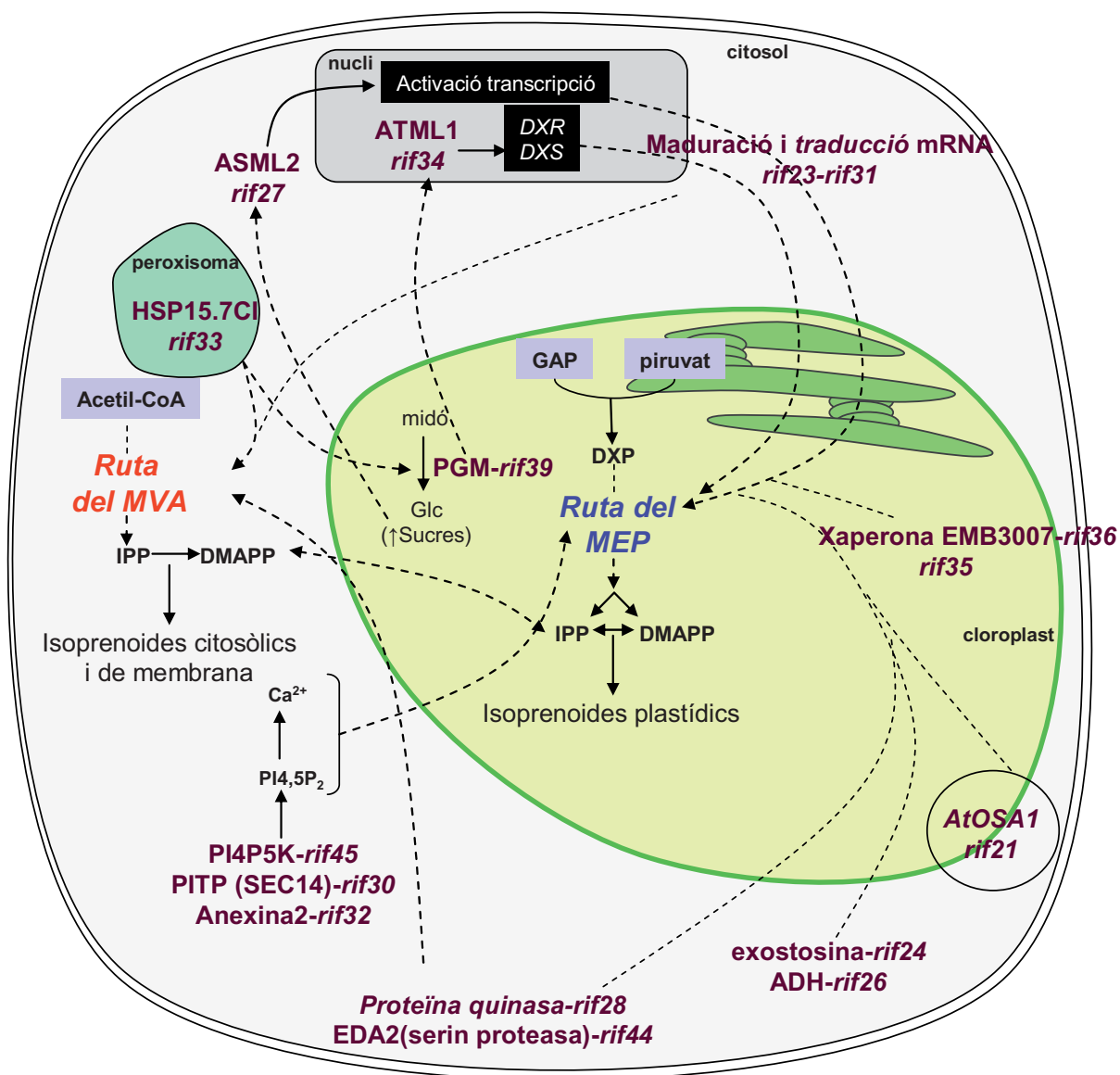
S'ha observat que 6 dels mutants *rif* seleccionats (*rif23*, *rif31*, *rif26*, *rif28*, *rif33* i *rif44*) mostren també resistència al bloqueig de la ruta del MVA amb MEV (Resultats, 3.6). Es podria pensar que en aquests mutants la ruta del MVA podria estar activada (almenys a nivell de l'HMGR, la diana de la MEV) o bé tenir incrementat l'intercanvi d'IPP (o altres prenifosfats) entre els plàstids i el citosol. En aquest últim cas resultaria de gran interès la identificació del mecanisme pel qual es produeix aquest intercanvi.

El mutant *rif33* mostra alts nivells de proteïna DXR. Per tant, es considera que la resistència a la FSM es deguda a aquest fet i no a una activació del mecanisme que promou l'intercanvi d'intermediaris entre la ruta del MEP i del MVA. A més, s'ha demostrat que les plantes transgèniques sobreexpresores de DXR no poden complementar el bloqueig de la ruta del MVA induït per la MEV (Carretero-Paulet 2003) i, per tant, l'increment de DXR observat a *rif33* difícilment explicaria la resistència a la MEV d'aquest mutant. No es pot descartar però la possibilitat que el mecanisme alterat a *rif33* conduïssin per una banda a l'increment dels nivells de DXR i, per una altra, afavorís l'intercanvi de precursors dels plàstids al citosol. L'anàlisi dels nivells de proteïna i activitat HMGR ajudarien a dilucidar el mecanisme pel qual el mutant *rif33* és resistent a la MEV.

Pel que fa als mutants *rif23*, *rif26* i *rif31*, s'observa en tots ells un alt increment dels nivells de proteïna DXR en resposta al tractament amb FSM. No s'ha estudiat si aquests mutants també incrementen la proteïna DXR quan es bloqueja la ruta del MVA amb MEV, la qual cosa, si es confirmés, podria explicar la resistència a la MEV que presenten. Tal com s'ha descrit anteriorment pel mutant *rif33*, seria important analitzar els nivells de proteïna HMGR en aquests mutants, així com també en els mutants *rif28* i *rif44*, que presenten uns nivells de proteïna DXR lleugerament incrementats.

### **La biosíntesi d'isoprenoides a *Arabidopsis* està modulada per múltiples processos cel·lulars**

Finalment, i a forma de conclusió general, es vol indicar que els resultats derivats de l'anàlisi bioquímic, genètic i fenotípic dels mutants *rif* identificats en aquest treball ha permès posar de manifest nous processos metabòlics i cel·lulars que afecten la funcionalitat de les rutes de síntesis d'IPP i DMAPP, malgrat que la majoria d'ells no mostren una connexió evident amb la biosíntesis d'isoprenoides (Figura 1). Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren l'existència d'una gran varietat de processos no relacionats amb les rutes del MEP i del MVA que afecten la homeostasi de la biosíntesi d'isoprenoides en les plantes.



**Figura 1.** Representació esquemàtica dels mecanismes pels quals els mutants *rif* identificats en aquest treball presenten resistència a la FSM. Les proteïnes associades amb guany de funció estan indicades amb lletra normal, i les de pèrdua de funció en cursiva.

# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

- Estudis de complementació del mutant *chs5* d'*Arabidopsis* (defectiu en l'activitat de l'enzim DXS1) han confirmat que la proteïna DXS2 d'*Arabidopsis* no mostra activitat DXS *in vivo*. Tampoc s'ha pogut detectar activitat DXS *in vitro* de la proteïna DXS2 expressada a *E. coli*. El conjunt de dades de que es disposa en l'actualitat indiquen que la proteïna DXS2 no té activitat DXS. A més, l'anàlisi d'un mutant d'*Arabidopsis* defectiu en la proteïna DXS2 ha mostrat que aquesta no és essencial pel creixement i desenvolupament de la planta.
- La DX és tòxica a *Arabidopsis* quan és administrada exògenament en el medi de creixement a concentracions superiors a 1 mM. Per exercir l'efecte tòxic la DX ha de ser fosforilada a DX5P en el citosol per acció de l'enzim xiluloquinasa. La toxicitat de la DX5P té lloc al citosol i no sembla afectar la biosíntesi i/o acumulació d'isoprenoides plastídics. La presència de sacarosa en el medi de creixement rescata a la planta de l'efecte tòxic de la DX.
- La DX inhibeix també el creixement del bacteri *E. coli* en medi mínim a partir d'una concentració de 10 mM. L'efecte tòxic de la DX (degut possiblement també a la seva conversió en DX5P) pot ser rescatat per la presència de piruvat en el medi de cultiu.
- Tant en *Arabidopsis* com en *E. coli*, la toxicitat a la DX sembla ser deguda a la inhibició per part de la DX5P (o d'algun metabolit derivat) d'una ruta essencial relacionada amb el metabolisme dels carbohidrats.
- La sobreexpressió de l'enzim DXR en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* resulta en un augment del contingut de clorofil·les i carotenoides, indicant que aquest enzim té un paper regulador en la ruta del MEP.
- S'han seleccionat 16 nous mutants *rif* (resistents a la inhibició per fosmidomicina) a partir de la col·lecció Scheible-Sommerville d'*activation tagging* que mostren una gran varietat en el seu grau de resistència a la FSM.
- Dels 16 mutants *rif* seleccionats, 4 són també resistents a la inhibició de la DXS per clomazona (mutants *rif32*, *rif34*, *rif35* i *rif39*) i 6 a la inhibició de l'enzim HMGR per mevinolina (mutants *rif23*, *rif26*, *rif28*, *rif33* i *rif44*). Cap dels mutants identificats ha mostrat resistència als tres inhibidors.
- En la majoria dels mutants *rif* seleccionats els nivells de clorofil·les i carotenoides són similars als de la varietat silvestre (Col2). En els mutants *rif26* i *rif35*, on els nivells d'aquests pigments són significativament més baixos, s'observa un fenotip pàlid en diferents etapes del seu desenvolupament.



## CONCLUSIONS

- En alguns dels mutants *rif* seleccionats s'han observat diverses alteracions en el desenvolupament que afecten principalment a la morfologia de les fulles (mutants *rif27*, *rif28*, *rif30*, *rif32*, *rif33*, *rif34* i *rif45*) i al temps de floració (mutants *rif24*, *rif28*, *rif30*, *rif32*, *rif34*, *rif39*, *rif44* i *rif45*).
- En les plàntules de la varietat silvestre d'*Arabidopsis* Col2, el bloqueig de la ruta del MEP amb FSM indueix un increment significatiu del nivell de les proteïnes DXS i DXR a través d'un mecanisme regulat principalment a nivell postranscripcional.
- Els mutants *rif27* i *rif33* presenten nivells basals elevats de la proteïna DXR (més de tres vegades que la varietat silvestre Col2) derivats de l'activació de mecanismes que operarien a nivell postranscripcional. Malgrat que el gen implicat en la resistència a la FSM en el mutant *rif27* no ha estat identificat amb certesa, és molt possible que el fenotip observat sigui conseqüència de l'activació del gen At3g12890, que codifica pel factor de transcripció ASML2. En el cas del mutant *rif33* la resistència a la FSM és deguda a l'activació del gen At5g37670, que codifica la *Small Heat Shock Protein* HSP15.7CI de localització peroxisomal. És interessant ressaltar que les plàntules de la varietat silvestre Col3 desenvolupen resistència a la FSM després de ser sotmeses a estrès tèrmic.
- Els mutants *rif23*, *rif26*, i *rif31* mostren una alta capacitat d'inducció de la proteïna DXR en resposta al tractament amb FSM, que incrementa entre 6-7 vegades respecte dels nivells basals observats en la varietat silvestre Col2. Aquest fort augment dels nivells de la proteïna DXR es degut a mecanismes postranscripcionals derivats de la sobreexpressió dels gens At3g23325, que codifica per un factor d'*splicing* en el mutant *rif23*, i At1g32780, que codifica per una alcohol deshidrogenasa en el mutant *rif26*. En el mutant *rif31* la inducció de la DXR està relacionada amb la pèrdua de funció del gen At1g62859 que codifica per un factor alliberador de la traducció.
- Els mutants *rif30*, *rif32* i *rif45* són resistents a la FSM com a conseqüència de l'activació de gens relacionats amb la senyalització per fosfatidilinositols. Els gens identificats són: At4g36640 que codifica per una proteïna transportadora de fosfoglicèrids en el mutant *rif30*, At5g65020, que codifica per una annexina 2 en el mutant *rif32*, i At1g21920, que codifica per una fosfatidilinositol 4-fosfat 5-quinasa en el mutant *rif45*.
- Els mutant *rif34* i *rif39* presenten nivells basals elevats de les proteïnes DXR i DXS que es correlacionen amb un increment dels transcrits corresponents. Mentre que el mutant *rif34* presenta una activació del gen At4g21750 que codifica pel factor de transcripció ATML1, el mutant *rif39* mostra una activació del gen At5g51820 que codifica per una fosfoglucmutasa cloroplastídica.

- El fet que els nivells de DXR detectats en els mutants *rif21*, *rif24*, *rif28* i *rif44* siguin semblants als de la varietat parental Col2 suggereixen que la resistència a la FSM vindria donada per mecanismes que no afectarien als nivells de la proteïna diana. La resistència a la FSM en aquests mutants ve conferida per l'activació del gen At5g64940, que codifica per la proteïna AtOSA1 (una possible proteïna quinasa cloroplastídica) a *rif21*, At5g42250, que codifica per una possible exostosina a *rif24*, i At2g18080, que codifica per la peptidasa de tipus serina EDA2 a *rif44*. La pèrdua de funció del gen At2g07180, que codifica per una proteïna quinasa amb domini N-terminal de miristoilació, promou la resistència a FSM en el mutant *rif28*.
- Els mutants *rif35* i *rif36* presenten nivells basals i/o induïbles de proteïna DXR lleugerament elevats respecte del parental Col2. La resistència a la FSM en aquests mutants està associada a l'activació del gen At1g73470, que codifica per una proteïna cloroplastídica de funció desconeguda a *rif35*, i del gen At5g18820, que codifica per la xaperona cloroplastídica EMB3007 a *rif36*.
- En el seu conjunt, els resultats obtinguts indicarien que la homeostàsi de la biosíntesi d'isoprenoides a *Arabidopsis*, i possiblement també en altres plantes, estaria regulada per una gran diversitat de processos cel·lulars no directament relacionats amb les vies del MEP i del MVA.



# MATERIALS I MÈTODES



# 1 Material biològic

## 1.1 Material vegetal

- *Arabidopsis thaliana* ecotip Columbia-3 (Col3). Es tracta de la varietat utilitzada en el projecte de seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*.
- *Arabidopsis thaliana* (Heyn) ecotip Columbia-2 (Col2).
- *Arabidopsis thaliana* (Heyn) ecotip Columbia-0 (Col0).
- *Arabidopsis thaliana* (Heyn) ecotip Wassilevskija (WS).
- Mutant *chs5* d'*Arabidopsis thaliana* (Araki i col. 2000) (*Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University*. Número de stock: CS 8004).
- Línies transgèniques:
  - 35S::*DXS* (en fons genètic Col3) (Carretero-Paulet 2003).
  - 35S::*DXR* (en fons genètic Col-3) (Carretero-Paulet 2003).
- Col·lecció de mutants Scheible i Somerville d'*activation tagging*. Mutants d'*Arabidopsis* Col2 que posseeixen un T-DNA inserit a l'atzar en el seu genoma. El T-DNA prové del vector pSKI015 amb el gen *BAR* de resistència a BASTA. Ha estat generada en els laboratoris dels Drs. Chris Somerville (Department of Plant Biology, The Carnegie Institution of Washington) i Wolf Scheible (System Regulation Group, Department 2: Metabolic Networks, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie). Distribuïda pel NASC.
- Mutants d'*Arabidopsis* de la col·lecció del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso i col., 2003). Mutants d'inserció d'un T-DNA generats en plantes d'*Arabidopsis* varietat Col0 en el laboratori del Dr. Joseph R. Ecker (Plant Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies). El T-DNA prové del vector pROK2. Els stocks corresponen a la generació T3 segregant d'una línia mutant amb la regió flanquejant al T-DNA seqüenciada. Distribuïts pel NASC.
  - Salk\_112762 (At3g21500) mutant *dxs2-1*
  - Salk\_079018 (At5g49650) mutant *Atxk-2* (Hemmerlin i col. 2006)
  - Salk\_129048 (At5g60790) mutant *rif30.1-1*
  - Salk\_045739 (At5g64940) mutant *rif21-1*
  - Salk\_135661 (At2g07180) mutant *rif28-1*

## MATERIALS I MÈTODES

- Mutants d'*Arabidopsis* de la col·lecció de l'INRA (Versalles). Són mutants d'inserció de T-DNA de plantes d'*Arabidopsis* varietat Wassilevskija (WS-4) generades al laboratori de Génétique et amélioration des plantes a l'INRA-Versalles. El T-DNA prové del vector pGKB5, i la regió genòmica flanquejant el T-DNA ha estat seqüenciada. Distribuïts per l'INRA-Versalles i pel NASC.
  - FLAG\_593f05 (At5g17630) mutant *Atxpt-1*
- Mutants d'*Arabidopsis* de la col·lecció de mutants Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library (SAIL). Són mutants d'inserció de T-DNA de plantes d'*Arabidopsis* varietat Columbia en els laboratoris del Dr. Alberto Martinez (Jealott's Hill International Research International Research Centre, Syngenta), del Dr. Joseph R. Ecker (Plant Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies) i del Dr. Allen Sessions (Torrey Mesa Research Institute, Syngenta). El T-DNA prové dels vectors pCSA110 i pDAP101, i la regió genòmica flanquejant el T-DNA ha estat seqüenciada. Distribuïts pel NASC.
  - SAIL\_378-C01.v1 (At5g17630) mutant *Atxpt-2*
  - SAIL\_622\_D06 (At1g62850) mutant *rif31-1*

### 1.2 Soques bacterianes

- *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  (*supE44*,  $\Delta$ *lac*, U169, ( $\Phi$ 80, *lacZ* $\Delta$ M15), *hsd* R17, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (*Invitrogen*)
- *Escherichia coli* **BL-21** (DE3) [*F<sup>+</sup> ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm*] (*Invitrogen*)
- *Agrobacterium tumefaciens* **C58C1** (Rif<sup>R</sup>-pGV2260) (Valvekens i col., 1988)

### 1.3 Vectors plasmídics

- pBLUESCRIPT-SK+ (*Stratagene*)
- pCAMBIA1303
- pGFPuv (*Clontech*)
- pGFP-PAU (Rodríguez-Concepción i col., 2000)
- pET-23 (*Novagen*)
- pLysS (*Invitrogen*)
- pUBS520

La majoria de les construccions es van generar originalment en els vectors pBLUESCRIPT-SK+/- i pGFPuv. El vector pCAMBIA1303 es va utilitzar per la generació de plantes transgèniques

mitjançant transformació d'*Arabidopsis*. Aquests plàsmids van ser propagats en la soca DH-5α d'*E. coli*, i també en la soca BL21 en els experiments d'expressió de proteïnes heteròlogues, on també es va utilitzar el plàsmid pUBS520. A més, les construccions generades a partir del vector pCAMBIA1303 van ser amplificades en la soca C58C1 (RifR-pGV2260) d'*A. tumefaciens*.

## 2 Medis de cultiu

### 2.1 Medis de cultiu de plantes

El medi de germinació s'esterilitza a l'autoclau durant 20 minuts a 120 °C abans de ser plaquejat en plaques de cultiu / germinació (plaques de Petri una mica més altes adequades pel desenvolupament *in vitro* de plàntules d'*Arabidopsis*). Aquest medi va ser l'utilitzat per créixer les plantes en condicions estèrils. Antibiòtics, inhibidors, intermediaris metabòlics y altres productes es van afegir una vegada esterilitzat el medi en l'autoclau i després d'haver-se atemperat fins aproximadament 50°C.

#### MEDI de GERMINACIÓ:

Murashige & Skoog*(MS).....	4,4 g
MES.....	0,5 g
Aigua miliQ q.s.p.....	1 l
Agar.....	8 g
Ajustar el pH a 5.7 amb KOH 1 N.	

#### MEDI MINERAL:

KNO <sub>3</sub> .....	5 mM
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH=5,5).....	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub> .....	2 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	2 mM
EDTA-Fe.....	50 mM
Micronutrients.....	0,1 %

#### MICRONUTRIENTS:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	70 mM
MnCl <sub>2</sub> .....	14 mM
CuSO <sub>4</sub> .....	0,5 mM
ZnSO <sub>4</sub> .....	1 mM
NaMoO <sub>4</sub> .....	0,2 mM
NaCl.....	10 mM
CoCl <sub>2</sub> .....	10,01 mM

\*El medi MS utilitzat no contenia ni sacarosa, ni agar, ni kinetina, ni àcid indolacètic (*ICN Biomedicals*).

#### 2.1.1 Suplements al medi de cultiu

Diferents intermediaris i inhibidors es van afegir al medi de germinació en cultius estèrils. S'enumeren els diferents productes que van ser utilitzats, els proveïdors, la preparació de les solucions mare o, en el seu cas, els procediments de síntesis:

- **Fosmidomicina** (àcid 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)propilfosfònic (*Invitrogen*): Es prepara una solució mare a 100 mM en Tris-HCl 10 mM a pH=8,5, que posteriorment s'esterilitza mitjançant filtres de 0,2 µm de diàmetre de porus.



## MATERIALS I MÈTODES

- **Clomazona:** (2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) (*Zeneca Agrochemicals*). La solució mare es prepara a 100 mM en aigua destil·lada, i s'esterilitza mitjançant filtres de 0,2 µm de diàmetre de porus.

- **Mevinolina** (*Sigma*): Aquest compost, es prepara en una solució al 6,5 mM. Així doncs, es dissolen 25 mg en 0,760 ml d'etanol absolut calentant a 50-55°C. Se li afegeix a continuació 0,25 ml de NaOH 0,6 N y es completa con 7,6 ml de H<sub>2</sub>O. Després de mitja hora d'incubació a T<sup>a</sup>A, s'ajusta el pH de la solució resultant a 7,8 amb HCl 2 N. Finalment es porta fins a 9,509 ml amb H<sub>2</sub>O i es fan alícuotes d'1 ml, que es conserven a -20°C.

- **1-Desoxi-D-xilulosa:** Aquest substrat es va preparar mitjançant la tècnica enzimàtica que es detalla a Concia i col., 2009 i cedida pel Dr. Pere Clapés (CID-CSIC, Barcelona)

### 2.2 Medis de cultiu de bacteris

Els medis de cultiu bacterians es van preparar amb aigua destil·lada i es van autoclavar 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):

Extrace 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

Per regla general, i per tal d'assolir la fase de creixement estacionari, es van seguir les condicions de cultiu indicades en la Taula 1:

**Taula 1:** Condicions generals de cultiu de les diferents espècies bacterianes utilitzades en aquest treball.

	MEDI SÓLID	MEDI LÍQUID
<i>Escherichia coli</i>	37°C o/n	37°C o/n amb agitació 200 rpm
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28°C 2-3 dies	28°C 2-3 dies amb agitació suau 120-160 rpm

### 3 Condicions de cultiu de plantes d'*Arabidopsis*

Les plantes d'*Arabidopsis* es van créixer en càmeres de cultiu a una temperatura de 22-24°C seguint essencialment dos programes de desenvolupament. En un cas es van mantenir sota un fotoperíode de 8h de llum i 16h de fosc (condicions de dia curt) en el que la planta es manté en fase vegetativa més temps i retarda la seva floració, augmentant la biomassa vegetal corresponent a les fulles de la roseta basal. En altres ocasions es van cultivar amb un fotoperíode de 16h de llum i 8 h de fosc (condicions de dia llarg). En aquestes condicions s'accelera l'entrada de les plantes a la fase reproductiva. Una combinació d'aquestes dues fases permet el desenvolupament òptim de les plantes. En alguns experiments es van fer créixer les plàntules d'*Arabidopsis* a 15-16°C.

El material vegetal utilitzat va ser cultivat en condicions estèrils o en testos amb una barreja de terra tal i com es detalla a continuació.

#### 3.1 Cultiu estèril d'*Arabidopsis*

##### 3.1.1 Cultiu en medi sòlid

Les llavors d'*Arabidopsis* es van fer germinar i cultivar en condicions estèrils en medi sòlid de germinació. Per cultivar les plantes en condicions estèrils, s'han d'extremar les precaucions al manipular les llavors, treballant sempre dins d'una cabina de flux laminar. L'omissió de sacarosa en el medi de germinació redueix considerablement l'aparició de contaminants. Convé també segellar les plaques, una vegada s'han sembrat les llavors, mitjançant un esparadrap transpirable (leukopor).

Per esterilitzar les llavors d'*Arabidopsis* es va seguir el següent mètode:

- 1.-Submergir les llavors (50-100 mg en un tub de microcentrífuga) en solució d'esterilització durant 8 minuts en agitació.

## MATERIALS I MÈTODES

2.-Rentar durant dos passos de 1-2 min amb etanol absolut i en agitació.

3.- Deixar assecat, dins del tub obert, en la cabina de flux laminar entre 4 hores i una nit, depenent de la quantitat d'etanol que quedi en el tub.

Les llavors estèrils es sembren directament sobre el medi sòlid. En la majoria d'experiments, per tal de sincronitzar la germinació de les llavors, s'ha seguit un procés anomenat estratificació, guardant les plaques 48 hores a 4°C i en fosc abans de posar-les a germinar.

### SOLUCIÓ d'ESTERILITZACIÓ:

Bayrol GmbH (desinfectant universal d'ús comú).....1.5 g

Aigua miliQ q.s.p.....40 ml

Diluir al 10 % en etanol absolut

### **3.2 Cultiu en terra.**

Les plantes destinades a completar el seu cicle biològic i produir llavors es van fer créixer en condicions no estèrils. El cultiu en testos es va dur a terme en un substrat sòlid consistent en una barreja de perlita:vermiculita:torba en proporcions 1:1:1. Per tal d'amortir la naturalesa àcida de la torba, es van afegir 2 g d'una barreja de carbonat potàssic:carbonat càlcic:carbonat magnèsic (en una relació 7:4,5:2) per cada litre de substrat. Els testos es van regar periòdicament (dos cops per setmana) intercalant aigua destil·lada amb el medi mineral indicat a l'apartat 2.1.

Les llavors no estèrils es van sembrar directament sobre el substrat previament irrigat amb aigua abundant. En la majoria de casos, però, les llavors es van germinar en condicions estèrils i després, si interessava, es traspasaven a terra al cap de 15 dies, quan les arrels ja s'havien desenvolupat suficientment.

Per traspasar plantes d'*Arabidopsis* d'un medi estèril a terra, s'han d'extremar les precaucions en la manipulació. La terra ha d'estar abundantment irrigada, i els testos es recobreixen amb una pel·lícula de plàstic (Saran Wrap o similar). L'objectiu és que les plantes s'habituin gradualment a les noves condicions, fonamentalment d'humitat de l'aire en el pas de l'atmosfera tancada de la placa a l'atmosfera de l'hivernacle. D'aquesta manera, i per afavorir paulatinament l'intercanvi d'aire, es practiquen uns orificis en el plàstic, retirant-lo quan els individus han arrelat convenientment (al cap d'uns 4 dies).

## 4 Biologia molecular i bioquímica d'*Arabidopsis*: tècniques específiques

### 4.1 Generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis*

La generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis* es va realitzar mitjançant infecció amb la soca C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens*, utilitzant la tècnica d'infiltració anomenada *floral dip* (Clough i Bent 1998).

#### 4.1.1 Descripció del vector utilitzat per generar les plantes transgèniques.

Per generar plantes transgèniques es va utilitzar un únic vector, anomenat pCAMBIA1303. En la Figura 1 es mostren els elements que componen la regió del T-DNA. S'hi troba el marcador de selecció *hpt*, que confereix resistència a l'antibiòtic higromicina, sota control de la regió promotora CaMV35S. Un altre promotor CaMV35S controla l'expressió de dos gens deladors: els codificants per la GFP i GUS, aquest últim truncat per un intró que evita l'expressió en sistemes bacterians. Per la seva banda, el promotor CaMV35S permet l'expressió forta i constitutiva de qualsevol cDNA clonat en el vector.

A més, el plàsmid pCAMBIA1303 conté orígens de replicació per *E. coli* y *A. tumefaciens*, permetent la propagació de les construccions d'interès en la soca DH5 $\alpha$  d'*E. coli* prèviament a la seva introducció a *A. tumefaciens*.

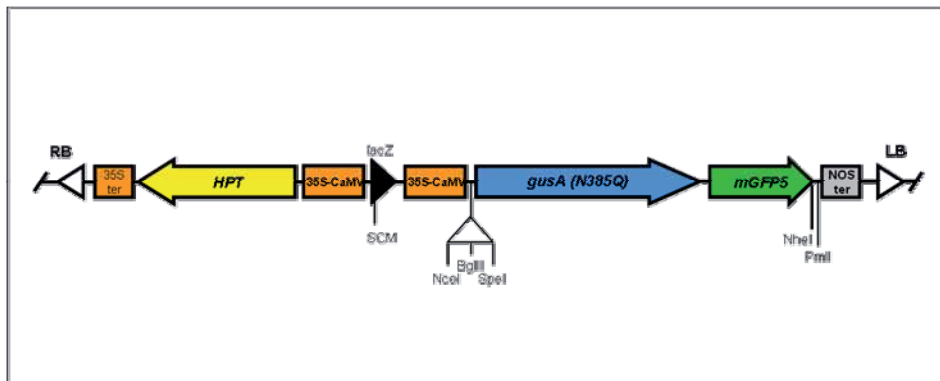


Figura 1. Representació esquemàtica del T-DNA del vector pCAMBIA1303.

#### 4.1.2 Transformació d'*Arabidopsis*

Per la generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis* es va seguir el mètode de *floral dip* (Clough i 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 transgèn. L'addició d'un agent

## MATERIALS I MÈTODES

tensoactiu 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* C58C1 (Rif<sup>R</sup>-pGV2260) portador del plàsmid pCAMBIA1303 contenint el trasngèn 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 (50mg/ml).
- Medi MS.
- Sacarosa.
- Tensoactiu 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 vulguin 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 tijes, es van podant desde la base, repetint la operació unes dues vegades amb un doble objectiu: Per una banda, estimular la formació de múltiples tijes laterals augmentant el número d'inflorescències susceptibles de ser posteriorment infectades per *Agrobacterium*; per una altra banda sincronitzar l'aparició de les tijes entre els diferents individus.

4.- En el moment en que les plantes han desenvolupat un número suficient d'inflorescències, unes 2-3 setmanes desde que van ser traslladades a dia llarg, estan en el moment òptim per a ser infiltrades. En aquest punt es poden eliminar les siliques 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 plàsmid 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 al 5%.

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

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 les plantes transformandes:**

Del total de llavors obtingudes a la generació  $T_1$ , només unes poques hauràn incorporat el transgèn. 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 3.1.1.

## MATERIALS I MÈTODES

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>, sobre la que 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.

5.- 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.

### 4.2 Tècniques específiques d'*Agrobacterium tumefaciens*

#### 4.2.1 Transformació d'*A. tumefaciens*

La transformació d'*A. tumefaciens* es va fer seguint el mètode descrit per An (1987). Es tracta d'una modificació del protocol clàssic de transformació de cèl·lules competents d'*E. coli* per xoc tèrmic. És crucial mantenir les cèl·lules a 4°C durant tot el temps que duri el procés.

#### Materials:

- Centrífuga *Beckman* J2-21 i rotor JA-10 (o equivalent).
- *A. tumefaciens* C58C1 (Rif<sup>R</sup>-pGV2260).
- ADN de la construcció contenint el T-DNA d'interès.
- Medi YEB.
- Rifampicina 34 mg/ml en DMSO, Kanamicina 100 mg/ml i Ampicilina 100 mg/ml en solució aquosa.
- NaCl 0,15 M i CaCl<sub>2</sub> 20 mM.
- N<sub>2</sub> líquid.

## **Preparació de cèl·lules competents d'*A. tumefaciens***

### **Mètode:**

1.- Inocular un precultiu de 10 ml de medi YEB-rifampicina 150 µg/ml a partir d'una colònia aïllada d'*A. tumefaciens* i incubar en agitació a 150 rpm a 28°C durant aproximadament 24 h.

2.- Inocular 50 ml de YEB-rifampicina 150 µg/ml amb una dilució 1/1000 del precultiu anterior. Incubar en agitació a 150 rpm i 28°C fins a obtenir una DO<sub>600</sub> de 0,5. Normalment, i si el precultiu no està excessivament saturat, el cultiu tarda unes 18-20 h en assolir la DO desitjada.

3.- Centrifugar les cèl·lules durant 5 min a 5000 rpm i 4 °C en un rotor JA-10 refredat. A partir d'aquest moment les cèl·lules es mantenen en gel, extremant la cura al manipular-les per evitar lisar-les mecànicament.

4.- Resuspendre suaument el sediment en 10 ml de solució de NaCl 0,15 M previament atemperada a 4°C.

5.- Centrifugar com en el pas 3 y resuspendre el sediment resultant en 1 ml de solució de CaCl<sub>2</sub> 20 mM previament refredada en gel.

6.- Distribuir les cèl·lules en alíquotes de 200 µl en tubs d microcentrífuga d'1,5 ml, congelar-les en nitrogen líquid i guardar-les a -80°C.

## **Transformació de cèl·lules competents d'*A. tumefaciens***

### **Mètode**

1.- Descongelar en gel una alíquota de cèl·lules competents

2.- Afegir de 1-3 µg d'ADN, mesclar i incubar en gel durant 30 min.

3.- Congelar en nitrogen líquid durant 1 min i a continuació col·locar en un bany a 37°C fins que la mostra estigui completament descongelada.

4.- Afegir 1 ml de medi YEB i incubar durant 2-4 h a 28°C amb agitació suau (120 rpm).

5.- Extendre 200 µl del cultiu amb l'ajuda d'una nansa de sembra en una placa de Petri amb medi YEB sòlid suplementat amb rifampicina (150 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) i kanamicina (30 µg/ml).

6.- Incubar a 28°C durant 2-3 dies protegida de la llum.



## MATERIALS I MÈTODES

7.- Comprovar la presència del vector en les colònies resultants mitjançant PCR, i inocular una d'aquestes colònies en medi YEB. Una vegada crescut el cultiu, guardar una alíquota a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en presència de 50 % (v/v) de glicerol.

### 4.3 Obtenció d'àcids nucleics a partir de teixits d'*Arabidopsis*

#### 4.3.1 Obtenció d'ADN genòmic

L'ADN genòmic de plàntules d'*Arabidopsis* s'ha obtingut utilitzant el kit de *Qiagen DNAeasy plant mini kit* seguint les instruccions del proveïdor i ha estat utilitzat en els experiments de PCR inversa i *walking PCR* (apartat 5.6)

#### 4.3.2 Minipreparació d'ADN genòmic

Alternativament s'ha utilitzat una senzilla y ràpida tècnica per obtenir ADN genòmic a partir de petites quantitats de teixit d' *Arabidopsis* (de l'ordre de 10-100mg). L' ADN obtingut permet, per exemple, confirmar per *PCR* la presència d'un transgèn:

1.-Congelar el teixit d'*Arabidopsis* en un tub de microcentrífuga i moldre fins obtenir una pols fina, treballant sempre en presència de  $\text{N}_2$  líquid. Alternativament, el teixit d'*Arabidopsis* s'ha molt utilitzant l'aparell *TissueLyser (Qiagen)*.

2.-Resuspendre en 10  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,5N/mg de teixit triturat i seguir molent fins homogeneïtzar a temperatura ambient (TA). Agitar amb l'ajuda del vòrtex 10-15 min.

3.-Transferir 20  $\mu\text{l}$  de l'homogeneïtzat anterior en 980  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 0,1 M a pH=8.

4.-Utilitzar 5  $\mu\text{l}$  de la solució anterior per les reaccions de *PCR*.

#### 4.3.3 Obtenció d'ARN

S'ha obtingut ARN procedent de teixits de plàntules crescudes en condicions estèrils i sotmeses a diferents tractaments utilitzant el kit de *Qiagen RNAeasy plant mini kit* seguint les instruccions del subministrador.

El treball amb ARN requereix extremar les precaucions per evitar les contaminacions amb ARNases, enzims particularment abundants, estables i actius que podrien degradar l'ARN. Per evitar-ho, tot el material plàstic fungible es va autoclavar 2 vegades, i es va tractar tota la resta del material amb una solució de DEPC (dietilpirocabonat), reactiu que modifica les His i Tyr de les proteïnes, inactivant-les.

## 4.4 Obtenció de proteïnes a partir de teixits d'*Arabidopsis*

### Materials:

- Tampó d'homogeneïtzació.
- N<sub>2</sub> líquid.
- Reactiu de Bradford (*Biorad Protein Assay*).
- Lector de plaques (model *Merck ELISA System Mios*).

### Mètode:

1.- Triturar 25-100 mg de teixit d'*Arabidopsis* congelat en N<sub>2</sub> líquid en un tub de microcentrifuga. Alternativament, el teixit s'ha mòlt utilitzant l'aparell *Tissuelyser (Qiagen)*.

2.- Afegir 20 µl de tampó d'homogeneïtzació per cada 10 mg de teixit inicial.

3.- Centrifugar a 4°C durant 5 min a 200xg i sense fre.

4.- Recuperar el sobrenadant en un tub nou.

5.- Centrifugar el sobrenadant 2-3 vegades més a 4°C durant 5 min a 200xg i sense fre, fins assegurar-se que està suficientment net, ja que el precipitat obtingut és molt poc compacte.

6.- Per la quantificació de proteïnes, s'ha seguit el mètode espectrofotomètric de Bradford (Bradford 1976), utilitzant el reactiu *Biorad Protein Assay*. S'han realitzat rèpliques de les mostres a mesurar, i s'han referit a una recta patró elaborada utilitzant albúmina de serum boví (BSA). Les mesures es van realitzar en un lector de plaques a una longitud d'ona de 595 nm.

7.- Congelar les mostres en N<sub>2</sub> líquid i conservar a -20°C.

#### TAMPÓ d'HOMOGENEÏTZACIÓ:

MgCl<sub>2</sub> .....1 mM  
KCl.....10. mM  
Sacarosa.....10 %(p/v)  
Tricina pH=7,5.....0,1 M  
Conservar a 4°C.

Aquesta solució va ser completada amb els següents components, els quals s'han d'afegir en el moment d'utilitzar-la:  
Tritó X 100.....0,2%  
DTT.....1 mM  
PMSF.....100 µg/ml  
E64..... 3 µg/ml  
Cocktail inhibidors proteases SIGMA...20 µl/ml

### 4.5 Microbombardeig de teixits d'*Arabidopsis*

S'han utilitzat fulles de roseta de plantes de 2 a 3 setmanes. El protocol seguit ha estat bàsicament el descrit pel proveïdor del sistema de biolística, amb adaptacions específiques destinades al bombardeig de teixits vegetals.

#### 4.5.1 Descripció de les construccions utilitzades pels experiments de microbombardeig

Les construccions utilitzades pels experiments de microbombardeig van ser generades a partir del vector pGFP-PAU. Aquest vector incorpora una regió de policlonatge que permet fusionar traduccionalment un ADNc concret a una variant de la GFP (sGFP:S65T) millorada per a multiplicar el senyal fluorescent en cèl·lules vegetals. Les construccions resultants codifiquen per a les diferents proteïnes quimèriques sota el control del promotor 35S-CaMV. Per a aquest treball, es van dissenyar construccions en les quals diferents versions de la seqüència codificant del gen *rij21* es van fusionar traduccionalment amb la proteïna verda fluorescent GFP.

#### 4.5.2 Protocol de microbombardeig

##### Material

- Sistema Biorad PDS100/He-Particle Delivery System.
- Cabina de fluxe laminar.
- Vórtex.
- Micropartícules de tungstè M17, diàmetre mitjà 1,1 µm.
- Membranes de ruptura, membranes portadores i reixetes de parada.
- Etanol absolut i al 70 %.
- Glicerol 50 %.
- ADN purificat.
- Espermidina 0,1 M.
- CaCl<sub>2</sub> 2,5 M.

##### Preparació dels microprojectils

- 1.- Pesar 30 mg de micropartícules de tungstè en un tub de microcentrífuga d'1,5 ml.

- 2.- Afegir 1 ml d'etanol al 70 %. Agitar vigorosament amb un vòrtex durant 3-5 minuts.
- 3.- Incubar 15 min a temperatura ambient.
- 4.- Precipitar les micropartícules amb un pols d'uns 5 seg en la microcentrífuga. Eliminar el sobrenadant.
- 5.- Afegir 1 ml d'H<sub>2</sub>O estèril i agitar amb un vòrtex durant 1 min. Deixar 1 min fins que les micropartícules sedimentin. Finalment, repetir el pols en la centrífuga i eliminar el sobrenadant amb l'ajuda d'una micropipeta.
- 6.- Repetir el pas anterior 2 vegades més.
- 7.- Afegir 0,5 ml de glicerol 50 % estèril (concentració final de micropartícules=60 mg/ml) i conservar a -20 °C per tal de prevenir la oxidació.

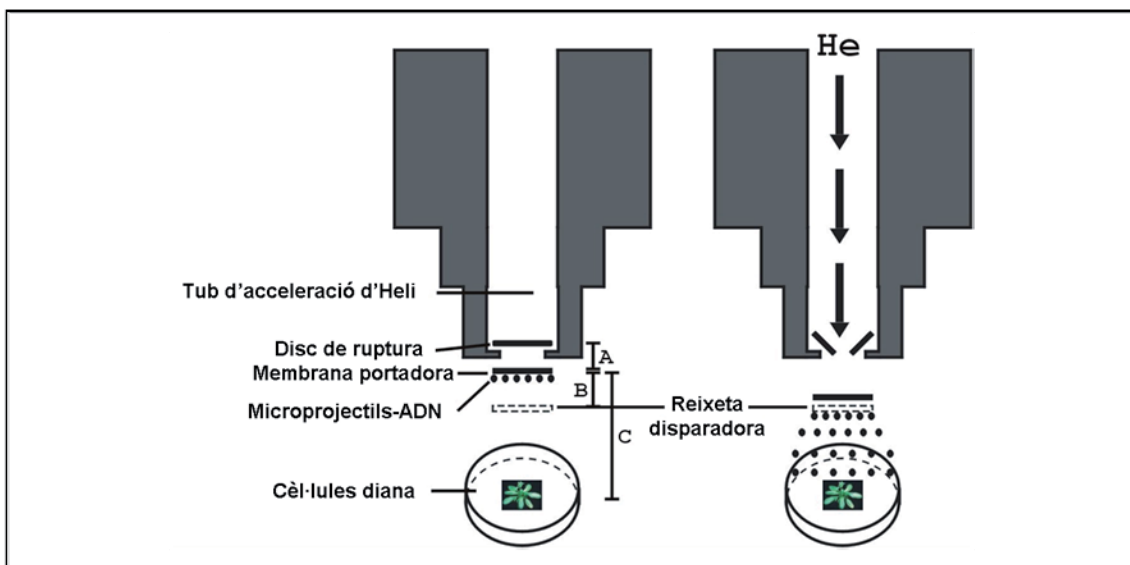
### **Precipitació de l'ADN sobre els microprojectils**

- 1.- Mantenir les micropartícules (preparades segons s'ha descrit anteriorment) en una plataforma vòrtex. És convenient deixar-les el temps suficient (mínim 20 min) per poder resuspendre i trencar els aglomerats de micropartícules.
- 2.- Passar 10 µl de micropartícules (600 µg) a un tub de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 3.- Mantenint en agitació el tub anterior i afegir:
  - 1-2 µg d'ADN plasmídic.
  - 14 µl de solució de precipitació (10 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M: 4 µl espermidina 0,1 M).
- 4.- Mantenir agitant en el vòrtex durant uns 5 min més.
- 5.- Deixar sedimentar les micropartícules durant 1 min.
- 6.- Aplicar un pols de centrifuga de 5 seg i eliminar el sobrenadant cuidadosament amb l'ajut d'una micropipeta.
- 7.- Rentar el precipitat (sense aixecar-lo) amb etanol 70 % i retirar el sobrenadant.
- 8.- Rentar el precipitat (sense aixecar-lo) amb etanol 100 % i retirar el sobrenadant.
- 9.- Resuspendre en 8 µl d'etanol absolut utilitzant una micropipeta.

### Microbombardeig

Els paràmetres del procediment de transfecció van ser optimitzats, i de la manera que s'il·lustra en la Figura 2, es refereixen a:

- Disc de ruptura (pressió d'heli a soportar, expressada en psi).
- Distància disc de ruptura-membrana portadora (A)=4,5 cm.
- Distància membrana portadora-reixeta de parada (B)=6 mm
- Distància membrana portadora-mostra a bombardejar (C)=12 cm.
- Pressió d'heli en la bombona de subministre.



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

Així mateix, cal considerar els paràmetres biològics relacionats amb la mostra a bombardejar, elecció de cèl·lules diana, etcètera.

Per a evitar contaminacions amb les construccions entre un episodi i altre de bombardeig, convé esterilitzar la zona de treball (cabina i càmera de bombardeig) amb etanol i rentar amb aigua. El mateix es va fer amb el material fungible utilitzat en cada bombardeig, mantenint les membranes de ruptura, membranes portadores i reixetes de parada en etanol absolut, i manipulant-les sempre amb pinces. També es van esterilitzar i rentar curosament les peces metàl·liques i de plàstic que serveixen de suport a aquells elements. Una vegada assecat aquest material sobre paper de filtre, es procedeix com segueix:

1.- Dipositar els 8 µl de micropartícules recobertes de la mostra d'ADN sobre una membrana portadora ja seca.

2.- Mentre s'espera que l'etanol s'evapori, ajustar el regulador de la bombona d'heli a una pressió de 1300 psi, unes 200 psi per sobre de la suportada pel disc de ruptura.

3.- Ajustar la membrana portadora correctament orientada sobre el suport metàl·lic amb l'ajuda de la peça vermella dissenyada a aquest efecte.

4.- Col·locar una reixeta de parada en la plataforma. A continuació, col·locar el suport metàl·lic amb la membrana portadora de manera que les micropartícules estiguin orientades cap a la reixeta.

5.- Tancar fermament el muntatge enroscant el tancament del suport metàl·lic.

6.- En aquest moment, esterilitzar un disc de ruptura submergint-lo breument en etanol absolut. Disposar ràpidament sobre el suport corresponent i s'enrosca en el tub d'acceleració del gas en l'extrem superior de la càmera de bombardeig.

7.- Tot seguit col·locar la plataforma amb la membrana en el nivell 5.

8.- Finalment, disposar la plataforma amb la mostra vegetal dipositada en una placa d'agar 0,8 % en el nivell 2. Aquest suport absorbirà l'impacte resultant del bombardeig i mantindrà condicions d'humitat per al teixit durant la incubació posterior.

9.- En aquest moment tancar la càmera de bombardeig i posar en marxa la bomba de buit.

10.- Connectar la càmera de bombardeig i accionar l'interruptor en la posició de buit (posició superior).

11.- La pressió de buit anirà pujant. En el moment que arribi a 27-29 mm de Hg (0,06 atm), passar l'interruptor a la posició inferior, en la qual es mantindrà la pressió de buit.

12.- Prémer ràpidament l'interruptor de tir. La pressió d'Heli indicada en el manòmetre del sistema s'anirà incrementant sobre el disc de ruptura fins a arribar al màxim suportat, moment que esclatarà, desprenent un soroll sord i baixant bruscament la pressió d'Heli des del valor màxim assolit (1100 psi) fins a 0.

13.- Posar immediatament l'interruptor en la posició intermitja per a permetre l'alliberament del buit. És convenient realitzar els passos 11 a 13 el més ràpidament possible a fi de reduir els danys que el buit pugui causar en el teixit vegetal.

## MATERIALS I MÈTODES

14.- Finalment, recuperar la mostra bombardejada, que ha de mostrar unes taques negres degudes al tungstè impactat. Deixar incubar 24 hores sota llum contínua a una temperatura de 22-24 °C perquè tingui lloc l'expressió de la construcció bombardejada.

15.- Descartar el disc de ruptura, que ha d'estar destrossat, la membrana portadora i la reixeta.

16.- Abans de procedir a un nou bombardeig, esterilitzar i netejar de nou la zona.

17.- És convenient, una vegada acabat l'experiment:

-Tancar la clau de pas de l'heli.

-Aplicar el buit el temps suficient per a permetre que s'encengui el botó disparador, i disparar quantes vegades sigui necessari per a alliberar el gas retingut en el sistema. Confirmar que, efectivament, l'indicador del manòmetre cau a 0 .

-Alliberar finalment el buit.

### 4.5.3 Observació de les mostres microbombardejades

Les mostres obtingudes després del procés de transformació transitòria mitjançant el sistema de biolística van ser examinades en el Servei de Microscopia Confocal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Les observacions es van realitzar directament utilitzant un microscopi làser d'escàner confocal model Leica TCS 4D, o bé Olympus IX70. La fluorescència verda corresponent a les proteïnes de fusió amb la GFP va ser detectada a través d'un filtre BP515-525 després d'excitació amb llum blava a 488 nm, mentre que la autofluorescència vermella corresponent a la clorofil·la es va detectar usant un filtre LP590, després d'excitar mitjançant l'emissió amb llum verda a 568 nm. Ocasionalment, es va efectuar una observació preliminar amb l'ajuda d'una lupa binocular de fluorescència Leica DC250, per tal de detectar les regions que estiguessin expressant la GFP.

L'anàlisi de la superposició dels dos tipus d'imatges obtingudes, així com el tractament de les mateixes, va ser efectuat mitjançant l'aplicació Corel Photo-Paint, integrada en el paquet informàtic Corel-Draw 9.

### 4.6 Quantificació de pigments fotosintètics a *Arabidopsis*

Per l'anàlisi quantitatiu de pigments fotosintètics de naturalesa prenilica, és a dir, clorofil·les i carotenoides (Fraser i col., 2000), s'ha seguit el mètode d'extracció basat en el descrit per Lichtenthaler (Lichtenthaler 1987). Es va treballar a escala de tub de microcentrífuga de 1,5 ml, partint de 10-40 mg de teixit fresc i congelat en N<sub>2</sub> líquid.

## Materials

- Liofilitzador-Evaporador-trampa de buit (*B. Braun Christ-Loc I*).
- N<sub>2</sub> líquid.
- Agitador múltiple.
- Cloroform, metanol, acetona i etilacetat.
- Solució d'homogeneïtzació.
- Espectrofotòmetre (model *Shimadzu UV-160A*).

## Mètode:

1.- Congelar el teixit d'*Arabidopsis* en un tub de microcentrífuga i moldre fins obtenir una pols fina, treballant sempre en presència de N<sub>2</sub> líquid. Alternativament, el teixit s'ha mòlt utilitzant l'aparell *Tissuelyser (Qiagen)*. A partir d'aquest moment, és convenient reduir la incidència de llum directa sobre la mostra per tal d'evitar la fotooxidació dels pigments. També s'ha de procurar mantenir en tot moment les mostres per sota de 4°C.

2.- Afegir 400 µl de metanol i resuspendre el teixit triturat i agitar cada mostra en un vòrtex durant 5 segons. Agitar el conjunt de les mostres en un agitador multitubs protegit de la llum durant 10 min.

3.- Afegir a la suspensió 400 µl de la solució d'homogeneïtzació, les sals de la qual eviten la producció artefactual de feofitina durant el procés, que podria alterar las mesures. Mantenir en agitació uns altres 10 min.

4.- Afegir 400 µl de cloroform i repetir el pas d'extracció.

5.- Agitar el conjunt de les mostres en un agitador multitubs protegides de la llum durant 2-3 min.

6.- Incubar les mostres en gel protegides de la llum durant 5 min.

7.- Centrifugar durant 5 min a 14.000 rpm i a 4°C per a la separació de la fase aquosa de la orgànica (inferior). Recuperar aquesta última cuidadosament i passar a un altre tub.

8.- Concentrar la mostra amb l'ajuda d'un evaporador-concentrador. Resuspendre el residu sec obtingut en 100-150 µl d'etilacetat. Evitar mantenir el tub obert a partir d'aquest moment ja que el dissolvent és extremadament volàtil.



## MATERIALS I MÈTODES

9.- Finalment, transferir 10 µl de l'extracte obtingut en 500 µl d'acetona, i determinar l'absorvència amb l'ajut d'un espectrofotòmetre a les següents longituds d'ona (Lichtenthaler 1987):

- Clorofil·la A ( $C_a$ ): 661,6 nm.
- Clorofil·la B ( $C_b$ ): 644,8 nm.
- Carotenoides y xantofil·les ( $C_{x+c}$ ): 470 nm.

Aquests valors representen les  $\lambda_{m\grave{a}x}$ , coeficients d'absorció màxims específics en presència d'acetona. Una vegada obtinguts els valors d'absorbència a aquestes longituds d'ona, s'apliquen les següents fórmules per tal de determinar les concentracions de cada un dels pigments analitzats, referint-los finalment en µg/mg d'extracte vegetal (Lichtenthaler 1987).

$$C_a = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$$

$$C_b = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$$

$$C_{a+b} = 7,05 \times A_{661,6} + 18,09 \times A_{644,8}$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b) / 214$$

### SOLUCIÓ d'HOMOGENEÏTZACIÓ:

Tris-HCl pH=7,5.....25 ml

NaCl.....1 M

No autoclavar.

Conservar a temperatura ambient.

## 5 Tècniques de biologia molecular

### 5.1 Tecnologia de l'ADN recombinant

Sota aquest epígraf s'engloben les tècniques utilitzades pel clonatge de seqüències d'ADN. La diversitat d'estratègies metodològiques utilitzades per a generar la multitud de construccions obtingudes al llarg d'aquest treball fan difícil descriure cadascuna d'elles independentment, de manera que s'ha optat per enunciar-les breument.

En primer lloc, i pel que es refereix a la minipreparació d'ADN plasmídic s'ha utilitzat el sistema *QIAPREP spin miniprep kit* de Qiagen. Les restriccions de l'ADN 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 hores 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, apartat 5.5) 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 DH5a Chemically Competent E. coli* de Life Technologies). L'anàlisi de les colònies resultants es va portar a terme en primer lloc mitjançant escrituri per PCR (apartat 5.5.1.), 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 de l'ADN 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 autoclavat per a preparar els glicerins a -80°C.

### 5.1.1 Construccions utilitzades en aquest treball

En aquest treball s'han realitzat un elevat nombre de construccions, i a continuació es descriu l'estratègia seguida per tal d'obtenir-les. Aquestes construccions s'han utilitzat per diferents propòsits, com han estat la generació de plantes transgèniques, l'expressió de proteïnes a *E. coli* o per microbombardejar fulles d'*Arabidopsis*.

Normalment s'ha seguit la mateixa estratègia en totes elles, de manera que primer s'ha obtingut el fragment de DNA que finalment es volia clonar. En determinats casos disposàvem d'aquest DNA clonat en un vector, i en d'altres, s'ha hagut de recórrer a la tècnica de RT-PCR (apartat 5.5.2) per obtenir-lo a partir d'RNA d'*Arabidopsis*. Seguidament fragment d'interès s'ha clonat en un vector de tipus pBLUESCRIPT-SK+ o pGFPuv) i posteriorment s'ha alliberat utilitzant enzims de restricció que reconeixien dianes pròpies del vector o del fragment. En la majoria dels casos, aquestes dianes es trobaven als extrems del fragment clonat, on havien estat introduïdes alhora d'amplificar-lo per PCR. En alguns casos, els fragments portadors de les dianes d'interès van ser digerits amb els enzims adequats sense passar per un vector de clonatge intermediari, de manera que el fragment ja digerit es clonava directament en el vector de clonatge final.

En la següent taula s'exposa el procediment utilitzat per cada una de les construccions:

## MATERIALS I MÈTODES

**Taula 2.** Estratègia de clonatge utilitzada per les diferents construccions realitzades en aquest treball.

Construcció	Fragment de DNA clonat	Origen del DNA clonat	Oligonucleòtids	Vector de clonatge primari	Enzims de restricció usats per digerir l'insert	Vector de clonatge final
<b>pC-DXS1DXS2</b>	cDNA <i>DXS2</i> amb el pèptid de trànsit de <i>DXS1</i>	(estratègia de clonatge descrita en el text, pàg. 172)			BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pET23-DXS1</b>	cDNA <i>DXS1</i>	pBI121-DXS1 (Carretero-Paulet, 2003)	DXS1.NheI DXS1.HindIII	pGFPuv (SmaI)	NheI HindIII	pET23 (NheI,HindIII)
<b>pET23-DXS1ATP</b>	cDNA <i>DXS1</i> sense pèptid de trànsit	pBI121-DXS1 (Carretero-Paulet, 2003)	DXS1.NheI.noTP DXS1.HindIII	pGFPuv (SmaI)	NheI HindIII	pET23 (NheI,HindIII)
<b>pC-RIF21</b>	cDNA At5g64940	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif21.1.F rif21.2.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BglII HpaI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF23</b>	cDNA At3g23325	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif23A.1.BamHI.F rif23A.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF24A</b>	cDNA At5g41240	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif24A.BamHI.1F rif24A.EcoRV.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF24B</b>	cDNA At5g41250	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif24B.BglII.1F rif24B.PmlI.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BglII PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF26A</b>	cDNA At1g32780	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif26A.F rif26A.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BglII PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF26B</b>	cDNA At1g32770	cDNA de tijes d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif26B.3.BamHI.F rif26B.4.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF27</b>	cDNA At3g12890	cDNA de tijes d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif27B.BamHI.1F rif27B.EcoRV.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)

Construcció	Fragment de DNA clonat	Origen del DNA clonat	Oligonucleòtids	Vector de clonatge primari	Enzims de restricció usats per digerir l'insert	Vector de clonatge final
<b>pC-RIF30.2</b>	cDNA At4g36640	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif30.2.1.BamHI.F rif30.2.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF32A</b>	cDNA At5g65010	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif32A.1.BamHI.F rif32A.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF32B</b>	cDNA At5g65020	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif32B.1.BamHI.F rif32B.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF33A</b>	cDNA At5g37670	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif33A.BamHI.1F rif33A.EcoRV.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF33B</b>	cDNA At5g37680	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif33B.BamHI.1F rif33B.PmlI.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF34</b>	cDNA At4g21750	cDNA de flors d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif34.1.B.1.BglII.F rif34.1.B.2.PmlII.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BglII PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF35.1</b>	cDNA At1g73470	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	A21.BamHI.1F A21.EcoRV.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI EcoRV	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF35.2</b>	cDNA At1g08010	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	A17.BamHI.1F A17.PmlI.2R		BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF36A</b>	cDNA At5g18810	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif36A.1.BamHI.F rif36A.2.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF36B</b>	cDNA At5g18820	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif36B.1.BamHI.F rif36B.2.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
<b>pC-RIF36C</b>	cDNA At5g18830	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif36C.1.SpeI.F rif36C.2.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	SpeI PmlI	pCAMBIA 1303 (SpeI,PmlI)

## MATERIALS I MÈTODES

Construcció	Fragment de DNA clonat	Origen del DNA clonat	Oligonucleòtids	Vector de clonatge primari	Enzims de restricció usats per digerir l'insert	Vector de clonatge final
pC-RIF39	cDNA At5g51820	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif39A.SpeI.1F rif39A.PmlI.2R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	SpeI PmlI	pCAMBIA 1303 (SpeI,PmlI)
pC-RIF44	cDNA At3g18080	cDNA de flors d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif44A.F.BamHI rif44A.R.PmlI	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
pC-RIF45	cDNA At1g21920	cDNA de plàntules d' <i>Arabidopsis</i> (RT-PCR)	rif45.BamHI.F rif45.PmlI.R	pBLUESCRIPT SK+ (SmaI)	BamHI PmlI	pCAMBIA 1303 (BglII,PmlI)
pGFP-TPRIF21	cDNA At5g64940 corresponent al pèptid de trànsit	pC-RIF21	rif21.NcoI.F rif21.TP.SalI		NcoI SalI	pGFP PAU (NcoI,SalI)
pGFP-RIF21	cDNA At5g64940	pC-RIF21	rif21.NcoI.F rif21.nostop.SalI		NcoI SalI	pGFP PAU (NcoI,SalI)

Per tal d'obtenir la construcció pC-DXS1DXS2, que conté la regió codificant del pèptid de trànsit de la DXS1 fusionat a la forma madura de la DXS2, es va seguir una estratègia més complexa. El fragment corresponent a la regió codificant del cDNA de la DXS2 sense el pèptid de trànsit es va amplificar per PCR utilitzant els oligonucleòtids DXS2noTP i DXS2.S3. A continuació es va realitzar una segona reacció de PCR utilitzant aquest fragment conjuntament amb el DNA de la construcció pBI121DXS1 que conté el cDNA de la DXS1. El fragment codificant pel pèptid de trànsit de DXS1 es va amplificar usant com encebadors el fragment de DXS2 i l'oligonucleòtid DXS1BamHI, de manera que es va obtenir el fragment desitjat que va acabar sent amplificat amb els oligonucleòtids DXS1BamHI i DXS2.S3.

### 5.1.2 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 ADN 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*.
- ADN 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.
- Nitrògen 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 preatempat 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 previament 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 preatempat a 4°C.

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

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

## MATERIALS I MÈTODES

### SOLUCIÓ TFB I:

Acetat postàssic.....	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.	

La transformació per xoc tèrmic de les cèl·lules competents obtingudes per aquest mètode es porta a terme igual que per les cèl·lules competents convencionals.

## 5.2 Tècniques d'hibridació d'àcids nucleics

### 5.2.1 Sondes utilitzades en els experiments de *northern-blot*

Pels experiments de *northern-blot* es van utilitzar sondes marcades amb dCTP-<sup>32</sup>P, utilitzant el kit *Ready-To-Go DNA labelling beads (-dCTP)* (Amersham-Pharmacia Biotech). El treball amb isòtops radioactius d'aquest tipus requereix extremar les precaucions, en el sentit d'evitar tot el que sigui possible l'exposició directa a les partícules β emeses, altament penetrants. Amb aquesta finalitat, treballar sempre vestint dos parells de guants i bata, protegint-se de la font de radioactivitat mitjançant mampares de metacrilat. Així mateix, s'ha de controlar sistemàticament la zona amb un comptador Geiger, així com respectar les normes pel tractament de residus marcats radioactivament amb isòtops del P.

Per tal d'obtenir les sondes d'interès, es van utilitzar els següents motlles:

-DXS1: Es va utilitzar el fragment de restricció amb EcoRV del clon H2A12, resultant en un fragment de 829 pb corresponent a la regió 5' del gen DXS1.

-DXR: A partir de la construcció pDXRA1.3 (Carretero-Paulet 2003) i després de digerir amb l'enzim de restricció EcoRV es va recuperar un fragment de 1378 pb procedent de la zona 5' del gen DXR.

-25S. Es va alliberar el fragment que codifica per l'rRNA25S, clonat en el vector pBLUESCRIPT, digerint amb l'enzim de restricció EcoRI. Es va utilitzar aquest motlle per tal d'obtenir la sonda 25S, la qual va permetre la normalització dels experiments de *northern-blot* realitzats.

## Materials

- [<sup>32</sup>P]dCTP a 3000Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech).
- Kit *Ready-To-Go DNA labelling beads (-dCTP)* (Amersham-Pharmacia Biotech).

- Bloc tèrmic.
- Comptador Geiger.
- Sonda d'ADN desnaturalizada.
- EDTA 0,5 M.
- Columnes cromatogràfiques *Poly-prep* (0,8x4cm) de *BioRad*.
- Resina *Sephadex G-50 SF* (*Amersham-Pharmacia Biotech*).
- Tampó TE
- Comptador d'escintil·lació 1209 *Rackbeta de Wallac*.

## Mètode

El kit de marcatge conté una barreja de reacció liofilitzada i estable a temperatura ambient que conté el tampó de reacció, barreja de desoxiribonucleòtids (excepte dCTP), la subunitat Klenow de l'ADN polimerassa així com una combinació aleatòria d'oligodesoxinucleòtids de 9 bases. El sistema permet marcar radioactivament fragments de restricció prèviament purificats i desnaturalitzats mitjançant una reacció de polimerització que utilitza els oligodesoxinucleòtids com a encebadors.

1.- Desnaturalitzar uns 50-100 ng de motlle bullint durant 5 min a 95-100°C i passant a continuació a gel almenys 2 min més.

2.- Preparar la següent barreja de reacció sobre el preparat del kit:

### BARREJA de REACCIÓ:

ADN motlle desnaturalitzat.....≈100 ng  
 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ .....50  $\mu\text{Ci}$   
 $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p.....50  $\mu\text{l}$

3.- Incubar de 30 min a 1 hora en bloc tèrmic a 37 °C .

4.- Parar la reacció de la polimerassa afegint 2  $\mu\text{l}$  d'EDTA 0,5 M, i passar a un bany amb gel.

5.- Preparar una columna de cromatografia amb 1 ml de resina *Sephadex-G50*. Rentar amb tampó TE evitant en tot moment que arribi a assecar-se.

6.- Una vegada eluida la columna completar la barreja de reacció amb TE fins a 200  $\mu\text{l}$ , i passar per la columna, recuperant el volum eluït en un tub de microcentrífuga. Repetir el procés 4 vegades més, afegint en cada cas 200  $\mu\text{l}$  de TE i recuperant l'eluït en un tub nou.



## MATERIALS I MÈTODES

7.- Recuperar alíquotes d'1 µl de cada fracció eluida en un tub de centelleig.

8.- Determinar la radioactivitat de cada fracció en un comptador d'escintil·lació. En funció dels resultats obtinguts, aplicar la següent fórmula per a determinar la quantitat total de marca radioactiva a utilitzar:

$$\text{Vol. Sonda (en } \mu\text{l)} = [1-2 \times 10^6 \text{ c.p.m./ml}] \times [\text{vol (en ml) de sol de hibridació/activ sonda (en c.p.m./}\mu\text{l)}].$$

9.- Afegir el volume resultant a la solució d'hibridació, desnaturizant previament la sonda com s'ha indicat en 1.

### 5.2.2 Northern-blot

El *northern-blot* constitueix la tècnica de referència per a la identificació i l'anàlisi de transcrits d'ARN. A l'hora de treballar amb ARN, han de seguir-se les precaucions referides en l'apartat 4.3.3.

### Materials

- Material de vidre fornejat.
- DEPC.
- Tampó de desnaturalització.
- Marcador de pesos moleculars d'ARN: *0.24-9.5 Kb RNA ladder de Life Technologies* o *RNA Molecular Weight Marker I (0,3-6,9 kb) (Roche)*.
- Solució de tinció.
- Solució d'hibridació.
- MOPS 10x.
- SSC 20x.
- Solució de rentat.
- Solució d'stripping.
- Tampó de càrrega.
- Membranes de nailon Hybond N+.

- Paper de filtre Whatmann 3MM<sup>®</sup> i paper de filtre normal.
- Solució de Br-Et 1 mg/ml.
- Sistema d'electroforesi.
- Sistema de transferència de gels d'agarosa.
- SSC 20x
- SDS 10 %.
- Càmera d'ultravioleta (*Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker de Spectronics Co.*) i estufa a 80°C .
- Agitador tèrmic.

## Mètode

1.- Preparar una solució d'agarosa al 1,2 % en aigua. Una vegada atemperat a 50 °C, completar amb MOPS 10x fins a 1x i amb formaldehid fins a un 2,2 %. El formaldehid és un al·lèrgen fort i convé evitar la inhalació de vapors fortament irritants, per la qual cosa és aconsellable preparar el gel dintre d'una campana d'extracció de gasos. El formaldehid confereix propietats desnaturalitzants al gel, encara que té com a contrapartida el fet de fer-lo més trencadís. És recomanable a més preparar el gel el més prim possible, doncs facilitarà el procés posterior de transferència.

2.- Concentrar les mostres d'ARN tal com es descriu a l'apartat 4.3.3. Es va treballar amb quantitats d'entre 10-20 µg d'ARN total.

3.- Desnaturalitzar les mostres portant fins a 20 µl amb tampó de desnaturalització i incubar 10 min a 65°C. Refredar i mantenir en gel fins que siguin carregades en el gel.

4.- Afegir 3,22 µl de tampó de càrrega.

5.- Omplir la cubeta amb MOPS 1x fins a cobrir lleugerament el gel. Amb l'objecte de netejar els pouets del gel pot aplicar-se un voltatge reduït (2-3 V/cm) abans de carregar.

6.- Carregar les mostres en el gel. Reservar un dels pouets pel marcador. Aplicar un voltatge de 3 V/cm de gel durant 15 min i, una vegada que les mostres hagin entrat en el gel, deixar migrar de 2 a 3 h a 5-7 V/cm, fins que el front de migració hagi arribat als 2/3 de la longitud del gel. És convenient barrejar la solució de migració d'ambdós costats de la cubeta cada 30-60 min, per tal d'assegurar la conductància.

7.- Verificar, amb ajuda del transiluminador, la integritat de les mostres de ARN en el gel. Fotografiar el gel acompanyat d'una regla que permeti precisar posteriorment sobre la pel·lícula

## MATERIALS I MÈTODES

d'autoradiografia la mobilitat de la banda resultant. La imatge servirà, a més, per a normalitzar els carrils en quant a la quantitat d'ARN carregada.

8.- Rentar el gel 2 vegades amb H<sub>2</sub>O durant 20 min per eliminar l'excés de formaldehid i Br-Et.

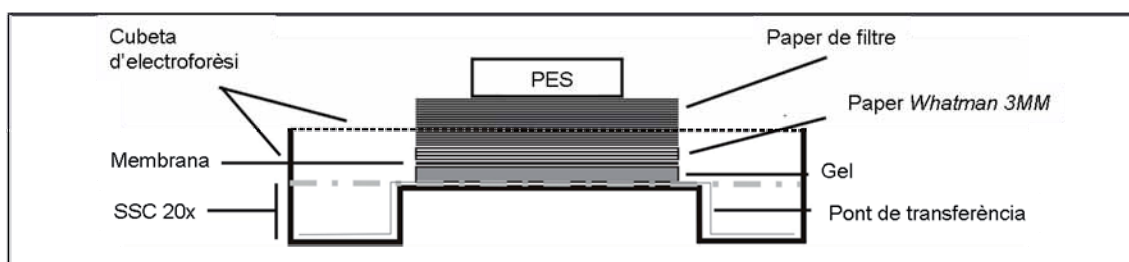
9.- Muntar el sistema de transferència dintre de la cubeta de electroforesis (un cop rentada amb aigua, sabó i etanol absolut) tal i com s'indica en l'esquema de la Figura V.3.

Per tal d'evitar possibles interferències en la transferència, la zona de pouets del gel va ser retallada amb l'ajuda d'un bisturí. A continuació es van realitzar els següents rentats:

-2 de 20 min amb H<sub>2</sub>O estèril.

-1 de 1 min amb SSC 20x (solució de transferència).

Col·locar el gel sobre el portagels a sobre del pont salí de transferència obtingut retallant una tira de paper Whatmann 3MM® de les dimensions adequades (30x7,5 cm) i que prèviament s'ha remullat en solució de transferència. Sobre aquest pont, i manipulant en tot moment amb unes pinces milipore, situar cuidadosament la membrana de nailon que s'haurà retallat segons les dimensions del gel, previa incubació uns minuts en SSC 2x. Després d'afegir unes gotes d'SSC 2x, passar una pipeta sobre el conjunt per evitar la formació de bombolles d'aire i eliminar les que ja hagin aparegut. Afegir 2-3 papers Whatmann 3MM®, també prementats en SSC 2x, i una pila de papers de filtre de 3-4 cm. Per acabar, es col·loca un pes a sobre, vigilant de que tot el sistema estigui perfectament horitzontal. Una vegada muntat tot el conjunt, afegir SSC 20X a la cubeta fins el nivell indicat en la Figura 3, i cobrir tota la superfície del muntatge amb plàstic Saram-Wrap per tal d'evitar l'evaporació del tampó de transferència.



**Figura 3:** Representació esquemàtica del muntatge de la transferència del *northern-blot*.

10.-Deixar transferint tota la nit. Després de 12-18h recuperar la membrana, rentar uns 3 min en SSC 2x i secar-la breument sobre un paper *Whatmann 3MM*. Convé fer un tall en una de les cantonades de la membrana amb un bisturí per facilitar posteriorment la orientació.

11.- Per valorar l'eficiència de la transferència, la membrana i el gel poden fotografiar-se amb el transiluminador de UV. Per fixar l'ARN, s'aplica una radiació de 254 nm durant uns segons amb una

càmera ultravioleta (*Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker de Spectronics Co*), una vegada que la membrana està totalment seca. Així s'aconsegueix que la unió de l'ARN a la membrana sigui de naturalesa covalent, i per tant més estable.

## **Hibridació**

Per tal de realitzar la hibridació de la sonda, es van seguir els següents passos, sempre utilitzant un forn d'hibridació giratori:

- 1.- Rentar la membrana durant 10 min en SSC 2x a temperatura ambient.
- 2.- Prehibridació: Mantenir la membrana almenys 1 hora a 65 °C en el tub d'hibridació que conté la solució d'hibridació. Utilitzar al voltant d'1-2 ml/10 cm<sup>2</sup> de membrana.
- 3.- Canviar la solució d'hibridació i afegir-ne de nova suplementada amb la sonda marcada amb dCTP-<sup>32</sup>P (apartat 5.2.3.), prèviament desnaturalitzada. Deixar incubar la membrana a 65 °C tota la nit en el forn giratori.

## **Rentats de membrana**

Es van obtenir resultats òptims rentant sota les següents condicions:

- 1.-3 rentats de 15 min a 60°C en solució de rentat.
- 2.- Retirar la membrana del tub i eliminar l'última solució de rentat. Segellar la membrana dins una bossa de plàstic i exposar sobre una pantalla phosphorimager. En funció del grau de decaïment de la marca i de l'abundància relativa del transcrit a estudi van ser necessaris entre 12 hores i 14 dies de contacte per a obtenir resultats satisfactoris. El marcatge es visualitza utilitzant el densitòmetre *Molecular Imager FX (Biorad)*, i les intensitats de banda es quantifiquen utilitzant el software *Quantity One (BioRad)*.

## **Tinció de la membrana**

Aquest mètode permet tenir específicament l'ARN sobre una membrana de nailon amb l'ajuda del blau de metilè. D'aquesta manera, es poden comparar les quantitats d'ARN que han estat realment transferides a la membrana:

- 1.-Incubar 30 min en SDS 1 % a temperatura ambient per eliminar les restes de colorants del tampó de càrrega.
- 2.-Rentar 3 vegades en aigua a temperatura ambient per eliminar l'excés d'SDS.

## MATERIALS I MÈTODES

3.-Tenir amb solució de tinció durant 5-10 min.

4.-Rentar 2-3 vegades amb aigua per períodes de diversos minuts fins que es resolguin correctament les bandes d'ARNr.

### **Deshibridació de la membrana (*stripping*)**

S'aconsegueixen resultats satisfactoris utilitzant la mateixa membrana per a diverses rehibridacions, sempre que aquesta no arribi a assecar-se completament.

1.-Rentar la membrana amb H<sub>2</sub>O.

2.-Dur a ebullició la solució d'*stripping* sobre un agitador tèrmic.

3.-Submergir la membrana i mantenir uns 15 min. Repetir aquest pas renovant la solució.

4.-Procedir a la rehibridació amb la nova sonda des del pas de prehibridació.

#### MOPS 10x:

MOPS.....0,2 M  
Acetat sòdic.....80 mM  
EDTA 0,4 M.....10 mM  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC .....q.s.p  
Ajustar a pH=7 amb NaOH.  
Autoclavar 20 min a 120 °C.  
Conservar a 4 °C i protegir de la llum.

#### SSC 20x

NaCl.....3 M  
Citrato sòdic.....0,3 M  
Ajustar a pH=7 con HCl.  
Autoclavar 20 min a 120 °C.  
Conservar a temperatura ambient

#### TAMPÓ de CÀRREGA:

EDTA pH=8.....1 mM  
Glicerol.....50 % (v/v)  
Blau de bromofenol.....0,25 % (v/v)  
Xilè-cianol.....0,25 % (v/v)  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....q.s.p.  
Conservar a T<sup>a</sup>A.

#### SOLUCIÓ de TINCIÓ:

Blau de metilè.....0,04 % (p/v)  
Acetat sòdic pH=5,2-5,6.....500 mM  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....q.s.p.

#### TAMPÓ de DESNATURALITZACIÓ (30 mostres):

H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....206 µl  
MAE 20x.....60 µl  
Br-Et 1mg/ml.....8 µl  
Formaldehid.....30 µl  
Formamida.....300 µl  
Preparar en la campana abans de fer servir.

#### SOLUCIÓ d'HIBRIDACIÓ:

Tampó fosfat pH=7,4.....0,3 M  
SDS.....7%(p/v)  
EDTA 0,5M.....1 mM  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....q.s.p.

#### SOLUCIÓ de RENTAT:

SSC 20x.....1x  
SDS.....0,1%(p/v)  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....q.s.p.

#### SOLUCIÓ d'STRIPPING:

SSC 20x.....0,1x  
SDS.....0,1%(p/v)  
H<sub>2</sub>O mili Q-DEPC.....q.s.p.

## 5.3 Anàlisi de proteïnes mitjançant *Western-blot*

### 5.3.1 Anticossos utilitzats

S'han utilitzat els següents anticossos:

-Anti-DXS: Aquest anticòs va ser produït immunitzant conills en el Servei de Producció d'Anticossos de l'IBMB-CSIC, amb la proteïna fusió  $\Delta$ DXS1-6His (Resultats, 1.2.1) purificada mitjançant cromatografia d'afinitat (apartat 5.4.5).

-Anti-DXR: anti-6x-His-ZmDXR (Hans i col. 2004). Aquest anticòs reconeix també una banda inespecífica, els nivells de la qual s'han utilitzat per normalitzar els nivells de proteïna DXR detectada (Flores-Perez i col. 2008). La rehibridació amb aquest anticòs de membranes hibridades prèviament amb l'anticòs anti-DXS, ha permès normalitzar també els nivells de proteïna DXS detectada.

### 5.3.2 *SDS-PAGE*

L'electroforèsi 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'electroforèsi permet afinar les condicions per tal de millorar la resolució.

## Materials

- Font d'electroforèsi.
- 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.

## MATERIALS I MÈTODES

- 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 peroxidassa de rave (HRP) (*GE Healthcare*).
- Sistema de detecció quimiluminiscent per antigens conjugats a la HRP i immovilitzats 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'acoplament 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. Agregar 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'estiguéssin 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'ELECTROFORESIS 10X:

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

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

#### 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 alícuotes 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.



## MATERIALS I MÈTODES

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 promouràn 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 minuts 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-DXS: 1/1000.

-Anti-DXR: 1/5000.

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 1/5000.

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 destilada 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 Sérica Bovina).....1 %  
FCS (Serum Fetal Boví).....5 %  
Alicuotar 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.

## MATERIALS I MÈTODES

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 DESTINCIÓ:

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

### 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

## **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.

## 5.4 Sobreexpressió i purificació de proteïnes recombinants

### 5.4.1 Soques utilitzades

Per tal de sobreexpressar proteïnes recombinants a *E. coli*, s'ha utilitzat la soca BL21(DE3)pLysS. Aquesta soca s'associa a vectors d'expressió controlats pel promotor T7, que és un promotor fort que en condicions d'inducció dona elevats nivells d'expressió, tot i que només ho fa en resposta a l'acció de l'ARN polimerassa de T7 i no de l'ARN polimerassa d'*E. coli*. És per aquest motiu que la soca BL21 integra en el seu genoma el gen que codifica per la polimerassa del fag T7 sota el control de l'operó lac i és induïble per IPTG. Alhora, incorpora el plàsmid pLysS que li confereix resistència a cloramfenicol i que codifica per la proteïna lizozim de T7 la qual és inhibidora de l'acció de la T7 ARN polimerassa. Amb aquest sistema, s'aconsegueix reduir al mínim l'efecte de l'expressió basal de la polimerassa, i resulta útil per tal d'expressar proteïnes recombinants tòxiques per la cèl·lula hoste. Un segon element que fa molt adequada aquesta soca, i que és també el resultat d'una manipulació genètica del seu genoma, és el fet que moltes de les proteïnes endògenes del microorganisme han estat deshabilitades de manera que es redueix significativament la degradació de la proteïna recombinant durant el procés de purificació.

### 5.4.2 Vectors d'expressió de proteïnes recombinants

Els cDNAs de les proteïnes que s'han sobreexpressat en aquest treball han estat clonats en el vector pET-23a (Invitrogen). Aquest és un plàsmid d'alt nombre de còpies (amb origen de replicació pBR322) que confereix resistència a l'ampicilina, i que és controlat en la cèl·lula hoste pel promotor T7 que és reconegut per l'ARN polimerassa del fag T7. Les característiques del plàsmid permeten modificar la proteïna recombinant introduïnt una cua de 6 histidines en la regió C-terminal que, posteriorment, facilitarà el procés de purificació.

### 5.4.3 Expressió de proteïnes recombinants

Per a obtenir quantitats grans de proteïna recombinant, s'ha utilitzat bàsicament un sistema d'expressió heteròleg basat en la combinació de la soca BL21(DE3)pLysS i el vector pET-23a. Per tal de solucionar problemes d'expressió, s'ha incorporat en el bacteri hoste un altre plàsmid adicional, el pUBS520, que codifica per RNAt inusuals a *E. coli*, ajudant a l'expressió de proteïnes heteròlogues amb codons inusuals.

## Materials

- Medi LB.
- Cloramfenicol 34 mg/ml, kanamicina 100 mg/ml i ampicilina 100 mg/ml en solució aquosa.
- Estufa a 37°C.

## MATERIALS I MÈTODES

- Càmera d'incubació amb agitació a temperatura variable.
- IPTG.

### Mètode

1.- Transformar per, xoc tèrmic, cèl·lules de la soca d'expressió escollida amb la construcció d'interès, sembrant en placa suplementada amb els antibiòtics adequats per un correcta selecció de les cèl·lules transformants. Cal fer-ho amb una dilució adient per tenir colònies clarament aïllades (10-40 colònies per placa). Després, incubar a 37°C durant 14 h.

2.- Per tal d'assegurar un fons genètic únic, es pica una colònia aïllada i s'inocula un precultiu de medi LB suplementat amb els antibiòtics de selecció. S'incuben les cèl·lules a 37°C i agitació de 200 r.p.m. durant un període de 12-16 h.

3.- S'utilitza aquest precultiu per inocular una dilució 1:100 del cultiu de LB suplementat amb els antibiòtics de selecció.

4.- Es fa créixer el cultiu a 37°C amb agitació constant (150-200 r.p.m.) seguint el creixement per determinació de la densitat òptica a 600 nm (DO600) fins que arribi a 0,4 aproximadament. En aquest punt es pot agafar mostra (1 ml) que posteriorment servirà com a control a temps 0 (T=0). El cultiu s'atempere uns 20 minuts a la temperatura d'inducció i s'afegeix l'IPTG a una concentració final d'entre 0,2-1 mM. Aquesta concentració d'IPTG, la temperatura i el temps d'expressió depèn de cada cas, i requereix una posta a punt. En el nostre cas, es van obtenir bons resultats a una temperatura de 22°C durant 16 h.

5.- Finalment es recull 1 ml de mostra de la suspensió i es comprova que la sobreexpressió ha funcionat correctament, comparant-la amb la mostra T=0 recollida anteriorment mitjançant *SDS-PAGE* (apartat 5.3.2).

#### 5.4.4 Obtenció dels extractes cel·lulars

Després d'expressar les proteïnes recombinants d'interès, es va procedir a realitzar l'extracte cel·lular proteic, ja fos per obtenir una fracció proteica soluble sobre la que realitzar els assajos enzimàtics pertinents, o per posteriorment purificar les proteïnes recombinants corresponents.

### Materials

- Centrífuga Beckman J2-21 i rotor adequat.
- Tampó A.
- EDTA.

- Lisozim.
- Sonicador.
- Sulfat de protamina.
- Cocktail d'inhibidors de proteases *Complete.mini EDTA free (Roche)*.

## Mètode

1.-Es centrifuguen els cultius a 5.000 r.p.m. durant 10 min a 4°C per recol·lectar les cèl·lules en forma de sediment i poder-ne eliminar el medi de cultiu. En aquest pas el sediment que es forma és bastant consistent, de manera que el fre de la centrifuga es pot posar al màxim per parar-lo més ràpidament sense perill que les cèl·lules es resuspenguin.

2.-Mantenint el sediment en gel en tot moment, aquest es resuspèn en tampó de lisi. El tampó de lisi es prepara a partir de tampó A, lisozim a 1mg/ml, i una pastilla d'inhibidors de proteases *Complete-mini EDTA free (Roche)* per cada 10 ml de tampó utilitzat. Tots aquests elements s'afegeixen per tal d'inhibir les proteases cel·lulars que s'alliberaran al trencar les cèl·lules i que podrien degradar la proteïna recombinant. La inhibició pot ser directe com és el cas de les pastilles comercials que inactiven les serin i cistein-proteases, o de forma indirecta com l'EDTA que és un agent quelant de cations divalents com el calci, el qual resulta imprescindible per l'activitat de moltes proteases. El paper del lisozim és totalment diferent ja que és capaç de trencar enllaços del peptidoglicà, i per tant s'encarrega de debilitar la paret cel·lular i facilitar el posterior trencament dels bacteris.

3.-La suspensió de cèl·lules s'incuba en gel durant 20 min. Aquesta incubació només es realitza si s'ha afegit lisozim al tampó, i també es pot obviar quan es treballa amb una soca especialment sensible o si la proteïna recombinant es degrada amb facilitat.

4.-A continuació, es sonica la suspensió per trencar les cèl·lules i alliberar el seu contingut al medi. Mantenint en tot moment la suspensió en gel, s'apliquen 5 polsos de 30 s a una potència de 30W, deixant intervals d'un minut traient la sonda del tampó, per evitar que la mostra s'escalfi en excés.

5.-Centrifugar la suspensió a 12.500 r.p.m. durant 30 min. a 4°C per separar la fracció soluble de les restes cel·lulars. L'objectiu és obtenir un sobrenadant clar i translúcid, però si està tèrbol, ens està indicant que hi ha un excés de DNA que s'ha d'eliminar. Per fer-ho, s'afegeix una solució de sulfat de protamina al 1% (p/v) en una proporció de 7:1 d'extracte-sulfat de protamina. S'incuba uns 20 min a 4°C, temps en el qual el sulfat s'unirà a l'ADN i el farà precipitar. Finalment, es centrifuga a 15.000 r.p.m. durant 30 min a 4°C, i amb una parada suau i es recupera el sobrenadant.

## MATERIALS I MÈTODES

### 5.4.5 Purificació

El mètode de purificació seguit va ser la Cromatografia d'Afinitat amb Cations Metàl·lics Immobilitzats (IMAC). Es basa en la interacció forta que es dona (a través d'enllaços de coordinació) entre determinats aminoàcids de les proteïnes (principalment la histidina), i els ions metàl·lics que previament s'han immobilitzat en una matriu absorbent.

Aprofitant aquesta propietat, en el clonatge es va utilitzar un vector que afegeix a la seqüència de la proteïna recombinant un fragment extra d'ADN que codifica per 6 histidines en l'extrem C-terminal. Aquesta seqüència addicional ens permet, gràcies a la seva gran afinitat pel níquel, purificar la proteïna eficientment en un únic pas.

A nivell esquemàtic, la purificació consisteix en fer passar l'extracte cel·lular per una columna prèviament carregada amb  $\text{Ni}^{2+}$ , de manera que la proteïna d'interès amb la cua d'histidines quedarà retinguda per afinitat amb el metall mentre que la resta eluirà a través de la columna. La proteïna recombinant es recupera utilitzant un gradient de concentració d'imidazol, de manera que s'estableix una competència entre les histidines i l'imidazol per ocupar les posicions de coordinació del níquel. A partir d'una determinada concentració d'imidazol, aquest provoca l'elució de la proteïna d'interès. La quantitat d'imidazol necessària varia segons la proteïna, però en general és de l'ordre de 100-150 mM.

### Materials

- Filtre estèril de tamany de porus  $\Phi=22 \mu\text{m}$ .
- Columna Hi-Trap Chelating HP (*Amersham Biosciences*).
- Sulfat de Níquel.
- *Biologic Controller*, *Biologic Workstation* i *2110 Fraction Collector* (*Bio-Rad*)
- Glicerol.
- EDTA.
- Etanol.

### Mètode

El sobrenadant obtingut, es fa passar per un filtre de tamany de porus  $\Phi=22 \mu\text{m}$ . Aquest procés es duu a terme per tal d'allargar el temps de vida útil de les columnes comercials que es fan servir, ja que cal evitar la presència de cossos estranys que la puguin obturar.

Paral·lelament es prepara la columna Hi-Trap Chelating HP, (*Amersham Biosciences*) carregant la matriu amb 3 ml de solució de sulfat de níquel 0,1 M (la columna agafa un tò blavós) amb l'ajut d'una xeringa. Es neteja l'excés de níquel fent passar 5-10 volums d'aigua i s'equilibra passant-hi 5-10 volums de tampó A.

En aquest moment la columna està preparada per iniciar la cromatografia que es realitza amb l'ajut d'un cromatògraf format per dos components: “*Biologic Controller*” i “*Biologic Workstation*”, (*BIO-RAD*).

1.-Es fa passar tampó A per la columna fins estabilitzar les lectures d'absorbància i conductivitat.

2.-Es fixa el zero d'absorbància a 280 nm (longitud d'ona de seguiment de proteïnes). En aquest punt s'atura el protocol, es treu la columna del sistema i amb una xeringa es fa passar l'extracte a través de la columna procurant no fer una pressió excessiva que la podria malmetre.

3.-Es torna a acoblar la columna i s'hi fa passar un volum gran (15 ml aproximadament) de tampó A que arrossegui tota la proteïna no retinguda. En aquest punt en el cromatograma apareix un pic gran d'absorbància reflex de les proteïnes de *E. coli*, que poc a poc va decreixent fins a recuperar-se el zero.

4.- S'inicia un gradient lineal d'imidazol desde 10 mM fins a 500 mM que s'aconsegueix variant la proporció de tampó A i B que es fa passar per la columna. En aquest instant es redirigeix la sortida de la columna cap a un col·lector de fraccions (“*2110 fraction collector*”, *BIO-RAD*) on es recull en volums d'1 ml. En el cromatograma es mostra el gradient i l'increment de conductivitat associat. Quan la concentració d'imidazol és suficient, té lloc l'elució de la proteïna que es revela per l'aparició d'un pic d'absorbància a 280 nm.

Per preservar l'activitat de l'enzim recombinant, s'afegeix glicerol a una concentració final de 50% a les fraccions per impedir la congelació quan el guardem a -20°C. La columna es renta fent passar uns 5 ml d'aigua, se li elimina el níquel utilitzant 2-5 ml d'EDTA 0,5M, es fa passar etanol al 20% (uns 10 ml), i es guarda a 4°C.

#### TAMPÓ A

Tris-HCl..... 40 mM  
 NaCl.....100 mM  
 NaN<sub>3</sub>.....0,04%(p/v)  
 2-Mercaptoetanol.....4 mM  
 Imidazol.....10 mM  
 pH 8.0

#### TAMPÓ B

Tris-HCl.....40 mM  
 NaCl.....100 mM  
 NaN<sub>3</sub>.....0,04%(p/v)  
 2-Mercaptoetanol.....4 mM  
 Imidazol.....500 mM  
 pH 8.0

El tampons es passen per un filtre de tamany de porus  $\Phi=22 \mu\text{m}$ , i es desgasifiquen per evitar la formació de bombolles a l'interior de la columna.



### 5.5 Tècniques basades en la utilització d'ADN polimerases termoestables

#### 5.5.1 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 i col., 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 i 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 ADN polimerases) o Pfu ADN polimerasa (ADN polimerases termoestables) 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 desde l'elecció de l'ADN polimerassa 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  $T_m$  dels oligonucleòtids, que és la temperatura en la qual el 50% d'aquests estaràn 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:

$$T_m = [4 \times (C + G)] + [2 \times (A + T)]$$

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

### Clonatge d'ADNc:

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

#### REACCIÓ:

Motlle\*.....ADNc  
 dNTP.....0,2 mM  
 Tampó d'activitat.....1x  
 Oligonucleòtid sentit.....0,5 mM  
 Oligonucleòtid antisentit.....0,5 mM  
 Pfu ADN polimerassa.....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 d'ADNc 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 ADN polimerassa 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 desitgi analitzar.

## MATERIALS I MÈTODES

### 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-1 min/Temp. anellament  
Extensió.....30 seg-1 min/72°C  
Repetir 35xcicles desde el pas 2  
Extensió final.....6 min/72°C

## **Anàlisi de línees transgèniques**

Partint d'ADN preparat segons es descriu en l'apartat 4.3.1. (minipreparació d'ADN genòmic) i seguint el següent protocol de *PCR* es va verificar de forma senzilla la presència del transgèn en les plantes estudiades.

### REACCIÓ:

Motlle .....50 ngr ADN  
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

Alhora de verificar la presència del transgèn en les diferents plantes transgèniques generades, es va utilitzar l'oligonucleòtid p35S, complementari a la regió promotora CaMV35S, mentre que l'oligonucleòtid antisentit es va dissenyar per cadascun dels transgèns estudiats.

### **5.5.2 RT-PCR**

Aquesta tècnica combina la capacitat de l'enzim Transcriptasa Reversa (RT), per a sintetitzar una cadena d'ADNc a partir d'un motlle d'ARN, amb la facultat d'amplificar seqüències nucleotídiques específiques que proporciona la tècnica de *PCR*. Les seves aplicacions són múltiples com, per exemple, la de generar productes amb la seqüència d'ADNc desitjada per al seu clonatge. Es va utilitzar el Kit "*RETROscript*" (*Ambion*) seguint les indicacions del proveïdor:

#### **1.- Desnaturalització del motlle:**

### REACCIÓ:

ARN total.....1-2 µg  
Barreja de decanucleòtids 50 µM.....2 µl  
H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....fins a 20 µl

Incubar durant 3 min a 80°C i transferir a un bany amb gel.

## 2.- Reacció de RT:

### REACCIÓ (afegir):

Tampó de RT 10x.....2 µl

Barreja de dNTPs 2,5 mM.....4 µl

"RNase inh".....1

Transcriptasa reversa (MMLV-RT)\*.....1 µl

H<sub>2</sub>O miliQ q.s.p.....fins a 20 µl

\* Transcriptasa Reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

Incubar durant 1 hora a 44°C, i seguidament inactivar l'enzim a una temperatura de 92°C durant 10 min.

En aquest punt, es disposa de l'ADNc del conjunt de gens expressats en el teixit del qual s'ha extret l'ARN. A partir d'aquest ADNc i utilitzant la tècnica de la PCR tal com s'ha descrit anteriorment, s'han amplificat els diferents ADNc d'interès per ser clonats posteriorment en els vectors adequats.

### 5.5.3 Seqüenciació

S'ha utilitzat el sistema *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*. El sistema conté una barreja de terminadors etiquetats amb marcadors fluorescents, deoxinucleòsids-trifosfat, tampó de reacció, MgCl<sub>2</sub>, i una versió millorada de la Taq ADN polimerasa. D'aquesta manera, només cal afegir a la barreja de reacció el motlle d'ADN sobre el que es vol realitzar l'entrada de seqüència i l'oligonucleòtid corresponent.

#### REACCIÓ:

Barreja de reacció.....4 µl

ADN .....50-200 ng

OLIGO 10 µM.....0,3 µl (1,6 pmol)

H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada q.s.p.....10 µl

#### PROGRAMA PCR:

Desnaturalització.....10 seg/96°C

Anellament.....10 seg/50°C

Extensió.....4 min/60°C

Repetir 24xcicles.

Finalment, les mostres es van portar a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona on es va netejar la barreja de reacció, resoldre el gel de seqüència i remetre el cromatograma amb els resultats corresponents.

### 5.6 Identificació del lloc d'inserció del T-DNA dels mutants *rif*

Per tal d'identificar la regió del genoma adjacent al lloc d'inserció del T-DNA en els mutants *rif* es van utilitzar dues tècniques: la PCR inversa i la Walking PCR. Ambdues tècniques permeten l'amplificació mitjançant PCR de fragments de DNA de seqüència no coneguda contigus a fragments de DNA de seqüència coneguda, i són àmpliament utilitzades per identificar el lloc d'inserció dels T-DNAs.

Aquestes dues tècniques van ser modificades depenent del lloc d'inserció i de la manera en què el T-DNA estava inserit. Per exemple, les tècniques utilitzades per identificar la regió adjacent al LB no

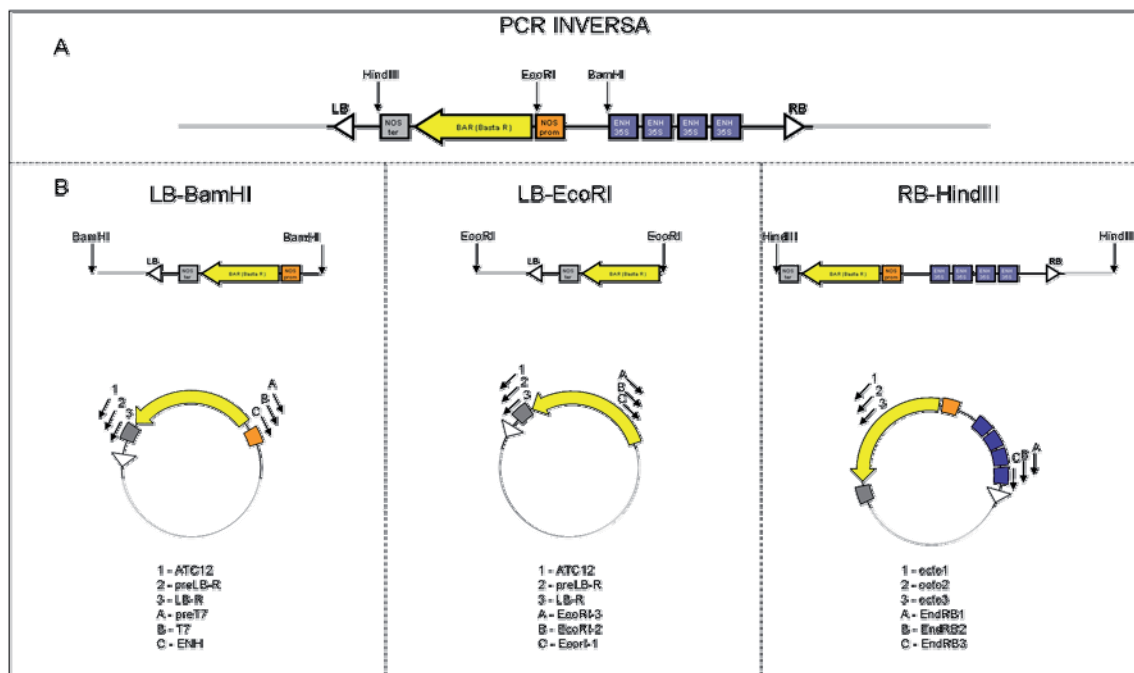
## MATERIALS I MÈTODES

eren adequades quan el T-DNA es trobava inserat en tàndem i amb els LB enfrontats. En aquest cas, es van passar estratègies alternatives que van permetre identificar la regió contigua al RB. També es van utilitzar diferents enzims de restricció quan algun mutant presentava problemes, pensant que depenent de la regió genòmica a identificar, algunes dianes podrien ser més adequades que d'altres. Cadascuna d'aquestes variacions requeria al mateix temps el disseny d'oligonucleòtids adequats.

Seguidament es descriuen les tècniques de la PCR inversa i la Walking PCR, així com les diferents variants que s'han utilitzat de cadascuna d'elles.

### 5.6.1 PCR inversa

La tècnica de la PCR inversa es basa en realitzar una reacció de PCR amb oligonucleòtids dissenyats sobre una seqüència coneguda però amb direccions oposades, de manera que en principi no podrien amplificar cap fragment. Si el fragment de DNA d'interès s'aconsegueix circularitzar, llavors els oligonucleòtids queden enfrontats i poden amplificar el fragment de DNA que els separa. El procediment està esquematitzat en la figura 4.



**Figura 4.** Representació esquemàtica de la PCR inversa. (A) Es mostra el T-DNA *d'activation tagging* inserit en una regió del genoma, i s'indiquen els punts de tall dins del T-DNA dels enzims de restricció utilitzats. (B) Es representa el procediment seguit, i es mostren les tres variants seguides, depenent de l'enzim de restricció utilitzat i de si es volia amplificar la regió contigua al LB o al RB. En cada cas, es representa l'hipotètic fragment d'interès obtingut després de digerir el DNA, la seva circularització una vegada lligat, i els oligonucleòtids que han permès amplificar de forma específica els fragments genòmics desitjats. En tots els casos es van realitzar tres *PCRs* amb els oligonucleòtids que s'especifiquen en la part inferior de la figura: *PCR I* (1+A), *PCR II* (2+B) i *PCR III* (3+C).

## Materials

- Termociclador.
- GoTaq®Green Master Mix, 2x (*Promega*).
- Tubs de paret fina de 0,2 o 0,5 ml.
- T4 DNA Lligassa (*Promega*) amb els seu tampó.
- Bany tèrmic.
- Estufa a 37°C.
- Enzims de restricció adequats amb els seus tampons corresponents.
- “*QIAPREP spin miniprep kit*” (*Qiagen*).
- Espectrofotòmetre (model “*Nanodrop-1000*”, *Thermo Scientific*).
- “*GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (*GE Healthcare*).
- Oligonucleòtids a 5-10 µM.

## Mètode

### Digestió

El primer pas va consistir en la digestió de l'ADN genòmic corresponent, amb enzims de restricció adequats. Aquests han de tallar en una zona d'interès del T-DNA, i preferentment han de generar extrems protuberants per tal d'afavorir la lligació que es realitza posteriorment. És important que els enzims utilitzats digereixin el DNA genòmic amb una alta freqüència, per tal que el fragment que es vol obtenir, que inclou part del T-DNA i el fragment de DNA genòmic contigu, tingui un tamany fàcilment amplificable per PCR (unes 3 Kb com a màxim). El DNA genòmic es digereix completament.

Així doncs, s'han seguit dues estratègies. L'una s'ha dissenyat per tal d'amplificar el fragment contigu al LB del T-DNA, i per fer-ho el DNA s'ha digerit amb BamHI (PCRinversa-LB-BamHI) o amb EcoRI (PCRinversa-LB-EcoRI). L'altra estratègia que s'ha utilitzat per identificar el fragment contigu al RB, ha comportat la digestió amb HindIII (PCRinversa-RB-HindIII). Depenent en la manera en què el T-DNA estava inserit en els diferents mutants, una estratègia ha resultat més adequada que l'altra. El producte de la digestió es va netejar utilitzant el *QIAPREP spin miniprep kit* de *Qiagen*, i posteriorment es va quantificar el DNA obtingut utilitzant l'espectrofotòmetre *Nanodrop-1000* (*Thermo Scientific*).

## MATERIALS I MÈTODES

### Lligació

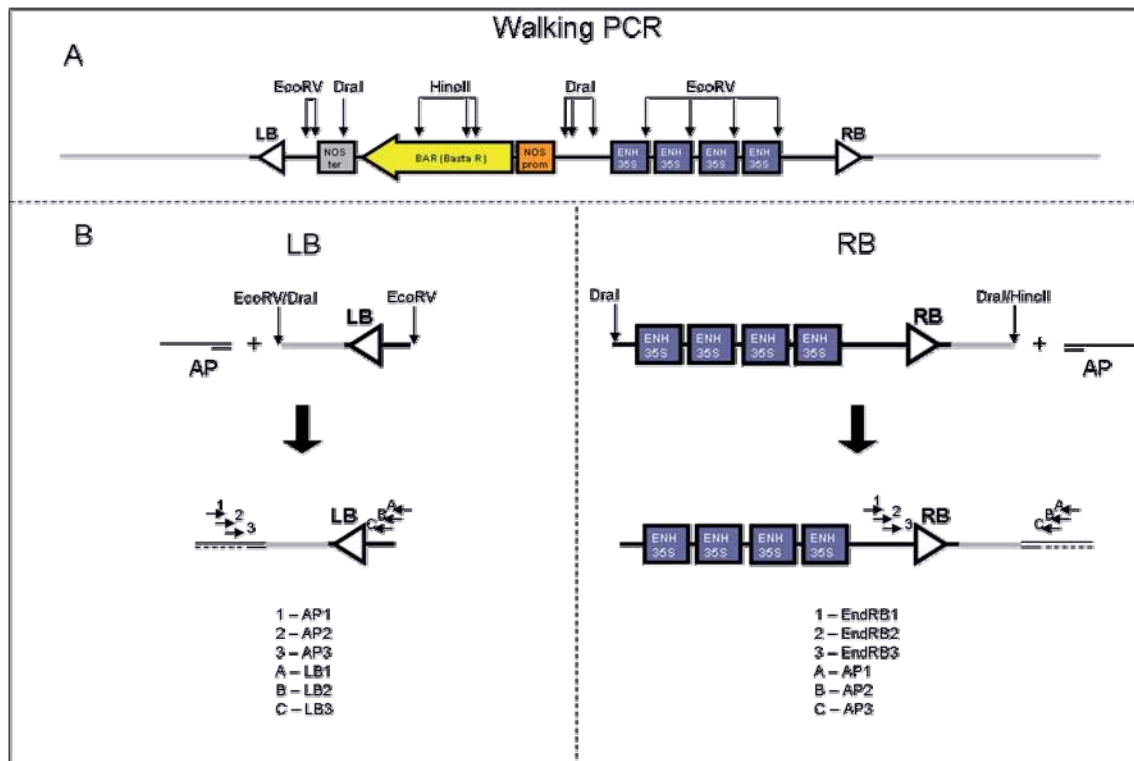
Amb el DNA genòmic completament digerit, es va procedir a lligar els fragments obtinguts. El que es pretén és que cada fragment es lligui amb sí mateix, ajuntant els seus extrems i circularitzant-se. Per tal d'aconseguir-ho i evitar que es lliguin diferents fragments entre sí, s'ha de realitzar la lligació amb una concentració de DNA baixa. En aquest treball es van aconseguir bons resultats amb una concentració de DNA d'1 ngr/ $\mu$ l, i realitzant la reacció de lligació durant 16h a 15°C. Finalment, es va netejar el producte de la lligació amb el *QIAPREP spin miniprep kit* de *Qiagen*.

### PCR

Es van realitzar tres *PCR*'s consecutives. En la primera (*PCRI*) es va utilitzar com a motlle el DNA circularitzat. El producte de la reacció de PCR es va córrer en un gel d'agarosa, es van retallar les bandes obtingudes, i es van purificar utilitzant el *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Cada banda purificada va servir de motlle per la *PCRII*, que utilitzava oligonucleòtids situats en posició més interna, afavorint l'especificitat de la reacció. Les bandes obtingudes també es van purificar i sobre elles es va realitzar la *PCRIII*, també amb un altre parell d'oligonucleòtids més interns. Finalment, les bandes obtingudes amb la *PCRIII* es van purificar i van ser seqüenciades per tal d'identificar la regió genòmica d'interès.

#### 5.6.2 *Walking PCR*

La tècnica de la *walking PCR* s'utilitza també per tal d'identificar un fragment de DNA contigu a un de conegut (en el nostre cas el T-DNA). Per fer-ho, es digereix el DNA i es lliga a un fragment de DNA de doble cadena que s'anomena adaptador. Així doncs, s'haurà flanquejat el DNA a identificar amb dues seqüències conegudes a partir de les quals es podrà amplificar aquest DNA. El procediment s'esquematitza en la figura 5.



**Figura 5.** Representació esquemàtica de la *Walking PCR*. (A) Es mostra el T-DNA d'*activation tagging* insertat en una regió del genoma, i s'indiquen els punts de tall dins del T-DNA dels diferents enzims de restricció utilitzats. (B) Es representa el procediment seguit, i es mostren les dues variants seguides, depenent de si es volia amplificar la regió contigua al LB o al RB. En cada cas, es representa l'hipotètic fragment d'interès obtingut després de digerir el DNA i la lligació de l'adaptador (AP). Es mostren també els oligonucleòtids que han permès amplificar de forma específica el fragment genòmic desitjat. En els dos casos es van realitzar tres *PCRs* amb els següents oligonucleòtids que s'especifiquen en la part inferior de la figura: *PCR I* (1+A), *PCR II* (2+B) i *PCR III* (3+C).

## Materials

- Termociclador.
- GoTaq®Green Master Mix, 2x (*Promega*).
- Tubs de paret fina de 0,2 o 0,5 ml.
- T4 DNA Lligassa (*Promega*) amb els seu tampó.
- Bany tèrmic.
- Estufa a 37°C.



## MATERIALS I MÈTODES

- Enzims de restricció adequats amb els seus tampons corresponents.
- “*GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare).
- Oligonucleòtids a 5-10  $\mu$ M.
- Adaptadors a 200  $\mu$ M.
- ATP a 30 mM.

### Mètode

#### Digestió

Per tal de realitzar la *walking PCR* sobre el DNA dels mutants es va digerir el DNA genòmic corresponent. Aquesta digestió es va realitzar amb enzims de restricció que tallessin el DNA deixant extrems roms, i que ho fessin també en una zona d'interès del T-DNA. Es van utilitzar enzims de restricció que tallessin amb una alta freqüència per tal que els fragments obtinguts que incloïen part del T-DNA i el fragment de DNA genòmic contigu tingués un tamany fàcilment amplificable per PCR.

Així doncs, s'han seguit dues estratègies. L'una s'ha dissenyat per tal d'amplificar el fragment contigu al LB del T-DNA, i per fer-ho el DNA s'ha digerit amb EcoRV i DraI (Walking PCR-LB). L'altra estratègia s'ha utilitzat per identificar el fragment contigu al RB, i en aquest cas el DNA s'ha digerit amb els enzims de restricció DraI i HindIII (Walking PCR-RB). Depenent en la manera en què el T-DNA estava inserit en els diferents mutants, una estratègia va resultar més adequada que l'altra.

#### RESTRICCIÓ:

DNA genòmic .....250 ng ADN  
Enzim de restricció 1.....7,5 u  
Enzim de restricció 2.....7,5 u  
Tampó de restricció.....1X  
H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada q.s.p.....fins a 40  $\mu$ l  
Reacció de 3h a 37°C.

#### Preparació de l'adaptador

L'adaptador es prepara just abans de procedir a la lligació dels fragments. Es van utilitzar dos oligonucleòtids a tal efecte: ADA1 (43 nucleòtids) i ADA2 (8 nucleòtids). ADA2 és complementari a la regió 3' d'ADA1, formant un extrem de doble cadena i rom. Per tal d'assegurar l'especificitat de la tècnica, els oligonucleòtids que posteriorment s'utilitzarien en la *PCR* anellaven amb la part

complementaria d'ADA1 que no és de doble cadena, la qual es formarà per l'acció de la ADN polimerassa si ADA1 i ADA2 s'han ajuntat correctament.

La preparació de l'adaptador és la següent:

#### REACCIÓ:

ADA1.....200  $\mu$ M

ADA2.....200  $\mu$ M

80°C durant 5 minuts

25°C durant 3 hores

Això resulta en una preparació de l'adaptador a una concentració de 100  $\mu$ M i preparat per ser lligat.

### **Lligació**

Amb el DNA genòmic completament digerit, es va procedir a lligar l'adaptador segons s'indica a continuació:

ADN genòmic digerit.....40  $\mu$ l (~250 ng)

Adaptador.....50  $\mu$ M

ATP.....5 mM

Lligassa.....2 u

Volum final de la reacció: 46  $\mu$ l

16°C durant 16h.

### **PCR**

Es van utilitzar 4  $\mu$ l de la reacció de lligació per fer una primera *PCR* en un volum de 10  $\mu$ l. Seguidament el producte de la *PCR I* es va diluir 1:100 i es va utilitzar com a motlle per la *PCR II*, que utilitza uns oligonucleòtids més interns per tal d'afavorir l'especificitat (Figura 5). El producte d'aquesta *PCR II* es va córrer en un gel d'agarosa, es van retallar les bandes obtingudes, i es van purificar utilitzant el "GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare). Cada banda purificada va servir de motlle per la *PCR III*, que utilitzava oligonucleòtids situats en posició més interna (Figura 5).

Finalment, les bandes obtingudes en la *PCR III* es van purificar i van ser seqüenciades per tal d'identificar la regió genòmica d'interès.

## **6 INFORMÀTICA**

### **6.1 Bioinformàtica**

Les anàlisi de restricció de les seqüències d'ADN i aliniaments es van dur a terme mitjançant el paquet *VECTOR NTi* versió 9.0 (InforMax, Inc).

## MATERIALS I MÈTODES

La base de dades i els recursos informàtics dels quals disposa el *National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)*, s'han utilitzat per realitzar les búsquedes de seqüències nucleotídiques similars, permetent identificar les seqüències obtingudes en aquest treball.

### 6.2 Ofimàtica

Les aplicacions comuns de processador de textos, fulls càlcul i el·laboració de presentacions s'inclouen en el paquet integrat *Microsoft Office Professional Edition 2003*. Pel tractament d'imatges es van utilitzar les aplicacions contingudes a *Adobe Photoshop 7.0*. Finalment, la gestió de recursos bibliogràfics es va realitzar amb l'aplicació *ENDNOTE v 9 (Isi Research Soft)*.

## 7 OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS.

Nom	SEQÜÈNCIA	Longitud	Direcció
<b>VECTORS</b>			
p35S	GTTTCATTTTCATTTGGAGAGAAC	22	
pT7	GTAATACGACTCACTATAGGG	21	
pT3	ATTAACCCTCACTAAAGGGAA	21	
pLac	CATTAATGCAGCTGGCAGCAG	23	
pGFP.F	GCATTCTACTTCTATTGCAGC	21	
pGFP.R	TCAGCTTGCCGTAGGTGG	18	
LB4 FLAG	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	26	
LB1 SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	34	
LBb1 SALK	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	22	
<b>DXS1</b>			
DXS1BamHI	CAGGATCCCATTGTTTTACTGTTTTTGCTAACCC	34	Sentit
DXS1.NheI	TTGCTAGCATGGCTTCTTCTGCATTTGC	28	Sentit
DXS1.HindIII	CTTAAAGCTTAAACAGAGCTTCCCTTGGTGAC	33	Antisentit
DXS1.NheI.noTP	TTGCTAGCATGGCTTCACTTGGAGAGAAGGGTG	33	Sentit
DXS1.S1	CTGTCAAGGAACTGAAACAAC	21	Sentit
DXS1.S10	CGCACCATCACCAATCACAGC	21	Antisentit
<b>DXS2</b>			
DXS2noTP	ATTATTCAAACAGACCACCAACTCC	25	Sentit
DXS2.S3	GCACTCTCATGGAGATCCCGTTAC	24	Antisentit
DXS2.S5	CGGGAAGAAGAGGAAAGATG	20	Sentit
DXS2.S10	GCCTCTGCTTCTGCAATCAAG	21	Antisentit

<b>Nom</b>	<b>SEQÜÈNCIA</b>	<b>Longitud</b>	<b>Direcció</b>
DXS2.S6	GCCCCGGTGCCAAAAGAGTC	19	Antisentit
DXS2.S2	GGCTCTCTCCGTATTTGCCTTTC	23	Sentit
<b>XILULOQUINASA</b>			
SA2	CTCTCTTCTCCCGATTCCCTCT	23	Sentit
AA2	TAGGAGATTCTTAACCGAAAAAGC	25	Antisentit
<b>XPT</b>			
XPT.F	TCTCTACCTGCGTTCGTGC	19	Sentit
XPT.R	ATAAGGAAAGACATTGAGTGCC	22	Antisentit
XPT.F.RT	TGTTTCCGCAAACCCTTGC	20	Sentit
<b>T-DNA ACTIVATION TAGGING</b>			
ATC12	TTGGGCGGGTCCAGGG	16	
preLB-R	TTGGACGTGAATGTAGACA	19	
LB-R	AGATTTCCCGGACATGAAGC	20	
preT7	ACGACGTTGTAAAACGA	17	
T7	AATACGACTCACTATAGGG	19	
ENH	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	20	
EcoRI.3	GCAGGTGGGTGTAGAGC	17	
EcoRI.2	CAGACGGACGAGGTCCG	16	
EcoR1.1	TGCTTGTCTCGATGTAGTGG	20	
Octo.1	CTAGATAAGATTAATGAATATCGG	24	
Octo.2	ACGCTGACACGCCAAGCC	18	
Octo.3	CATAACCAATCTCGATACACC	21	
EndRB.1	ATGTGATATCTAGATCCGAAAC	22	
EndRB.2	GATATCTAGATCCGAAACTATC	22	
EndRB.3	CTAGATCCGAAACTATCAGTG	21	
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	27	
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC	18	
AP3	GGCCGCCGGGGAGGT	15	
LB1	TAAGCCCCCATTTGGACGTGAATGTAGACA	30	
LB2	TTGCTTTCGCCTATACCTACGACGGA	26	
LB3	TAATAACGCTGCGGACATCTACA	23	
ADA1	CTAATCAGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGGAGGT	43	
ADA2	ACCTCCCC	8	

MATERIALS I MÈTODES

Nom	SEQÜÈNCIA	Longitud	Direcció
GENOTIPATGE MUTANTS <i>rif</i>			
rif21.F	TGGAGCAAATCTTATCTCATGG	22	Sentit
rif21.R	AAAGGAGATCACATTTCTTCACC	23	Antisentit
rif23.F	AGACGAGTAAGAGCTTGTGTGC	22	Sentit
rif23.R	GTTTAGATCATGATCAACAACCTGC	24	Antisentit
rif24.F	TTCCTCCGATTTTGTGTATCG	21	Sentit
rif24.R	GTAATGTTTGCCTCATGAATG	22	Antisentit
rif26.F	TCAAAATGACAATGATACTTTATCC	25	Sentit
rif26.R	ATTTTGATGACGAAGTTATAGACG	24	Antisentit
rif27.F	GGTTATAACCTTCATTAATCC	22	Sentit
rif27.R	GATATTGTGTTTAAAGATATGTCC	24	Antisentit
rif28.F	GCATTGGTATGCCAAACCAGC	21	Sentit
rif28.R	TTTAAGCATATGCATGTTGATACG	24	Antisentit
rif30.1.F	ACCACGCAAAGATCACTCTGC	21	Sentit
rif30.1.R	AAGCTCATGACTGGTGAATTGC	22	Antisentit
rif30.2.F	TGTAACGTTTTACTCGATCTATTG	24	Sentit
rif30.2.R	ATAGAAGACCAATATATATCTTGG	24	Antisentit
rif31.F	CGCACATCGGACGGATACG	19	Sentit
rif31.R	GACATCGTCATTTTGACATCGG	22	Antisentit
rif32.F	ACCGGTTTCTCTAGGTCTAGG	21	Sentit
rif32.R	TCCTAGCAAAGTAGCAATTATGC	23	Antisentit
rif33.F	AAGTTGTTCCGTGGGTTTCG	20	Sentit
rif33.R	CCAGCTTTCACGATGATGG	20	Antisentit
rif34.F	CCCTACGAGAATCCGTGAGG	20	Sentit
rif34.R	GGTGAGGAAGAGGATGTGGC	20	Antisentit
rif35.1.F	CATAATCGAGGATCATTATACC	23	Sentit
rif35.1.R	CTACGCTAGAATCCTAAGAGC	21	Antisentit
rif35.2.F	TTATGGCATCACGATATGCG	20	Sentit
rif35.2.R	GTCTCTGTAATGAAGCTTACG	22	Antisentit
rif36.F	ACGAGTTAGAGAGTGAATTTTGG	23	Sentit
rif36.R	TCTCACCACCGAGAATTTTCG	21	Antisentit
rif39.F	TTCTACTCGCTCCTAAAATGC	21	Sentit
rif39.R	CCATCGGCTCCGATCTCAGCC	21	Antisentit

<b>Nom</b>	<b>SEQÜÈNCIA</b>	<b>Longitud</b>	<b>Direcció</b>
rif44.F	TTAACTTTAATGGGGTATATTGG	23	Sentit
rif44.R	CTCAGTCAAGCTACCGTAGG	20	Antisentit
rif45.F	AGAAGAAGGAGAGCCGTTGG	20	Sentit
rif45.R	AAAATCTGAAATGTGATGCTGGC	23	Antisentit
<b>GENOTIPATGE MUTANTS INSERCIONALS DE GENS <i>rif</i></b>			
rif21.3.R	TTGCCTGTCCCATCTCTTTC	20	Antisentit
rif28 salk F	GGCTGGTAATGTTGGATATATCG	23	Sentit
rif28 salk R	GTATATGATGGAGCGTTCAGC	21	Antisentit
rif30.1.salk.F	ATGAAGAATCTATCTGACGGAC	22	Sentit
rif30.1.salk.R	CTTCAAGTCCGGCTTTAGCC	20	Antisentit
rif31.sail.F	ATTGTCAGCTTTTCGACGCGC	20	Sentit
rif31.sail.R	AATTTAGGATAATAGAGTATTTGG	24	Antisentit
<b>CONSTRUCCIONS GENS <i>rif</i></b>			
rif21.1F	TCACTGCAAAGTGCCAACAACAAC	25	Sentit
rif21.2.R	GTGGTTTGACTAGTTGACCATC	22	Antisentit
rif23A.1.BamHI.F	TCAGTCATGGATCCCTTGCGAACTCGCTGAAGTC	34	Sentit
rif23A.2R	GCAATTACATTGGTGGAGCAG	21	Antisentit
rif24A.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCCCGATACACAAAATCGGAGG	36	Sentit
rif24A.EcoRV.2R	TTGGAAGCATGATATCCAAACGTTGAACATAGTTAAGG	38	Antisentit
rif24B.BglII.1F	TGGATACCGAAGATCTATGGTTTCAAAGAGAAAGTCAAG	39	Sentit
rif24B.PmlI.2R	TGGTAACCCTCACGTGTTATACCACTGACCTGTTGATTTTC	41	Antisentit
rif26A.F	CTCTCGGGATTATTGACTCG	20	Sentit
rif26A.PmlI.R	TATCGTATTCACGTGTGATGATGATGATACACATTTATAGG	41	Antisentit
rif26B.3.BamHI.F	TAGGTTACAGGATCCATGGCTGATAATAAGGTCAATC	36	Sentit
rif26B.4.PmlI.R	TAGGTTACACGTCATACAGATAAATGAAGAAGTG	37	Antisentit
rif27B.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCCCCAAACCTATAACAAAATGGC	28	Sentit
rif27B.EcoRV.2R	TTGGAAGCATGATATCCTAGAGACATTAATTGATTCCGG	29	Antisentit
rif30.2.1.BamHI.F	ATCTGATTACGGATCCCGACCAAACCTCCATCGAGC	35	Sentit
rif30.2.2R	GTTACAAAAGTGGTTGGCTCAC	21	Antisentit
rif32A.1.BamHI.F	TCAGGTTACGGATCCCATTGTTATTTGTTTCGTTGCC	38	Sentit
rif32A.2R	GGTCCAAGACTTGTCTAACAC	21	Antisentit
rif32B.1.BamHI.F	TCATTATCAGGATCCCGTGCCTGCTTCGTCTC	34	Sentit
rif32B.2R	CATTGATAAATAGTTGCAGAACC	23	Antisentit

MATERIALS I MÈTODES

<b>Nom</b>	<b>SEQÜÈNCIA</b>	<b>Longitud</b>	<b>Direcció</b>
rif33A.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCTTTAGAAAAACAAGCTTAGCTAAAG	40	Sentit
rif33A.EcoRV.2R	TTGGAAGCATGATATCCAATTTTATTTCATCTTAAGAAAACC	41	Antisentit
rif33B.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCCACAAACTGACAAATTCTATTACC	40	Sentit
rif33B.PmlI.2R	TGGTAACCCTCACGTGGTTTTCTCTAGACCAATGAGC	38	Antisentit
rif34.1.B.1.BgIII.F	TAGGTTCAAGATCTCCTCCTCCACCAAATTCTCC	34	Sentit
rif34.1.B.3R	CCGACTCCGGTACAGAAGC	19	Antisentit
rif34.1.B.2.PmlI.R	TAGGTTACACGTGCCTTTCACTCTTACCTTCGG	34	Antisentit
A21.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCGAAGAGAAACAATCTCATCGC	37	Sentit
A21.EcoRV.2R	TTGGAAGCATGATATCCATTGTTTACCGACATAGTTCCG	38	Antisentit
A17.BamHI.1F	CCTAGGTCAGGGATCCCTCCCAAAGTCGAACCTGC	35	Sentit
A17.PmlI.2R	TGGTAACCCTCACGTGTTCTGCGGATCAGAGACC	34	Antisentit
rif36A.1.BamHI.F	TAGGTTCAAGATCCCCAAAATTCCTCTCTAACTCG	36	Sentit
rif36A.2.PmlI.R	TAGGTTACACGTGGATATTGGTGAAACATTGAAGG	36	Antisentit
rif36B.1.BamHI.F	TAGGTTCAAGATCCTTCGATAAACCTCCCGGAGG	34	Sentit
rif36B.2.PmlI.R	TAGGTTACACGTGTCCTCTGACATACCATTGC	35	Antisentit
rif36C.1.SpeI.F	TAGGTTCAACTAGTAACTTCTCAACAACCGATGG	35	Sentit
rif36C.3.R	GAGTTCAATTGGTTTTCCAGC	21	Antisentit
rif36C.2.PmlI.R	TAGGTTACACGTGAAGGGAACTCTCTGAGAAGC	35	Antisentit
rif39A.SpeI.1F	ACTTACGTACTAGTTTTATCATCTTCAGGCTTATTCG	37	Sentit
rif39A.PmlI.2R	AATGGGCAATCACGTGCAAATTCATAAGAAATGAAGTTGG	40	Antisentit
rif44A.F.BamHI	TCGTTAGTGGATCCATGGACTACTTTTCGATCTCCAG	36	Sentit
rif44A.R.PmlI	TAGTTCATCACGTGCTATATTGAACTCCTAATAGATTG	38	Antisentit
rif45.BamHI.F	AGCGTGGATCCAGTTACGGTGGTGAAGCAGC	31	Sentit
rif45.PmlI.R	AGATCGCACGTGAACTCTCTGTTACAAACCTCTG	34	Antisentit
rif21.NcoI.F	CATTGCTACCATGGCGACTTCTTCTTCTCATC	33	Sentit
rif21.TP.Sall	ACTGATTGTGCGACGCTTAATCGGTTTCTGGGTAAG	35	Antisentit
rif21.nostop.Sall	ACCCTAAGTCAGTCGACAGCTGTTCCAGTGATTAGTTTTTC	41	Antisentit

# BIBLIOGRAFÍA





## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., H. Katsumata, et al.** (2003). "Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis." *Development* **130**(4): 635-643.
- Adam, K. P., R. Thiel, et al.** (1999). "Incorporation of 1-[1-<sup>13</sup>C]Deoxy-D-xylulose in Chamomile Sesquiterpenes." *Arch Biochem Biophys* **369**(Sep): 127-132.
- Adam, K. P. and J. Zapp** (1998). "Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes." *Phytochemistry* **48**(6): 953-959.
- Adam, P., S. Hecht, et al.** (2002). "Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12108-13.
- Affek, H. P. and D. Yakir** (2003). "Natural abundance carbon isotope composition of isoprene reflects incomplete coupling between isoprene synthesis and photosynthetic carbon flow." *Plant Physiol* **131**(4): 1727-36.
- Alonso, J. M. and A. N. Stepanova** (2003). "T-DNA mutagenesis in Arabidopsis." *Methods Mol Biol* **236**: 177-88.
- Altincicek, B., E. C. Duin, et al.** (2002). "LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." *FEBS Lett* **532**(3): 437-40.
- Altincicek, B., A. Kollas, et al.** (2001a). "LytB, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli." *FEBS Lett* **499**(1-2): 37-40.
- Altincicek, B., A. K. Kollas, et al.** (2001b). "GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli." *J Bacteriol* **183**(8): 2411-6.
- An, G.** (1987). "Binary Ti vectors for plant transformation and promotor analysis." *Methods Enzymol* **153**: 292-305.
- Antonio, C., T. Larson, et al.** (2008). "Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from Arabidopsis thaliana leaf tissue." *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(9): 1399-407.
- Araki, N., K. Kusumi, et al.** (2000). "Temperature-sensitive Arabidopsis mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." *Physiologia Plantarum* **108**(1): 19-24.
- Arenas-Huertero, F., A. Arroyo, et al.** (2000). "Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar." *Genes & Development* **14**(16): 2085-2096.
- Arigoni, D., S. Sagner, et al.** (1997). "Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement." *PNAS* **94**(20): 10600-10605.
- Balmer, Y., A. Koller, et al.** (2003). "Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins." *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(1): 370-5.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bar-Tana, J. and W. W. Cleland** (1974). "Rabbit Muscle Phosphofructokinase." *Journal of Biological Chemistry* **249**(4): 1271-1276.
- Becker, J. D., L. C. Boavida, et al.** (2003). "Transcriptional Profiling of Arabidopsis Tissues Reveals the Unique Characteristics of the Pollen Transcriptome." *Plant Physiol.* **133**(2): 713-725.
- Benveniste, P.** (2002). "Sterol metabolism." In: *The Arabidopsis Book*, Somerville, CR y Meyerowitz, EM eds (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD): 1-31.
- Berridge, M. J.** (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." *Nature* **361**(6410): 315-25.
- Besumbes, O.** (2004). Aproximaciones biotecnológicas y proteómicas para el análisis de la producción de taxadieno, el primer intermediario específico de la biosíntesis de Taxol, en *Arabidopsis thaliana*. Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de Barcelona.
- Besumbes, O., S. Sauret-Gueto, et al.** (2004). "Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol." *Biotechnol Bioeng* **88**(2): 168-75.
- Blanc, G. and K. H. Wolfe** (2004). "Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during Arabidopsis Evolution." *Plant Cell* **16**(7): 1679-1691.
- Botella-Pavia, P., O. Besumbes, et al.** (2004). "Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors." *The Plant Journal* **40**(2): 188-199.
- Bouvier, F., A. Rahier, et al.** (2005). "Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids." *Progress in Lipid Research* **44**(6): 357-429.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Broers, S.** (1994a). über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in Escherichia coli. [On the early stages of isoprenoid biosynthesis in E. coli]. Eidgenössische Technische Hochschule. Tesis Doctoral, Zurich University.
- Broers, S. T. J.** (1994b). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in Escherichia coli. [On the early stages of isoprenoid biosynthesis in E. coli]. Eidgenössische Technische Hochschule. Tesis Doctoral, Zurich University.
- Budziszewski, G. J., S. P. Lewis, et al.** (2001). "*Arabidopsis* genes essential for seedling viability. Isolation of insertional mutants and molecular cloning." *Genetics* **159**(4 Dec): 1765-78.
- Burlat, V., A. Oudin, et al.** (2004). "Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites." *The Plant Journal* **38**(1): 131-141.
- Calvert, C. M., S. J. Gant, et al.** (1996). "Tomato Annexins p34 and p35 Bind to F-Actin and Display Nucleotide Phosphodiesterase Activity Inhibited by Phospholipid Binding." *Plant Cell* **8**(2): 333-342.

- Campos, N., M. Rodríguez-Concepcion, et al.** (2001). "Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **488**(3): 170-3.
- Carretero-Paulet, L.** (2003). Caracterización a nivel molecular de los genes 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Carretero-Paulet, L., I. Ahumada, et al.** (2002). "Expression and Molecular Analysis of the *Arabidopsis* DXR Gene Encoding 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, the First Committed Enzyme of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway." *Plant Physiol.* **129**(4): 1581-1591.
- Carretero-Paulet, L., A. Cairó, et al.** (2006). "Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase." *Plant Molecular Biology* **62**(4): 683-695.
- Clark, G. B., M. Dauwalder, et al.** (1998). "Immunological and biochemical evidence for nuclear localization of annexin in peas." *Plant Physiology and Biochemistry* **36**(9): 621-627.
- Clark, G. B. and S. J. Roux** (1995). "Annexins of Plant Cells." *Plant Physiol.* **109**(4): 1133-1139.
- Clark, G. B., A. Sessions, et al.** (2001). "Differential Expression of Members of the Annexin Multigene Family in *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* **126**(3): 1072-1084.
- Clark GB, T. G., Roux SJ** (2001). "Signal transduction mechanisms in plants: An overview." *CURRENT SCIENCE* **80**(2): 170-177.
- Clough, S. J. and A. F. Bent** (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **16**(6): 735-743.
- Conant, G. C. and K. H. Wolfe** (2008). "Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions." *Nat Rev Genet* **9**(12): 938-950.
- Concia, Alda L., C. Lozano, et al.** (2009). "Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds." *Chemistry - A European Journal* **15**(15): 3808-3816.
- Contento, A. L., S.-J. Kim, et al.** (2004). "Transcriptome Profiling of the Response of *Arabidopsis* Suspension Culture Cells to Suc Starvation." *Plant Physiol.* **135**(4): 2330-2347.
- Croteau, R., T. Kutchan, et al.** (2000). "Natural products (secondary metabolites)." *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B, Grissem, W y Jones, R, eds (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD): 1250-1318.
- Cunningham, F. X., Jr., T. P. Lafond, et al.** (2000). "Evidence of a role for *LytB* in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." *J Bacteriol* **182**(20): 5841-8.
- Chahed, K., A. Oudin, et al.** (2000). "1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells." *Plant Physiology and Biochemistry* **38**(7-8): 559-566

## BIBLIOGRAFÍA

- Chapman, A. and B. Hill** (2000). "Dictionary of Natural Products on CD-ROM (version 9.1)." (CRC Press, London, New York).
- Chappell, J.** (1995). "The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism." *Plant Physiol* **107**(1): 1-6.
- Delmer, D. P. and T. S. Potikha** (1997). "Structures and functions of annexins in plants." *Cellular and Molecular Life Sciences* **53**(6): 546-553.
- Dudareva, N., S. Andersson, et al.** (2005). "The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers." *PNAS* **102**(3): 933-938.
- Duvold, T., Cali, P., Bravo, J.M., Rohmer, M.** (1997). "Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*." *Tetrahedron Lett* **38**: 6181-6184.
- Eastmond, P. J. and I. A. Graham** (2001). "Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds." *Trends Plant Sci* **6**(2): 72-8.
- Eicks, M., V. Maurino, et al.** (2002). "The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants." *Plant Physiol* **128**(2): 512-22.
- Eisenreich, W., A. Bacher, et al.** (2004). "Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **61**(12): 1401-1426.
- Eisenreich, W., F. Rohdich, et al.** (2001). "Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids." *Trends in Plant Science* **6**(2): 78-84.
- Enfissi, E. M. A., P. D. Fraser, et al.** (2005). "Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato." *Plant Biotechnology Journal* **3**(1): 17-27.
- Enjuto, M., L. Balcells, et al.** (1994). "*Arabidopsis thaliana* Contains two Differentially Expressed 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase Genes, which Encode Microsomal Forms of the Enzyme." *PNAS* **91**(3): 927-931.
- Enjuto, M., Lumbreras, V., Marin, C., Boronat, A.** (1995). "Expression of the *Arabidopsis HMG2* gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues." *Plant Cell* **7**(May): 517-527.
- Ershov, Y. V., R. R. Gantt, et al.** (2002). "Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate." *J Bacteriol* **184**(18): 5045-51.
- Estévez, J. M., A. Cantero, et al.** (2001). "1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants." *J Biol Chem* **276**: 22901-9.
- Estevez, J. M., A. Cantero, et al.** (2000). "Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **124**(1): 95-104.

- Flesch, G. and M. Rohmer** (1988). "Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose." *Eur J Biochem* **175**(2): 405-11.
- Flores-Perez, U., S. Sauret-Gueto, et al.** (2008). "A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in Arabidopsis Plastids." *Plant Cell* **20**(5): 1303-1315.
- Flügge, U. I. and W. Gao** (2005). "Transport of Isoprenoid Intermediates Across Chloroplast Envelope Membranes." *Plant Biol (Stuttg)* **7**(01): 91-97.
- Fraenkel, D. G.** (1968). "The accumulation of glucose 6-phosphate from glucose and its effect in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate dehydrogenase." *J Biol Chem* **243**(24): 6451-7.
- Fraser, P. D., M. E. Pinto, et al.** (2000). "Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids." *Plant J* **24**(4): 551-8.
- Fray, R. G., A. Wallace, et al.** (1995). "Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway." *Plant J* **8**(5): 693-701.
- Gerke, V. and S. E. Moss** (1997). "Annexins and membrane dynamics." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1357**(2): 129-154.
- Gidrol, X., P. A. Sabelli, et al.** (1996). "Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(20): 11268-11273.
- Gokhale, N. A., A. Abraham, et al.** (2005). "Phosphoinositide Specificity of and Mechanism of Lipid Domain Formation by Annexin A2-p11 Heterotetramer." *Journal of Biological Chemistry* **280**(52): 42831-42840.
- Goldstein, J. and M. Brown** (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* **343**: 425-430.
- González, V.** (2002). Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilmetilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Gräwert, T., J. Kaiser, et al.** (2004). "IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis." *J Am Chem Soc* **126**(40): 12847-55.
- Guevara-Garcia, A., C. San Roman, et al.** (2005). "Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway." *Plant Cell* **17**(2): 628-643.
- Gutierrez-Nava, M. d. I. L., C. S. Gillmor, et al.** (2004). "CHLOROPLAST BIOGENESIS Genes Act Cell and Noncell Autonomously in Early Chloroplast Development." *Plant Physiol.* **135**(1): 471-482.
- Hans, J., B. Hause, et al.** (2004). "Cloning, Characterization, and Immunolocalization of a Mycorrhiza-Inducible 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in Arbuscule-Containing Cells of Maize." *Plant Physiol.* **134**(2): 614-624.

## BIBLIOGRAFÍA

- Harker, M. and P. M. Bramley** (1999). "Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis." *FEBS Lett* **448**(1): 115-9.
- Hattenbach, A. and D. Heineke** (1999). "On the role of chloroplastic phosphoglucomutase in the regulation of starch turnover." *Planta* **207**(4): 527-532.
- Havaux, M.** (1998). "carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts." *Trends in Plant Science* **3**(4): 147-151.
- Hecht, S., W. Eisenreich, et al.** (2001). "Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 14837-42.
- Hemmerlin, A., J.-F. Hoeffler, et al.** (2003). "Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells." *J. Biol. Chem.* **278**(29): 26666-26676.
- Hemmerlin, A., D. Tritsch, et al.** (2006). "A Cytosolic Arabidopsis D-Xylulose Kinase Catalyzes the Phosphorylation of 1-Deoxy-D-Xylulose into a Precursor of the Plastidial Isoprenoid Pathway." *Plant Physiol.* **142**(2): 441-457.
- Herz, S., J. Wungsintaweekul, et al.** (2000). "Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2486-90.
- Hintz, M., A. Reichenberg, et al.** (2001). "Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gamma delta T cells in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **509**(2): 317-22.
- Hofmann, A., J. Proust, et al.** (2000). "Annexin 24 from *Capsicum annum*." *Journal of Biological Chemistry* **275**(11): 8072-8082.
- Jasinski, M., D. Sudre, et al.** (2008). "AtOSA1, a Member of the Abc1-Like Family, as a New Factor in Cadmium and Oxidative Stress Response." *Plant Physiol.* **147**(2): 719-731.
- Jomaa, H., J. Wiesner, et al.** (1999). "Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs." *Science* **285**(5433): 1573-1576.
- Julliard, J. H.** (1992). "Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B6) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B1)." *C R Acad Sci Ser III* **314**: 285-290.
- Julliard, J. H. and R. Douce** (1991). "Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2042-5.
- Karl, T., R. Fall, et al.** (2002). "On-line analysis of the <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> labeling of leaf isoprene suggests multiple subcellular origins of isoprene precursors." *Planta* **215**(6): 894-905.
- Kasahara, H., A. Hanada, et al.** (2002). "Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*." *J. Biol. Chem.* **277**(47): 45188-45194.
- Kasahara, H., K. Takei, et al.** (2004). "Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*." *J Biol Chem* **279**(14): 14049-54.

- Kemp, L. E., M. S. Alpey, et al.** (2005). "The identification of isoprenoids that bind in the intersubunit cavity of *Escherichia coli* 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase by complementary biophysical methods." *Acta Crystallographica D* **61**(1): 45-52.
- Kemp, L. E., C. S. Bond, et al.** (2001). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant *Escherichia coli* 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthetase." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 8): 1189-91.
- Kemp, L. E., C. S. Bond, et al.** (2002). "Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4- cyclodiphosphate synthase: an essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development." *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(10): 6591-6.
- Kemp, L. E., C. S. Bond, et al.** (2003). "Structure of a tetragonal crystal form of *Escherichia coli* 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 3): 607-10.
- Kishida, H., T. Wada, et al.** (2003). "Structure and catalytic mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) synthase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis." *Acta Crystallographica D* **59**(1): 23-31.
- Kobayashi, K., M. Suzuki, et al.** (2007). "LOVASTATIN INSENSITIVE 1, a Novel Pentatricopeptide Repeat Protein, is a Potential Regulatory Factor of Isoprenoid Biosynthesis in Arabidopsis." *Plant Cell Physiol.* **48**(2): 322-331.
- Kollas, A. K., E. C. Duin, et al.** (2002). "Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." *FEBS Lett* **532**(3): 432-6.
- Koo, A. J. K. and J. B. Ohlrogge** (2002). "The Predicted Candidates of Arabidopsis Plastid Inner Envelope Membrane Proteins and Their Expression Profiles." *Plant Physiol.* **130**(2): 823-836.
- Kovács, I., F. Ayaydin, et al.** (1998). "Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa." *The Plant Journal* **15**(2): 185-197.
- Kuzuyama, T., M. Takagi, et al.** (2000). "Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis." *Journal of Bacteriology* **182**(4): 891-897.
- Kuzuyama, T., S. Takahashi, et al.** (1998). "Direct formation of 2-C-methyl-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate " *Tetrahedron Letters* **39**(25): 4509-4512.
- Lange, B. M. and R. Croteau** (1999). "Isoprenoid Biosynthesis via a Mevalonate-Independent Pathway in Plants: Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Peppermint." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**(1): 170-174.
- Lange, B. M., M. R. Wildung, et al.** (1998). "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." *PNAS* **95**(5): 2100-2104.
- Laule, O., A. Furholz, et al.** (2003). "Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *PNAS* **100**(11): 6866-6871.



## BIBLIOGRAFÍA

- Learned, R. M. and E. L. Connolly** (1997). "Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **11**(Mar): 499-511.
- Lee, D., J.-Y. Park, et al.** (2007). "Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 ( ARR7 ) overexpression in cytokinin response." *Molecular Genetics and Genomics* **277**(2): 115-137.
- Lee, S., E. J. Lee, et al.** (2004). "Proteomic Identification of Annexins, Calcium-Dependent Membrane Binding Proteins That Mediate Osmotic Stress and Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis." *Plant Cell* **16**(6): 1378-1391.
- Lehmann, C., K. Lim, et al.** (2002). "Structure of 2C-methyl-D-erythrol-2,4-cyclodiphosphate synthase from *Haemophilus influenzae*: activation by conformational transition." *Proteins* **49**(1): 135-8.
- Leivar, P.** (2003). Anàlisi funcional de la regió N-terminal de l'HMG-CoA reductasa d'Arabidopsis. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Leivar, P., V. M. Gonzalez, et al.** (2005). "Subcellular Localization of Arabidopsis 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase." *Plant Physiol.* **137**(1): 57-69.
- Lemaire, S. D., B. Guillon, et al.** (2004). "New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(19): 7475-7480.
- Lichtenthaler, H. K.** (1987). "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes." *Methods Enzymol* **148**: 351-382.
- Lichtenthaler, H. K.** (1999). "The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**(1): 47-65.
- Lichtenthaler, H. K.** (2000). "Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors." *Biochem Soc Trans* **28**(6): 785-789.
- Lichtenthaler, H. K., M. Rohmer, et al.** (1997). "Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants." *Physiologia Plantarum* **101**(3): 643-652.
- Lichtenthaler, H. K., J. Zeidler, et al.** (2000). "The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite." *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal Of Biosciences* **55**(5-6): 305-313.
- Lim, E.-K., M. R. Roberts, et al.** (1998). "Biochemical Characterization of Tomato Annexin p35." *Journal of Biological Chemistry* **273**(52): 34920-34925.
- Lois, L. M., N. Campos, et al.** (1998). "Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis." *PNAS* **95**(5): 2105-2110.
- Lois, L. M., M. Rodriguez-Concepcion, et al.** (2000). "Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase." *Plant Journal* **22**(6): 503-513.

- Lopez-Molina, L., S. Mongrand, et al.** (2002). "ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination." *Plant J* **32**(3): 317-28.
- Lorkovic, Z. J., R. Lehner, et al.** (2005). "Evolutionary conservation of minor U12-type spliceosome between plants and humans." *Rna* **11**(7): 1095-107.
- Lu, P., R. Porat, et al.** (1996). "Identification of a Meristem L1 Layer-Specific Gene in Arabidopsis That Is Expressed during Embryonic Pattern Formation and Defines a New Class of Homeobox Genes." *Plant Cell* **8**(12): 2155-2168.
- Lumbreras, V., N. Campos, et al.** (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." *The Plant Journal* **8**(4): 541-549.
- Luttgen, H., F. Rohdich, et al.** (2000). "Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of Escherichia coli phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1062-7.
- Lynch, M. and J. S. Conery** (2000). "The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes." *Science* **290**(5494): 1151-1155.
- Ma, C., M. Haslbeck, et al.** (2006). "Identification and Characterization of a Stress-Inducible and a Constitutive Small Heat-Shock Protein Targeted to the Matrix of Plant Peroxisomes." *Plant Physiol.* **141**(1): 47-60.
- Madson, M., C. Dunand, et al.** (2003). "The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins." *Plant Cell* **15**(7): 1662-70.
- Mahmoud, S. S. and R. B. Croteau** (2001). "Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase." *PNAS* **98**(15): 8915-8920.
- Mandel, M. A., K. A. Feldmann, et al.** (1996). "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution." *Plant J* **9**(5): 649-58.
- Manjunath, S., C.-H. Kenneth Lee, et al.** (1998). "Molecular and Biochemical Characterization of Cytosolic Phosphoglucomutase in Maize . Expression during Development and in Response to Oxygen Deprivation." *Plant Physiol.* **117**(3): 997-1006.
- Manzano, D.** (2004). Estudio de la función reguladora de las enzimas farnesilodifosfato sintasa y HMG-CoA reductasa en la vía del mevalonato en *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona.
- Manzano, D., X. Fernandez-Busquets, et al.** (2004). "The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoformB 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity." *Planta* **219**(6): 982-992.
- Masaki, T., H. Tsukagoshi, et al.** (2005). "Activation tagging of a gene for a protein with novel class of CCT-domain activates expression of a subset of sugar-inducible genes in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **43**(1): 142-152.

## BIBLIOGRAFÍA

- McCaskill, D. and R. Croteau** (1998). "Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants." *Trends in Biotechnology* **16**(8): 349-355.
- McClung, A. D., A. D. Carroll, et al.** (1994). "Identification and characterization of ATPase activity associated with maize (*Zea mays*) annexins." *Biochem J.*(303(Pt 3): 709–712.
- ).
- Miallau, L., M. S. Alphey, et al.** (2003). "Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase." *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(16): 9173-8.
- Mikami, K., T. Katagiri, et al.** (1998). "A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **15**(4): 563-8.
- Miller, B., T. Heuser, et al.** (2000). "Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis." *FEBS Lett* **481**(3 Sep 22): 221-6.
- Moehs, C. P., L. Tian, et al.** (2001). "Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development." *Plant Mol Biol* **45**(3): 281-93.
- Moore, R. C. and M. D. Purugganan** (2005). "The evolutionary dynamics of plant duplicate genes." *Current Opinion in Plant Biology* **8**(2): 122-128.
- Morris, W. L., L. J. M. Ducreux, et al.** (2006). "Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle." *J. Exp. Bot.*: erl061.
- Mueller-Roeber, B. and C. Pical** (2002). "Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C." *Plant Physiol* **130**(1): 22-46.
- Mühlbach, H. and C. Schnarrenberger** (1978). "Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves." *Planta* **141**(1): 65-70.
- Munne-Bosch, S. and L. Alegre** (2003). "Drought-induced changes in the redox state of  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid content." *Plant Physiology* **131**: 1816-1825.
- Munné-Bosch, S. and L. Alegre** (2002). "The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 31-57.
- Munoz-Bertomeu, J., I. Arrillaga, et al.** (2006). "Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender." *Plant Physiol.* **142**(3): 890-900.
- Nagata, N., M. Suzuki, et al.** (2002). "Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway." *Planta* **216**(2): 345-350.
- Nakamura, M., H. Katsumata, et al.** (2006). "Characterization of the Class IV Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family in *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* **141**(4): 1363-1375.

- Okada, K., H. Kawaide, et al.** (2002). "Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects *ent*-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*." *Planta* **215**: 339-344.
- Oliver, D. J., B. J. Nikolau, et al.** (2009). "Acetyl-CoA--Life at the metabolic nexus." *Plant Science* **176**(5): 597-601.
- Pagnussat, G. C., H.-J. Yu, et al.** (2005). "Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*." *Development* **132**(3): 603-614.
- Peltier, J.-B., O. Emanuelsson, et al.** (2002). "Central Functions of the Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteome of *Arabidopsis* Determined by Experimentation and Genome-Wide Prediction." *Plant Cell* **14**(1): 211-236.
- Peñuelas, J. and S. Munné-Bosch** (2005). "Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection." *Trends in Plant Science* **10**(4): 166-169.
- Pérez-Gil, J.** (2004). Clonatge i caracterització funcional de diversos enzims de la via del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat de biosíntesi d'isoprenoides de plantes i microorganismes. Bioquímica i Biologia Molecular. Master experimental, Universitat de Barcelona.
- Periappuram, C., L. Steinhauer, et al.** (2000). "The Plastidic Phosphoglucomutase from *Arabidopsis*. A Reversible Enzyme Reaction with an Important Role in Metabolic Control." *Plant Physiol.* **122**(4): 1193-1200.
- Phillips, S. E., P. Vincent, et al.** (2006). "The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(1): 21-49.
- Pierre, M., J. A. Traverso, et al.** (2007). "N-Myristoylation Regulates the SnRK1 Pathway in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **19**(9): 2804-2821.
- Poliquin, K., Y. V. Ershov, et al.** (2004). "Inactivation of *sll1556* in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrates in vitro." *J Bacteriol* **186**(14): 4685-93.
- Proust, J., G. Houlné, et al.** (1996). "Characterization and gene expression of an annexin during fruit development in *Capsicum annuum*." *FEBS Letters* **383**(3): 208-212.
- Querol, J., N. Campos, et al.** (2002). "Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis." *FEBS Letters* **514**(2-3): 343-346.
- Razem, F. A., K. Baron, et al.** (2006). "Turning on gibberellin and abscisic acid signaling." *Current Opinion in Plant Biology* **9**(5): 454-459.
- Re, E. B., D. Jones, et al.** (1995). "Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*." *Plant J* **7**(May): 771-784.
- Rescher, U., D. Ruhe, et al.** (2004). "Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes." *J Cell Sci* **117**(16): 3473-3480.
- Reuter, K., S. Sanderbrand, et al.** (2002). "Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, a Crucial Enzyme in the Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis." *J. Biol. Chem.* **277**(7): 5378-5384.

## BIBLIOGRAFÍA

- Richard, S. B., M. E. Bowman, et al.** (2001). "Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis." *Nat Struct Mol Biol* **8**(7): 641-648.
- Richard, S. B., J. L. Ferrer, et al.** (2002). "Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase. An enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway." *J Biol Chem* **277**(10): 8667-72.
- Rizhsky, L., H. Liang, et al.** (2004). "When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress." *Plant Physiol.* **134**(4): 1683-1696.
- Rodríguez-Concepción, M.** (2004). "The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs." *Curr Pharm Des* **10**(19): 2391-400.
- Rodríguez-Concepción, M., I. Ahumada, et al.** (2001). "1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening." *The Plant Journal* **27**(3): 213-222.
- Rodríguez-Concepción, M. and A. Boronat** (2002). "Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics." *Plant Physiol.* **130**(3): 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., O. Fores, et al.** (2004). "Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development." *Plant Cell* **16**(1): 144-156.
- Rodríguez-Concepción, M., G. Toledo-Ortiz, et al.** (2000). "Carboxyl-methylation of prenylated calmodulin CaM53 is required for efficient plasma membrane targeting of the protein." *Plant Cell* **24**(6)(Dec): 775-784.
- Rohdich, F., S. Hecht, et al.** (2002). "Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1158-63.
- Rohdich, F., J. Wungsintaweekul, et al.** (1999). "Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of Escherichia coli catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11758-63.
- Rohmer, M.** (1999a). "The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants." *Nat Prod Rep* **16**(5): 565-74.
- Rohmer, M.** (1999b). "The mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis, including carotenoids." *Pure Appl. Chem* **71**: 2279-2284.
- Rohmer, M.** (2008). "From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway." *Lipids* **43**(12): 1095-107.
- Rohmer, M., M. Knani, et al.** (1993). "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate." *Biochem J* **295** ( Pt 2): 517-24.
- Rohmer, M., M. Seemann, et al.** (1996). "Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis." *J Am Chem Soc* **1**(2564-2566).

- Rolland, F., B. Moore, et al.** (2002). "Sugar sensing and signaling in plants." *Plant Cell* **14 Suppl**: S185-205.
- Rook, F., S. A. Hadingham, et al.** (2006). "Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression." *Plant, Cell & Environment* **29**(3): 426-434.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al.** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Salvucci, M. E., R. R. Drake, et al.** (1990). "Identification of the 64 Kilodalton Chloroplast Stromal Phosphoprotein as Phosphoglucomutase." *Plant Physiol.* **93**(1): 105-109.
- Sambrook, R. and D. Russell** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor.
- Sánchez-Fernández, R., T. G. E. Davies, et al.** (2001). "The Arabidopsis thaliana ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory." *Journal of Biological Chemistry* **276**(32): 30231-30244.
- Sauret-Gueto, S.** (2005). Estrategias genéticas para el estudio de la síntesis de isoprenoides en bacterias y plastos. *Bioquímica i Biología Molecular*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Sauret-Gueto, S., P. Botella-Pavia, et al.** (2006). "Plastid Cues Posttranscriptionally Regulate the Accumulation of Key Enzymes of the Methylerythritol Phosphate Pathway in Arabidopsis." *Plant Physiol.* **141**(1): 75-84.
- Sauret-Gueto, S., A. Ramos-Valdivia, et al.** (2003). "Identification of lethal mutations in Escherichia coli genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**(2): 408-415.
- Schaller, H., B. Grausem, et al.** (1995). "Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in Sterol Overproduction." *Plant Physiol.* **109**(3): 761-770.
- Schnitzler, J. P., M. Graus, et al.** (2004). "Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar leaves." *Plant Physiol* **135**(1): 152-60.
- Schuur, C. A., T. Radykewicz, et al.** (2003). "Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy." *Phytochemistry Reviews* **2**(1-2): 3-16.
- Schwarz, M.** (1994). *Terpenbiosynthese in Ginkgo biloba: Eine überraschende geschichte*. Eidgenössische Technische Hochschule., Zurich University.
- Schwender, J., C. Muller, et al.** (1999). "Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Letters* **455**(1-2): 140-144.
- Schwender, J., M. Seemann, et al.** (1996). "Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*." *Biochem J* **316** ( Pt 1): 73-80.

## BIBLIOGRAFÍA

- Schwender, J., J. Zeidler, et al.** (1997). "Incorporation of 1-deoxy--xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae." *FEBS Letters* **414**(1): 129-134.
- Seemann, M., B. T. Bui, et al.** (2002a). "Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(22): 4337-9.
- Seemann, M., N. Campos, et al.** (2002b). "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: accumulation of 2-C-methyl--erythritol 2,4-cyclodiphosphate in a gcpE deficient mutant of *Escherichia coli*." *Tetrahedron Letters* **43**(5): 775-778.
- Seemann, M., N. Campos, et al.** (2002c). "Isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (E)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol." *Tetrahedron Letters* **43**(8): 1413-1415.
- Seemann, M., P. Wegner, et al.** (2005). "Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein." *J Biol Inorg Chem* **10**(2): 131-7.
- Shin, H. and R. M. Brown, Jr.** (1999). "GTPase Activity and Biochemical Characterization of a Recombinant Cotton Fiber Annexin." *Plant Physiol.* **119**(3): 925-934.
- Sicher, R. C.** (1989). "Evidence for a Light Dependent Increase of Phosphoglucomutase Activity in Isolated, Intact Spinach Chloroplasts." *Plant Physiol.* **89**(2): 557-563.
- Skorupinska-Tudek, K., J. Poznanski, et al.** (2008). "Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants." *J Biol Chem* **283**(30): 21024-35.
- Sprenger, G. A., U. Schorken, et al.** (1997). "Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." *PNAS* **94**(24): 12857-12862.
- Steinbacher, S., J. Kaiser, et al.** (2003). "Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate Synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development." *J. Biol. Chem.* **278**(20): 18401-18407.
- Steinbacher, S., J. Kaiser, et al.** (2002). "Structure of 2C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids." *J Mol Biol* **316**(1): 79-88.
- Stermer, B. A., G. M. Bianchini, et al.** (1994). "Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants." *Journal of Lipid Research* **35**(7): 1133-1140.
- Streatfield, S. J., A. Weber, et al.** (1999). "The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression." *Plant Cell* **11**(9): 1609-22.
- Suzuki, M., Y. Kamide, et al.** (2004). "Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels." *The Plant Journal* **37**(5): 750-761.

- Takahashi, S., T. Kuzuyama, et al.** (1998). "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis." *PNAS* **95**(17): 9879-9884.
- Takenawa, T. and T. Itoh** (2001). "Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1533**(3): 190-206.
- Tetlow, I. J., K. J. Blissett, et al.** (1997). "Metabolite pools during starch synthesis and carbohydrate oxidation in amyloplasts isolated from wheat endosperm." *Planta* **204**(1): 100-108.
- Thomas, S. and D. A. Fell** (1998). "The role of multiple enzyme activation in metabolic flux control." *Adv Enzyme Regul* **38**: 65-85.
- Tripathi, L. P. and R. Sowdhamini** (2006). "Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice." *BMC Genomics* **7**: 200.
- Urós, E. M.** (2009). Análisis molecular de mutantes de *Escherichia coli* resistentes al bloqueo en diferentes etapas de la ruta del metileritritol fosfato (MEP). Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Valvekens, D., M. Van Montagu, et al.** (1988). "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5536-5540.
- van Leeuwen, W., J. E. M. Vermeer, et al.** (2007). "Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings." *The Plant Journal* **52**(6): 1014-1026.
- Velikova, V., A. Edreva, et al.** (2004). "Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen." *Physiologia Plantarum* **122**(2): 219-225.
- Vincent, P., M. Chua, et al.** (2005). "A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs." *J Cell Biol* **168**(5): 801-12.
- Vitha, S., M. Yang, et al.** (1998). "Light Promotion of Hypocotyl Gravitropism of a Starch-Deficient Tobacco Mutant Correlates with Plastid Enlargement and Sedimentation." *Plant Physiol.* **116**(2): 495-502.
- W L Dills, W. L. M.** (1976). "Studies of 1-deoxy-D-fructose, 1-deoxy-D-glucitol, and 1-deoxy-D-minnitol as antimetabolites. ." *Biochemistry* **15**( 20 ): 4506-12
- Wada, T., T. Kuzuyama, et al.** (2003). "Crystal structure of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis." *J Biol Chem* **278**(32): 30022-7.
- Walter, M. H., J. Hans, et al.** (2002). "Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots." *Plant J* **31**(3): 243-54.
- Weigel, D., J. H. Ahn, et al.** (2000). "Activation tagging in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **122**(4): 1003-13.



## BIBLIOGRAFÍA

- Welsch, R., J. Medina, et al.** (2003). "Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*." *Planta* **216**(3): 523-34.
- Wentzinger, L. F., T. J. Bach, et al.** (2002). "Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase." *Plant Physiol* **130**(1): 334-46.
- Wildung, M. R. and R. Croteau** (1996). "A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis." *J Biol Chem* **271**(16): 9201-4.
- Wilkinson, J. Q., M. B. Lanahan, et al.** (1995). "Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display." *Plant Molecular Biology* **27**(6): 1097-1108.
- Will, C. L., C. Schneider, et al.** (1999). "Identification of Both Shared and Distinct Proteins in the Major and Minor Spliceosomes." *Science* **284**(5422): 2003-2005.
- Wolfertz, M., T. D. Sharkey, et al.** (2004). "Rapid regulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway during isoprene synthesis." *Plant Physiology* **135**(4): 1939-1945.
- Wolff, M., M. Seemann, et al.** (2002). "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*." *Tetrahedron Letters* **43**(14): 2555-2559.
- Wolff, M., M. Seemann, et al.** (2003). "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein." *FEBS Lett* **541**(1-3): 115-20.
- Wu, P., L. Ma, et al.** (2003). "Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves." *Plant Physiol* **132**(3): 1260-71.
- Wungsintaweekul, J., H. Stefan, et al.** (2001). "Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*." *European Journal of Biochemistry* **268**(2): 310-316.
- Xiang, S., G. Usunow, et al.** (2007). "Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis." *J. Biol. Chem.* **282**(4): 2676-2682.
- Yajima, S., T. Nonaka, et al.** (2002). "Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase Complexed with Cofactors: -Implications of a Flexible Loop Movement upon Substrate Binding." *J Biochem (Tokyo)* **131**(3): 313-317.
- Zeidler, J., J. Schwender, et al.** (1998). "Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin." *Z Naturforsch* **53c**: 980-986.