

**ESTUDIS DE  $\Delta^{11}$  ACIL-CoA DESSATURASES  
IMPLICADES EN LA BIOSÍNTESI DE  
FEROMONES SEXUALS DE LEPIDÒPTERS**

Montserrat Serra Mas

Barcelona, 2006





UNIVERSITAT DE BARCELONA



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE BIOLOGIA

Programa de Doctorat de Biotecnologia  
Bienni 2002/2004

**ESTUDIS DE  $\Delta^{11}$ -ACIL-CoA DESSATURASES IMPLICADES EN LA BIOSÍNTESI DE  
FEROMONES SEXUALS DE LEPIDÒPTERS**

Memòria presentada per Montserrat Serra Mas per optar al títol de  
Doctor per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat en el Departament de Química Orgànica Biològica  
de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (C.S.I.C.)

Directors

Tutor

**Jordi Bujons Vilàs**

Científic titular  
Dpt. Química Orgànica Biològica  
Institut d'Investigacions Químiques  
i Ambientals de Barcelona  
(I.I.Q.A.B.-C.S.I.C.)

**Montserrat Busquets Abió**

Professora titular  
Dpt. Bioquímica y Biología Molecular  
Facultat de Biología  
Universitat de Barcelona

**Gemma Fabriàs Domingo**

Investigador científic  
Dpt. Química Orgànica Biològica  
Institut d'Investigacions Químiques  
i Ambientals de Barcelona (I.I.Q.A.B.-C.S.I.C.)



*What we know is a drop.  
What we don't know is an ocean.*

Isaac Newton (1643-1727)

*Como siempre:  
lo urgente no deja tiempo para lo Importante.*

Mafalda



# AGRAÏMENTS

Quan s'arriba al punt de redactar els agraïments de la tesi doctoral vol dir que ja queda poca cosa per fer. A més, aquest és un apartat especialment important ja que saps del cert que aquestes dues pàgines les llegirà tothom. En aquest moment mires enrera i recordes el dia en el que vas entrar per primera vegada en un laboratori. Tenia claríssim que la meva especialitat havia d'ésser la bioquímica i els meus primers passos els vaig donar en un laboratori de la setena planta de la facultat de Química. Encara sembla que fos ahir quan una nena espantada i extremadament tímida s'estava asseguda en un escriptori llegint una tesina sobre la malat deshdrogenasa citosòlica de porc. Han passat ja vuit anys des d'allò i ara toca donar les gràcies a tota la gent que ha fet possible que aquesta tesi existeixi.

Primer de tot, i com ha de ser en qualsevol tesi voldria agrair la direcció d'aquesta tesi als Drs. Gemma Fabriàs i Jordi Bujons, per les estones dedicades a corregir coses i a proposar noves línies de treball. També a la Dra. Montserrat Busquets per haver acceptat de ser la tutora d'aquesta tesi.

També he d'agrair al Dr. Francesc Camps que en el seu dia confiés en mi per realitzar aquesta tesi. Així com a tots els integrants del Profero: Jesús Joglar, Pere Clapés, Conxita Solans....

Una menció a part mereix el Dr. Benjamí Piña. Sense les teves instruccions, els teus consells i les estones que has passat amb la teva becària "externa" aquesta tesi no sé pas si s'hauria arribat a acabar mai. Recordo ara totes les hores passades comentant si uns llevats amb  $\Delta^{11}$  de *T. ni* creixien amb C10 o si la seqüència de la processonària estava bé o no. Moltíssimes gràcies....

Qui també sempre ha estat allà ha estat el Dr. José Luis Abad (JLAS per als amics o almenys aquí al CSIC) sempre obsequiant-nos amb les seves interessants converses. Molta sort amb les opos!!! Ànims que tu pots!!

M'agrada tenir un record per al meu predecessor en el tema de la Biologia Molecular de les dessaturases, el Dr. Sergio Rodríguez. De tu Sergi, vaig aprendre moltíssimes coses (i no només on era el material que hauria de fer servir durant la tesi!!!). Gràcies a tu i a la Dra. Gemma Villorbina em vaig posar al dia del tema de les dessaturases i els insectes dels que no en tenia ni idea (a part de l'acollida al teu piset).

D'aquella primera època també vull recordar la resta de gent que ens movíem pels laboratoris 213, 004 i 314: Carme, Marta, Lidia Batlle, Lidia Roura, Ismael, Cristina, Òscar, Itziar, Jorge i Tània.

No em deixo en Carles Soldevila del que mai no sabies si estava aquí o a la lluna de València ni tampoc la Victòria que definiria una miqueta com la meua psicòloga particular ja que sempre em deixa parlar i m'escolta les meves paranoies.

Vull també expressar el meu agraïment a la gent de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona per haver-me deixat utilitzar els aparells i els kits que m'han fet falta en moments molt puntuals d'aquest treball i en especial la Sílvia.

Una abraçada molt forta a la gent del laboratori 516: l'Alba (últimament sempre et trobo a l'hora de dinar (quan vaig mooolt tard)), la Sue (gràcies pel protocol del Western), la Marta, la Tània (quines tertúlies a primera hora del matí), el David i la Laia (vam començar gairebé juntes i ara ja falta una miqueta menys per acabar).

També he de donar les gràcies al Dr. Isidre Casals que durant aquests quatre anys de tesi ha estat el meu taxi particular. Però no només això m'ha escoltat i m'ha aconsellat sempre que ho he necessitat.

I want to thank to Prof. Peter H. Buist the opportunity of working with you in Carleton University (Ottawa, Canada) and thank you for the paper. It was one of the most wonderful experiences I ever had. Thank you very much for all your help and give my best wishes for the people from the lab. I also wanted to thank the assistance given by Dr. William G. Willmore in his lab for all the microsomes work. I want also to dedicate my thought to all the people who helped me when I stayed there: Molly, John, Laura (all the best in your graduation), Kim, Amber, Amy, Nigel, Rishi, James, Ryan, Chris, Angie and Joann (I am so sorry if I didn't write any of the names correctly).

Tampoc em vull oblidar de la Dori i la Roser que sempre m'han ajudat amb el cromatògraf de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses, quan es penjava, quan els pics no sortien prou clars....vaja! Quan hi havia problemes!!! També he d'agrair la bona feina del servei de seqüenciació del CSIC encapçalat per la Mercè Miquel.

He de recordar en aquest punt als companys de fatigues en els temes de biologia molecular dins el departament: la Noemí, la Glòria, el Gerard, la Cristina i el Xavi.

Cal anomenar a tots els companys amb els qui he compartit laboratori: la Mikaela, la Carme, el Pablo, l'Hèctor, el Javi Adrián (no més humiliacions al Supermanager), el Javi Ramon (m'encanta Wagner), el Dani, el Mark, la Raquel, la



Núria, el Roger i la Begoña (amb qui hem compartit moltíssimes bones estones). També l'acollida dels Drs. Pilar Marco i Francisco Sánchez.

Moltes gràcies a tota la gent de la segona planta: la Maria, l'Ariadna, el Carles, el Jordi, el Jose, la Sònia, l'Aurora i els del RUBAM per ser-hi sempre: la Isabel, la Marta, l'Anna, la Patrícia, la Meri, la Gemma, la Sílvia Saludes, la Sílvia González, la Rebeca, l'Elena, el Fabrizio, el Pedro, l'Albert, el Santi, el Dani, el Youssef, el Laurent i el Jose. I moltíssimes gràcies a l'Esmeralda, la Lourdes, el David i la Carma els millors companys que es poden tenir a l'hora de fer una tesi doctoral.

Un petonàs molt fort per tots els antics enzimos: la Meri (no passis gaire fred a Munich), l'Oscar Besumbes (no maltractis molt els "nanos"), l'Oscar Alegre i la Mari, el Churri (ho sento Jose però t'ha quedat aquest nom) i la Sònia (sort a tots dos a Indianapolis), el Víctor, el Cristòbal, el Joan i el Heavy (sort amb els esterols).

Dins d'aquest apartat d'agraïments també hi he de posar la meva família, els meus pares i germans que malgrat no entendre res del que explico sempre intenten preguntar com va la feina i em donen el màxim suport.

Finalment, voldria agrair tot el suport i la comprensió que m'ha donat el Xavier. Ell que ha hagut d'aguantar tots els meus nervis i els meu mal humor com les coses no anaven prou bé però amb qui també he compartit totes les bones estones. Només et volia dedicar unes petites paraules:

Por una mirada un mundo;  
por una sonrisa, un cielo;  
por un beso..., ¡yo no sé  
qué te diera por un beso!

Gustavo Adolfo Bécquer (1836-1870)

Moltes gràcies a tots!!!!



## ÍNDEX

---



ÍNDEX .....	v
ABREVIATURES .....	1
NOTACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS .....	5
I. INTRODUCCIÓ .....	9
I.1. Feromones. ....	11
I.1.1. Perspectiva històrica. ....	11
I.1.2. Les feromones en lepidòpters. ....	14
I.2. Dessaturases. ....	17
I.2.1. Mecanisme catalític. ....	20
I.2.2. $\Delta^9$ acil-CoA dessaturases. ....	25
I.2.3. Citocrom b <sub>5</sub> . ....	27
I.2.4. Dessaturases en lepidòpters. ....	28
I.3. Antecedents de la recerca sobre dessaturases en el grup de treball. ....	30
II. OBJECTIUS .....	33
III. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	37
IIIa. ESTUDIS SOBRE LA $\Delta^{11}$ ACIL-CoA DESSATURASA DE <i>Trichoplusia ni</i> . CONSTRUCCIÓ I DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT $\Delta^{11}$ DESSATURASA D'UNA PROTEÏNA QUIMÈRICA. ....	39
IIIa.1. <i>Trichoplusia ni</i> . ....	41
IIIa.2. Biologia molecular. ....	43
IIIa.2.1 Construcció del gen de la proteïna quimèrica $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> i clonatge en els vectors d'expressió en llevat pYES2, YEpOLEX i pYEXTHS- BN. ....	46
IIIa.2.2. Clonació en un vector d'expressió bacterià. ....	53
IIIa.3. Cultiu de llevats transformats amb les diferents construccions derivades de la dessaturasa de <i>Trichoplusia ni</i> . ....	54
IIIa.4. Anàlisi funcional de les construccions derivades de la $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> expressades en llevat. ....	57
IIIa.5. Assaigs d'expressió de les construccions derivades de $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> en un sistema procariota. ....	65
IIIa.6. Assaigs d'inducció de l'expressió de les construccions basades en pYEXTHS-BN amb diferents concentracions de Cu <sup>2+</sup> . ....	68
IIIa.7. Procediments experimentals. ....	70
IIIa.7.1. Construcció del vector pYES2- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> . ....	70
IIIa.7.2. Construcció del vector YEpOLEX- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> . ....	71
IIIa.7.3. Preparació de les construccions pYEX- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> i pYEX- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> . .....	72
IIIa.7.4. Preparació vectors pET28a(+)- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> i pET28a(+)- $\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> i expressió en cèl·lules d' <i>E. coli</i> . ....	73
IIIb. ACTIVITATS CATALÍTIQUES DE LES $\Delta^{11}$ ACIL-CoA DESSATURASES DE <i>Spodoptera littoralis</i> I <i>Trichoplusia ni</i> .....	75
IIIb.1. <i>Spodoptera littoralis</i> . ....	77
IIIb.2. Formació d'àcids diènics conjugats en posicions 10 i 12 catalitzada per la $\Delta^{11}$ acil-CoA dessaturasa d' <i>Spodoptera littoralis</i> . ....	80
IIIb.2.1. Inducció de l'expressió de la $\Delta^{11}$ dessaturasa d' <i>S. littoralis</i> a diferents concentracions de Cu <sup>2+</sup> . ....	85

IIIb.3. Les $\Delta^{11}$ dessaturases de <i>T. ni</i> i <i>S. littoralis</i> tenen activitat hidroxilasa residual.....	88
IIIb.4. Activitat de $\Delta^{11}$ acil-CoA dessaturases sobre substrats no naturals.....	92
IIIb.4.1. Àcids grassos monoinsaturats de geometria <i>E</i> . .....	92
IIIb.5. Procediments experimentals.....	96
IIIb.5.1. Construcció del plasmidi pYEX- $\Delta^{11}$ Sls.....	96
IIIb.5.2 Estudi de la formació dels productes hidroxilats procedents de la dessaturació incompleta. ....	97
IIIc. CLONATGE I EXPRESSIÓ FUNCIONAL D'UNA DESSATURASA IMPLICADA EN LA BIOSÍNTESI DE LA FEROMONA SEXUAL DE <i>Thaumetopoea pityocampa</i> . ....	99
IIIc.1. <i>Thaumetopoea pityocampa</i> .....	101
IIIc.2. Acetilenases. ....	102
IIIc.3. Aïllament de les dessaturases implicades en la biosíntesi de la feromona sexual de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> .....	103
IIIc.4. Discussió. ....	120
IIIc.5. Procediments experimentals. ....	125
IIIc.5.1. Extracció de glàndules feromonals de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> . .	125
IIIc.5.2. Aïllament de RNA. ....	125
IIIc.5.3. Determinació de la seqüència central del gen. ....	126
IIIc.5.4. Identificació de les seqüències dels extrems 3' i 5'.....	127
IIIc.5.5. Clonatge de la dessaturasa de la processionària del pi en el vector pYEXTHS-BN. ....	128
IIId. INFLUÈNCIA DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN EL CREIXEMENT DE MUTANTS DE LLEVAT QUE EXPRESSEN DESSATURASES EXÒGENES. ....	131
IIId.1. Lípids, dessaturases i membranes cel·lulars.....	133
IIId.1.1. Regulació de la dessaturació. ....	135
IIId.2. Efecte de diferents àcids grassos saturats en el medi de cultiu en llevats <i>Δelol_ΔoleI</i> transformats amb diferents dessaturases de lepidòpter.....	136
IIId.3. Efecte de la temperatura de cultiu sobre el creixement i composició d'àcids grassos en llevats <i>Δelol_ΔoleI</i> transformats amb les diferents $\Delta^{11}$ dessaturases d'insecte. ....	143
IIId.4. Assaigs d'activitat acil-CoA dessaturasa efectuats en microsomes de llevat. ....	148
IIId.5. Procediments experimentals. ....	151
IIId.5.1. Preparació de microsomes de llevat.....	151
IIId.5.2. Mètode de Bradford per a la determinació de proteïna. ....	151
IIId.5.3. Assaig d'activitat dessaturasa. ....	152
IIId.5.4. Extracció dels àcids grassos de la suspensió de microsomes. ....	152
IV. CONCLUSIONS .....	153
V. MATERIALS I MÈTODES.....	157
V.1. Procediments generals. ....	159
V.1.1. Equipament i instrumentació.....	159
V.1.2. Reactius. ....	160
V.1.3. Procediments d'esterilització. ....	160

---

---

V.1.4. Cultius cel·lulars.....	160
V.1.4.1. Soques d' <i>E. coli</i> .....	160
V.1.4.2. Medis de cultiu de cultius d' <i>E. coli</i> .....	161
V.1.4.3. Soques d'eucariotes.....	161
V.1.4.4. Medis de cultiu de <i>S. cerevisiae</i> .....	162
V.2. Mètodes de biologia molecular.....	162
V.2.1. Vectors i construccions.....	162
V.2.1.1. Vectors de clonatge.....	162
V.2.1.1. Vectors de d'expressió.....	163
V.2.2. Protocols d'introducció de DNA plasmídic a cèl·lules.....	164
V.2.2.1. Preparació i transformació de cèl·lules d' <i>E. coli</i> competents.....	164
Protocol de Hanahan.....	164
Transformació per xoc tèrmic de cèl·lules d' <i>E. coli</i> competents.....	165
V.2.2.2. Preparació i transformació de cèl·lules de llevat competents.....	165
Mètode de l'acetat de liti.....	165
V.2.3. Preparació de DNA plasmídic d' <i>E. coli</i> .....	166
V.2.4. Purificació de DNA plasmídic de <i>S. cerevisiae</i> .....	167
V.2.5. Reaccions de modificació de DNA.....	167
V.2.5.1. Digestió amb enzims de restricció.....	167
V.2.5.2. Reaccions de desfosforilació.....	168
V.2.5.3. Reaccions de lligació.....	168
V.2.5.4. Mutagènesi dirigida.....	169
V.2.5.5. Reaccions de PCR.....	169
V.2.5.6. Electroforesi de DNA.....	170
V.2.5.7. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa.....	170
V.4. Anàlisi dels extractes lipídics.....	171
V.4.1. Preparació de derivats DMDS.....	171
V.4.2. Preparació d'adductes de MTAD.....	171
V.4.3. Anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses.....	172
V.5. Anàlisi d'expressió de la dessaturasa en llevat i bacteri.....	172
V.5.1. Extracció de proteïnes de llevat.....	172
V.5.2. Extracció de proteïnes de bacteri.....	173
V.5.3. Electroforesi SDS-PAGE.....	173
V.5.4. Tinció amb blau de Coomassie.....	174
V.5.5. Anàlisi per <i>Western blot</i> .....	174
V.5.5.1. Immunodetecció.....	174
VI. BIBLIOGRAFIA.....	177
VII. ANNEXOS.....	191





## **ABREVIATURES**

---

---



---

---

Abs	absorbància
ACP	proteïna transportadora d'acil
APS	persulfat amònic
bp	parells de bases
cDNA	àcid desoxiribonucleic còpia
CoA	coenzim A
C-terminal	extrem carboxil-terminal
DMDS	disulfur de dimetil
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNAsa	desoxiribonucleasa
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
FOA	àcid 5-fluorooròtic
GC-MS	cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopirànòsid
Kb	kilobase
<i>m/z</i>	relació massa-càrrega
MCS	lloc de clonatge múltiple
MMO	monoxigenasa de metà
mRNA	àcid ribonucleic missatger
MTAD	4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona
NADH	dinucleòtid de nicotinamida i adenina, forma reduïda
NADPH	dinucleòtid fosfat de nicotinamida i adenina, forma reduïda
N-terminal	extrem amino-terminal
O.D.	densitat òptica
O/N	tota la nit
OLE1	$\Delta^9$ acil-CoA dessaturasa de llevat
ORF	pauta de lectura oberta
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil

RNA	àcid ribonucleic
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
RT-PCR	transcripció inversa i reacció en cadena de la polimerasa
SD	desviació estàndard
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant amb dodecilsulfat sòdic
SIM	adquisició selectiva d'ions
<i>sp.</i>	espècies
TIC	cromatograma dels conjunt total d'ions seleccionats
5'-UTR, 3'-UTR	regions 5' i 3' transcrites no traduïdes

## **NOTACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS**

---



Quan s'utilitza aquesta notació es tracta dels èsters metàlics dels àcids grassos següents excepte en els casos on aquests àcids s'han addicionat al medi de cultiu dels llevats.

C12	àcid dodecanoic (làuric)
C13	àcid tridecanoic
C14	àcid tetradecanoic (mirístic)
C15	àcid pentadecanoic
C16	àcid hexadecanoic (palmític)
C17	àcid heptadecanoic
C18	àcid octadecanoic (esteàric)
Z9:C14	àcid (Z)-9-tetradecenoic
Z11:C14	àcid (Z)-11-tetradecenoic
E9:C14	àcid (E)-9-tetradecenoic
E11:C14	àcid (E)-11-tetradecenoic
Z9:C16	àcid (Z)-9-hexadecenoic
E9:C16	àcid (E)-9-hexadecenoic
9:C16	àcid 9-hexadecenoic
Z11:C16	àcid (Z)-11-hexadecenoic
Z7:C18	àcid (Z)-7-octadecenoic
Z9:C18	àcid (Z)-9-octadecenoic
Z11:C18	àcid (Z)-11-octadecenoic
Z13:C18	àcid (Z)-13-octadecenoic
(E,E)-10,12:C14	àcid (E,E)-10,12-tetradecadienoic
(E,Z)-10,12:C14	àcid (E,Z)-10,12-tetradecadienoic
(E,E)-9,11:C14	àcid (E,E)-9,11-tetradecadienoic
(E,Z)-9,11:C14	àcid (E,Z)-9,11-tetradecadienoic
(Z,E)-9,11:C14	àcid (Z,E)-9,11-tetradecadienoic
(E,Z)-9,11:C16	àcid (E,Z)-9,11-hexadecadienoic
(E,Z)-10,12:C16	àcid (E,Z)-10,12-hexadecadienoic

( <i>E,Z</i> )-7,11:C18	àcid ( <i>E,Z</i> )-7,11-octadecadienoic
( <i>E,Z</i> )-9,11:C18	àcid ( <i>E,Z</i> )-9,11-octadecadienoic
( <i>Z,E</i> )-11,13:C18	àcid ( <i>Z,E</i> )-11,13-octadecadienoic
9OTMS:C16	9-trimetilsililohexadecanoat de metil
11OTMS:C16	11-trimetilsililohexadecanoat de metil
9OTMS:C18	9-trimetilsililoctadecanoat de metil
11OTMS:C18	11-trimetilsililoctadecanoat de metil



## I. INTRODUCCIÓ

---



En el regne animal, les relacions entre individus i entre els individus i l'entorn sovint està modulada per comunicació química. Els compostos químics són àmpliament utilitzats entre organismes per la seva comunicació (Tegoni et al., 2004).

## **I.1. Feromones.**

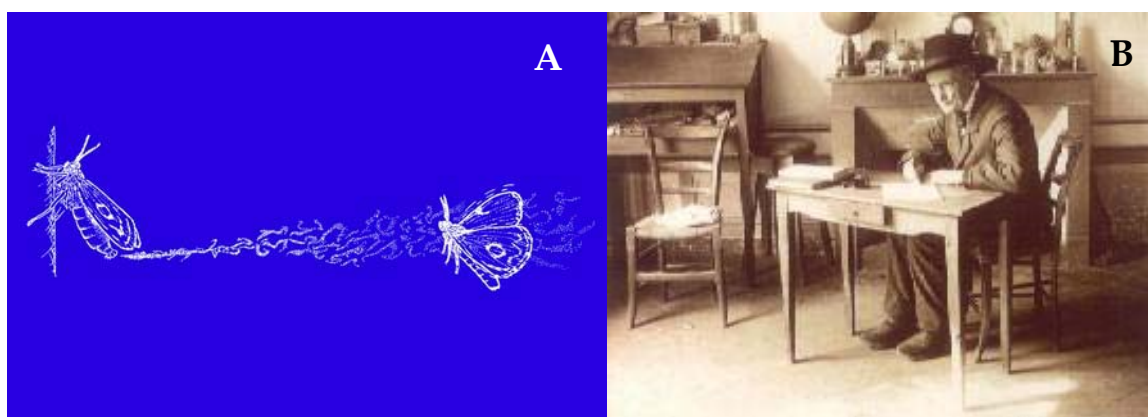
El compost químic o mescla de compostos químics alliberats per un organisme que causa un comportament específic o una reacció fisiològica específica en un o més individus de la mateixa espècie són el que anomenem feromones (Tillman et al., 1999).

La paraula feromona resulta de la combinació de les paraules gregues *pherein* (transportar i transferir) i *hormon* (excitar). Aquest terme fou introduït pel bioquímic alemany Peter Karlson i l'entomòleg suís Martin Lüscher (Patlak, 2003). Aquests compostos son mediadors importants de la comunicació en bacteris, plantes i animals (Tillman et al., 1999). Les feromones són utilitzades per una gran varietat d'organismes per a la seva comunicació química. Els trets de comportament més comuns mitjançats per feromones inclouen l'atracció per a l'aparellament (feromones sexuals), l'agregació a un lloc específic per l'alimentació o per l'aparellament (feromones d'agregació), el rastreig o seguiment de pistes (feromones de rastre), l'alarma i la maduració (Tillman et al., 1999; Jurenka, 2004). L'atracció sexual entre moltes espècies d'insectes inclou l'emissió d'un senyal de llarga distància d'una feromona sexual per part de les femelles.

### **I.1.1. Perspectiva històrica.**

El fenomen d'una sola femella atraient una gran quantitat de mascles fou observat molt abans de comprendre la seva naturalesa química. Un matí de primavera durant la dècada de 1870 el naturalista francès Jean-Henri Fabre

s'embadalí quan una femella de gran pavó, *Saturnia pyri*, va emergir d'un capoll en la taula del seu laboratori. Aquesta femella va ésser capaç d'atreure prop de 150 mascles (Patlak, 2003). Poc temps després, l'any 1882, l'entomòleg nord-americà Joseph A. Lintner va observar un fenomen similar, l'espectacle de 50 mascles de *Promethea* atrets per una sola femella que estava posada sobre la finestra de la seva oficina. Aquest esdeveniment va cridar l'atenció de la gent que passava per la vorera (Roelofs, 1995). Fabre, després de múltiples assaigs, va concloure que malgrat que el nas humà no podia detectar-ho, la femella emetia un tipus d'olor que atreia els mascles de la seva espècie.



**Figura I.1.** A) Atracció del mascle per part de la femella i B) l'entomòleg francès Jean Henry-Fabre (1823-1915).

A la dècada de 1930, Adolf Butenandt, un químic alemany conegut per haver descobert les hormones sexuals humanes estrona, testosterona i progesterona, es va plantejar elucidar quines eren aquestes substàncies que emetien les femelles d'insecte amb la finalitat de desenvolupar un nou mètode de control de plagues d'insectes (Patlak, 2003). L'any 1959 va publicar la primera identificació química d'una feromona sexual, la de *Bombyx mori* (Lepidoptera), papallona del cuc de seda, després d'un treball de recerca de més de vint anys. L'elucidació estructural del bombicol, el (*E,Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol, va requerir una extracció de més de mig milió de femelles (Butenandt et al., 1959). Més tard, l'any 1961, es va comprovar l'estructura química per síntesi total (Butenandt and Hecker, 1961).

Durant la dècada dels seixanta, per a la identificació de feromones eren clau els assaigs de comportament. Emprant aquesta metodologia es va identificar la feromona que regula el desenvolupament fisiològic de l'abella (*Apis mellifera*) (Butler, 1961) i el component principal de la feromona sexual de *Trichoplusia ni* (Berger, 1966).

La col·laboració entre Peter Karlson i Dietrich Schneider va donar lloc l'any 1957 a una nova tècnica per a l'estudi de les feromones, l'electroantenografia (EAG). Schneider va escindir una antena d'una papallona del cuc de seda, que va introduir en una dissolució salina per mantenir les cèl·lules vives i la va connectar a uns elèctrodes per detectar l'activitat elèctrica. Aquest experiment va permetre detectar l'estímul en l'antena de l'insecte per la presència de bombicol (la feromona del cuc de seda) (Schneider, 1957).

A finals de la dècada dels seixanta es varen començar a emprar tècniques noves en la investigació sobre feromones: la cromatografia de gasos, l'espectrometria de masses i la ressonància magnètica nuclear. L'any 1971, Wendell Roelofs aplicà la cromatografia de gasos acoblada a l'electroantenografia per separar els components de la feromona sexual de *Cydia pomonella* (Roelofs et al., 1971). Una altra tècnica emprada per separar i identificar l'estructura dels components de la mescla feromonal fou la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses.

Durant la dècada dels setanta, el zoòleg anglès John Kennedy utilitzà una invenció seva del final dels anys trenta, el túnel de vent, per estudiar com els insectes s'orienten i troben el camí cap a la font de la feromona (Kennedy and Thomas, 1974).

La investigació en el camp de les feromones suggerí la idea d'utilitzar les feromones sexuals per alterar la comunicació per l'aparellament dels insectes a llarga distància de la mateixa manera que ja havia plantejat Adolf Butenandt prèviament. El primer assaig d'aquest nou mètode de control de plagues es realitzà l'any 1967 per Harry Shorey que va utilitzar feromones de *Trichoplusia ni* per interrompre l'aparellament d'aquests insectes (Shorey et al., 1967).

Durant els darrers anys els estudis realitzats s'han focalitzat en l'elucidació de les vies de biosíntesi d'aquests compostos, el seu control endocrí i l'estudi de la percepció d'aquests compostos per part dels altres individus de la mateixa espècie.

### **I.1.2. Les feromones en lepidòpters.**

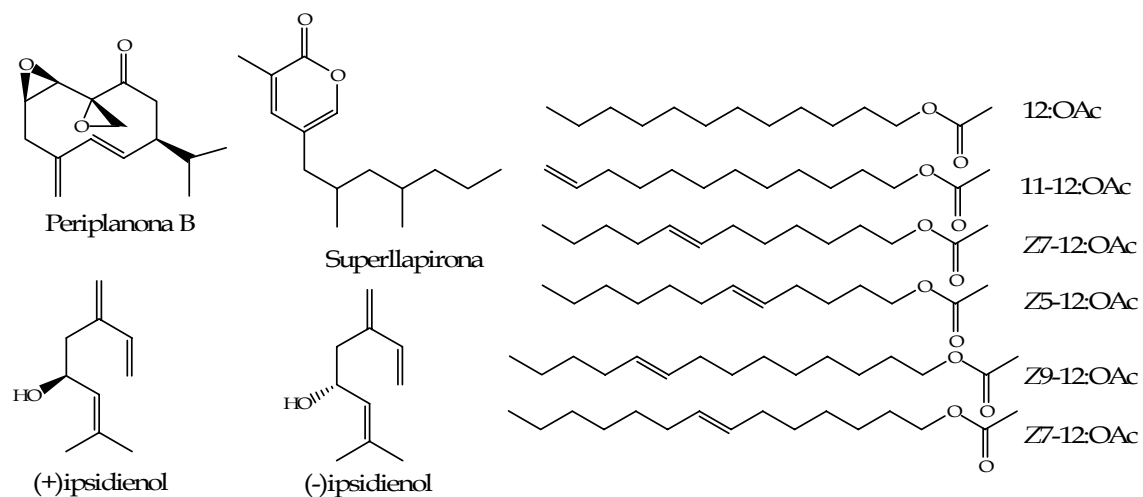
Els lepidòpters són el segon grup d'insectes més gran que existeix i inclou al voltant de 150.000 espècies descrites, que han evolucionat durant uns 100 milions d'anys des de l'era Mesozoica. Al voltant del 99% de les espècies pertanyen al subordre Ditrysia i posseeixen dues obertures genitals separades, l'orifici copulatori i l'ovipositor (Ando et al., 2004).

La major part d'investigacions sobre la biosíntesi i regulació de la biosíntesi de feromones d'insectes s'ha dut a terme sobre espècies que són econòmicament significatives, produeixen quantitats importants de feromona i són fàcils de criar. En particular s'han estudiat models d'insectes dels ordres *Blattodea*, *Coleoptera*, *Diptera* i *Lepidoptera*. Es coneix que la biosíntesi de feromona pot produir-se per dues vies: la síntesi *de novo* o la modificació de precursors ingerits en la dieta (Tillman et al., 1999).

El senyal de comunicació per l'aparellament, que es difon en l'ambient entre un fons químic "sorollós", ha de ser específic pel receptor. Per aconseguir aquesta especificitat de resposta, una possibilitat seria l'utilització d'estructures químiques tan complexes que no puguin ésser duplicades en la natura. S'han trobat compostos químics complexos que provoquen un ampli repertori de respostes a concentracions biològicament significatives. Les feromones sexuals dels escarabats, periplanona B (*Periplaneta americana*) i supellapirona (*Supella longipalpa*) (figura I.2), són exemples de compostos químics únics que poden atreure mascles de la mateixa espècie només amb l'alliberament d'uns quants centenars de molècules (Roelofs, 1995). En d'altres casos aquests compostos químics complexos contenen centres quirals i els insectes són capaços de produir un únic enantiòmer (Roelofs, 1995). Finalment, en els lepidòpters, l'especificitat s'aconsegueix emprant estructures ben definides pel que fa a la

longitud de la cadena, el tipus de grup funcional oxigenat, el nombre, la posició i la naturalesa isomèrica dels dobles enllaços i els percentatges precisos dels diversos components que formen part de la mescla feromonal (Tillman et al., 1999).

Entre les diverses feromones, els alcohols primaris i els seus derivats (principalment acetats i aldehids) amb una cadena hidrocarbonada llarga ( $C_{10}$ - $C_{18}$ ) són els compostos més comunament detectats en lepidòpters. Els compostos químics d'aquest grup comprenen al voltant del 75 % de les feromones conegudes (Ando et al., 2004). Els hidrocarburs poliinsaturats i els derivats epòxid amb una longitud de cadena més llarga ( $C_{17}$ - $C_{23}$ ) comprenen un segon grup que no conté grup funcional a la posició terminal i representen al voltant del 15 % de les feromones de lepidòpters conegudes (Ando et al., 2004).



**Figura I.2.** Estructures de feromones de diferents espècies d'insecte: d'escarabat americana (periplanona B), del barrinador d'escorça (enantiòmers de l'ipsidienol), de *Supella longipalpa* (superllapirona) i de *Trichoplusia ni* (els sis acetats).

Les feromones sexuals dels lepidòpters comparteixen un precursor comú que és sintetitzat *de novo* a partir de l'acetil-CoA a través de la via de síntesi d'àcids grassos en la glàndula feromonal (Ohnishi et al., 2006). Els centenars de compostos químics utilitzats com a feromones sexuals en aquest enorme grup taxonòmic són derivats d'àcids grassos simples per rutes similars que inclouen dessaturació en una o més posicions, extensió o escurçament de les cadenes i modificacions reductives dels grups funcionals (Knipple et al., 2002).

Les feromones es sintetitzen en glàndules diferenciades de les femelles adultes. En les arnes, la glàndula feromonal deriva d'una modificació de cèl·lules epidèrmiques entre el 8è i 9è segments abdominals (Tillman et al., 1999). Aquesta glàndula conté cèl·lules secretores que són cèl·lules epidèrmiques hipertròfiques i modificades, que generalment contenen un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat involucrat en el metabolisme dels àcids grassos (Tillman et al., 1999). En un treball pioner realitzat per laboratori del Dr. W.L. Roelofs, s'observà que els extractes de la punta de l'ovipositor de deu espècies diferents de lepidòpters contenen àcids grassos no usuals que tenien la mateixa longitud de cadena, posicions i estereoquímica dels dobles enllaços dels acetats, alcohols o aldehids que componien les mescleres feromonals (Wolf et al., 1981).

Al principi dels anys 80, diversos estudis en lepidòpters de les famílies *Tortricidae* i *Noctuidae* van determinar que una  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa<sup>1</sup> es trobava involucrada en la biosíntesi de les feromones sexuals d'aquestes espècies (Foster and Roelofs, 1996). L'acció combinada d'aquesta  $\Delta^{11}$  dessaturasa, que pot actuar sobre èsters de coenzim A d'àcids grassos de 12, 14, 16 o 18 àtoms de carboni, i reaccions altament específiques d'escurçament de cadena origina les cadenes carbonades dels components de les feromones dels lepidòpters (Tillman et al., 1999).

Diversos enzims participen en la producció d'aquest tipus de feromones, com són l'acetil-CoA carboxilasa i la sintasa d'àcids grassos. Les modificacions de la cadena inclouen la introducció de dobles enllaços a través d'una dessaturasa i l'escurçament de la cadena per l'acció d'enzims específics de  $\beta$ -oxidació (Jurenka, 2004). Depenent del grup funcional final present en la feromona es poden trobar també reductases, acetiltransferases i oxidases.

La via d'escurçament de la cadena encara no s'ha caracteritzat amb detall a nivell enzimàtic en insectes, si bé es coneix que hi participen enzims de la ruta de  $\beta$ -oxidació localitzats en peroxisomes. Els enzims clau són l'acil-CoA oxidasa

---

<sup>1</sup> La nomenclatura que s'utilitza generalment per designar les dessaturases empra la designació  $\Delta^x$ , on x representa la posició del carboni on s'insereix la insaturació respecte l'extrem carboxilat.



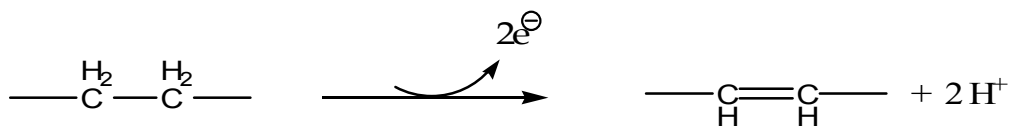
---

i la 3-oxoacilCoA tiolasa, que actuen de manera ordenada per escurçar la cadena dels acil-CoAs per l'eliminació d'un grup acetil (Jurenka, 2004).

## I.2. Dessaturases.

El terme “dessaturació” s'utilitza per distingir la deshidrogenació dependent d'O<sub>2</sub> de grups metilè no activats, de l'abstracció anaeròbia d'àtoms d'hidrogen en posicions activades, com ara àtoms de carboni adjacents a funcions de tipus carbonil (Buist, 2004b). L'estudi de la formació de compostos insaturats estableix la ubiqüitat de la via modulada per dessaturases d'àcids grassos en diverses formes de vida aeròbiques, incloent bacteris, llevats, fongs, plantes i animals (Buist, 2004b).

Les dessaturases d'àcids grassos són enzims clau en el manteniment de les membranes cel·lulars; regulen la seva fluïdesa i adaptació als canvis de temperatura. Alguns organismes procariotes, com *Escherichia coli*, introdueixen dobles enllaços en els àcids grassos anaeròbiament (Shanklin and Cahoon, 1998). La capacitat de regular la fluïdesa de la membrana controlant el nombre de dobles enllaços en els àcids grassos de la membrana en resposta als canvis de temperatura confereix un avantatge selectiu als organismes capaços de realitzar la dessaturació aeròbica. Les dessaturases també juguen un paper clau en la biosíntesi d'agents de senyalització cel·lular com són les ceramides, els derivats de l'àcid araquidònic i les feromones (Behrouzian and Buist, 2002). La dessaturació d'àcids grassos inclou una primera etapa d'eliminació enzimàtica d'un hidrogen d'un grup metilè d'una cadena d'acil. Aquest és un pas que requereix d'una aportació d'energia important ja que l'enllaç C-H en un grup metilè és un dels més estables químicament ( $\Delta H^\circ=98$  kcal/mol) (Shanklin and Cahoon, 1998). A continuació té lloc la pèrdua de l'hidrogen de l'àtom de carboni adjacent per formar el doble enllaç. El procés de dessaturació implica la transferència de dos electrons per a la formació de cada doble enllaç.



**Figura I.3.** Reacció de dessaturació.

Atenent a la seva localització en la cèl·lula, es poden distingir dos tipus de dessaturases evolutivament no relacionades (Shanklin and Cahoon, 1998; Buist, 2004b):

- a) les solubles, que es troben únicament en sistemes fotosintètics, i
- b) les integrals de membrana, que són ubíquies en totes les cèl·lules eucariotes.

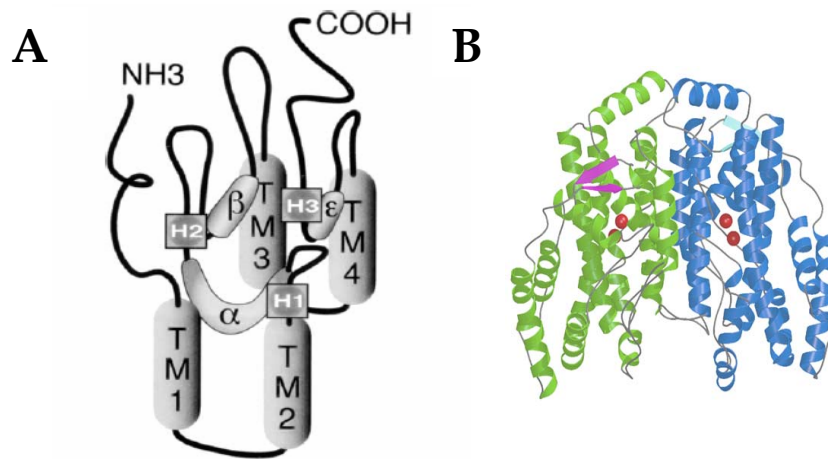
L'existència de diversos tipus de substrat també permet classificar-les en tres grups:

- a) Acil-CoA dessaturases, que empren èsters de coenzim A d'àcids grassos (figura I.4.A).
- b) Acil-ACP dessaturases, els substrats de les quals són àcids grassos units a una proteïna transportadora d'acil (ACP) (figura I.4.B).
- c) Acil-lipid dessaturases, que utilitzen com a substrats els àcids grassos enllaçats als residus hidroxilats dels glicerolípid.

Totes les dessaturases conegudes presenten com a característica comuna la inhibició per cianur i la insensibilitat al CO. Aquests dos fets indiquen que el centre actiu de l'enzim conté ferro no hemo com a grup prostètic (Buist, 2004b).

Els estudis estructurals d'aquests enzims van revelar que les dessaturases solubles presenten motius d'unió a ferro (D/E)X<sub>2</sub>H, mentre que les dessaturases integrals de membrana presenten un domini altament conservat que consisteix en tres motius HX<sub>(3-4)</sub>H; HX<sub>(2-3)</sub>HH i HX<sub>(2-3)</sub>HH. S'assumeix que aquests residus d'His actuen com a lligands per dos àtoms de ferro. En aquest sentit s'ha demostrat que per la  $\Delta^9$ -acilCoA dessaturasa de rata la mutació de qualsevol dels vuit residus d'histidina conservats provoca una pèrdua d'activitat dessaturasa, suggerint que aquests residus són essencials per a la funció de

l'enzim (Shanklin et al., 1994). La presència de motius similars rics en histidina s'ha detectat en altres enzims que presenten activitats similars a la de les dessaturases, com ara la monoxigenasa de metà o la monoxigenasa d'alquens de *Pseudomonas* (Shanklin and Cahoon, 1998).



**Figura I.4.** Estructures de diferents tipus de dessaturases. **A)** Estructura proposada per les dessaturases integrals de membrana. Es pot observar la presència dels tres *clústers* d'histidina (H1, H2 i H3) que coordinen els àtoms de ferro responsables de la funció catalítica. També es troben indicats quatre fragments transmembrana (TM1 a TM4) i tres fragments hidrofòbics ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\epsilon$ ). El centre catalític es troba encarat a la cara citoplasmàtica de la membrana del reticle endoplasmàtic. **B)** Estructura determinada per raigs X de la dessaturasa de la llavor de ricí (Lindqvist et al., 1996). Aquesta és una proteïna soluble que en estat natiu es troba en forma de dímer. Els cercles de color vermell indiquen els àtoms de Fe que formen part del centre actiu.

L'estudi detallat de les dessaturases solubles de plantes utilitzant tècniques tan diverses com l'espectrometria Mössbauer, la ressonància Raman, la cristal·lografia de raigs X i el dicromisme circular mostraren que aquestes dessaturases tenen un centre de diferro en el que els dos àtoms metàl·lics estan units per un àtom d'oxigen que actua com a lligand formant un complex  $\mu$ -oxodiferro. El centre metàl·lic de les dessaturases està estabilitzat per lligands com ara histidina, glutamina, àcid aspàrtic i àcid glutàmic. El model cristal·logràfic de l'homodímer (figura I.4.B) indicà una potencial regió d'unió al substrat que forma un canal estret que travessa la proteïna. Posterior modelització computacional suggerí que aquest espai podia acomodar el substrat si aquest adoptava la conformació *gauche* entre les posicions C9 i C10 a la regió proximal al centre difèrric (Sperling and Heinz, 2001; Buist, 2004b). La topologia d'aquest canal permet a la dessaturasa reconèixer el nombre d'àtoms que conté el

substrat, la posició on s'ha d'inserir el doble enllaç i l'existència d'altres dobles enllaços preformats a la cadena. En les dessaturases solubles la regioselectivitat sempre està determinada per la posició del carboxil terminal, mentre que les dessaturases integrals de membrana han evolucionat cap a tres tipus diferents segons el mètode de posicionament del doble enllaç en la cadena (Shanklin and Cahoon, 1998). Així parlem de:

- a) dessaturases on la posició del doble enllaç ve determinada per la posició del grup carboxil terminal (com passa en les dessaturases solubles). Això passa en les  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturases de llevat, de rata i les dessaturases d'insectes
- b) dessaturases que introdueixen el doble enllaç en una posició determinada pel grup metil terminal, com ara algunes  $\Delta^{15}$  dessaturases d'alguns cianobacteris, i es solen anomenar  $\omega$ -3 estearoil dessaturases
- c) dessaturases que no fan servir cap dels dos tipus de marcatge sinó que utilitzen com a marcador un doble enllaç preexistent en la cadena.

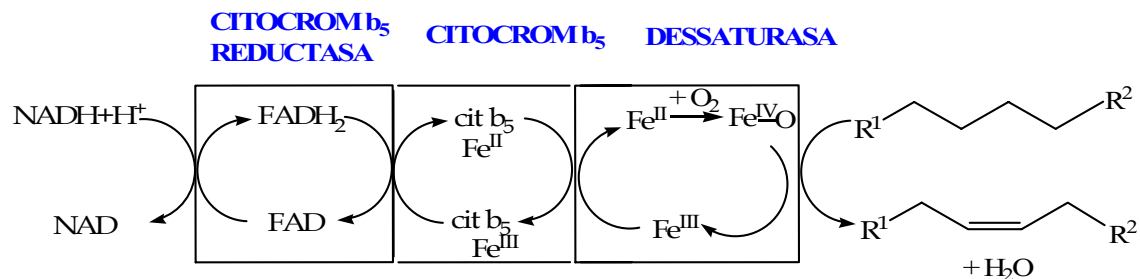
A més de les cadenes d'àcid gras també són substrats de dessaturases els esfingolípidis (Geeraert et al., 1997; Mitchell and Martin, 1997; Sperling et al., 1998; Savile et al., 2001), esterols (Taton et al., 2000), carotenoids, aldehyds i fins i tot probablement ubiquinol en els mitocondris (Sperling and Heinz, 2001).

### **I.2.1. Mecanisme catalític.**

El complex enzimàtic que catalitza les reaccions de dessaturació implica, a més de la pròpia dessaturasa, una font d'electrons i dues proteïnes que tenen com a funció el retorn de la dessaturasa a l'estat natiu per tal de tancar el cicle enzimàtic. Aquests sistemes de regeneració de la dessaturasa són diferents segons el tipus de compartiment subcel·lular on es troba l'enzim (Shanklin and Cahoon, 1998):

- a) en les dessaturases solubles i integrals de membrana que es troben en plastidis la font d'equivalents reductors és el NADPH, les proteïnes de transport electrònic són la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa i la ferredoxina 2Fe-2S.

- b) en les dessaturases localitzades al reticle endoplasmàtic, els equivalents reductors són subministrats pel NADH, i les altres proteïnes són la citocrom  $b_5$  reductasa i el citocrom  $b_5$ .

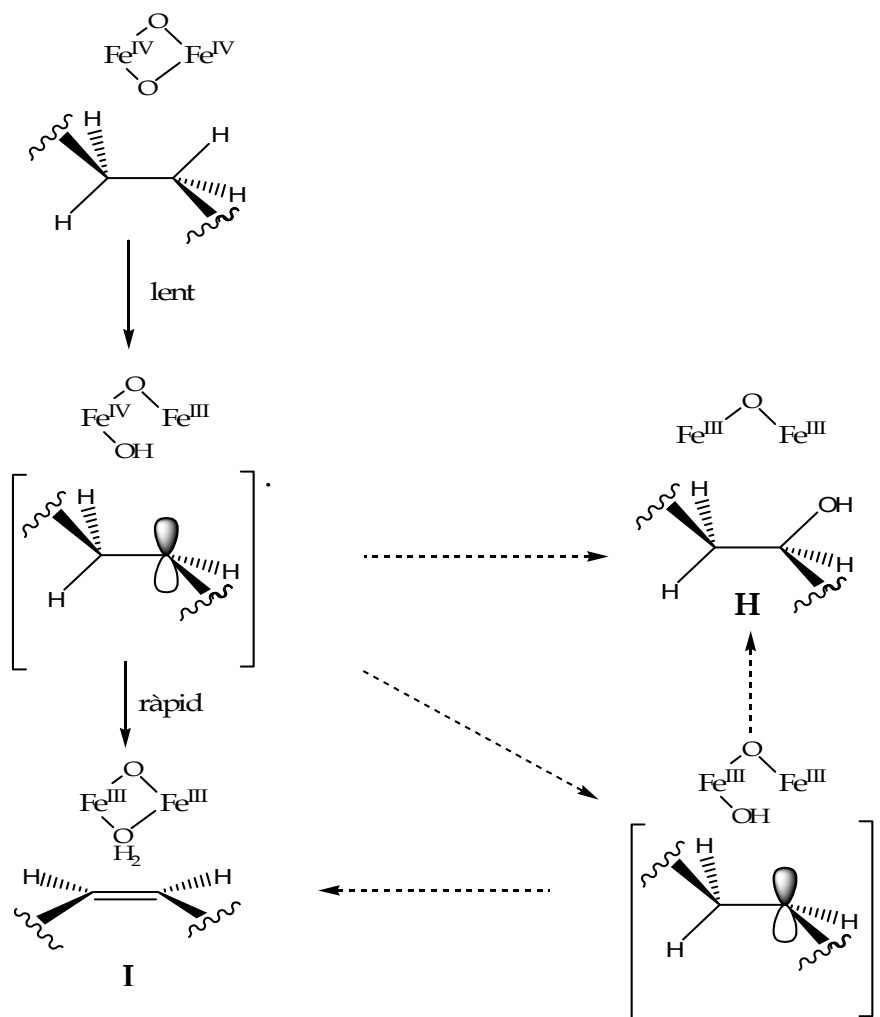


**Figura I.5.** Sistema enzimàtic que catalitza les reaccions de dessaturació en el reticle endoplasmàtic (Shanklin and Cahoon, 1998).

La diferència més gran entre aquests dos sistemes rau en els potencials electroquímics dels transportadors d'electrons; per la ferredoxina el potencial ( $E^\circ$ ) és de  $-420$  mV, mentre que per al citocrom  $b_5$  aquest és de  $-24$  mV. Aquest fet podria ésser explicat per una menor mobilitat de les estructures proteiques que es troben imbuïdes en la membrana del reticle endoplasmàtic respecte a les formes solubles (Shanklin and Cahoon, 1998).

Un cert nombre de dessaturases de membrana contenen un domini addicional que presenta una homologia de seqüència significativa amb el citocrom  $b_5$  (Mitchell and Martin, 1995). Aquest domini pot trobar-se fusionat tant en l'extrem *N*-terminal, el *C*-terminal com al mig de la seqüència de la dessaturasa (Sperling and Heinz, 2001; Buist, 2004b). Tot i que no es coneix amb certesa quina és la seva funció, es creu que possiblement facilita la transferència electrònica a partir de la NADH reductasa cap al centre catalític de diferro.

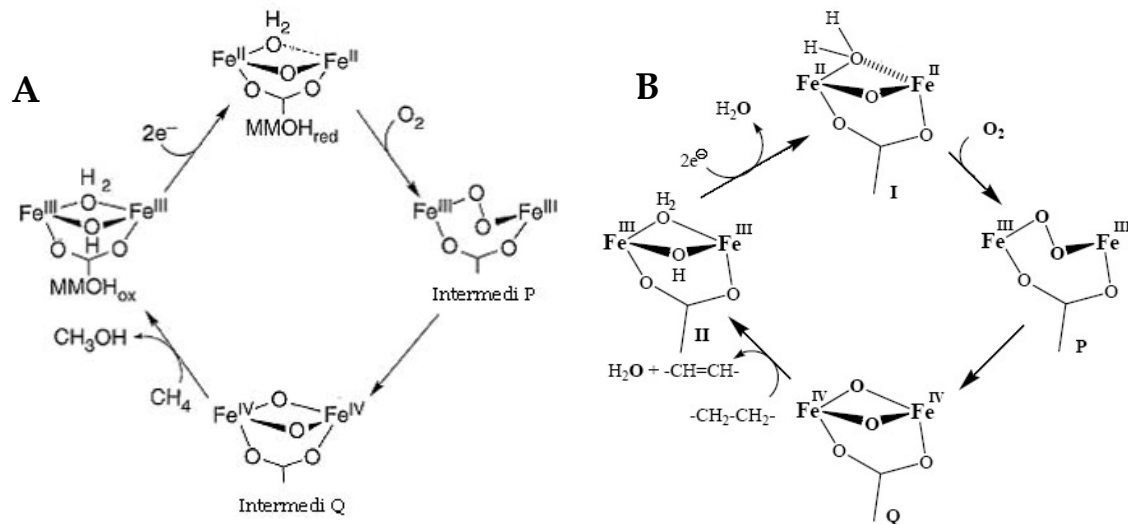
La majoria dels estudis mecanístics de les dessaturases s'han realitzat en organismes intactes o bé en sistemes d'expressió en llevat. Només en són excepcions la  $\Delta^9$  dessaturasa soluble de plantes (Behrouzian et al., 2002), una  $\Delta^4$  dessaturasa d'esfingolípid (Savile et al., 2001) i una  $\Delta^5$  dessaturasa d'esterol (Taton et al., 2000; Rahier, 2001), que han pogut ésser aïllades.



**Figura I.6.** Mecanisme genèric de la dessaturació d'àcids grassos on es mostra la seva relació amb la hidroxilació (la forma I és la dessaturada i la forma H la hidroxilada, que podrien provenir d'un intermedi comú). Les estructures del grup diferro oxidant i els intermedis reactius són especulatius (Buist, 2004b).

Diferents estudis indiquen que la dessaturació és un procés seqüencial en dues etapes. En les dessaturases d'àcids grassos, tant les solubles com les integrals de membrana, el component oxidant és una espècie de  $\text{Fe}_2\text{-O}_2$  similar a la que es troba en les hidroxilacions catalitzades per monooxigenases de metà (MMO). Tot i que els detalls del mecanisme de reacció de les dessaturases no són gaire clars, l'obtenció del compost olefínic sembla que té lloc a partir d'una primera etapa lenta de reacció que consisteix en l'abstracció del primer àtom d'H, donant lloc a un intermedi radicalari altament inestable que ràpidament evoluciona per eliminació del segon àtom d'H ajudat per la presència de l'intermedi  $\text{Fe-OH}$  en el centre catalític de l'enzim (figura I.6). També és

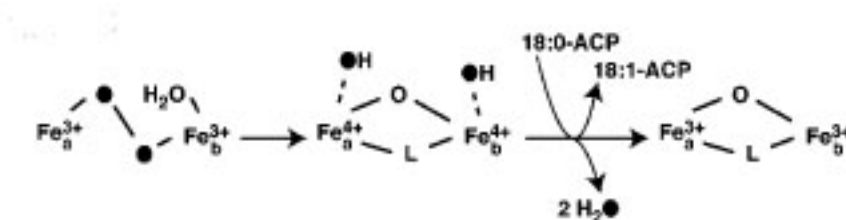
possible la via a través d'un intermedi carbocatiònic. En general l'eliminació del primer hidrogen és *pro-(R)* i la dessaturació es dona amb estereoquímica *syn* (Buist, 2004b; Buist, 2004a).



**Figura I.7.** A) mecanisme de reacció de la monooxigenasa de metà (Shu et al., 1997) i B) mecanisme de reacció proposat per les desaturases d'àcid grassos (en la seva forma soluble) assumint com a model la monooxigenasa de metà.

Pel que fa a la desaturasa, el detall dels estats intermedis pels que passa el centre catalític durant el cicle enzimàtic són poc coneguts, i ha estat un motiu d'estudi intensiu en els darrers anys. Els detalls de la reacció química de la monooxigenasa de metà són més coneguts que el mecanisme de les desaturases. Es proposa que la monooxigenasa de metà i les desaturases comparteixen un intermedi activat comú diferro-oxigen (Que and Dong, 1996; Wallar and Lipscomb, 1996; Shu et al., 1997) (veure figura I.7). En repòs el centre actiu de diferro de l'enzim es troba en la seva forma oxidada (Fe<sup>III</sup>-Fe<sup>III</sup>). L'activació s'inicia amb una reducció de 2 electrons procedents del NADH, per donar lloc a la forma reduïda (Fe<sup>II</sup>-Fe<sup>II</sup>). Després d'aquesta reducció una molècula d'oxigen s'enllaça al centre actiu produint una forma peroxo (P). L'escissió de l'enllaç O-O ocasiona el compost Q, l'intermedi clau oxidant que és responsable de l'abstracció dels àtoms d'hidrogen (figura I.7A). En algun punt durant l'activació de l'oxigen una molècula d'aigua es perd, però es desconeix exactament quan passa aquest fet. Sembla ser que les desaturases solubles

(acil-ACP) s'activen de manera similar a la monooxigenasa de metà perquè comparteixen un plegament comú, tenen un centre actiu de diferro amb el que comparteixen propietats espectroscòpiques i lligands similars i depenen d'oxigen i un reductor per a la seva activitat. Diversos components del cicle catalític, com les formes reduïda i oxidada de la dessaturasa (acil-ACP dessaturasa), observats per espectroscòpia Mössbauer i ressonància Raman són semblants als que s'observen per altres proteïnes amb centre catalític de ferro (Fox et al., 1993; Fox et al., 1994; Wallar and Lipscomb, 1996). Un possible mecanisme de dessaturació d'àcids grassos, basat en el que es coneix per la monooxigenasa de metà, implicaria un compost de tipus Q que abstrauria el primer hidrogen per donar lloc a un intermedi radicalari, i la posterior abstracció del segon àtom d'hidrogen provocaria la formació d'un dirradical que espontàniament recombinaria per donar lloc al doble enllaç (Shanklin and Cahoon, 1998). Experiments de ressonància Raman duts a terme utilitzant  $^{18}\text{O}$  amb la  $\Delta^9$  acil-ACP dessaturasa de ricí (Lyle et al., 2000) mostraren que l'oxigen marcat no s'incorporava en el pont  $\mu$ -oxo, suggerint que els àtoms d'O de la molècula d' $\text{O}_2$  són eliminats ràpidament cap al dissolvent. La figura I.8 mostra un possible mecanisme que permet la pèrdua dels àtoms d'O marcats en forma d'aigua (Fox et al., 2004).



**Figura I.8.** Esquema del paper de l' $\text{O}_2$  durant l'intercanvi amb el centre catalític de diferro en les acil-ACP dessaturases. Amb un cercle negre es simbolitza l'oxigen marcat. La dessaturasa no incorpora cap dels oxígens marcats durant la catàlisi en el pont  $\mu$ -oxo diferro.

Els complexes de tipus  $\mu$ -oxo-diferro, que participen en el mecanisme enzimàtic de les dessaturases poden catalitzar també altres tipus de reaccions com ara: dessaturació en *trans*, conjugació, hidroxilació, epoxidació, acetilació, descarboxilació i fins i tot deshidrogenació (Sperling and Heinz,



2001). Les dessaturases són potencials agents hidroxilants; moltes dessaturases integrals de membrana permeten una via alternativa hidroxilativa que pot donar lloc a alcohols secundaris com a subproductes de reacció (Broadwater et al., 2002).

### I.2.2. $\Delta^9$ acil-CoA dessaturases.

La primera acil-CoA dessaturasa descrita va ésser la  $\Delta^9$  estearoïl-CoA dessaturasa purificada d'extractes de fetge de rata (Strittmatter et al., 1974). El cDNA que codifica aquesta dessaturasa integral de membrana no s'aconseguí aïllar i seqüenciar fins als anys 80 (Thiede et al., 1986; Strittmatter et al., 1988). La determinació de la seqüència d'aquesta dessaturasa i d'altres com les de teixit adipós de ratolí (Ntambi et al., 1988) i de fetge de carpa (Tiku et al., 1996) revelaren que es tracta de seqüències altament conservades que estan compostes per residus hidrofòbics en més d'un 60 %.

L'aïllament de la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa integral de membrana del llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Stukey et al., 1989; Stukey et al., 1990) i la seva comparació amb la seqüència de l'enzim de rata va permetre determinar que hi havia quatre hèlixs  $\alpha$  hidrofòbiques que es pensà que corresponen als dominis transmembrana (Knipple, 2004). Es tracta d'una proteïna de 510 aminoàcids (Los and Murata, 1998) que permet el rescat de soques de llevat deficientes en  $\Delta^9$  dessaturasa i citocrom  $b_5$ , que en principi són no viables. Aquest rescat no s'observa amb la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de rata. La comparació de les dues seqüències dels gens de la dessaturasa de llevat i de rata mostrà que la proteïna de llevat conté un fragment extra de 113 aminoàcids en el seu extrem C-terminal que no es troba en l'enzim de rata (figura I.9). L'anàlisi de seqüència d'aquest fragment revelà una homologia significativa al citocrom  $b_5$  (26 % d'identitat i un 46 % de similitud). Aquest domini a més conté el motiu conservat d'unió al grup hemo EHPGG (X<sub>10</sub>)DAT(X<sub>9-11</sub>)HS i es creu que pot participar en el procés de transport electrònic fins al centre actiu de la dessaturasa (Mitchell and Martin, 1995).

	10	20	30	40	50	60
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	MPTSGTTIEL	IDDQFPKDDS	ASSGIVDEV	LTEANILATG	LNKKAPRIVN	GFGSLMGSKE
Cit. b <sub>5</sub>	-----	MPAHMLQEIS	SSYTTTTTIT	EPPSGNLQNG	REK-----	-----
Consens	-----	-----S	-S-----	-----L--G	--K-----	-----
	70	80	90	100	110	120
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	MVSVEFDKKG	NEKKSNDLRL	LEKDNQEKEE	AKTKIHISEQ	PWTLNNWHQH	LNWLNMLVLC
Cit. b <sub>5</sub>	MKKVPLYLEE	DIRPEMREDI	HDPSYQDEEG	PPPKLEYVWR	NIIL-----	MALLHV GALY
Consens	M--V-----	-----	-----Q--E-	---K-----	---L-----	---L-----
	130	140	150	160	170	180
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	GMPMIGWYFA	LSGKVPLHLN	VFLFSVFYFA	VGGVSITAGY	HRLWSHRSYS	AHWPLRRLFYA
Cit. b <sub>5</sub>	GITLIP----	SSKV----Y	TLLWGIFYYL	ISALGITAGA	HRLWSHRTYK	ARLPLRIFLI
Consens	G---I-----	-S-KV-----	--L---FYY-	-----ITAG-	HRLWSHR-Y-	A--PLR-F--
	190	200	210	220	230	240
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	IFGCASVEGS	AKWWGHSRI	HHRYTDTLRD	PYDARRGLWY	SHMGWMLLKP	NPKYKAR---
Cit. b <sub>5</sub>	IANTMAFQND	VYEWARHRA	HHKFSETHAD	PHNSRRGFFF	SHVGWLLVRK	HPAVKEKGGK
Consens	I-----	---W---HR-	HH----T--D	P---RRG---	SH-GW-L---	-P--K-----
	250	260	270	280	290	300
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	ADITDMTDDW	TIRFQHRHYI	LLMLLTAFVI	PTLICGYFFN	-DYMGLLIYA	GFIRVFVIQQ
Cit. b <sub>5</sub>	LDMSDLKAEK	LVMFQRRYK	PGLLLMCFIL	PTLVPWYCWG	ETFLHSLFVS	TFLRYTLVLN
Consens	-D--D-----	---FQ-R-Y-	---LL--F--	PTL---Y---	-----L---	-F-R-----
	310	320	330	340	350	360
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	ATFCINSLAH	YIGTQPFDDR	RTPRDNWITA	IVTFGEGYHN	FHHEFPDYR	NAIKWYQYDP
Cit. b <sub>5</sub>	ATWLNSAAH	LYGYRPYDKN	IQSRENILVS	LGSVGEFHN	YHHAFPYDYS	ASEYRWHINF
Consens	AT--NS-AH	--G--P-D--	---R-N----	----GEG-HN	-HH-FP-DY-	-----
	370	380	390	400	410	420
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	TKVIIYLTSL	VGLAYDLKKF	SQNAIEEALI	QQEQKINKK	KAKINWGPVL	TDLP-MWDKQ
Cit. b <sub>5</sub>	TTFIDCMAA	LGLAYDRKKV	SKAAV-LARI	KRTGDGSHKS	S-----	-----
Consens	T---I-----	-GLAYD-KK-	S--A---A-I	-----K-	-----	---P-----Q
	430	440	450	460	470	480
$\Delta^9$ S.cer	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	TFLAKSKENK	GLVIIISGIVH	DVSGYISEHP	GGETLIKTAL	GKDATKAFSG	GVYRHSNAAQ
Cit. b <sub>5</sub>	EVAEHNGPEN	FWIIIDDKVY	DVSQFKDEHP	GGDEIIMDLG	GQDATESFVD	IG--HSDEAL
Consens	-----	---II--V-	DVS---EHP	GG---I----	G-DAT--F--	----HS--A-

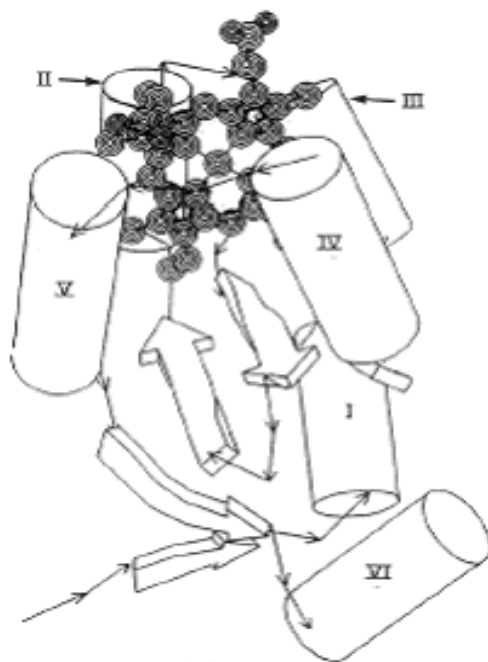
	490	500	510	520	530
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^{\circ}$ S.cer	NVLADMVA-	VIKESKNSAI	RMASKRGEIY	ETGKFF----	-----
$\Delta^{\circ}$ rata	-----	-----	-----	-----	-----
Cit. $b_5$	RLLKGLYIGD	VDKTSERVS	EKVSTSENQS	KSGTLLVVIL	AILLMLGVAYY LLNE
Consens	--L-----	V-K-S-----	---S-----	-----	-----

**Figura I.9.** Alineament de les seqüències de les dessaturases de llevat i de rata juntament amb la del citocrom  $b_5$  de llevat. Es pot observar l'homologia de seqüència entre l'extrem C-terminal de la dessaturasa de llevat i el citocrom  $b_5$  (Mitchell and Martin, 1995).

### I.2.3. Citocrom $b_5$ .

El citocrom  $b_5$  és una proteïna de membrana, mòbil i amfipàtica, que es sol trobar en la superfície del reticle endoplasmàtic. És una proteïna transportadora d'electrons, amb un potencial redox a pH=7 de ~20 mV, que és capaç d'acceptar i transferir un sol electró (Velick and Strittmatter, 1956).

Les interaccions entre el citocrom  $b_5$  i la dessaturasa són crítiques, ja que la dessaturasa és una proteïna que es troba completament submergida en la membrana degut a que requereix l'entorn hidrofòbic de la regió hidrocarbonada de la bicapa lipídica per mantenir les característiques estructurals essencials per a la seva funció. L'orientació específica que es requereix per la transferència d'electrons entre les dues proteïnes (citocrom  $b_5$  i dessaturasa) pot estar altament restringida en virtut de la interacció limitada entre la dessaturasa i el pèptid que conté el grup hemo del citocrom  $b_5$  en la fase aquosa (Dailey and Strittmatter, 1978).



**Figura I.10.** Estructura tridimensional de citocrom  $b_5$  de *Saccharomyces cerevisiae*. Els cilindres representen hèlixs  $\alpha$  i les fletxes, les làmines  $\beta$  (Xia and Mathews, 1990).

El domini d'unió al grup hemo del citocrom  $b_5$  i els altres integrants del sistema redox es troben localitzats a la cara citoplasmàtica del reticle endoplasmàtic (Vergeres and Waskell, 1995). La figura I.10 representa l'estructura del citocrom  $b_5$  de *S. cerevisiae*. L'ancoratge a la membrana del reticle endoplasmàtic es creu que està determinada pels 10 aminoàcids de l'extrem carboxil terminal (Mitoma and Ito, 1992).

#### **I.2.4. Dessaturases en lepidòpters.**

L'anàlisi de moltes vies biosintètiques de feromones sexuals d'arnes posa de manifest que la diversitat d'estructures utilitzades com a feromona prové de l'evolució cap a noves especificitats de substrat i mecanismes catalítics diferents en enzims clau de la ruta biosintètica. Les dessaturases implicades en la biosíntesi de feromones sexuals en lepidòpters han evolucionat cap a especificitats posicionals i estereoquímiques diferents, donant lloc a àcids grassos monoinsaturats i poliinsaturats (Knipple and Roelofs, 2003).

Els estudis realitzats sobre les propietats bioquímiques de les  $\Delta^{11}$  dessaturases de *Trichoplusia ni* i *Spodoptera littoralis* mostraren que aquestes

---

compartien propietats comunes amb les  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturases, com ara la localització subcel·lular, l'utilització d'èsters de coenzim A, l'inhibició per cianur, la falta de sensibilitat al monòxid de carboni i l'utilització del NADH com a donador d'electrons (Wolf and Roelofs, 1986; Rodríguez et al., 1992).

Les dades anteriors van portar l'any 1998 al clonatge per primer cop d'una dessaturasa implicada en la biosíntesi de les feromones sexuals en lepidòpters: la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *Trichoplusia ni*, que va ésser identificada amplificant les dues caixes d'histidina conservades descrites per Shanklin i col. l'any 1994 (Shanklin et al., 1994). La seqüència d'aquesta dessaturasa conté un ORF (fragment de pauta oberta de lectura) de 1047 bp que codifica una proteïna de 349 aminoàcids (Knipple et al., 1998).

Des de llavors ençà, s'han clonat, seqüenciat i expressat funcionalment diverses dessaturases implicades en la biosíntesi de les feromones sexuals de diferents membres de la família dels lepidòpters (taula I.1).

Recentment s'ha dut a terme l'expressió heteròloga funcional de diferents dessaturases. Això ha estat possible gràcies a l'observació que les dessaturases de diferents organismes poden suplir la manca d'activitat dessaturasa en soques de llevat (L8-14C o *Δole1*) deficientes en l'enzim endògen (Stukey et al., 1990). Aquestes soques poden créixer també mitjançant l'addició d'àcids grassos insaturats, com ara l'àcid (Z)-11-octadecenoic, al medi de cultiu (Knipple and Roelofs, 2003). Aquest sistema ha permès, per tant, abordar l'expressió en cultius de llevat de les dessaturases implicades en la biosíntesi de les feromones sexuals de diferents espècies de lepidòpters. D'aquesta manera s'han obtingut resultats satisfactoris amb algunes  $\Delta^{11}$  dessaturases, com ara les de *Trichoplusia ni* (Knipple et al., 1998), *Spodoptera littoralis* (Rodríguez et al., 2004b), *Argyrotaenia velutinana* (Liu et al., 2002b) i *Helicoverpa zea* (Rosenfield et al., 2001), però no amb la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *Epiphyas postvittana* (Liu et al., 2002a) que només és capaç d'introduir dobles enllaços amb geometria E, ni amb la  $\Delta^{10}$  dessaturasa de *Planotortrix octo* (Hao et al., 2002a). Altres dessaturases, com les  $\Delta^{14}$  dessaturases, clonades fins a la data s'han hagut d'expressar en cèl·lules d'insecte utilitzant sistemes basats en baculovirus (Roelofs et al., 2002).

**Taula I.1.** Acil-CoA dessaturases de lepidòpters clonades.<sup>a</sup>

<b>Acil-CoA dessaturasa</b>	<b>Espècies</b>	<b>Referència</b>
$\Delta^9$	<i>Trichoplusia ni</i> <i>Planotortrix octo</i> <i>Epiphyas postvittana</i> <i>Helicoverpa zea</i> <i>Argyrotaenia velutinana</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Ostrinia furnacalis</i> <i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Manduca sexta</i>	(Liu et al., 1999) (Hao et al., 2002a) (Liu et al., 2002a) (Rosenfield et al., 2001) (Liu et al., 2002b) (Rodríguez et al., 2004b) (Roelofs et al., 2002) (Roelofs et al., 2002) *
$\Delta^{10}$	<i>Planotortrix octo</i>	(Hao et al., 2002a)
$\Delta^{11}$ (geometria Z)	<i>Trichoplusia ni</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Helicoverpa zea</i>	(Knipple et al., 1998) (Rodríguez et al., 2004b) (Rosenfield et al., 2001)
$\Delta^{11}$ (geometria E)	<i>Choristoneura parallela</i> <i>Epiphyas postvittana</i>	(Liu et al., 2004) (Liu et al., 2002a)
$\Delta^{11}$ (configuració E/Z)	<i>Bombyx mori</i> <i>Argyrotaenia velutinana</i> <i>Choristoneura rosaceana</i> <i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Ostrinia scapulalis</i> <i>Ostrinia furnacalis</i>	(Moto et al., 2004) (Liu et al., 2002b) (Hao et al., 2002b) (Roelofs et al., 2002) (Fukuzawa et al., 2005) (Roelofs et al., 2002)
$\Delta^{14}$	<i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Ostrinia furnacalis</i>	(Roelofs et al., 2002) (Roelofs et al., 2002)

\* Número d'accés al GenBank AM076338 ( Jostova,P., Svatos,A. i Pichova,I; 2005 (no publicat)).

<sup>a</sup> Dessaturases d'insecte de les que es coneix actualment la seqüència codificant. Les dessaturases clonades presenten diferents estereoquímiques donant lloc a una àmplia diversitat estructural en les feromones sexuals dels insectes.

### **I.3. Antecedents de la recerca sobre dessaturases en el grup de treball.**

En el departament de Química Orgànica Biològica de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC) durant els darrers anys s'han realitzat múltiples investigacions sobre la comunicació sexual entre lepidòpters. L'interès rau en la possible aplicació dels resultats d'aquestes investigacions en el control biorracional de plagues en cultius econòmicament importants, evitant l'ús d'insecticides que puguin ésser perjudicials per al medi ambient o fins i tot tòxics per al consum humà.

En aquest context s'han abordat diferents aspectes com l'elucidació estructural dels compostos que formen part de les mescles feromonals de diferents espècies, com ara *Thaumetopoea pityocampa* (Guerrero et al., 1981; Quero et al., 1997), l'estudi dels mecanismes de biosíntesi de feromones sexuals de diferents espècies d'insectes, especialment en les espècies *Spodoptera littoralis* (Martínez et al., 1990; Rodríguez et al., 1992; Navarro et al., 1997a; Navarro et al., 1997b; Pinilla et al., 1999; Abad et al., 2000; Abad et al., 2001; Rodríguez et al., 2001; Rodríguez et al., 2002) i *Thaumetopoea pityocampa* (Fabriàs et al., 1989; Arsequell et al., 1990; Barrot et al., 1994; Villorbina et al., 2003a; Abad et al., 2004). En aquest context s'han estudiat les seqüències biosintètiques i la seva activació (Fabriàs et al., 1994; Fabriàs et al., 1995; Iglesias et al., 2002), així com la seva possible inhibició mitjançant àcids grassos fluorats (Arsequell et al., 1992; Abad et al., 2003) i ciclopropènics (Arsequell et al., 1992; Gosalbo et al., 1992; Rodríguez et al., 2004a).

Darrerament les investigacions realitzades en el nostre grup de recerca han estat dirigits cap a l'estudi mecanístic detallat dels enzims clau en la biosíntesi de les feromones en lepidòpters: les dessaturases. S'han preparat compostos marcats isotòpicament per estudiar la criptoregioquímica i l'estereoquímica del procés d'eliminació dels àtoms d'hidrogen en el procés de dessaturació en *Spodoptera littoralis* (Navarro et al., 1997a; Pinilla et al., 1999; Abad et al., 2001; Rodríguez et al., 2002) i en *Thaumetopoea pityocampa* (Abad et al., 2004).

Així mateix, la generalització de les tècniques de biologia molecular i la seva adaptació a la investigació de la biosíntesi de feromones sexuals (Knipple et al., 1998) féu que s'abordés el clonatge i l'expressió de les dessaturases implicades en la biosíntesi de la mescla feromonal d'*Spodoptera littoralis* (Rodríguez et al., 2004b).





## **II. OBJECTIUS**

---



D'acord amb els antecedents presentats anteriorment i en el marc d'un projecte sobre producció biotecnològica d'àcids grassos insaturats utilitzant dessaturases, els objectius que s'han abordat en aquesta tesi són els següents:

1. Estudis sobre la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *Trichoplusia ni*. Construcció i determinació de l'activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa d'una proteïna quimèrica.

a) Sobreexpressió de l'enzim de *T. ni* salvatge en llevat i anàlisi de la seva activitat sobre diferents substrats.

b) Construcció i expressió d'una variant quimèrica i comparació de la seva activitat amb la de l'enzim salvatge.

2. Determinació de les activitats catalítiques de les  $\Delta^{11}$ -acil-CoA dessaturases de *Spodoptera littoralis* i *Trichoplusia ni*.

a) Caracterització de l'activitat dessaturasa de l'enzim de *S. littoralis* i comparació amb la de l'enzim de *T. ni*. Activitat hidroxilasa residual d'aquestes dessaturases.

b) Estudi de la seva possible activitat com a  $\Delta^{10,12}$  dessaturasa.

c) Activitat sobre d'altres substrats.

3. Clonatge i expressió funcional de les dessaturases implicades en la biosíntesi de la feromona sexual de *Thaumetopoea pityocampa*.

a) Clonació i identificació d'una dessaturasa present en la glàndula feromonal de la processonària del pi.

b) Anàlisi funcional de l'enzim.

4. Investigació de la influència de diferents condicions de cultiu sobre el creixement de mutants de llevat transformats amb els gens de dessaturases.

a) Posar a punt un mètode de determinació de l'activitat dessaturasa *in vitro*.

## **III.RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---



IIIa. ESTUDIS SOBRE LA  $\Delta^{11}$  ACIL-CoA  
DESSATURASA DE *Trichoplusia ni*.  
CONSTRUCCIÓ I DETERMINACIÓ DE  
L'ACTIVITAT  $\Delta^{11}$  DESSATURASA D'UNA  
PROTEÏNA QUIMÈRICA.

---

---





### IIIa.1. *Trichoplusia ni*.

L'insecte *Trichoplusia ni* es troba àmpliament estès a Canadà, Mèxic i al sud d'Estats Units en els cultius de crucíferes. És una plaga altament dispersiva ja que els adults es poden trobar a grans alçades i lluny de la costa.

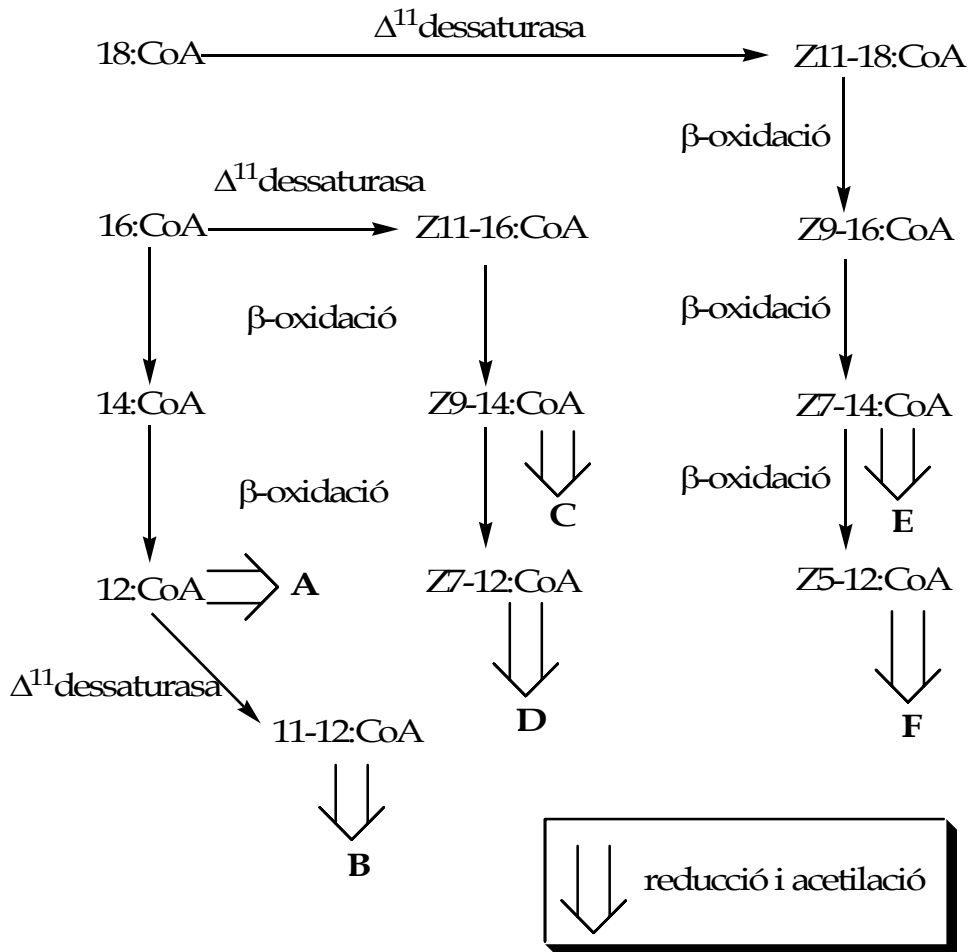


**Figura IIIa.1.** Exemplar de femella de l'arna *Trichoplusia ni*.

El principal component de la feromona sexual d'aquest insecte va ésser identificat com l'acetat de (Z)-7-dodecenil (Berger, 1966). Posteriorment s'identificà l'acetat de dodecil com a segon component majoritari, important sobre el comportament a distàncies curtes. La femella també produeix acetat de (Z)-5-dodecenil, acetat de (Z)-11-dodecenil, acetat de (Z)-7-tetradecenil i acetat de (Z)-9-tetradecenil (Bjostad et al., 1984).

En l'estudi de la biosíntesi de la feromona sexual d'aquest insecte s'ha demostrat que la ruta comença amb la síntesi de novo dels èsters de coenzim A dels àcids grassos palmític i esteàric seguida de l'acció d'una  $\Delta^{11}$  dessaturasa per obtenir els corresponents derivats dels àcids (Z)-11-hexadecenoic i (Z)-11-octadecenoic. Posteriors etapes de  $\beta$ -oxidació escurcen la cadena en dos o

quatre àtoms de carboni i finalment els compostos són reduïts i acetilats (Bjostad and Roelofs, 1983)(figura IIIa.2).



**Figura IIIa.2.** Esquema biosintètic de la mescla feromonal de *Trichoplusia ni*. Components de la mescla feromonal: **A** acetat de dodecil; **B** acetat de 11-dodecenil; **C** acetat de (Z)-9-tetradecenil; **D** acetat de (Z)-7-dodecenil; **E** acetat de (Z)-7-tetradecenil i **F** acetat de (Z)-5-dodecenil.

*T. ni* fou el primer lepidòpter del que es va aïllar el cDNA corresponent a la  $\Delta^{11}$  dessaturasa (Knipple et al., 1998). De l'aïllament de l'RNA de les glàndules feromonals se n'identificaren dos cDNAs: un corresponent a una  $\Delta^9$  dessaturasa (Liu et al., 1999) i un altre corresponent a una  $\Delta^{11}$  dessaturasa (Knipple et al., 1998).

### IIIa.2. Biologia molecular.

Com ja s'ha indicat, el clonatge de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* fou el primer aconseguit d'una dessaturasa implicada en la biosíntesi de feromones sexuals en lepidòpters (Knipple et al., 1998). Prèviament ja s'havia establert que aquesta dessaturasa, a l'igual que passava amb la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa d'*S. littoralis* mostrava moltes similituds amb les  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturases ubiques que es troben en molts organismes eucariotes (Wolf and Roelofs, 1986; Rodríguez et al., 1992).

```

1 ATGGCTGTGA TGGCTCAAAC AGTACAAGAA ACGGCTACAG TGTTGGAAGA
  M A V M A Q T V Q E T A T V L E E
51 GGAAGCTCGC ACAGTGACTC TTGTGGCTCC AAAGACAACG CCAAGGAAAT
  E A R T V T L V A P K T T P R K Y
101 ATAAATATAT ATACACCAAC TTTCTTACAT TTTCATATGC GCATTTAGCT
  K Y I Y T N F L T F S Y A H L A
151 GCATTATACG GACTTTATTT GTGCTTCACC TCTGCGAAAT GGGAAACATT
  A L Y G L Y L C F T S A K W E T L
201 GCTATTCTCT TTCGTA CTCT TCCACATGTC AAATATAGGC ATCACC GCAG
  L F S F V L F H M S N I G I T A G
251 GGGCTCACCG ACTCTGGACT CACAAGACTT TCAAAGCCAA ATTGCCTTTG
  A H R L W T H K T F K A K L P L
301 GAAATTGTCC TCATGATATT CAACTCTTTA GCCTTTCAAA ACACGGCTAT
  E I V L M I F N S L A F Q N T A I
351 TACATGGGCT AGAGAACATC GGCTACATCA CAAATACAGC GATACTGATG
  T W A R E H R L H H K Y S D T D A
401 CTGATCCCCA CAATGCGTCA AGAGGGTTCT TCTACTCGCA TGTTGGCTGG
  D P H N A S R G F F Y S H V G W
451 CTATTAGTAA AAAAACATCC CGATGTCCTG AAATATGGAA AAAC TATAGA
  L L V K K H P D V L K Y G K T I D
501 CATGTCGGAT GTATAACAATA ATCCTGTGTT AAAATTT CAG AAAAAGTACG
  M S D V Y N N P V L K F Q K K Y A
551 CAGTACCCTT AATTGGAACA GTTTGT TTTG CTCTTCCAAC TTTGATTCCA
  V P L I G T V C F A L P T L I P
601 GTCTACTGTT GGGGCGAATC GTGGAACAAC GCTTGGCACA TAGCCTTATT
  V Y C W G E S W N N A W H I A L F
651 TCGATACATA TTCAATCTTA ACGTGACTTT CCTAGTCAAC AGTGCTGCGC
  R Y I F N L N V T F L V N S A A H
701 ATATCTGGGG GAATAAGCCT TATGATAAAA GCATCTTGCC CGCTCAAAAC
  I W G N K P Y D K S I L P A Q N
751 CTGCTGGTTT CCTTCCTAGC AAGTGGAGAA GGCTTCCATA ATTACCATCA
  L L V S F L A S G E G F H N Y H H
801 CGTCTTTCCA TGGGATTACC GCACAGCAGA ATTAGGGAAT AACTTCCTGA
  V F P W D Y R T A E L G N N F L N
851 ATTTGACGAC GCTGTT CATT GATTTTTGTG CCTGGTTTGG ATGGCTTAT
  L T T L F I D F C A W F G W A Y
901 GACTTGAAGT CTGTATCAGA GGATAT TATA AAACAGAGAG C TAAACGAAC
  D L K S V S E D I I K Q R A K R T
951 AGGTGACGGT TCTTCAGGGG TCATTTGGGG ATGGGACGAC AAAGACATGG
  G D G S S G V I W G W D D K D M D

```

1001 ACCGCGATAT AAAATCTAAA GCTAACATT TTTATGCTAA AAAGGAATGA  
 R D I K S K A N I F Y A K K E \*

**Figura IIIa.3.** Seqüència nucleotídica i aminoacídica de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni*.

El cDNA que codifica la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* consisteix en una seqüència de 1047 bp que dóna lloc a una proteïna de 349 aminoàcids (figura IIIa.3). L'expressió funcional en llevat d'aquesta proteïna implica la conservació funcional de l'interaccions entre l'acil-CoA dessaturasa i el citocrom  $b_5$  i la interacció d'aquest darrer amb la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa (Knipple et al., 1998). En treballs anteriors s'havia descrit l'expressió de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* en la soca de *S. cerevisiae* anomenada  $\Delta ole1$ , deficient en  $\Delta^9$  dessaturasa, que permet dur a terme una selecció dels clons funcionals de dessaturases exògenes, ja que aquests suplementen la manca d'activitat dessaturasa endògena. Així ha estat possible l'expressió de les  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturases d'algunes espècies de lepidòpters com ara *T. ni* (Knipple et al., 1998), *Helicoverpa zea* (Rosenfield et al., 2001) o bé *S. littoralis* (Rodríguez et al., 2004b) però no en el cas d'altres com *Epiplatys postvittana* (Liu et al., 2002a), que enlloc d'expressar-se en llevat ha calgut recórrer a sistemes més complexes basats en baculovirus.

Com ja s'ha esmentat en la introducció, la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de llevat (OLE1) presenta en l'extrem C-terminal de la seva seqüència un domini homòleg al citocrom  $b_5$  (OLE $b_5$ ), que es creu que té la funció de promoure el flux d'electrons fins al grup prostètic de l'enzim, pas necessari per tal de tancar el seu cicle catalític. L'eliminació del domini OLE $b_5$  en la  $\Delta^9$  dessaturasa de llevat origina que aquesta proteïna no sigui capaç de reparar l'auxotròfia d'àcids grassos monoinsaturats fins i tot en presència del gen del citocrom  $b_5$  en la cèl·lula del llevat (Mitchell and Martin, 1995). S'especula que aquesta funció podria estar facilitada per una correcta orientació del grup hemo respecte el centre catalític de la dessaturasa tot i que no hi ha evidències clares. Per aquest motiu es va plantejar la proteïna quimèrica que sortiria de la fusió de la  $\Delta^{11}$  *Tni* al domini OLE $b_5$  amb l'objectiu d'analitzar els efectes que aquesta modificació tindria sobre l'activitat dessaturasa i determinar si pot contribuir a augmentar la

seva activitat. La figura IIIa.4. mostra les seqüències de les dues dessaturases naturals (OLE1 i  $\Delta^{11}Tni$ ) i la que resultaria per la proteïna quimèrica ( $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ ). Aquest estudi seria interessant per a la possible utilització biotecnològica de la dessaturasa d'aquest insecte, que com ja s'ha indicat és un dels objectius finals del projecte en els que s'emmarquen aquest estudis.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55	65
$\Delta^{11}T.ni$	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OLE1	MPTSGTTIEL	IDDQFPKDDS	ASSGIVDEVD	LTEANILATG	LNKKAPRIVN	GFGSLMGSKE	MVSVEFDKKG
Consens							
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	75	85	95	105	115	125	135
$\Delta^{11}T.ni$	--MAVMAQTV	QETATVLEEE	ARTVTLVAPK	TTPRKYKIY	TNFLTFSYAH	LAALYGLYLC	FT---SAKWE
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	--MAVMAQTV	QETATVLEEE	ARTVTLVAPK	TTPRKYKIY	TNFLTFSYAH	LAALYGLYLC	FT---SAKWE
OLE1	NEKKSNDRL	LEKDNQEKKE	AKTKIHISEQ	PWTLNWNHQH	LNWLNMLVLC	GMPMIGWYFA	LSGKVPLHLN
Consens	:	:	*	.	:	**	:
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	145	155	165	175	185	195	205
$\Delta^{11}T.ni$	TLFVSFVLFH	MSNIGITAGA	HRLWTHKTFK	AKLPLEIVLM	IFNSLAFQNT	AITWAREHRL	HHKYSDDTDAD
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	TLFVSFVLFH	MSNIGITAGA	HRLWTHKTFK	AKLPLEIVLM	IFNSLAFQNT	AITWAREHRL	HHKYSDDTDAD
OLE1	VFLFSVIFYA	VGGVSITAGY	HRLWSHRSYS	AHWPLRLFYA	IFGCASVEGS	AKWWGSHSRI	HHRYPDTLRD
Consens	.	***	.	:	***	****	****
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	215	225	235	245	255	265	275
$\Delta^{11}T.ni$	PHNASRGGFY	SHVGWLLVKK	HPDVLKYGKT	IDMSDVYNNP	VLKFQKKYAV	PLIGTVCFAL	PTLIPVYCWG
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	PHNASRGGFY	SHVGWLLVKK	HPDVLKYGKT	IDMSDVYNNP	VLKFQKKYAV	PLIGTVCFAL	PTLIPVYCWG
OLE1	PYDARRGLWY	SHMGWMLLKP	NP---KYKAR	ADITDMDDDW	TIRFQHRHYI	LLMLLTAFVI	PTLICGYFFN
Consens	*	***	***	***	***	***	***
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	285	295	305	315	325	335	345
$\Delta^{11}T.ni$	ESWNNAWHIA	LFRYIFNLNV	TFLVNSAAHI	WGNKPYDKSI	LPAQNLLVSF	LASGEGFHNY	HHVFPWDYRT
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	ESWNNAWHIA	LFRYIFNLNV	TFLVNSAAHI	WGNKPYDKSI	LPAQNLLVSF	LASGEGFHNY	HHVFPWDYRT
OLE1	DYMGGLIYAG	FIRVFVIQQA	TFCINSLAHY	IGTQPFDDRR	TPRDNWITAI	VTFGEGYHNF	HHEFPTDYRN
Consens	:	:	:	:	:	:	:
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	355	365	375	385	395	405	415
$\Delta^{11}T.ni$	AELGNNFLNL	TTLFIDFCAW	FGWAYDLKSV	SEDIKQRAK	RTGD---GSS	GVIWGWDDKD	MDRDIKSKAN
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	AELGNNFLNL	TTLFIDFCAW	FGWAYDLKSV	SEDIKQRAK	RTGD---GSS	GVIWGWDDKD	MDRDIKSKAN
OLE1	AIKWYQYD-P	TKVIIYLTSL	VGLAYDLKKF	SQNAIEEALI	QQEQKK----	-----	---INKKKAK
Consens	*	:	:	:	:	:	:
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	425	435	445	455	465	475	485
$\Delta^{11}T.ni$	IFYAKKE---	-----	-----	-----	-----	-----	-----
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	IFYAKKEVDL	PMWDKQTFLA	KSKENKGLVI	ISGIVHDVSG	YISEHPGGET	LIK TALGKDA	TKAFSGGVYR
OLE1	INWGPVLTDL	PMWDKQTFLA	KSKENKGLVI	ISGIVHDVSG	YISEHPGGET	LIK TALGKDA	TKAFSGGVYR
Consens	:	:	:	:	:	:	:

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.
	495	505	515	525	
$\Delta^{11}T.ni$	-----				
$\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	HSNAAQNVL*	DMRVAVIKES	KNSAIRMASK	RGEIYETGKF	F
OLE1	HSNAAQNVL*	DMRVAVIKES	KNSAIRMASK	RGEIYETGKF	F
<b>Consens</b>					

**Figura IIIa.4.** Alineament de les seqüències de les dessaturases  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. cerevisiae* (OLE1) i  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* ( $\Delta^{11}Tni$ ) amb la seqüència de la proteïna quimèrica  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni/OLEb<sub>5</sub>* ( $\Delta^{11}Tni /OLEb_5$ ). L'asterisc (\*) indica posicions que tenen un sol residu totalment conservat. Els dos punts (:) i el punt (.) indiquen modificacions conservatives.

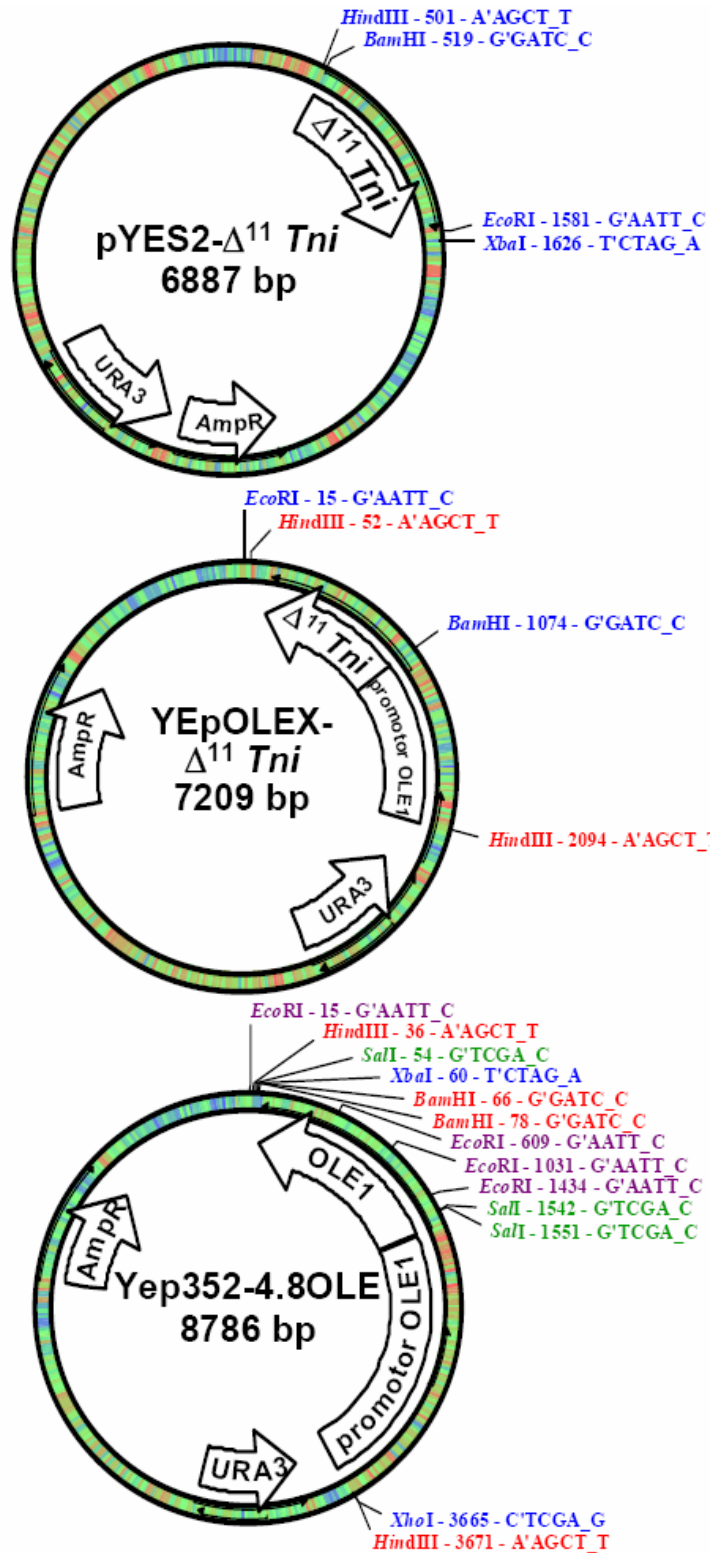
### IIIa.2.1 Construcció del gen de la proteïna quimèrica $\Delta^{11} Tni/OLEb_5$ i clonatge en els vectors d'expressió en llevat pYES2, YEpOLEX i pYEXTHS-BN.

Es disposava del gen de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T.ni* ( $\Delta^{11}Tni$ ) clonat en el vector d'expressió pYES2 que s'havia obtingut prèviament en el grup a partir de la construcció YEpOLEX-CRL7 (nomenclatura de l'article original que en aquest treball es substitueix per YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ ) (Knipple et al., 1998). Així mateix es disposava de la construcció Yep352-4.8OLE, que conté el gen de la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. cerevisiae* (Stukey et al., 1989). Els mapes d'aquests tres plasmidis es mostren a la figura IIIa.5. Calia, per tant, introduir en la seqüència codificant de  $\Delta^{11} Tni$  una mutació al final per a eliminar el codó de parada i poder fusionar-hi la seqüència d'OLEb<sub>5</sub>.

Un cop construïda la seqüència codificant d'aquesta quimera es pretenia clonar-la en els vectors pYES2 i YEpOLEX. El vector pYES2 és un vector induïble que es reprimeix per glucosa però s'indueix per galactosa quan aquest sucre és la font de carboni. Per altra banda, el vector YEpOLEX és un vector d'expressió en llevat de tipus constitutiu que ja s'havia emprat prèviament en el clonatge d'altres dessaturases (Stukey et al., 1990; Knipple et al., 1998; Liu et al., 1999; Rosenfield et al., 2001; Hao et al., 2002a; Hao et al., 2002b; Liu et al., 2002a; Liu et al., 2002b; Roelofs et al., 2002; Jeong et al., 2003; Liu et al., 2004).

Els vectors pYES2 i YEpOLEX permeten transformar tant cèl·lules de bacteri com cèl·lules de llevat (per aquest motiu s'anomenen shuttle vectors) i poden replicar-se en aquests organismes de manera independent, ja que la seva

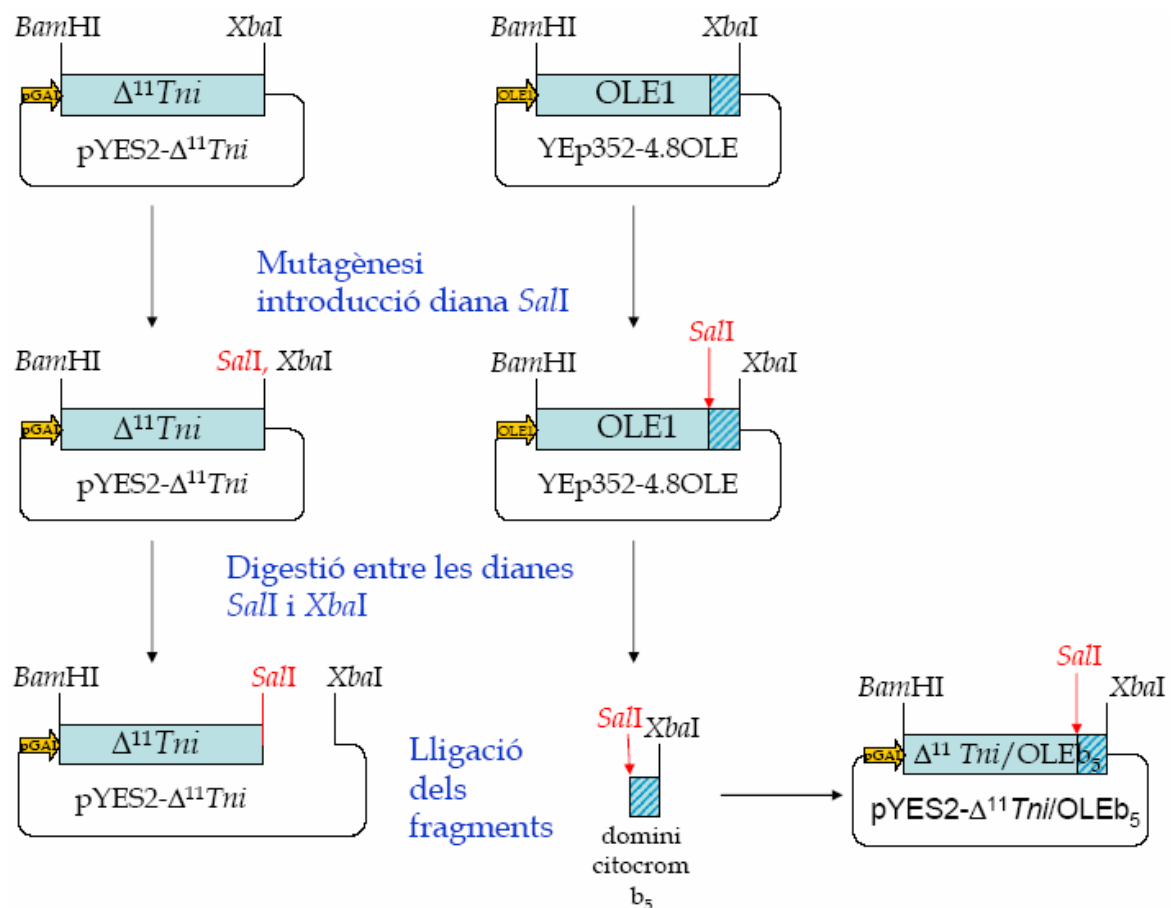
seqüència de nucleòtids inclou un origen de replicació en llevat (fragment 2  $\mu$ m) com un origen de replicació en bacteri (fragment pUC18 en el vector YEpOLEX i el fragment ColE1 en el vector pYES2).



**Figura IIIa.5.** Mapes dels plasmidis pYES2- $\Delta^{11}$ Tni, YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni (YEpOLEX-CRL7) i Yep352-4.8OLE. S'indiquen les posicions dels marcadors en llevat (URA3) i bacteri (Amp<sup>R</sup>).

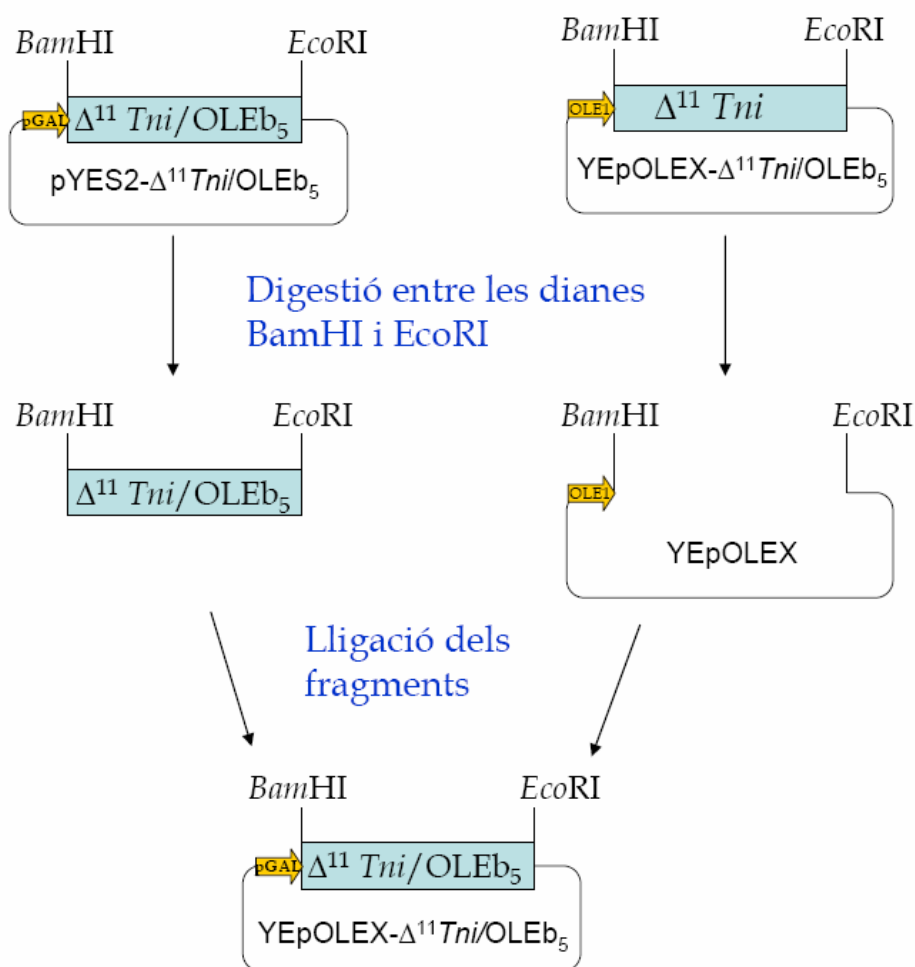
Els dos vectors presenten la seqüència del gen URA3, que permet la selecció dels llevats transformats emprant mutants auxotròfics d'uracil que tinguin disruptat el seu propi gen URA3. A més, també presenten la seqüència codificant de la  $\beta$ -lactamasa, que actua conferint al llevat resistència a l'antibiòtic ampicil·lina.

El vector constitutiu YEpOLEX (Stukey et al., 1989) prové de la modificació del vector Yep352 (Hill et al., 1986) per introducció d'un fragment de l'extrem 5' UTR de la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de *S. cerevisiae*, que conté el promotor OLE1 (Stukey et al., 1990).



**Figura IIIa.6.** Estratègia emprada per a la construcció del plasmidi pYES2- $\Delta^{11}$ Tni/OLE<sub>b5</sub>.





**Figura IIIa.7.** Esquema de la introducció del cDNA de la desaturasa quimèrica  $\Delta^{11}$  *Tni/OLEb<sub>5</sub>* en el vector d'expressió YEpOLEX.

A les figures IIIa.6 i IIIa.7 es mostra l'estratègia de clonatge emprada per a obtenir la construcció desitjada en els dos vectors esmentats, mentre que en la figura IIIa.8 es mostra el detall de les seqüències codificants de  $\Delta^{11}$ *Tni* i OLE1. Un cop aconseguit el clonatge, les construccions resultants *pYES2-Δ<sup>11</sup>Tni/OLEb<sub>5</sub>* i *YEpOLEX-Δ<sup>11</sup>Tni/OLEb<sub>5</sub>*, que contenen la seqüència codificant de la desaturasa quimèrica de 1362 bp, donaven lloc a una proteïna de 454 aminoàcids, amb la seqüència aminoacídica que es mostra a la figura IIIa.3. Els resultats obtinguts en l'expressió d'aquestes construccions i els corresponents estudis funcionals es descriuen més endavant en aquest mateix capítol.

$\Delta^{11}$  *Tni*

```

10          20          30          40          50          60
TTAAGCTTGG TACCGAGCTC GGATCCATGG CTGTGATGGC TCAAACAGTA CAAGAAACGG
                        BamHI Inici
70          80          90          100         110         120
CTACAGTGTT GGAAGAGGAA GCTCGCACAG TGA CTCTTGT GGCTCCAAAG ACAACGCCAA
130         140         150         160         170         180
GGAAATATAA ATATATATAC ACCAACTTTC TTACATTTTC ATATGCGCAT TTAGCTGCAT
190         200         210         220         230         240
TATACGGACT TTATTTGTGC TTCACCTCTG CGAAATGGGA AACATTGCTA TTCTCTTTTCG
250         260         270         280         290         300
TACTCTTCCA CATGTCAAAAT ATAGGCATCA CCGCAGGGGC TCACCGACTC TGGACTCACA
310         320         330         340         350         360
AGACTTTCAA AGCCAAATTG CCTTTGAAA TTGTCCTCAT GATATTCAAC TCTTTAGCCT
370         380         390         400         410         420
TTCAAAAACAC GGCTATTACA TGGGCTAGAG AACATCGGCT ACATCACAAA TACAGCGATA
430         440         450         460         470         480
CTGATGCTGA TCCCCACAAT GCGTCAAGAG GGTTCCTTCTA CTCGCATGTT GGCTGGCTAT
490         500         510         520         530         540
TAGTAAAAAA ACATCCCGAT GTCCTGAAAT ATGGAAAAAC TATAGACATG TCGGATGTAT
550         560         570         580         590         600
ACAATAATCC TGTGTTAAAA TTTCAGAAAA AGTACGCAGT ACCCTTAATT GGAACAGTTT
610         620         630         640         650         660
GTTTTGCTCT TCCAACCTTG ATTCCAGTCT ACTGTTGGGG CGAATCGTGG AACAACGCTT
670         680         690         700         710         720
GGCACATAGC CTTATTTTGA TACATATTCA ATCTTAACGT GACTTTCCTA GTCAACAGTG
730         740         750         760         770         780
CTGCGCATAT CTGGGGGAAT AAGCCTTATG ATAAAAGCAT CTTGCCCGCT CAAAACCTGC
790         800         810         820         830         840
TGGTTTCCTT CCTAGCAAGT GGAGAAGGCT TCCATAATTA CCATCACGTC TTTCCATGGG
850         860         870         880         890         900
ATTACCGCAC AGCAGAATTA GGAATAACT TCCTGAATTT GACGACGCTG TTCATTGATT
910         920         930         940         950         960
TTTGTGCTTG GTTTGGATGG GCTTATGACT TGAAGTCTGT ATCAGAGGAT ATTATAAAAC
970         980         990         1000        1010        1020
AGAGAGCTAA ACGAACAGGT GACGGTTCTT CAGGGGTCAT TTGGGGATGG GACGACAAAG
1030        1040        1050        1060        1070        1080
ACATGGACCG CGATATAAAA TCTAAAGCTA ACATTTTTTTA TGCTAAAAAG GAATGAGAGC
                                                Stop
1090        1100        1110        1120        1130        1140
TCGAATTCTG CAGATATCCA TCACACTGGC GGCCGGTCGA GCATGCATCT AGAGGGCCGC
    EcoRI                                     XbaI
1150        1160        1170        1180        1190        1200
ATCATGTAAT TAGTTATGTC ACGCTTACAT TTACGCCCTT CCCCACATC CGCTCTAACC
1210        1220        1230        1240        1250        1260
GAAAAGGAAG GAGTTAGACA ACCTGAAGTC TAGGTCCCTA TTTATTTTTT TATAGTTATG
1270        1280        1290
GTAGGATTAA GAACGTATTT ATATTTCAAA TTTTC

```

Encebador *Tnis\_for*:

```

GCTAAAAAGG AAGTCGACCT CGAATTCTGC AGATATCC
                Sali

```

OLEI

```

10          20          30          40          50          60          70
ATGCCAACTT CTGGAACTAC TATTGAAATTG ATTGACGACC AATTTCCAAA GGATGACTCT GCCAGCAGTG
Inici
      80          90          100         110         120         130         140
GCATTGTCGA CGAAGTCGAC TTAACGGAAG CTAATATTTT GGCTACTGGT TTGAAATAAGA AAGCACCAAG
      150         160         170         180         190         200         210
AATTGTCAAC GGTTTTGGTT CTTTAATGGG CTCCAAAGAA ATGGTTTCCG TGGAAATTCGA CAAGAAAGGA
      220         230         240         250         260         270         280
AACGAAAAGA AGTCCAATT GGATCGTCTG CTAGAAAAAGG ACAACCAAGA AAAAGAAGAA GCTAAAACTA
      290         300         310         320         330         340         350
AAATTCACAT CTCCGAACAA CCATGACTT TGAATAACTG GCACCAACAT TTGAACTGGT TGAACATGGT
      360         370         380         390         400         410         420
TCTTGTTTGT GGTATGCCAA TGATTGGTTG GTACTTCGCT CTCTCTGGTA AAGTACTTT GCATTTAAAC
      430         440         450         460         470         480         490
GTTTTCCCTT TCTCCGTTT CTACTACGCT GTCGGTGGTG TTTCTATTAC TGCCGGTTAC CATAGATTAT
      500         510         520         530         540         550         560
GGTCTCACAG ATCTTACTCC GCTCACTGGC CATTGAGATT ATTCTACGCT ATCTTCGGT GTGCTTCCGT
      570         580         590         600         610         620         630
TGAAGGGTCC GCTAAATGGT GGGGCCACTC TCACAGAATT CACCATCGTT ACACTGATAC CTTGAGAGAT
      640         650         660         670         680         690         700
CCTTATGACG CTCGTAGAGG TCTATGGTAC TCCCACATGG GATGGATGCT TTTGAAGCCA AATCCAAAAT
      710         720         730         740         750         760         770
ACAAGGCTAG AGCTGATATT ACCGATATGA CTGATGATTG GACCATTAGA TTCCAACACA GACACTACAT
      780         790         800         810         820         830         840
CTTGTTGATG TTATTAACCG CTTTCGTCAT TCCAACTCTT ATCTGTGGGT ACTTTTTCAA CGACTATATG
      850         860         870         880         890         900         910
GGTGTTTGA TCTATGCCGG TTTTATTCGT GTCTTTGTC TTCAACAAGC TACTTTTGC ATTAACTCCA
      920         930         940         950         960         970         980
TGGCTCATTA CATCGGTACC CAACCATTCG ATGACAGAAG AACCCCTCGT GACAACTGGA TTACTGCCAT
      990         1000        1010        1020        1030        1040        1050
TGTTACTTTC GGTGAAAGTT ACCATAACTT CCACCACGAA TTCCCAACTG ATTACAGAAA CGCTATTAAG
      1060        1070        1080        1090        1100        1110        1120
TGGTACCAAT ACGACCCAAC TAAGGTTATC ATCTATTTGA CTTCTTTAGT TGGTCTAGCA TACGACTTGA
      1130        1140        1150        1160        1170        1180        1190
AGAAATTCTC TCAAAATGCT ATTGAAGAAG CCTTGATTCA ACAAGAACAA AAGAAGATCA ATAAAAAGAA
      1200        1210        1220        1230        1240        1250        1260
GGCTAAGATT AACTGGGGTC CAGTTTTGAC TGATTTGCCA ATGTGGGACA AACAAACCTT CTTGGCTAAG
      1270        1280        1290        1300        1310        1320        1330
TCTAAGGAAA ACAAGGGTTT GGTTATCATT TCTGGTATTG TTCACGACGT ATCTGGTTAT ATCTCTGAAC
      1340        1350        1360        1370        1380        1390        1400
ATCCAGGTGG TGAAACTTTA ATTAAACTG CATTAGGTAA GGACGCTACC AAGGCTTTCA GTGGTGGTGT
      1410        1420        1430        1440        1450        1460        1470
CTACCGTCAC TCAAAATGCCG CTCAAAATGT CTTGGCTGAT ATGAGAGTGG CTGTTATCAA GGAAAGTAAG
      1480        1490        1500        1510        1520        1530        1540
AACTCTGCTA TTAGAATGGC TAGTAAGAGA GGTGAAATCT ACGAACTGG TAAGTTCCTT TAAGCATCAC
                                                                                               Stop
      1550        1560        1570
ATTACCGCGG ATCCGCGCGC GGATCCTCTA GA
                                                                                               XbaI

```

Encebador OLEs\_for:

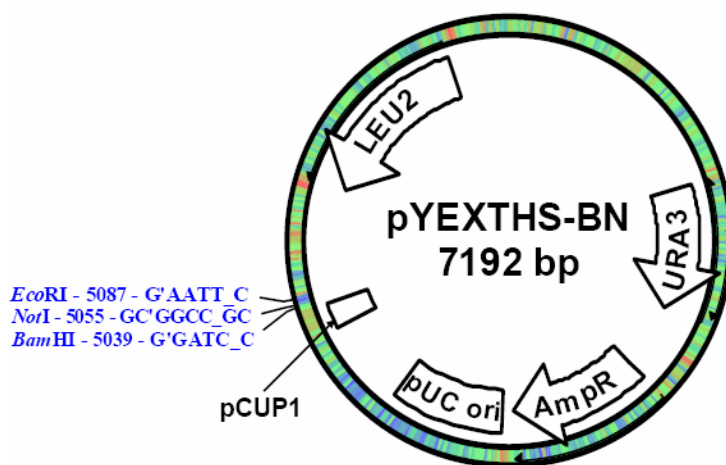
```

GGGGTCCAGT TTTGGTCGAC TTGCCAATGT GGGAC
                SaII

```

**Figura IIIa.8.** Seqüència de nucleòtids de  $\Delta^{11}$  *Tni* i OLE1 on s'indiquen els nucleòtids que formen part dels encebadors en color verd. Subratllat en vermell es troba la seqüència que ha patit mutagènesi. En negreta s'indiquen els codons de parada i en lila les metionines d'inici. També s'indiquen les dianes de restricció emprades en aquest treball. S'elimina el codó de parada de la seqüència de  $\Delta^{11}$ *Tni* i s'hi introdueix una diana *SaII*.

Amb posterioritat, quan ja es disposava de les construccions anteriors i degut a problemes sorgits en intentar expressar les dessaturases en el vector induïble pYES2, els quals es descriuran més endavant en aquest capítol, es va decidir abordar de nou el clonatge dels gens  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  en el vector pYEXTHS-BN, induïble per coure. El vector pYEXTHS-BN es basa en el plasmidi episomal pYEXbx. Aquest sistema utilitza el promotor induïble per  $Cu^{2+}$  CUP1 del gen de la metal·lotioneïna de llevat per controlar l'expressió dels gens inserits en el lloc de clonatge múltiple (MCS). Aquest vector conté dos epítops, un N-terminal, que conté una seqüència de sis histidines i una altra seqüència *StrepII* en l'extrem C-terminal que poden ésser utilitzats en la immunodetecció i purificació de les proteïnes a les que estan units. Les proteïnes resultants estan fusionades a aquests dos pèptids que permeten la purificació i immunodetecció de la proteïna. El vector pYEXTHS-BN conté, a més del marcador URA3, el gen de la beta-isopropilmalat deshidrogenasa (LEU2), implicada en la biosíntesi de la leucina.



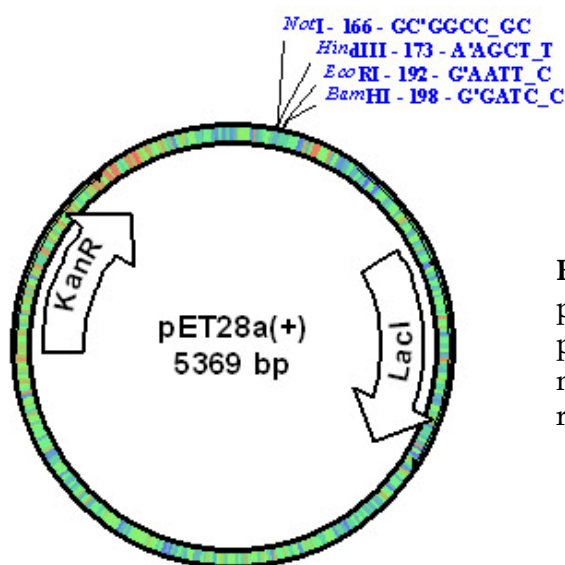
**Figura IIIa.9.** Esquema del vector pYEXTHS-BN. Es mostra el lloc de clonatge múltiple amb el promotor pCUP1.

L'estratègia emprada per al clonatge va ser similar a l'emprada anteriorment amb el vector YEpOLEX (veure figura IIIa. 7). L'estratègia escollida va implicar el clonatge de les dessaturases  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  emprant les dianes *Bam*HI i *Eco*RI, com s'havia fet amb el clonatge en el vector YEpOLEX. Com es veurà més endavant, les construccions resultants

expressaven proteïnes amb una cua de sis residus d'His en el seu extrem N-terminal.

### IIIa.2.2. Clonació en un vector d'expressió bacterià.

A més de les construccions per expressió en llevat, es va plantejar la possible expressió de les dues formes de la dessaturasa de *T.ni* en un entorn bacterià per tal d'intentar incrementar els nivells d'expressió de les dues proteïnes. Existeixen antecedents en la bibliografia que utilitzen un sistema basat en *E. coli* per a l'expressió funcional de la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de rata (Strittmatter et al., 1988). En el cas de la proteïna quimèrica, la presència del domini OLEb<sub>5</sub> ens féu pensar que la proteïna es podria expressar en un sistema procariota només requerint de la presència d'un sistema generador d'electrons.



**Figura IIIa.10.** Mapa del vector pET28a(+). Es pot observar la presència del lloc de clonatge múltiple i del gen encarregat de la resistència a kanamicina.

Per aquest motiu es va escollir el vector pET28a(+) d'expressió en bacteri, que conté un promotor de tipus T7 i dues seqüències de sis histidines que es poden introduir en l'extrem N-terminal o C-terminal de la proteïna expressada, depenent dels llocs de restricció que s'utilitzessin. Aquest vector disposa de dianes *Bam*HI i *Eco*RI, que eren adequades per a dur a terme el clonatge. Per altra banda, enlloc de portar el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa (que confereix resistència a ampicil·lina), duu associat el gen que codifica l'aminoglucòsid 3'-

fosfotransferasa (APH), que atorga a les cèl·lules que contenen el plasmidi resistència als antibiòtics kanamicina i neomicina. L'estratègia emprada va consistir doncs en digerir les construccions YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni i YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> utilitzant les endonucleases de restricció BamHI i EcoRI. Els fragments codificants d'interès  $\Delta^{11}$  Tni i  $\Delta^{11}$  Tni/OLEb<sub>5</sub> es varen lligar al vector pET28a(+) prèviament linearitzat. Les construccions resultants, pET28a(+)- $\Delta^{11}$  Tni i pET28a(+)- $\Delta^{11}$  Tni/OLEb<sub>5</sub>, es varen introduir, com es descriu més endavant, en la soca d'expressió d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS. Les soques bacterianes DE3 contenen el gen que codifica la T7 RNA polimerasa sota el control del promotor *lacUV5*, que permeten un alt nivell d'expressió de proteïnes i són fàcilment induïbles. El plasmidi pLysS codifica la T7 lisozima, que és un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa, fet que evita que se sintetitzi proteïna durant el creixement de la cèl·lula evitant que aquesta sigui tòxica per al bacteri. Quan s'indueix l'expressió amb IPTG, aquesta és tan forta que és capaç de compensar l'efecte del pLysS. Per mantenir la presència d'aquest vector pLysS es precisa de la presència en el medi de cultiu de l'antibiòtic cloramfenicol a més de l'antibiòtic específic per al plasmidi utilitzat.

### **IIIa.3. Cultiu de llevats transformats amb les diferents construccions derivades de la dessaturasa de *Trichoplusia ni*.**

Inicialment, les construccions per expressió en llevat, preparades segons s'ha descrit en l'apartat anterior es van transformar en una soca de llevat derivada de la soca W303a diploide, a la que s'ha eliminat el gen que codifica la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa endògena (Stukey et al., 1989). Aquesta soca *Δole1* (L8-14C), cedida amablement pel Dr. C. E. Martin, necessita per a la seva supervivència la presència d'àcids grassos monoinsaturats en el medi de cultiu (Stukey et al., 1989).

Els clons positius es seleccionaren utilitzant plaques de medi mínim SD que contenen àcids oleic i palmitoleic i emprant un selector d'uracil present en tots els plasmidis. Els primers assaigs d'activitat realitzats amb aquestes

cèl·lules transformades resultaren en uns nivells d'insaturació molt baixos comparats amb els descrits en les mateixes condicions per Knipple i col. (Knipple et al., 1998). Aquests nivells descrits a la literatura es varen poder confirmar mitjançant experiments duts a terme en paral·lel emprant cèl·lules de llevat *ΔoleI* transformades amb el plasmidi YEpOLEX- $\Delta^{11}$ *Tni* que havien estat proveïdes pel laboratori del Dr. Knipple. Així es va descobrir que les cèl·lules de llevat *ΔoleI* de que es disposava inicialment presentaven una deficiència en adenina (tenen una coloració rosada deguda a aquesta deficiència) no descrita per la mateixa soca en el treball publicat per Knipple i col. (Knipple et al., 1998). Aquest fet ens va fer pensar que la soca que utilitzàvem no era la mateixa (hi havia diferències significatives entre el seu fenotip i el genotip descrit), de manera que va ser necessari extreure el plasmidi original de la soca de llevat L8-14C YEpOLEX- $\Delta^{11}$ *Tni* i utilitzar aquesta nova soca per a la transformació amb els plasmidis objecte del treball d'aquesta tesi. Per abordar aquest objectiu es van utilitzar plaques de medi suplementat amb àcid 5-fluorooròtic (FOA) per afavorir el creixement del llevat no transformat respecte al transformat aprofitant la presència en el vector del selector URA3. La presència del FOA provoca que les cèl·lules que contenen el plasmidi no sobrevisquin, ja que el selector URA3 codifica l'orotidina-5'-fosfat (OMP) descarboxilasa, implicada en la biosíntesi de l'uracil. Aquest enzim catalitza el sisè pas enzimàtic de la biosíntesi de novo de les pirimidines, convertint l'OMP en uridina monofosfat (UMP). A més, pot convertir l'àcid 5-fluorooròtic en 5-fluorouracil, que és un compost tòxic per al llevat (Boeke et al., 1987). D'aquesta manera, la soca *ΔoleI* que es va fer servir a partir d'aquest moment al llarg de tot el treball de tesi és la cedida pel grup del Dr. Knipple un cop extret el plasmidi YEpOLEX- $\Delta^{11}$ *Tni*.

Paral·lelament, el grup del Dr. W.L. Roelofs ens facilità una nova soca de llevat deficient en dessaturasa i elongasa *ΔeloI\_ΔoleI* (Schneider et al., 2000) procedent de l'encreuament de les soques *ΔoleI* i *ΔeloI*, deficientes respectivament en  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa (Stukey et al., 1989) i elongasa (Toke and Martin, 1996). Aquesta soca és deficient en *ade3* de manera que cal suplir aquesta deficiència d'adenina per al seu creixement correcte.

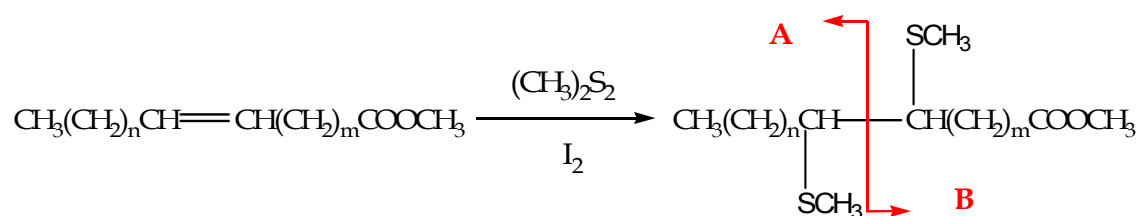
Els experiments preliminars amb cultius de les dues soques de llevat estudiades (*ΔoleI* i *ΔeloI\_ΔoleI*) transformades amb les construccions constitutives YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  van fer palesa la capacitat dels llevats de sobreviure en medi YPD (o YPAD) sense la presència en el medi d'àcids grassos monoinsaturats (Stukey et al., 1990; Knipple et al., 1998).

D'altra banda, per a comprovar la viabilitat dels llevats transformats amb els plasmidis induïbles pYES2 calia obtenir cultius de les dues soques transformades amb pYES2- $\Delta^{11}Tni$  i pYES2- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  al principi de la fase estacionària. Tot seguit es feia un canvi del medi que contenia glucosa com a font de carboni (que reprimeix el promotor GAL1 del vector pYES2) i àcids grassos monoinsaturats (oleic i palmitoleic) per un medi amb galactosa (activador del promotor GAL1) i rafinosa com a fonts de carboni i sense la presència dels àcids grassos monoinsaturats. Amb aquest canvi, el promotor es des-reprimeix i comença la transcripció del gen inserit en el plasmidi. Les característiques d'un promotor induïble permeten l'expressió en llevat de proteïnes que podrien ésser tòxiques per al creixement del microorganisme. Malgrat la realització de múltiples assajos canviant les condicions de cultiu i d'inducció no es va aconseguir observar activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa. Ni tan sols en cultius induïts per galactosa des de  $t_{emp}=0$  es va aconseguir creixement de les cèl·lules de llevat degut a l'absència d'activitat dessaturasa. Per aquest motiu, va ésser en aquest punt que es va decidir provar un nou vector induïble, el pYEXTHS-BN, per a l'expressió de les construccions de  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni*. En aquest cas, com es veurà més endavant en aquest mateix capítol (apartat IIIa.6), si que es va aconseguir fer créixer els cultius en absència d'àcids grassos insaturats, tal com s'havia observat prèviament per les construccions basades en el vector YEpOLEX.



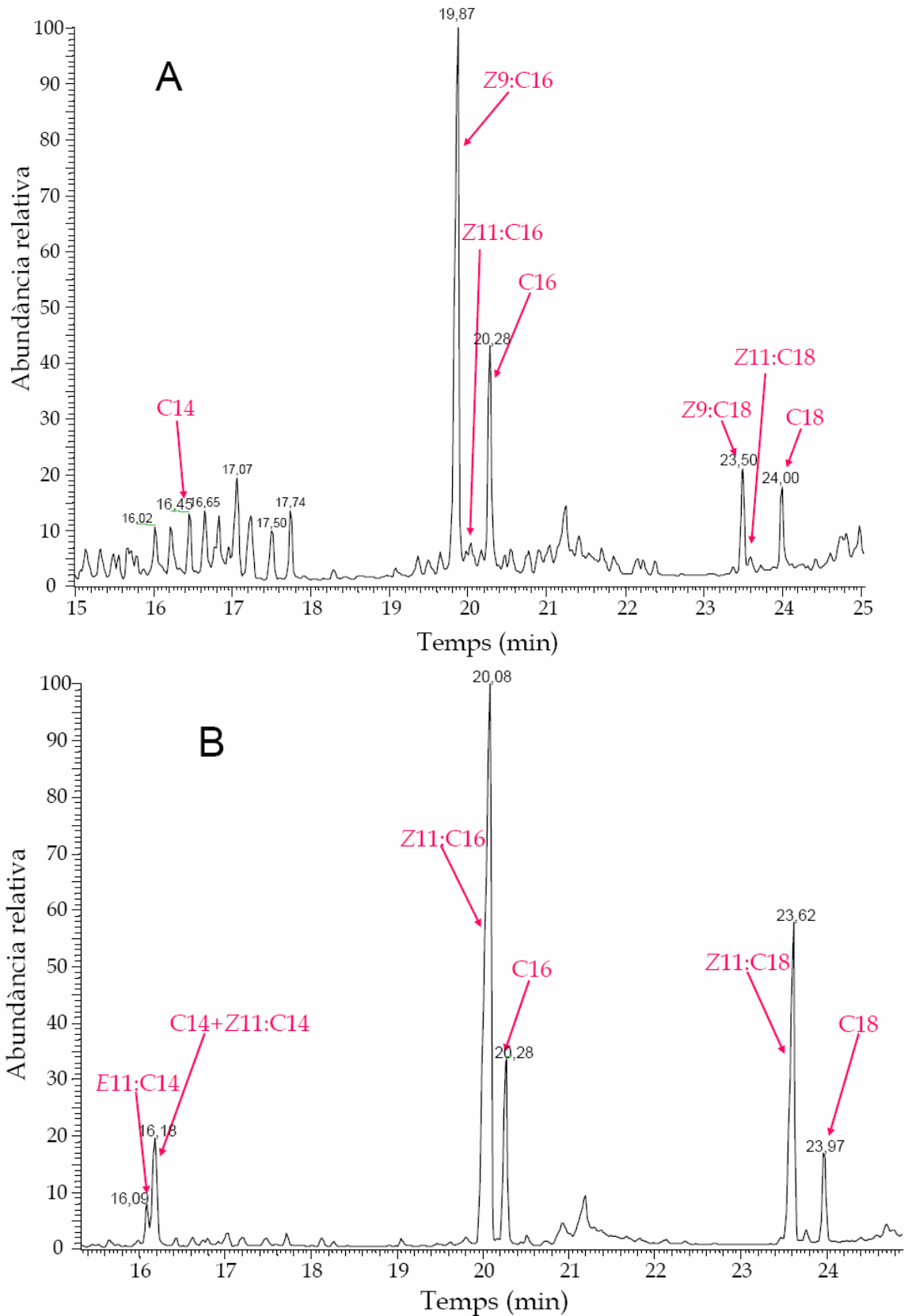
### IIIa.4. Anàlisi funcional de les construccions derivades de la $\Delta^{11}$ Tni expressades en llevat.

L'activitat dessaturasa en aquests llevats es va mesurar fent una extracció d'àcids grassos totals, els quals es derivatitzaven emprant una reacció de transmetilació i finalment s'analitzaven els extractes lipídics per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses. La posició dels dobles enllaços es determinava preparant els derivats de disulfur de dimetil (DMDS), que donen lloc a fragmentacions característiques a  $m/z = 217$ , 245 o 273, segons si es tracta d'àcids grassos monoinsaturats en les posicions 9, 11 o 13, respectivament (figura IIIa.11) (Buser et al., 1983).



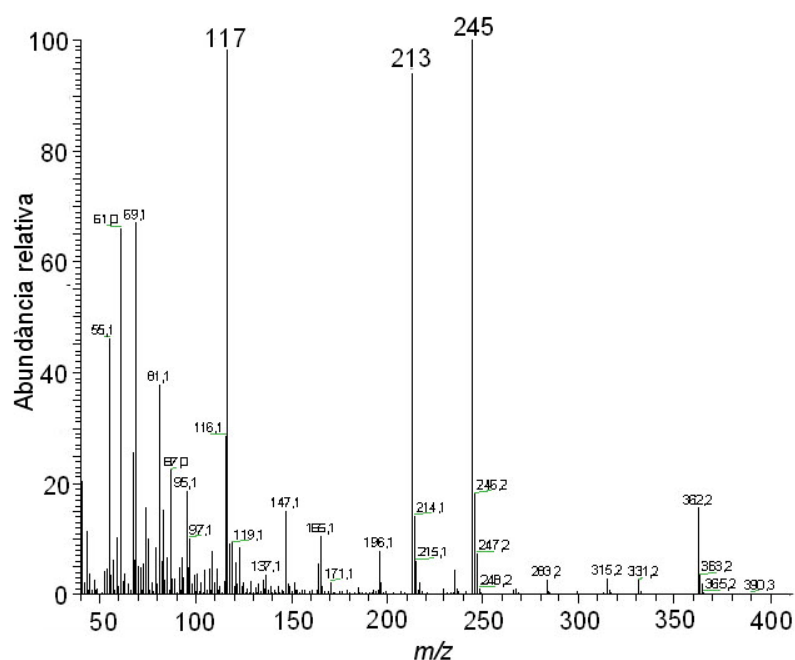
	Longitud de la cadena		Àcid gras	$m/z$	
	m	n		A	B
$\Delta^9$	7	3	C14	117	217
$\Delta^9$	7	5	C16	145	217
$\Delta^9$	7	7	C18	173	217
$\Delta^{11}$	9	1	C14	89	245
$\Delta^{11}$	9	3	C16	117	245
$\Delta^{11}$	9	5	C18	145	245
$\Delta^{13}$	11	terminal	C14	61	273
$\Delta^{13}$	11	1	C16	89	273
$\Delta^{13}$	11	3	C18	117	273

**Figura IIIa.11.** Derivatització dels dobles enllaços dels àcids grassos monoinsaturats utilitzant disulfur de dimetil (DMDS). La fragmentació característica es produeix a partir del punt indicat de color vermell, donant lloc a fragments de diferents relacions  $m/z$  depenent de la longitud de les cadenes i de la posició inicial del doble enllaç.



**Figura IIIa.12.** Cromatogrames (TIC) de GC-MS obtinguts amb els extractes dels llevats *Δole1*: **A)** transformat amb el plasmidi pYES2- $\Delta^{11}Tni$  i **B)** transformat amb el plasmidi YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ .

En els diversos assaigs realitzats amb els llevats  $\Delta oleI$  i  $\Delta eloI\_oleI$  transformats amb les construccions pYES2- $\Delta^{11}Tni$  i pYES2- $\Delta^{11}Tni$  /OLEB<sub>5</sub> es van observar uns nivells molt baixos d'activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa. La figura IIIa.12A il·lustra els resultats obtinguts amb la soca  $\Delta oleI$ , que van ser molt semblants als obtinguts amb la soca  $\Delta eloI\_oleI$ . Tal com es pot apreciar, s'observa clarament la presència dels pics corresponents als àcids grassos monoinsaturats oleic (Z9:C18) i palmitoleic (Z9:C16), presents en el medi de cultiu emprat per créixer els llevats. Per contra, la proporció dels corresponents productes  $\Delta^{11}$  insaturats (Z11:C16 i Z11:C18) es molt més baixa. Com ja s'ha esmentat, aquests resultats es van reproduir sistemàticament quan els cultius es van repetir en les mateixes condicions o d'altres variant els temps d'inducció.



**Figura IIIa.13.** Espectre de masses del derivat DMDS del (Z)-11-hexadecenoat de metil. Es poden observar els fragments característics a  $m/z=245$ ,  $m/z = 213$  ( $m/z =245$ -OMe) i  $m/z =117$ .

D'altra banda, la figura IIIa.12.B mostra els resultats obtinguts amb els llevats transformats amb les construccions basades en un entorn constitutiu. Com pot apreciar-se, en aquest cas hi ha un nivell de producció de derivats  $\Delta^{11}$  insaturats molt elevat. La identitat dels pics es va confirmar en analitzar els corresponents espectres de masses de la derivatització amb DMDS. La figura

IIIa.13 mostra l'espectre obtingut per el derivat de Z11:C16, on s'aprecien clarament els fragments diagnòstic a  $m/z=245$  i 117.

L'activitat de les dues construccions,  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni /OLEb_5$ , en el vector constitutiu fou suficientment elevada com per permetre la viabilitat de les dues soques de llevats emprades, en medis de cultiu en absència d'àcids grassos monoinsaturats (oleic i palmitoleic). D'aquesta manera es podia concloure que la presència de la fusió del domini  $OLEb_5$  no interfereix en la funció enzimàtica, si bé no es podia dir en aquest punt si incrementava o no l'activitat del enzim. Aquestes anàlisis van fer palès també que els productes principals de les reaccions de dessaturació eren l'àcid (Z)-11-hexadecenoic i l'àcid (Z)-11-octadecenoic, tot i que també es van detectar quantitats menors dels àcids (E)-11-tetradecenoic i (Z)-11-tetradecenoic. Els resultats obtinguts amb les construccions basades en el vector pYEX van ésser similars. La taula IIIa.1 resumeix la composició en àcids grassos insaturats de les fraccions lipídiques que es van obtenir en cada cas.

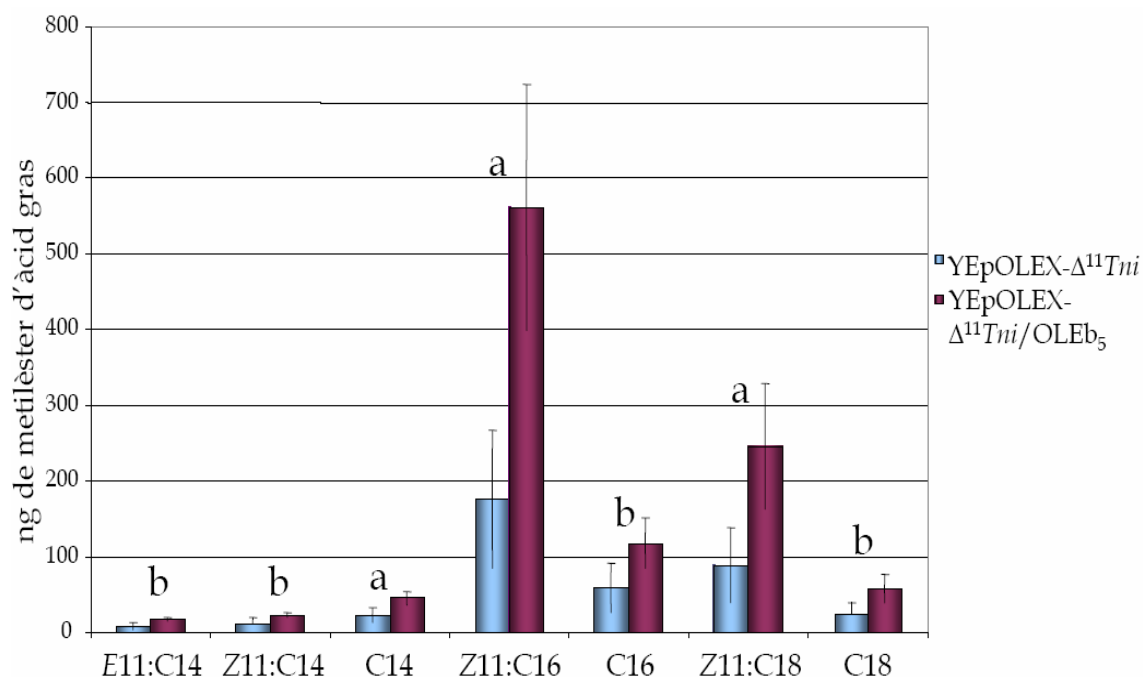
**Taula IIIa.1.** Percentatge de cadascun dels compostos insaturats respecte el total d'insaturats presents en llevats *ΔeloI\_ΔoleI* transformats amb les dues construccions constitutives YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  i les dues construccions induïbles per  $Cu^{2+}$  pYEX- $\Delta^{11}Tni$  i pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  crescuts en un medi YPAD amb 0.5 mM de  $Cu^{2+}$  en el cas dels llevats que contenen els plasmidis de tipus pYEX.

	YEpOLEX- $\Delta^{11}T.ni$	YEpOLEx- $\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$	pYEX- $\Delta^{11}T.ni$	pYEX- $\Delta^{11}T.ni/OLEb_5$
E11:C14	2.7 ± 0.5	2.1 ± 0.3	3.4 ± 1.2	3.0 ± 1.5
Z11:C14	4.0 ± 0.8	3.0 ± 0.7	6.3 ± 3.1	4.2 ± 2
Z11:C16	62.1 ± 2.4	63 ± 3.2	63.3 ± 3.8	62.5 ± 3.6
Z11:C18	31.2 ± 3	32 ± 3.8	27 ± 6.4	30.3 ± 5.6

Com es pot apreciar, les diferents construccions no donaren lloc a canvis substancials en la composició d'àcids grassos  $\Delta^{11}$  insaturats dels cultius. Pel que fa a les diferències entre soques, es va observar que la soca de llevat *ΔeloI\_ΔoleI* donava lloc a resultats més fàcils d'interpretar, ja que en la soca *ΔoleI* l'acció del gen ELO1P provocava l'allargament de les cadenes d'àcids grassos produint productes d'insaturació que no derivaven directament de l'acció de la

dessaturasa. Aquest allargament es podia observar clarament en els àcids grassos de cadena imparell quan aquests s'addicionaven en el medi de cultiu. Per exemple, si en el medi de cultiu s'hi afegia àcid pentadecanoic s'observava la presència d'àcid heptadecanoic i a més el seu producte insaturat en  $\Delta^{13}$  com a conseqüència de l'activitat del gen ELO1P.

Donat que des del punt de vista de la seva aplicació biotecnològica calia determinar la quantitat real d'àcids grassos insaturats que es podien obtenir emprant aquests cultius de llevats transformats, es van realitzar quantificacions sobre tres cultius (2 mL) de cada construcció crescuts en les mateixes condicions durant el mateix temps i amb la mateixa quantitat d'inòcul de partida. Es mesurà la densitat òptica dels cultius per conèixer el nombre de vegades que s'havien duplicat les cèl·lules just abans de fer l'extracció d'àcids grassos. Els ésters metílics dels àcids grassos es quantificaren per GC-MS en funció d'un patró intern de concentració coneguda.

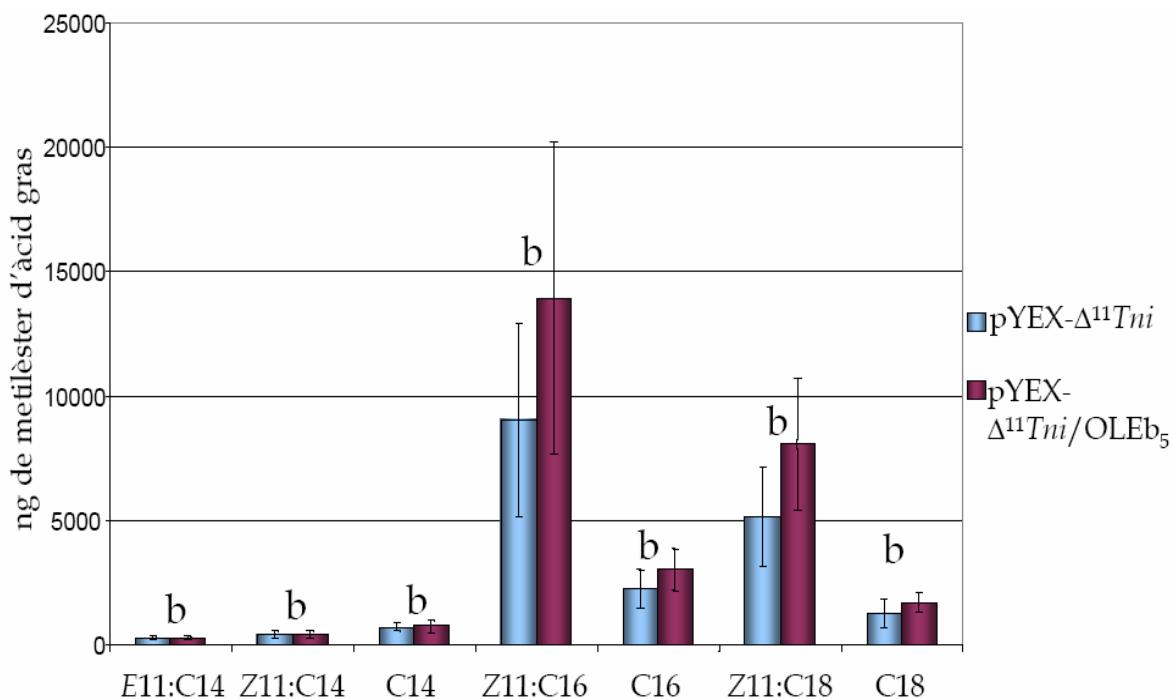


**Figura IIIa.14.** Quantificació dels àcids grassos presents en els lípids de llevats *Δelo1\_Δole1* transformats amb les construccions YEpOLEX $\Delta^{11}$ Tni i YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEB<sub>5</sub>. S'ha utilitzat acetat de dodecil com a patró intern i la quantificació s'ha realitzat sobre el cromatograma TIC. Els resultats corresponen a la mitjana de ng totals de cadascun dels ésters metílics per 2 mL de cultiu total. El nombre de doblatges dels dos cultius era gairebé idèntic (5.66 per al llevat que expressa la proteïna natural i 5.54 per al llevat que expressa la proteïna quimèrica). Les barres corresponen a la desviació estàndard. Es va utilitzar el test de Levene per conèixer si es podien assumir variàncies iguals o si calia assumir variàncies diferents i posteriorment, el test d'Student amb un

límit de confiança del 95 % per a determinar si les diferències entre els resultats obtinguts per les dues construccions eren significatives. L'etiqueta **a** indica diferències significatives mentre que la lletra **b** indica diferències no significatives.

Com es pot observar en la figura IIIa.14, si bé hi ha una certa variabilitat entre les mesures realitzades per les tres rèpliques de cada quantificació, la quantitat d'àcids grassos extrets dels cultius que expressen la dessaturasa quimèrica ( $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ ) és aparentment en tots els casos més gran que la corresponent als cultius que expressen la dessaturasa salvatge ( $\Delta^{11}Tni$ ). Malgrat tot, l'anàlisi estadístic dels resultats, realitzat mitjançant els tests de Levene (Levene, 1960) i t de student (Student, 1908) amb un límit de confiança del 95%, mostra que és principalment en el cas dels productes  $\Delta^{11}$  monoinsaturats de 16 i 18 àtoms de carboni on aquesta diferència és significativa, essent la dessaturasa quimèrica la que produeix quantitats més elevades dels àcids (Z)-11-hexadecenoic i (Z)-11-octadecenoic.

D'altra banda, la figura IIIa.15 mostra els resultats de la quantificació dels àcids grassos presents en els llevats *ΔeloI\_ΔoleI* que expressen les dessaturases  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  sota el control del promotor induïble per  $Cu^{2+}$ .



**Figura IIIa.15.** Quantificació dels àcids grassos presents en els lípids de llevats *ΔeloI\_ΔoleI* transformats amb les construccions YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ . S'ha utilitzat acetat de dodecil com a patró intern i la quantificació s'ha

realitzat sobre el cromatograma TIC. Els resultats corresponen a la mitjana de ng totals de cadascun dels ésters metàlics per 2 mL de cultiu total. El nombre de doblatges dels dos cultius era gairebé idèntic (5.75 per al llevat que expressa la proteïna natural i 5.82 per al llevat que expressa la proteïna quimèrica). Les barres corresponen a la desviació estàndard. La lletra **a** presenten diferències significatives i la lletra **b**, la manca de diferències significatives, segons el test d'Student amb un límit de confiança del 95%.

En aquest cas, si bé sembla mantenir-se una tendència a una major producció d'àcids grassos insaturats per part de la proteïna quimèrica que de la salvatge, les diferències entre totes dues son menors. De fet, l'aplicació del test d'Student indica que aquestes diferències no són estadísticament significatives.

L'aparent variabilitat en els resultats obtinguts en aquests experiments va dificultar la seva interpretació. Tot i que semblava en principi raonable que la presència del domini OLEB<sub>5</sub> en la proteïna quimèrica podria millorar l'eficiència de l'enzim en la formació d'àcids grassos insaturats, mitjançant la participació d'aquest domini en el procés de transferència electrònica que reverteix l'enzim a l'estat natiu, els resultats obtinguts fins aquest punt no permetien arribar a aquesta conclusió. Més endavant, en aquest mateix capítol, es comenten les possibles raons per aquestes observacions.

Els experiments d'expressió de les dues construccions derivades de la dessaturasa de *T. ni* en les soques *ΔoleI* i *ΔoleI\_ΔoleI*, van donar lloc a extractes lipídics amb una composició d'àcids grassos insaturats similar en els dos casos, malgrat les petites diferències produïdes per la presència de l'enzim elongasa 1 en la soca *ΔoleI*. En la soca *ΔoleI\_ΔoleI* l'absència d'elongasa 1 fa que les anàlisis dels resultats siguin més senzills, ja que no es produeix allargament de les cadenes dels àcids grassos formats.

Les membranes dels llevats en aquest cas estan bàsicament formades pels àcids (Z)-11-hexadecenoic, (Z)-11-octadecenoic i els seus corresponents precursors saturats (àcids palmític i esteàric), essent l'àcid (Z)-11-hexadecenoic el més abundant. En menor quantitat, els llevats també presenten els àcids (Z) i (E)-11-tetradecenoic i àcid mirístic. Entre els dos insaturats predomina el compost de geometria Z. Aquests resultats suggereixen que aquests sistemes, convenientment optimitzats, poden conduir a mètodes biotecnològics per a la producció d'àcids grassos monoinsaturats en la posició 11.

El fragment extra corresponent al domini OLEb<sub>5</sub> pot comportar un plegament incorrecte de la proteïna de manera que no s'encabeixi correctament a les membranes cel·lulars i aquest fet provoqui una inactivació de l'enzim. El llevat que expressa l'enzim dessaturasa fusionat al domini citocrom b<sub>5</sub> no presenta problemes de creixement en un medi complet sense suplement d'àcids grassos monoinsaturats, és a dir, la dessaturasa és funcional. De fet, no s'observen canvis de creixement evidents entre la soca de llevat que expressa la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* i la soca de llevat que expressa la mateixa proteïna fusionada al citocrom b<sub>5</sub>, de manera que la fusió no afecta de manera apreciable la seva activitat enzimàtica (ni sembla doncs, que s'alteri el correcte plegament de la proteïna).

Per contra, la transformació de les dues soques, *ΔeloI\_ΔoleI* i *ΔoleI*, amb les construccions de les dues mateixes proteïnes en el plasmidi pYES2 no va resultar en una activitat enzimàtica detectable. Les característiques del vector pYES2 fan que l'expressió s'indueixi per la presència de galactosa en el medi de cultiu, juntament amb l'absència de glucosa, ja que aquest sucre reprimeix el promotor del plasmidi. Després de múltiples assaigs no es va aconseguir detectar productes (èsters metílics d'àcids grassos) d'insaturació en la posició 11. Aquest fet podia tenir dues possibles explicacions: la primera és que el promotor pGAL no estigui funcionant correctament de manera que no es produeixi mRNA de la dessaturasa i per aquest motiu, no hi hagi expressió de la proteïna. Una altra possibilitat podia ser que la presència d'àcids grassos monoinsaturats en el medi de cultiu (oleic i palmitoleic) sigui suficient i fins i tot excessiva per al creixement de la cèl·lula, i malgrat hi hagi expressió de la dessaturasa, la construcció contingui algun punt de regulació per excés d'àcids grassos monoinsaturats que reprimeixi l'activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa. Aquesta segona hipòtesi, però, quedà descartada pel fet que els cultius *ΔoleI* pYES2- $\Delta^{11}Tni$  i pYES2- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub> no presentaven creixement en un medi complet sense àcids grassos monoinsaturats on s'havia substituït la glucosa per galactosa.



L'anàlisi de cultius transformats amb els plasmidis pYEX- $\Delta^{11}$ Tni i pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> crescuts en medi complet i en presència d'una concentració de Cu<sup>2+</sup> de 0.5 mM mostraren la formació dels àcids grassos monoinsaturats e Z11:C16 i Z11:C18 i també, tot i que en menor quantitat, dels àcids Z11:C14 i E11:C14. Per tant, aquest sistema és interessant des del punt de vista biotecnològic per a la producció induïda d'àcids grassos monoinsaturats en la posició 11.

### IIIa.5. Assaigs d'expressió de les construccions derivades de $\Delta^{11}$ Tni en un sistema procariota.

L'activitat dessaturasa observada utilitzant la proteïna de fusió  $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> plantejà la possibilitat d'expressar aquesta dessaturasa en *E. coli* en gran quantitat per assajar l'activitat dessaturasa *in vitro*. Aquesta possibilitat es basava en la informació que s'havia descrit per la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de rata (Strittmatter et al., 1988; Miller et al., 1999). Si es comparen les seqüències de les dessaturases de rata i la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T.ni* es pot comprovar que els 26 residus aminoacídics que manquen en l'extrem aminoterminal de la dessaturasa de rata en aquest experiment descrit són l'extrem de seqüència més divergent entre les dues dessaturases (figura IIIa.16), de manera que es podia pensar que l'enzim de *T. ni* es podria expressar en un sistema procariota de manera funcional.

	10	20	30	40	50	60
$\Delta^{11}$ T.ni	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	-----	-----	-----	----MAVMAQ	TVQETATVLE	EEARTVTLVA
Consens				*	::	. : . * : : :
	70	80	90	100	110	120
$\Delta^{11}$ T.ni	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	PKTTPRKYKY	IYTNFLTFSY	AHLAALYGLY	LCFTSAKWET	LLFSFVLFHM	SNIGITAGAH
Consens	: . * * * * :	:: * : : :	* : * * * * :	* : * * * * :	** : . : . :	* : * * * * * :
	130	140	150	160	170	180
$\Delta^{11}$ T.ni	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
$\Delta^9$ rata	RLWTHKTFKA	KLPLEIVLMI	FNSLAFQNTA	ITWAREHRLH	HKYSDTDADP	HNASRGFFYS
Consens	*** : * : * * :	*** . * . * * :	* : * * * * :	*** : * * * * :	*** : * . * * * * :	*** : * * * * * :

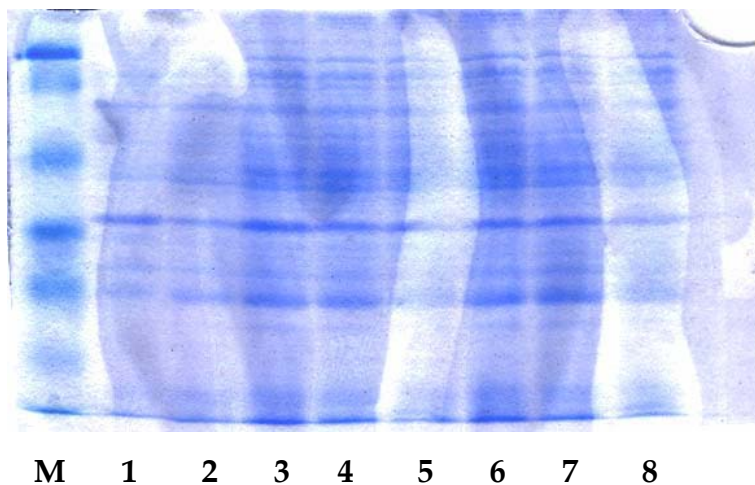
	190	200	210	220	230	240
$\Delta^{11}$ <i>T.ni</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
$\Delta^9$ rata	HVGWLLVKKH	PDVLKYGKTI	DMSDVYNNPV	LKFQKKYAVP	LIGTVCFALP	TLIPVYCWGE
Consens	*****:**	* * : *	.: *****:	: : : *****:	* * : ** **	***: * *****
	250	260	270	280	290	300
$\Delta^{11}$ <i>T.ni</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
$\Delta^9$ rata	SWNNAWHIAL	FR-YIFNLNV	TFLVNSAAHI	WGNKPYDKSI	LPAQNLLVSF	LASGEGFHNY
Consens	:: : .: :	* * : **	*****: *	:* :****.*	. :*****:	: *****
	310	320	330	340	350	360
$\Delta^{11}$ <i>T.ni</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
$\Delta^9$ rata	HHVFPWDYRT	AELGNNFLNL	TTLFIDFCAW	FGWAYDLKSV	SEDI IKQRAK	RTGDGSSGVI
Consens	** .**:**	: * .: *	***** *	:* *** *. *	* * : * *	*****
	370	380				
$\Delta^{11}$ <i>T.ni</i>	.... ....	.... ....	....			
$\Delta^9$ rata	WGWDDKMDR	DIKSKANIFY	AKKE			
Consens	-----	-----	----			

**Figura IIIa.16.** Comparació entre les seqüències de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* i la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de rata. L'asterisc (\*) indica posicions que tenen un sol residu totalment conservat. Els dos punts (: ) i el punt (.) indiquen modificacions conservatives.

Per abordar aquest objectiu s'emprà un vector pET28a(+) que conté una seqüència de sis histidines que es pot posar tant en l'extrem N-terminal com C-terminal de la proteïna expressada. El cDNA codificant de la  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  inserits en aquest vector està sota el control del promotor T7lac i per evitar possibles problemes de toxicitat deguts a l'expressió de la dessaturasa s'utilitzà una soca d'*E. coli* que contingui el vector pLysS, per reprimir l'expressió de la proteïna abans de l'addició de l'inductor en el medi de cultiu. El principal problema en aquest cas era la localització subcel·lular de la proteïna, ja que aquesta es localitza normalment en la membrana del reticle endoplasmàtic i un entorn procariota com *E. coli* no presenta orgànuls, de manera que no es podia preveure on es localitzaria la proteïna. D'altres interrogants que es plantejaven van ser si la proteïna es plegaria correctament, si es degradaria per efecte de proteases presents en el bacteri o si s'excretaria d'alguna manera cap a l'exterior de la cèl·lula.

Els assaigs d'expressió es van realitzar emprant la soca d'*E. coli*, BL21(DE3)pLysS, que no permet l'expressió d'aquesta proteïna durant el creixement del bacteri i fa que aquesta comenci just en el moment d'addició en

el medi de cultiu de l'inductor. Posteriorment, la presència de la proteïna a diferents temps d'inducció va ésser analitzada per electroforesi.



**Figura IIIa.17.** Electroforesi SDS-PAGE de lisats de cèl·lules bacterianes transformades amb: **1-**pET28- $\Delta^{11}Tni$  0 h d'inducció; **2-** pET28 $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  0 h; **3-**pET28- $\Delta^{11}Tni$  2 h ;**4-** pET28- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  2 h; **5-**pET28- $\Delta^{11}Tni$  4 h; **6-** pET28- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  4 h; **7-**pET28- $\Delta^{11}Tni$  6 h; **8-** pET28- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  6 h i **M**-marcador. Les proteïnes es revelaren amb blau de Coomassie.

Tal com s'observa en la figura IIIa.17., no es van observar diferències entre els extractes proteics dels cultius de bacteri transformats amb pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni$  i pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  i els cultius d'*E. coli* que contenen el vector buit sota les mateixes condicions de creixement i als mateixos temps d'inducció. Per tant es va concloure que o bé l'expressió no era òptima en aquest entorn o bé que la proteïna, degut a la manca de membranes del reticle endoplasmàtic, es degradava ràpidament donant lloc a fragments que no es corresponien amb el pes molecular de la proteïna total.

Davant la impossibilitat de detectar en cap cas una banda clara que es pogués atribuir a la dessaturasa i que reflectís l'obtenció de quantitats apreciables de proteïna per a un posterior assaig de la seva activitat in vitro es va decidir abandonar aquesta idea. La manca del material adequat va impedir la realització d'un assaig d'expressió per *Western blot*.

### IIIa.6. Assaigs d'inducció de l'expressió de les construccions basades en pYEXTHS-BN amb diferents concentracions de $\text{Cu}^{2+}$ .

La transcripció del cDNA en el vector pYEXTHS-BN està controlada pel promotor induïble per  $\text{Cu}^{2+}$  (pCUP1) del gen de la metal·lotioneïna de llevat. Aquest promotor és fort i és ràpidament induït i permet l'expressió de proteïnes recombinants potencialment tòxiques quan s'aconsegueix una alta concentració de cèl·lules, si bé, generalment, s'observa un nivell d'expressió basal en absència de coure exogen, degut a la concentració natural de  $\text{Cu}^{2+}$  intracel·lular (Holz et al., 2002).

Per comprovar si la concentració de Cu(II) en el medi de cultiu afectava la producció d'àcids grassos insaturats es van fer créixer cultius de les soques de llevat *Δ<sub>ole1\_Δole1</sub>* transformades amb les construccions pYEX- $\Delta^{11}$ Tni i pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> en presència de concentracions creixents de  $\text{CuSO}_4$ . Els resultats, que es recullen a la taula IIIa.2, revelen que no es produeixen diferències significatives en la composició d'àcids grassos  $\Delta^{11}$  monoinsaturats en els extractes cel·lulars dels cultius realitzats a concentracions de  $\text{CuSO}_4$  entre 0 i 5 mM.

**Taula IIIa.2.** Percentatge (mitjana  $\pm$  SD, n=3) de cadascun dels àcids grassos en 2 mL de cultiu crescut a concentracions creixents de coure en el medi. A totes les concentracions de coure assajades els cultius són viables i creixen de manera semblant.

#### pYEX- $\Delta^{11}$ Tni

[ $\text{Cu}^{2+}$ ] mM	E11:C14	Z11:C14	C14	Z11:C16	C16	Z11:C18	C18
0	2.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1	9.0 $\pm$ 0.1	45.5 $\pm$ 0.1	19.2 $\pm$ 0.1	15.4 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.1
0.5	3.0 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 0.2	45.2 $\pm$ 6.4	19.3 $\pm$ 7.3	13.8 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 2.5
1	2.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.8	44.7 $\pm$ 2.9	20.4 $\pm$ 2.9	14.9 $\pm$ 1.7	5.3 $\pm$ 1.2
1.5	2.7 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 1.8	46.4 $\pm$ 3.1	17.5 $\pm$ 3.6	17.1 $\pm$ 3.4	5.7 $\pm$ 1.1
2	3.1 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.1	46.7 $\pm$ 4.8	17.4 $\pm$ 4.7	15.2 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 2.0
3	2.8 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.2	46.7 $\pm$ 3.5	17.3 $\pm$ 3.2	17.5 $\pm$ 1.1	5.4 $\pm$ 2.0
4	2.6 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 1.4	48.0 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 2.7	20.7 $\pm$ 3.8	5.1 $\pm$ 1.1
5	2.5 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.6	48.9 $\pm$ 0.7	15.4 $\pm$ 0.8	19.5 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.6

pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>

[Cu <sup>2+</sup> ] mM	E11:C14	Z11:C14	C14	Z11:C16	C16	Z11:C18	C18
0	4.4 ± 2.0	4.3 ± 1.9	7.6 ± 0.7	45.2 ± 3.2	17.2 ± 0.2	16.3 ± 4.0	5.7 ± 2.6
0.5	3.4 ± 1.0	3.4 ± 0.7	6.0 ± 1.6	46.3 ± 0.8	17.1 ± 0.3	18.1 ± 0.3	6.2 ± 1.0
1	3.4 ± 0.8	3.4 ± 0.5	5.3 ± 0.9	46.6 ± 1.2	14.7 ± 1.2	21.6 ± 1.5	5.6 ± 1.3
1.5	3.5 ± 0.9	3.5 ± 0.6	5.3 ± 0.6	44.8 ± 3.1	16.0 ± 0.3	21.1 ± 1.5	6.4 ± 2.3
2	3.3 ± 2.0	3.3 ± 2.0	5.1 ± 1.1	48.5 ± 6.5	13.9 ± 2.0	21.1 ± 6.2	5.3 ± 3.4
3	3.1 ± 1.4	3.1 ± 1.3	5.0 ± 0.1	42.5 ± 4.7	17.5 ± 2.6	22.3 ± 1.2	7.1 ± 3.5
4	2.6 ± 1.1	2.6 ± 1.0	4.2 ± 0.1	42.5 ± 3.7	15.6 ± 3.4	25.8 ± 0.2	7.1 ± 2.7
5	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.1	4.0 ± 0.8	44.0 ± 6.5	14.5 ± 5.0	25.9 ± 2.0	6.8 ± 3.2

Els resultats mostrats a la taula IIIa.2 no presenten una tendència clara. No s'observa un augment considerable de la quantitat d'àcids grassos monoinsaturats tot i que a l'augmentar la concentració de coure en el medi de cultiu l'inducció de la transcripció hauria de ser més elevada. Observant amb deteniment els resultats sembla que la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Tni podria tenir una lleugera tendència a augmentar la quantitat d'àcids grassos monoinsaturats de 16 i 18 àtoms de carboni, i també és així per a la producció de Z11:C18 promoguda per pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>, però en tots els casos l'efecte és molt lleuger.

Cal remarcar que en tots els casos es treballa amb cèl·lules de llevat intactes que precisen d'una composició molt definida de les seves membranes per mantenir les seves propietats físico-químiques i les seves funcions cel·lulars. Un excés d'àcids monoinsaturats en les seves membranes pot provocar alteracions d'aquestes que comportessin canvis estructurals i de fluïdesa que afectessin la viabilitat d'aquestes cèl·lules (Zakim et al., 1992). La formació adequada de les membranes afavoriria el creixement correcte dels llevats i la seva adaptació al medi. Per tant, el funcionament de la dessaturasa té un paper essencial en la viabilitat de les cèl·lules de llevat. Es pot destacar també el fet que malgrat que hi ha un baix nivell de mRNA detectat en absència de Cu<sup>2+</sup> exogen (Holz et al., 2002) aquest és suficient per tal de mantenir la viabilitat de les cèl·lules en un medi complet sense àcids grassos monoinsaturats. Aquest fet produeix que el creixement dels llevats sigui lleugerament inferior (~ 4.5

doblatges en 48 hores) al que hi ha en presència de  $\text{Cu}^{2+}$  (de 5.5 a 6 doblatges en 48 hores)

La presència d'activitat dessaturasa en nivells comparables als obtinguts en presència de coure i el creixement normal dels cultius en absència de  $\text{Cu}^{2+}$  en el medi de cultiu es va atribuir a la presència d'aquest catió com a element essencial per a les proteïnes de transport electrònic i altres enzims (Etcheverry, 1990) i a la possible presència de petites quantitats de  $\text{Cu}^{2+}$  en els components del medi de cultiu dels llevats.

### **IIIa.7. Procediments experimentals.**

#### **IIIa.7.1. Construcció del vector pYES2- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>.**

Per tal d'aïllar la seqüència codificant de l'OLEb<sub>5</sub> de la dessaturasa de llevat, s'introduí la diana *SalI* en el vector Yep352-4.8OLE per mutagènesi dirigida emprant el protocol descrit al capítol de Materials i Mètodes. S'utilitzaren els encebadors OLEs\_for i OLEs\_rev (taula IIIa.3) i les condicions de PCR següents: a 95°C durant 30 s., 18 cicles amb les següents etapes: desnaturalització a 95°C durant 30 s., anellament a 55°C durant 1 min., extensió a 68°C durant 2 min. per kilobase del DNA motlle i una darrera extensió a 68°C durant 10 min.

A la construcció pYES2- $\Delta^{11}$ Tni es creà la diana *SalI* utilitzant mutagènesi dirigida per PCR emprant els encebadors Tnis\_for i Tnis\_rev (taula IIIa.3) amb les mateixes condicions de mutagènesi dirigida que en el cas anterior, excepte l'extensió, que es fa a 66°C.

**Taula IIIa. 3.** Encebadors utilitzats per a la construcció de la proteïna quimèrica  $\Delta^{11}Tni$  OLEb<sub>5</sub>.

Nom encebador	Seqüència 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)
Tnis_for	GCT AAA AAG GAA GTC GAC CTC GAA TTC TGC AGA TAT CC	70.5
Tnis2_rev	GGA TAT CTG CAG AAT TCG AGG TCG ACT TCC TTT TTA GC	70.5
OLEs_for	GGG GTC CAG TTT TGG TCG ACT TGC CAA TGT GGG AC	74.2
OLEs_rev	GTC CCA CAT TGG CAA GTC GAC CAA AAC TGG ACC CC	74.2

La presència de les dianes es comprovà mitjançant digestió amb les endonucleasa de restricció *SalI*, anàlisi per electroforesi de DNA en agarosa i posterior seqüenciació.

Un cop creades les dianes de restricció adequades, els plasmidis es van digerir, utilitzant les dianes *SalI* i *XbaI*. Es va separar un fragment de 348 bp, corresponent al domini OLEb<sub>5</sub> de l'extrem C-terminal de la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S.cerevisiae*, i un altre de 6.8 Kb, corresponent al vector pYES2- $\Delta^{11}Tni$  obert), mitjançant electroforesi de DNA en agarosa i es van purificar utilitzant el kit de purificació de banda Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Un cop purificats els fragments es van lligar utilitzant lligasa T4 segons es descriu a l'apartat VII.5.3 del capítol de Materials i Mètodes per donar lloc a la construcció pYES2- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub> i es transformaren en cèl·lules competents de DH5 $\alpha$ .

Els clons positius es comprovaren per digestió i posterior seqüenciació i es transformaren les construccions en cèl·lules competents de llevat, tant de la soca  $\Delta eloI_{\Delta oleI}$  com de la soca  $\Delta oleI$ .

### IIIa.7.2. Construcció del vector YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub>.

Per tal d'introduir tota la proteïna de fusió  $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub> al vector YEpOLEX va caldre afegir una diana *EcoRI* al final de la seqüència que correspon al domini citocrom b<sub>5</sub> de la dessaturasa de llevat. Això es realitzà

mitjançant mutagènesi dirigida de la construcció pYES2- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub> amb els encebadors Tnib5eco\_for i Tnib5eco\_rev, utilitzant condicions de termociclació descrites a l'apartat anterior. Després de comprovar que la seqüència era correcta va fer falta una segona etapa de mutagènesi dirigida per tal d'eliminar una diana BamHI de la seqüència codificant de la dessaturasa. Per aquesta finalitat es van utilitzar els encebadors Tnib5nb\_for i Tnib5nb\_rev i les mateixes condicions de reacció que en el cas anterior. El DNA obtingut es comprovà per digestió i posterior seqüenciació.

**Taula IIIa.4.** Encebadors utilitzats per a la introducció d'una diana EcoRI en l'extrem 3' de la seqüència codificant de la dessaturasa.

Nom encebador	Seqüència 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)
Tnib5eco_for	GGA TCC GCG CGC GAA TTC TCT AGA GGG CCG	>75
Tnib5eco_rev	GCG GCC CTC TAG AGA ATT CGC GCG CGG ATC	>75
Tnib5nb_for	GCA TCA CAT TAC CGC GGG TCC GCG CGC G	>75
Tnib5nb_rev	CGC GCG CGG ACC CGC GGT AAT GTG ATG C	>75

La construcció pYES2- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub> que provenia de la doble reacció de mutagènesi dirigida i la construcció YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  (Knipple et al., 1998) es digeriren utilitzant les dianes BamHI i EcoRI. Els productes de la digestió (1.4 Kb per la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* fusionada al domini homòleg al citocrom b<sub>5</sub> i 6.1 Kb per al vector YEpOLEX obert) es van separar per electroforesi preparativa de DNA en gel d'agarosa i es van extreure de l'agarosa els fragments d'interès. Posteriorment es van unir els extrems cohesius dels fragments per crear la construcció YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub>.

### IIIa.7.3. Preparació de les construccions pYEX- $\Delta^{11}Tni$ i pYEX- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub>.

El vector pYEXTHS-BN deriva del plasmidi pYEXbx (Clontech). Es digeriren els vectors pYEXTHS-BN, YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i YEpOLEX-



$\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  utilitzant les dianes *Bam*HI i *Eco*RI. Posteriorment es varen separar els fragments de DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Es van purificar els fragments de 7 Kb corresponent al vector pYEXTHS-BN obert, d'1.1 Kb corresponent a la seqüència codificant de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* i d'1.4 Kb corresponent a la seqüència de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* amb la fusió del domini homòleg al citocrom  $b_5$  provinent de la dessaturasa de llevat.

Posterior lligació dels fragments va donar lloc a les construccions pYEX- $\Delta^{11}Tni$  i pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  que van ésser introduïdes pel mètode de l'acetat de liti (descriu a l'apartat V.2.2.2) en la soca de llevat *Aelol\_AoleI*. Es comprovà que la dessaturasa funcionava inoculant els llevats transformats amb aquestes construccions en un medi de cultiu complet amb un suplement d'adenina (concentració final 4 mg/mL) i 0.5 mM de  $Cu^{2+}$  per induir el promotor i que comencés la transcripció del gen de la dessaturasa.

#### **IIIa.7.4. Preparació vectors pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni$ i pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ i expressió en cèl·lules d'*E. coli*.**

Els cDNAs codificants de les construccions  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni OLEb_5$  es van introduir en el vector pET28a(+) (Novagen) utilitzant les dianes de restricció *Bam*HI i *Eco*RI. Aquests plasmidis es van transformar en la soca d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Els cultius de BL21(DE3)pLysS pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni$ , BL21(DE3)pLysS pET28a(+)- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  i BL21(DE3)pLysS pET28a(+) es van fer créixer a 37°C fins a una  $OD_{600nm}$  al voltant de 0.6. Els cultius es tractaren amb IPTG a una concentració final de 0.4 mM, es deixaren a 37°C en agitació i s'agafaren diferents mostres al cap de diferents temps d'inducció (des de t=0, en el moment d'afegir l'IPTG, fins a 6 h, a intervals de 2 h).

Les cèl·lules bacterianes obtingudes es varen trencar mitjançant un xoc tèrmic entre  $N_2$  líquid i 42°C utilitzant NETN i inhibidors de proteases. Les mostres es van analitzar per electroforesi en gels d'acrilamida (SDS-PAGE) com es descriu al capítol de Materials i Mètodes.



**IIIb. ACTIVITATS CATALÍTIQUES DE LES  
 $\Delta^{11}$  ACIL-CoA DESSATURASES DE  
*Spodoptera littoralis* I *Trichoplusia ni***

---

---



### IIIb.1. *Spodoptera littoralis*.

*S. littoralis* és una arna de la família noctuidea. L'eruga afecta cultius hortícoles (blat de moro, alfals, tomàquet, patata, arròs....) de la zona mediterrània i constitueix una plaga de conreus important.



**Figura IIIb.1.** Exemplar de femella de l'insecte *Spodoptera littoralis*.

La composició de la mescla feromonal d'aquesta espècie difereix lleugerament entre diferents soques (Dunkelblum and Kehat, 1987; Martínez et al., 1990; Navarro et al., 1997b) si bé els components generalment són acetats d'alcohols de 14 àtoms de carboni amb diferents graus d'insaturació (taula IIIb.1).

Els diens conjugats amb diferents configuracions dels dobles enllaços són elements estructurals comuns en les feromones sexuals d'insectes. S'han descrit dessaturases que catalitzen la formació de dobles enllaços conjugats (Löfstedt and Bengtsson, 1988; Fabriàs et al., 1989; Martínez et al., 1990; Fang et al., 1995; Cahoon et al., 2001; Moto et al., 2004). Alguns d'aquests enzims produeixen el diè conjugat per l'inserció d'un doble enllaç en un compost monoinsaturat (Fabriàs et al., 1989; Martínez et al., 1990; Cahoon et al., 1999), mentre que en altres casos es produeix una reorganització electrònica d'una insaturació

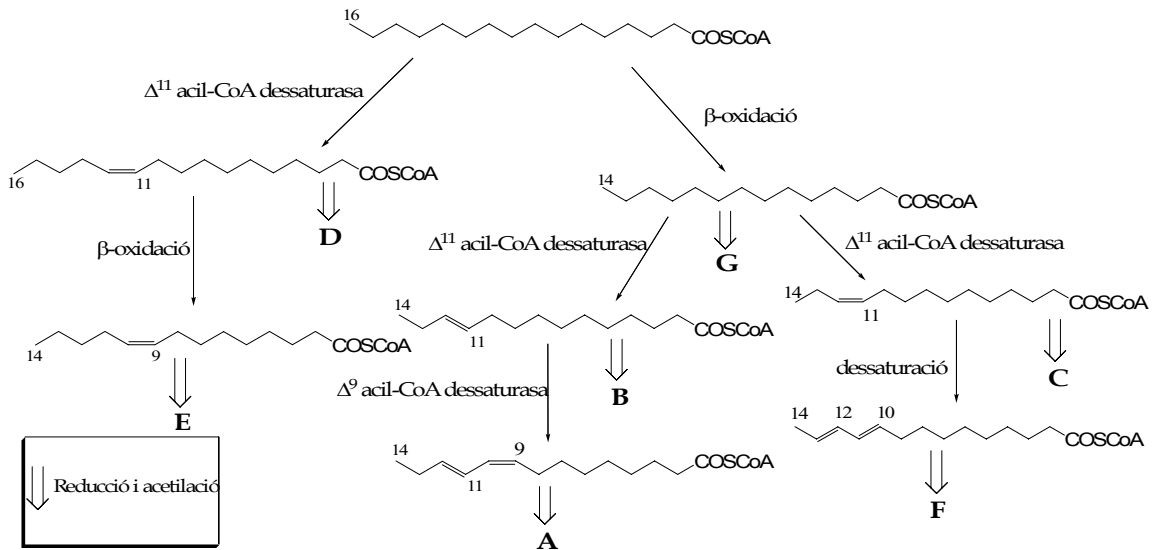
preexistent a més de formar-se la segona insaturació (Löfstedt and Bengtsson, 1988; Fang et al., 1995; Cahoon et al., 1999; Moto et al., 2004).

**Taula IIIb.1.** Compostos identificats en extractes de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis*.

Acetat de (Z,E)-9,11-tetradecadienil	(Z,E)-9,11:C14:Ac	<b>A</b>
Acetat de (E)-11-tetradecenil	E11:C14:Ac	<b>B</b>
Acetat de (Z)-11-tetradecenil	Z11:C14:Ac	<b>C</b>
Acetat de (Z)-11-hexadecenil	Z11:C16:Ac	<b>D</b>
Acetat de (Z)-9-tetradecenil	Z9:C16:Ac	<b>E</b>
Acetat de (E,E)-10,12-tetradecadienil	(E,E)-10,12:C14:Ac	<b>F</b>
Acetat de tetradecil	C14:Ac	<b>G</b>
Acetat de (Z,E)-9,12-tetradecadienil	(Z,E)-9,12:C14:Ac	*

\* Diè no detectat en la colònia criada als nostres laboratoris, però present en altres poblacions de la mateixa espècie.

La ruta biosintètica proposada per la feromona sexual de *S. littoralis* s'inicia amb l'èster de coenzim A de l'àcid hexadecanoic que pot seguir dues vies: una  $\beta$ -oxidació o bé una dessaturació en C-11. A través de diversos passos d'insaturació i  $\beta$ -oxidació progressius s'arriba a la barreja feromonal final (figura IIIb.2) (Martínez et al., 1990; Navarro et al., 1997a). Donat que no existien estudis a la bibliografia dirigits a la identificació i caracterització de cap de les dessaturases implicades, al nostre grup de treball es van iniciar fa uns anys estudis en aquest sentit (Rodríguez, 2003).



**Figura IIIb.2.** Biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*. L'estructura dels compostos A-G s'indica en la taula IIIb.1.

A partir d'extractes de la glàndula feromonal es van aïllar tres cDNAs diferents que codificaven per una  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa, una  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa i una probable dessaturasa de la qual no es va poder esbrinar la funció (Rodríguez et al., 2004b). En aquest estudi, a més, es va poder comprovar que la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa era capaç de promoure la dessaturació de l'àcid (E)-11-tetradecenoic per donar lloc a l'àcid diènic (Z,E)-9,11-tetradecadienoic, i que la  $\Delta^{11}$  dessaturasa catalitzava la formació dels àcids monoinsaturats Z11:C16, Z11:C14 i E11:C14. Així i tot, no es va poder determinar que cap d'elles fos la responsable de la formació de l'àcid (E,E)-10,12-tetradecadienoic.

D'altra banda, l'estudi dels enzims implicats en la biosíntesi de la feromona sexual de *Bombyx mori* desvetllà que la mateixa dessaturasa que produïa l'àcid (Z)-11-hexadecenoic era capaç d'utilitzar aquest compost com a substrat i produir els àcids (E,Z)-10,12-hexadecadienoic i (E,E)-10,12-hexadecadienoic (Moto et al., 2004). De manera similar, estudis realitzats en el nostre grup demostraven que la biosíntesi en *S. littoralis* del diè (E,E)-10,12:C14 té lloc per reorganització i dessaturació de l'àcid (Z)-11-tetradecenoic (Navarro et al., 1997b; Rodríguez et al., 2001). Per tant, es va plantejar la hipòtesi que aquest diè de la mescla feromonal d' *S. littoralis* es generès per acció de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa sobre l'àcid (Z)-11-tetradecenoic.

### **IIIb.2. Formació d'àcids diènics conjugats en posicions 10 i 12 catalitzada per la $\Delta^{11}$ acil-CoA dessaturasa d'*Spodoptera littoralis*.**

Per tal de comprovar la hipòtesi anterior, calia dur a terme experiments d'expressió de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis* en cultius de llevat, per tal de cercar la presència del compost diènic esmentat en els corresponents extractes lipídics. Al nostre laboratori es disposava d'aquesta dessaturasa clonada en el vector pYEX. Malgrat tot, degut als problemes observats en l'expressió de la dessaturasa de *T. ni* en aquest mateix entorn pYES2, es va optar per subclonar la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis* en el vector induïble pYEXTHS-BN, que ja s'havia utilitzat amb molts bons resultats.

Per assolir aquest objectiu, calia introduir les dianes adequades, *Bam*HI i *Not*I, als extrems N i C-terminals de la dessaturasa de *S. littoralis*, respectivament, tot mantenint la pauta de lectura per tal de conservar l'epítop de sis histidines i, fins i tot, la seqüència *Strep*II per una immunodetecció posterior.

Les cèl·lules *ΔeloI\_ΔoleI* transformades amb aquesta construcció varen créixer bé en un medi complet YPAD amb  $\text{CuSO}_4$  sense l'addició d'àcids grassos monoinsaturats. L'extracció dels lípids cel·lulars, subseqüent metilació i posterior anàlisi per GC-MS mostrà que els llevats transformats produïen quantitats importants d'àcids grassos insaturats en la posició 11 en les proporcions que s'indiquen a la taula IIIb.2. L'àcid (Z)-11-hexadecenoic fou el component principal, tot i que també es podia observar la presència en menors quantitats dels àcids (Z)-11-tetradecenoic i (E)-11-tetradecenoic. No s'observà, a diferència del que passava amb la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni*, la presència d'àcid (Z)-11-octadecenoic, la qual cosa suggeria que la cavitat de l'enzim que s'uneix al substrat és més petita en *S. littoralis* i no permet acomodar àcids grassos de longitud de cadena llarga.

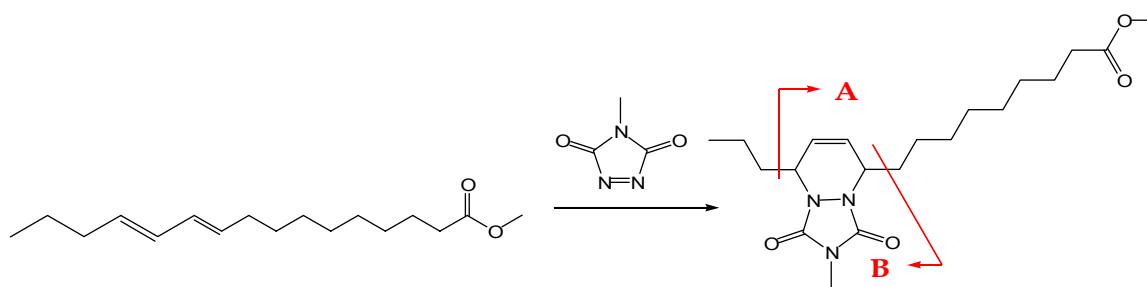


**Taula IIIb.2.** Percentatge d'àcids grassos monoinsaturats presents en els llevats que expressen la  $\Delta^{11}$  dessaturasa d'*S. littoralis*.

Àcid gras	%
E11:C14	7
Z11:C14	4
Z11:C16	89
Z11:C18	no detectat

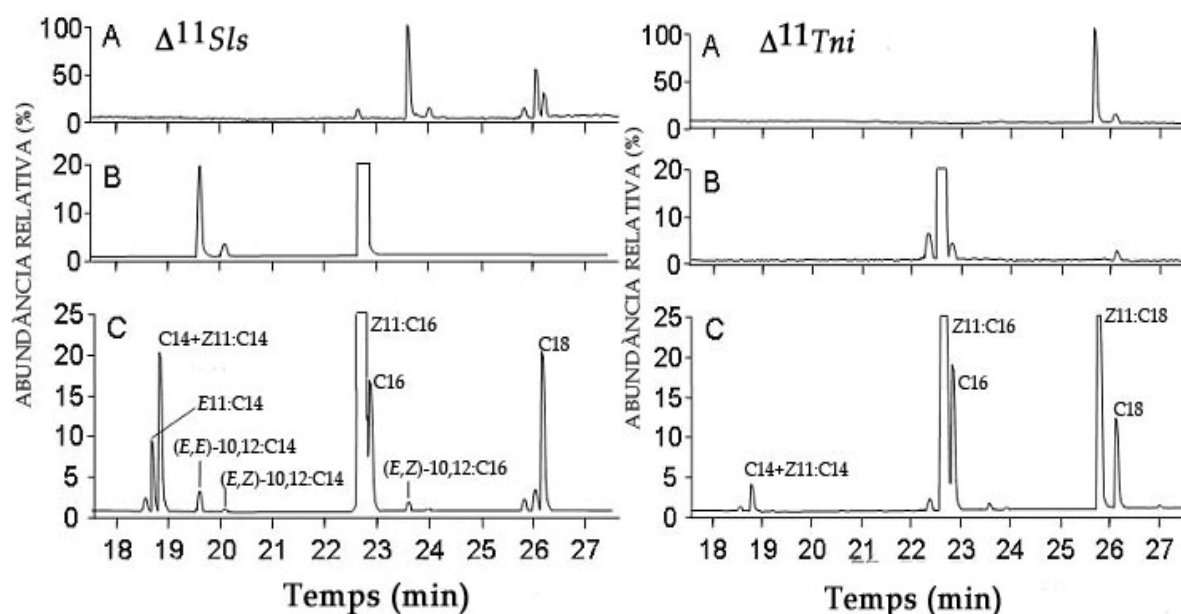
A més dels productes monoinsaturats en posició 11, les cèl·lules produïen dos diens de 14 àtoms de carboni, tot i que un era molt minoritari. La derivatització d'aquests extractes utilitzant 4-metil-1,2,4-triazolina-3,5-diona (MTAD) (Rodríguez et al., 2004b) produí un adducte de 14 àtoms de carboni que presentava ions a  $m/z=351$  (ió molecular), 336 i 180, característics d'un diè amb els dobles enllaços en posicions 10 i 12 (figura IIIb.3).

La comparació dels temps de retenció en el cromatograma de gasos amb els diferents isòmers sintètics dels èsters metílics corresponents va confirmar que el diè majoritari corresponia a l'èster metílic de l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic. El diè minoritari no es detectava després de la derivatització amb MTAD degut a la seva poca abundància, si bé s'ha identificat temptativament com a l'isòmer *E,Z* en base a la comparació de temps de retenció amb l'estàndard sintètic. Els espectres de GC-MS dels extractes lipídics metanolitzats de llevat transformat amb la dessaturasa de *T. ni* en el mateix entorn induïble pYEXTHS-BN no mostraven la presència de diens. Per tant, es pot concloure que si bé la dessaturasa de *T.ni* no presenta activitat sobre els productes (*Z*)-11-monoinsaturats (figura IIIb.4), la dessaturasa d'*S. littoralis*, a més de l'activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa prèviament identificada (Rodríguez et al., 2004b), es capaç de produir l'àcid (*E,E*)-10,12:C14 a partir de l'àcid Z11:C14, de manera similar a l'activitat bifuncional descrita per la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *B. Mori*, així com el seu isòmer (*E,Z*)-10,12:C14 encara que aquest en molt baixa proporció.



Longitud de la cadena	Fragments característics $m/z$			
	diè 7,9	diè 9,11	diè 10,12	diè 11,13
C14	$M^+ = 351$	$M^+ = 351$	$M^+ = 351$	$M^+ = 351$
	A = 308	A = 322	A = 336	A no existeix
	B = 208	B = 194	B = 180	B = 166
C16	$M^+ = 379$	$M^+ = 379$	$M^+ = 379$	$M^+ = 379$
	A = 308	A = 322	A = 336	A = 350
	B = 236	B = 222	B = 208	B = 194
C18	$M^+ = 407$	$M^+ = 407$	$M^+ = 407$	$M^+ = 407$
	A = 308	A = 322	A = 336	A = 350
	B = 264	B = 250	B = 236	B = 222

**Figura IIIb.3.** Esquema de la derivatització del (*E,E*)-10,12-hexadienoats de metil utilitzant MTAD. En la taula es mostren els fragments característics dels derivats MTAD de diens de diferent longitud amb els dobles enllaços conjugats en diferents posicions.



**Figura IIIb.4.** Cromatogrames de GC-MS dels extractes lipídics metanolitzats de llevats *ΔeolI\_ΔoleI* transformats amb pYEX- $\Delta^{11}Sls$  i pYEX- $\Delta^{11}Tni$ . **A)** els cromatogrames obtinguts per selecció dels ions a  $m/z=266$  (ió molecular del hexadecadienoat de metil), **B)** els cromatogrames obtinguts per selecció dels ions a  $m/z=238$  (ió molecular del

tetradecadienoat de metil) i C) els cromatogrames amb detecció TIC. Els pics corresponen als èsters metílics dels corresponents àcids.

Estudis realitzats prèviament en el grup sobre la criptoregioquímica<sup>2</sup> (Pinilla et al., 1999) i l'especificitat de substrat de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *S. littoralis* (Villorbina et al., 2003b) havien suggerit que la geometria dels productes insaturats resultants depenia de la longitud de cadena del substrat, ja que en el cas dels àcids tridecanoic i mirístic es produïen isòmers *E* preferiblement, mentre que en el cas de que els substrats fossin àcids hexadecanoic i heptadecanoic es formaven exclusivament els isòmers *Z*.

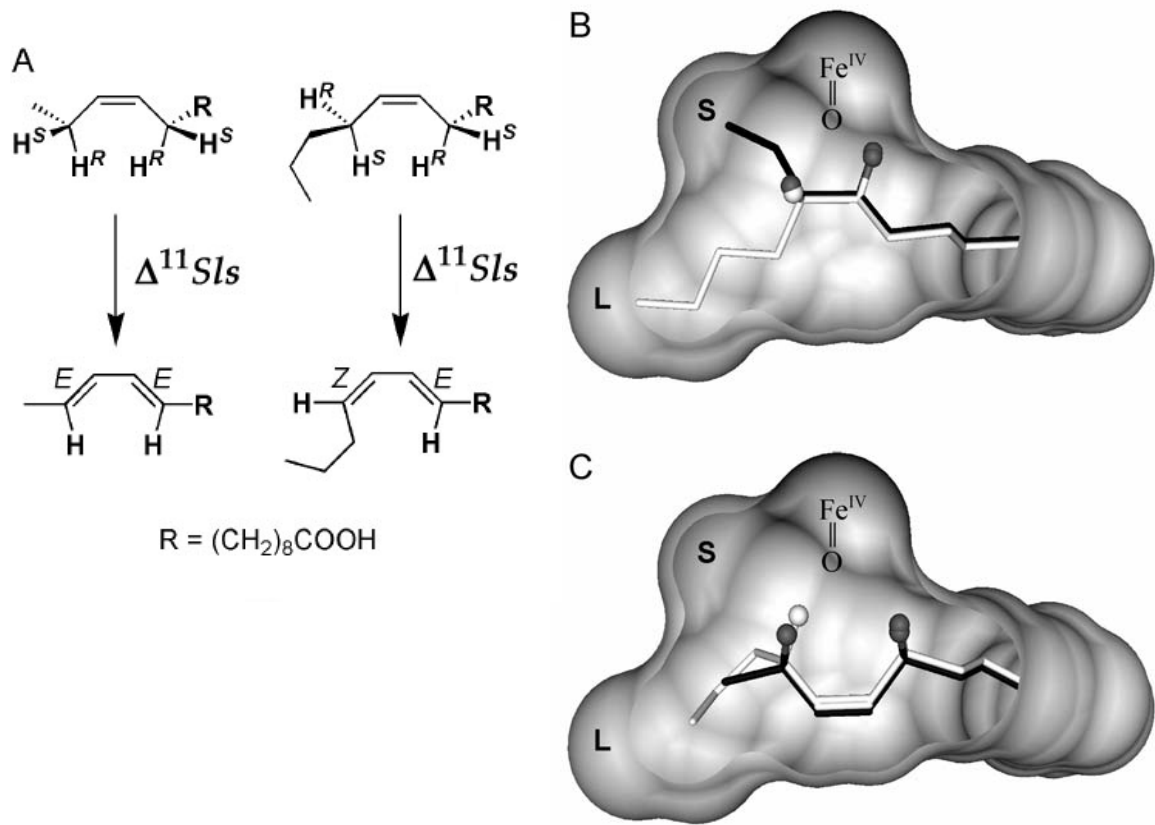
Segons aquesta hipòtesi, i tenint en compte que la  $\Delta^{11}$  dessaturasa presenta també activitat 10,12 dessaturasa, era esperable la presència de 10,12-hexadecadienoats en els extractes lipídics dels llevats transformats, però de configuració diferent a la observada pel derivat diènic de C14 (*E,E*). L'anàlisi per GC-MS utilitzant condicions SIM amb selecció dels ions a  $m/z = 266$  ( $M^+$ ) i  $235$  ( $M^+ - \text{MeO}^-$ ) mostra la presència en l'extracte de quantitats molt petites d'un hexadecadienoat conjugat. Per posterior derivatització amb MTAD i comparació amb estàndards d'origen sintètic aquest compost s'identificà com el (*E,Z*)-10,12-hexadecadienoat, que és també el diè majoritari produït per la dessaturasa del cuc de seda *B. mori* (Moto et al., 2004). Aquests resultats confirmaren la hipòtesi que l'estereoquímica de les reaccions catalitzades per la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis* depèn de les característiques estructurals dels substrat.

---

<sup>2</sup> **Criptoregioquímica.** Lloc on es produeix la primera etapa d'oxidació en la reacció de dessaturació (Buist, P.H. and Behrouzian, B.: Deciphering the cryptoregiochemistry of oleate delta-12 desaturase: A kinetic isotope effect study. J Am Chem Soc **120** (1998) 871-876.).

La formació preferent dels àcids (*E,Z*)-10,12-hexadecadienoic i (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic recolza la hipòtesi plantejada en estudis anteriors (Pinilla et al., 1999; Villorbina et al., 2003b) segons la qual el canal hidrofòbic que acomoda l'àcid gras substrat té dues cavitats més enllà del C-12: una més gran, que acomoda la conformació eclipsada dels substrats saturats de cadena llarga (C16), els quals perden els hidrògens *pro-(R)* en C11 i C12, per donar lloc als productes olefínics amb geometria *Z* (Navarro et al., 1997a; Ando et al., 1998), i una cavitat més petita, que és capaç d'allotjar el confòrmer anticlinal dels substrats saturats de cadena curta (C14), que per pèrdua dels hidrògens *pro-(R)* del C11 i *pro-(S)* del C12, produeixen els productes monoinsaturats de geometria *E* (Navarro et al., 1997a; Ando et al., 1998).

Segons aquest model, i tenint en compte que la formació de l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic té lloc per pèrdua dels hidrògens *pro-(R)* de C10 i C13, la formació de l'isòmer (*E,Z*)-10,12 hauria de tenir lloc per l'eliminació de l'àtom d'hidrogen *pro-(S)* del C13. Aquest supòsit s'il·lustra a la figura IIIb.5, on es representa un model teòric que explica que l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic podria encabir-se en les dues cavitats de l'enzim donant lloc a una aproximació on l'hidrogen que s'elimina del C13 pot ser tant *pro-(R)* com *pro-(S)*. En canvi, l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic només pot entrar en la cavitat gran de l'enzim de manera que només l'hidrogen *pro-(S)* del C13 queda pròxim als àtoms de Fe del centre catalític, donant lloc al producte (*E,Z*)-10,12.



**Figura IIIb.5.** A) Estructura que adoptarien els isòmers (Z)-11- dels àcids tetradecenoic i hexadecenoic en el centre actiu de l'enzim per a la formació dels compostos diènics tenint en compte que la dessaturació és un procés d'eliminació *syn*-. B) Models de l'estructura de la cavitat de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa amb els substrats C14 (negre) i C16 (blanc) disposats per donar lloc als productes  $E_{11}:C_{14}$  i  $Z_{11}:C_{16}$ , respectivament. C) Models de l'estructura de la cavitat amb els substrats derivats de  $E_{11}:C_{14}$  (negre) i  $Z_{11}:C_{16}$  (blanc) disposats per donar lloc als productes  $(E,E)$ -10,12: $C_{14}$  i  $(E,Z)$ -10,12: $C_{16}$ . Els àtoms d'hidrogen reactius es mostren com a esferes de color fosc *pro*-(R) i clar *pro*-(S).

### IIIb.2.1. Inducció de l'expressió de la $\Delta^{11}$ dessaturasa d'*S. littoralis* a diferents concentracions de $Cu^{2+}$ .

Com ja s'ha esmentat en l'apartat IIIa.6, el vector pYEXTHS-BN presenta un promotor que permet la inducció variable de la transcripció mitjançant l'addició de concentracions creixents de l'ió  $Cu^{2+}$  en el medi de cultiu.

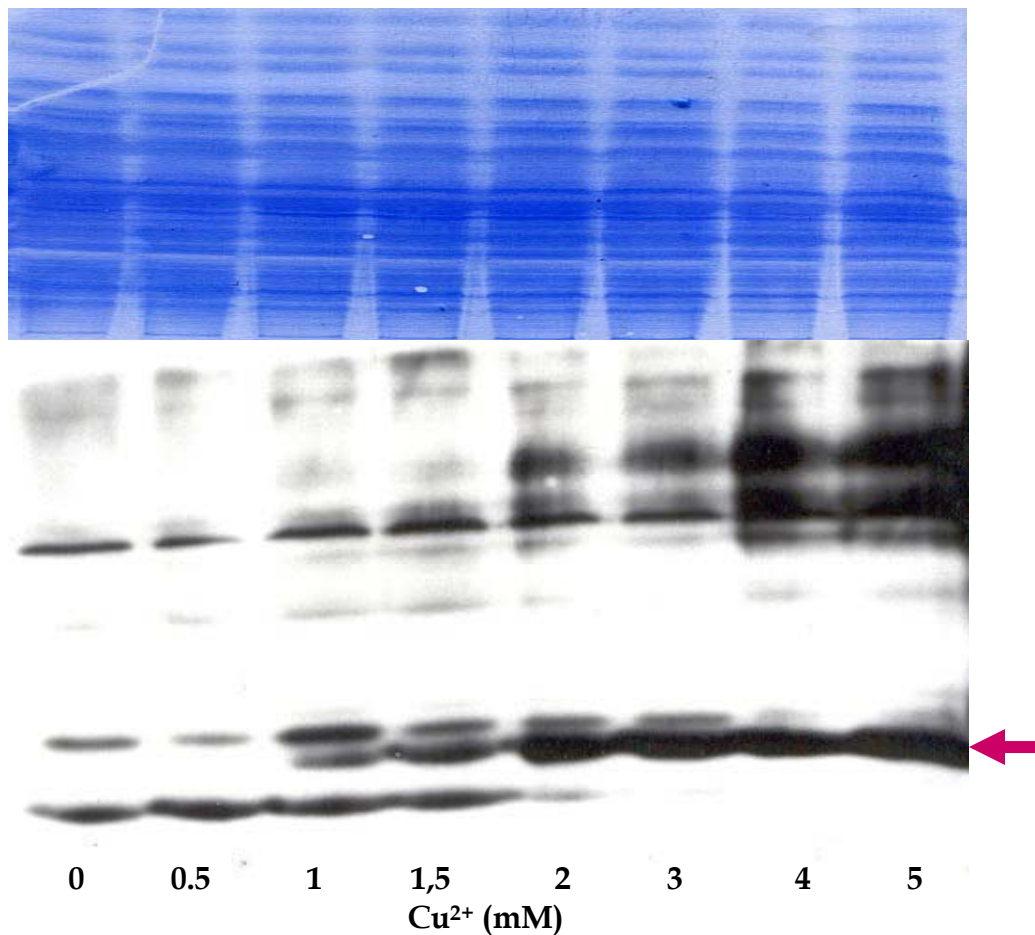
Tal com es va fer amb les construccions que expressaven la dessaturasa de *T. ni* es van fer créixer cèl·lules de llevats transformats amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}Sls$  en presència de diferents concentracions de coure en el medi de

cultiu ( $\text{CuSO}_4$  des de 0 fins a 5 mM), per tal de comprovar si aquesta afectava l'eficiència d'aquest promotor. En mesurar la concentració d'àcids grassos insaturats i saturats en els llevats transformats s'observà, de forma similar al que es comenta a l'apartat IIIa.6, que no hi havia grans diferències entre les cèl·lules crescudes a diferents concentracions de coure, ni tan sols amb els cultius realitzats sense la presència d'aquest catió (taula IIIb.3), essent només en el cas del Z11:C16 que s'observa un cert increment de la seva proporció en augmentar la concentració de coure en els cultius.

**Taula IIIb.3.** Percentatge (mitjana  $\pm$  SD, n=3) d'àcids grassos en els llevats transformats amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Sls en presència de diferents concentracions de coure.

[Cu <sup>2+</sup> ] mM	E11:C14	Z11:C14	C14	(E,E)- 10,12:C14	Z11:C16	C16	C18
0	4.7 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 3.1	0.5 $\pm$ 0.2	55.7 $\pm$ 2.2	14.6 $\pm$ 1.4	8.6 $\pm$ 2.6
0.5	5.3 $\pm$ 1.3	3.1 $\pm$ 0.8	9.1 $\pm$ 5.2	0.6 $\pm$ 0.1	62.8 $\pm$ 5.9	11.6 $\pm$ 1.9	7.4 $\pm$ 0.8
1	4.9 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 5.1	0.8 $\pm$ 0.1	64.8 $\pm$ 6.8	11.3 $\pm$ 3.1	6.4 $\pm$ 0.4
1.5	5.1 $\pm$ 1.4	2.8 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 3.9	0.7 $\pm$ 0.1	64.4 $\pm$ 4.5	10.7 $\pm$ 2.2	6.7 $\pm$ 0.5
2	5.8 $\pm$ 1.6	4.2 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 5.5	0.8 $\pm$ 0.2	62.7 $\pm$ 6.9	11.0 $\pm$ 3.0	8.5 $\pm$ 1.4
3	4.2 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	9.4 $\pm$ 3.7	0.7 $\pm$ 0.1	60.9 $\pm$ 5.6	12.3 $\pm$ 2.1	10.7 $\pm$ 0.2
4	4.6 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 3.9	1.2 $\pm$ 0.1	67.0 $\pm$ 8.5	8.5 $\pm$ 2.8	9.0 $\pm$ 3.3
5	4.2 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 3.4	1.0 $\pm$ 0.1	68.4 $\pm$ 6.4	8.3 $\pm$ 1.5	8.4 $\pm$ 1.0

Per tal de determinar els nivells d'expressió de la dessaturasa, es varen recollir 2 mL de cadascun dels cultius, se'n va fer una extracció de proteïnes emprant lisi alcalina i es va fer una anàlisi per *Western blot* utilitzant com a sonda un anticòs (anti-6His) que reconeix el tag de sis histidines en l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant, derivat del plasmidi pYEXTHS-BN.



**Figura IIIb.6.** *Western blot* de 50  $\mu\text{g}$  dels extractes proteics del llevat *Δelo1\_Δole1* transformat amb pYEX- $\Delta^{11}$ Sls corresponents a diferents concentracions de  $\text{Cu}^{2+}$ . La detecció es va realitzar amb un anticòs anti-6His. S'indica amb una fletxa la banda de 40 kDa atribuïda a  $\Delta^{11}$ Sls. S'observen diverses bandes degut a un temps d'exposició llarg, a temps d'exposició menors es pot observar una sola banda. A la part superior es pot observar la tinció amb blau de Coomassie de la membrana de PVDF utilitzada per a fer l'anàlisi per *Western blot*.

Com es pot observar a la figura IIIb.6, es detectà una proteïna de la mida esperada (40 kDa), per la  $\Delta^{11}$  dessaturasa recombinant, l'expressió de la qual es detectava a partir d'una concentració de  $\text{Cu}^{2+}$  propera a 1 mM i que aparentment creixia en augmentar aquesta concentració. Així i tot, com ja s'ha comentat, aquest augment en l'expressió no sembla tenir conseqüències sobre la composició relativa de les fraccions lipídiques dels cultius. Aquests resultats a l'igual que els que des van obtenir degut als experiments realitzats amb la dessaturasa de *T. ni*, indiquen l'existència de mecanismes de regulació de la composició en àcids grassos dels lípids cel·lulars, a fi de mantenir l'homeostasi

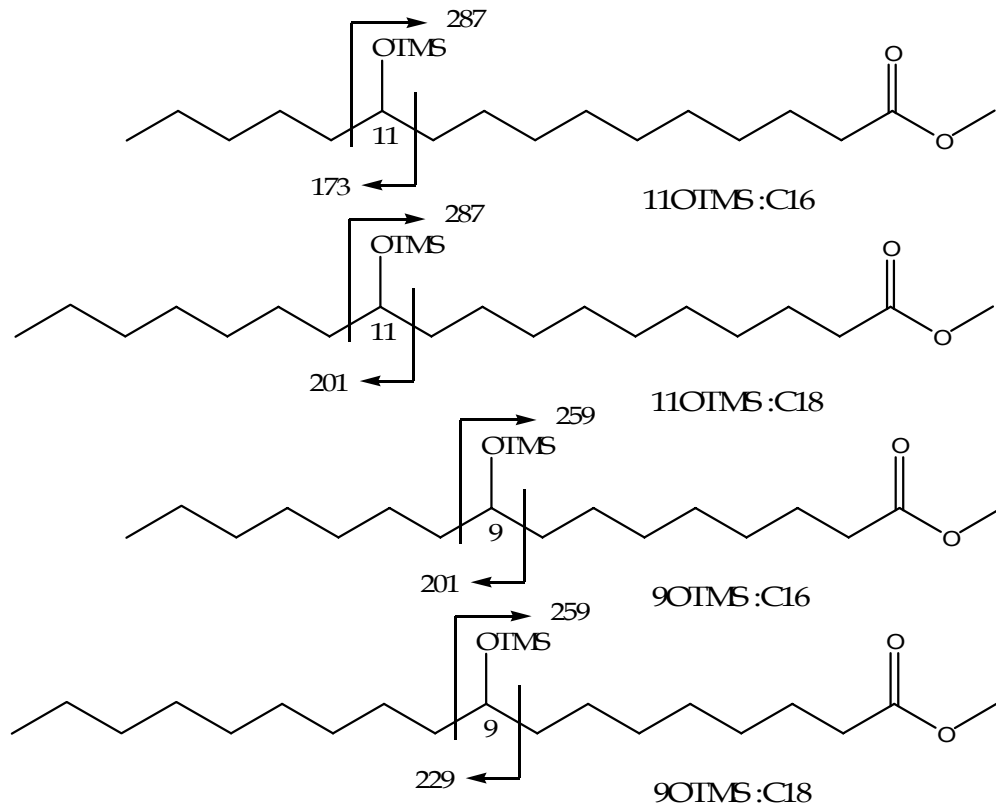
de les membranes de la cèl·lula, que son determinants de la composició d'aquestes.

### **IIIb.3. Les $\Delta^{11}$ dessaturases de *T. ni* i *S. littoralis* tenen activitat hidroxilasa residual.**

En estudis previs publicats per Carvalho i col·laboradors s'havia descrit que la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. cerevisiae* presentava activitat hidroxilasa (Carvalho et al., 2005). Per tal de confirmar si aquesta activitat tenia lloc també amb les  $\Delta^{11}$  dessaturases de *T.ni* i *S. littoralis*, en el context d'una estada de quatre mesos al laboratori del Prof. Peter H. Buist (Carleton University, Ottawa, ON, Canada), es va determinar la composició dels extractes lipídics de cultius de *S. cerevisiae*  $\Delta eloI\_AoleI$  transformats amb pYEX- $\Delta^{11}Tni$ , pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ , pYEX- $\Delta^{11}Sls$  o YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  o YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  prèviament metanolitzats i tractats amb bis(trimetilsilil)-acetamida/piridina. Els resultats obtinguts es varen comparar amb els observats amb la mateixa soca de llevat transformada amb la construcció constitutiva de la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. cerevisiae* (YEp352-4.8OLE) i amb els resultats publicats amb la soca salvatge S522C (Carvalho et al., 2005).

L'anàlisi acurada dels cromatogrames mostra la presència del derivat trimetilsililat de l'11-hidroxihexadecanoat de metil (11OTMS:C16) en els extractes provinents de llevats modificats per expressar una  $\Delta^{11}$  dessaturasa, amb una abundància relativa al voltant del 0.1 % dels àcids grassos totals (taula IIIb.3). La posició del grup OTMS es deduí per l'aparició dels pics corresponents als fragments característics a  $m/z= 287$  i  $173$  (figura IIIb.7).





**Figura. IIIb.7.** Fragmentació característica dels trimetilsilil derivats dels ésters metàlics dels àcids 11-hidroxihexadecanoic (11OTMS:C16), 11-hidroxiioctadecanoic (11OTMS:C18), 9-hidroxihexadecanoic (9OTMS:C16) i 9-hidroxiioctadecanoic (9OTMS:C18). S'indica la relació  $m/z$  dels fragments característics.

En els cromatogrames dels extractes de llevats transformats amb la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* també s'observà el derivat de trimetilsilil de l'11-hidroxiioctadecanoat de metil (11OTMS:C18) amb una abundància similar a la del seu equivalent de 16 àtoms de carboni. Aquest compost no es detectà en els cromatogrames corresponents als llevats transformats amb la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis*. Aquest resultat està d'acord les observacions prèvies que apuntaven a la incapacitat de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis* de processar l'àcid esteàric. En cap cas es va poder detectar la presència de producte hidroxilat en C11 derivat de l'àcid mirístic, probablement perquè els nivells d'aquest derivat estaven per sota del llindar de sensibilitat de la tècnica analítica emprada. Pel que fa a la comparació entre els dos entorns d'expressió, induïble (pYEX) i constitutiu (YE<sub>p</sub>OLEX), en que es van expressar les dues construccions derivades de la dessaturasa de *T. ni*,  $\Delta^{11}Tni$  i  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ , cal dir, un cop més,

que no es van observar diferències substancials en les proporcions de productes hidroxilats.

Per contra, en els cultius de llevat que expressaven la  $\Delta^9$  dessaturasa, com era d'esperar, es van detectar només els corresponents productes hidroxilats en C-9 de 16 i 18 àtoms de carboni, a més dels ja coneguts derivats monoinsaturats. Malgrat que aquests productes eren també minoritaris en la barreja d'àcids grassos que contenien els extractes lipídics analitzats, la seva proporció sempre fou superior a les detectades pels productes hidroxilats en C-11, cosa que podria indicar una major eficiència d'aquesta dessaturasa en dur a terme aquestes reaccions d'hidroxilació.

En cap cas, es va detectar la presència de derivats hidroxilats en C12. La forta preferència per introduir l'hidroxil en el C-11 dels substrats que presenten les  $\Delta^{11}$  dessaturases d'insecte correlaciona amb el mecanisme descrit per aquesta reacció de dessaturació, segons el qual la reacció s'inicia per l'abstracció d'un àtom d'hidrogen en la posició C-11 (Pinilla et al., 1999). Aquests fets semblen indicar que tant l'hidroxilació com la dessaturació impliquen un intermedi radicalari comú, centrat en el carboni C-11, que pot evolucionar captant una espècie hidroxil o bé eliminant un segon àtom d'hidrogen del carboni contigu. Aquest tipus de mecanisme bimodal s'ha observat en diverses dessaturases integrals de membrana, de manera que es tracta de potencials agents hidroxilants. L'activitat hidroxilant normalment és residual però en certs tipus de sistemes vegetals i microbians aquesta és l'activitat predominant (Broadwater et al., 2002). Aquest fenomen es pot observar també en la biosíntesi d'un alcaloide de defensa en l'escarabat *Epilachna varivestis*, que presenta un intermedi del tipus 15-hidroxiolat, que probablement es forma per activitat hidroxilasa d'una  $\Delta^{15}$  dessaturasa (Attygalle et al., 1994; Attygalle et al., 1999).

**Taula IIIb.3.** Composició en àcids grassos dels extractes lipídics derivats dels llevats transformats amb diferents construccions per a l'expressió de dessaturases. A la taula es mostren les proporcions relatives (%) de cada àcid gras determinades utilitzant GC-MS en el cromatograma TIC. Els valors per cada analit representen la mitjana  $\pm$  SD d'entre tres i cinc determinacions.

<b>Composició dels extractes lipídics</b>													
<b>Soca de <i>S. cerevisiae</i></b>													
	Z11:C14	Z9:C14	C14	Z11:C16	Z9:C16	C16	11OTMS:C16	9OTMS:C16	Z11:C18	Z9:C18	C18	11OTMS:C18	9OTMS:C18
Salvatge <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	42.7 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 1.6	0.9 $\pm$ 0.3	32.2 $\pm$ 2.2	5.1 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.1				
YEp352-4:SOLE <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 1.5	36.4 $\pm$ 3.7	19.9 $\pm$ 2.1	0.6 $\pm$ 0.2	28.9 $\pm$ 2.7	5.8 $\pm$ 2.1	0.3 $\pm$ 0.1					
YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tri <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 1.2	37.5 $\pm$ 2.9	21.3 $\pm$ 2.3	0.05 $\pm$ 0.03	25.2 $\pm$ 1.7	7.3 $\pm$ 0.7	0.08 $\pm$ 0.03					
YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tri/OLEb <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.3	9.1 $\pm$ 0.5	42.6 $\pm$ 2.2	18.5 $\pm$ 1.0	0.08 $\pm$ 0.03	22.3 $\pm$ 1.7	6.1 $\pm$ 1.3	0.08 $\pm$ 0.03					
pYEX- $\Delta^{11}$ Tri <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.7	40.7 $\pm$ 1.8	14.4 $\pm$ 1.0	0.09 $\pm$ 0.03	31.1 $\pm$ 2.1	8.0 $\pm$ 1.2	0.09 $\pm$ 0.03					
pYEX- $\Delta^{11}$ Tri/OLEb <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 1.5	43.8 $\pm$ 2.7	18.0 $\pm$ 2.4	0.08 $\pm$ 0.03	25.0 $\pm$ 3.4	4.7 $\pm$ 1.2	0.08 $\pm$ 0.03					
pYEX- $\Delta^{11}$ Sl <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 1.4	53.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 0.9	0.11 $\pm$ 0.03	n.d.	13.5 $\pm$ 0.6	n.d.					

n.d. no detectat.

<sup>a</sup>Les dades indicades per la soca salvatge corresponen a les descrites per Carvalho et al. (Carvalho et al., 2005).

<sup>b</sup>Dades obtingudes utilitzant la soca *Δ10L\_Δole1* transformada amb les construccions que s'indiquen.

### IIIb.4. Activitat de $\Delta^{11}$ acil-CoA dessaturases sobre substrats no naturals.

#### IIIb.4.1. Àcids grassos monoinsaturats de geometria *E*.

Els àcids grassos que contenen un doble enllaç de geometria (*E*) són estructuralment similars als seus corresponents homòlegs saturats (Mahfouz et al., 1980; Rodríguez, 2003) i són capaços d'ésser acceptats com a substrat de les dessaturases. En treballs anteriors (Fabriàs et al., 2004) s'havia vist que la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. cerevisiae* era capaç d'introduir dobles enllaços en cadenes d'àcid vaccènic ((*E*)-11-octadecenoic) per tal de produir un àcid gras d'alt valor afegit, l'àcid linolènic conjugat (àcid (*Z,E*)-9,11-octadecadienoic o CLA). Amb aquests precedents es va considerar assajar l'activitat de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* sobre diferents substrats (*E*) monoinsaturats.

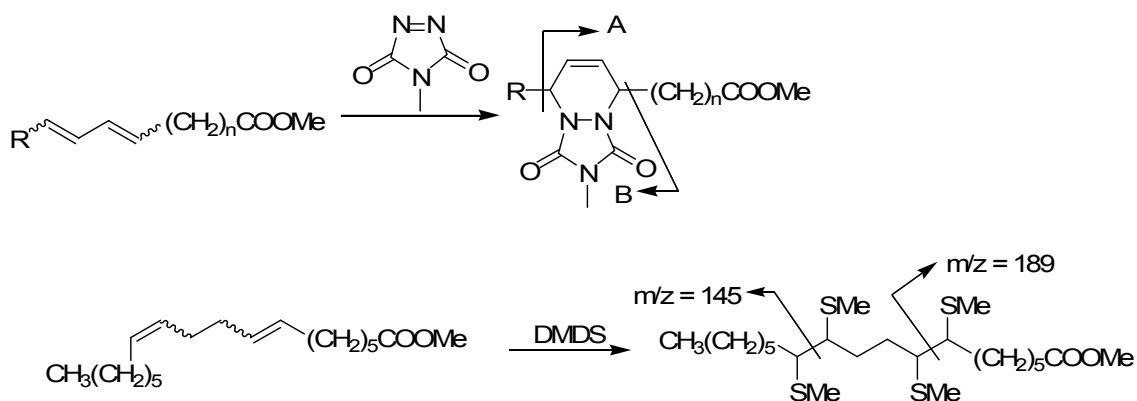
Cultius de la soca de llevat *ΔeloI\_ΔoleI* transformada amb les construccions YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ , YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ , pYEX- $\Delta^{11}Tni$  i pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  es van incubar en presència dels àcids: (*E*)-7-octadecenoic, (*E*)-9-octadecenoic, (*E*)-13-octadecenoic, (*E*)-9-tetradecenoic, (*E*)-9-hexadecenoic o 9-hexadecenoic.

Les incubacions dels llevats que expressaven la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T.ni* amb els substrats (*E*)-monoinsaturats mostraren la presència dels corresponents productes doblement insaturats (taula IIIb.4), amb ions moleculars amb dues unitats de massa menys que els corresponents substrats. Aquestes anàlisis van evidenciar que els àcids grassos formats presentaven, a més de la insaturació original amb configuració *E*, una insaturació en la posició 11 de la cadena d'àcid gras, en general amb geometria *Z*. Només en el cas de les incubacions amb *E9:C14* es va observar una petita proporció del producte on la nova insaturació presentava geometria *E*. Aquest fet és compatible amb el model proposat a la figura IIIb.5. En el cas dels diens conjugats, la posició dels dobles enllaços en 9,11 o 11,13 es va determinar a partir dels derivats de MTAD. L'estructura del diè 7,11 es deduí per anàlisi del derivat de DMDS, que presentava els fragments característics a  $m/z = 189$  i  $145$  (figura IIIb.7) a l'espectre de masses.

Taula IIIb.4. Àcids dienoics presents en els extractes de la soca *Δ10I\_ΔoleI* transformada amb YEpOLEX- $\Delta^{11}$ T.*ni*, YEpOLEX- $\Delta^{11}$ T.*mi*/OLEb<sub>5</sub>, pYEX- $\Delta^{11}$ T.*mi* i pYEX- $\Delta^{11}$ T.*mi*/OLEb<sub>5</sub>, i incubada amb diferents àcids grassos monoinsaturats de geometria E. Les proporcions s'han determinat (mitjana  $\pm$  SD, n=3) a partir dels cromatogrames TIC de GC-MS.

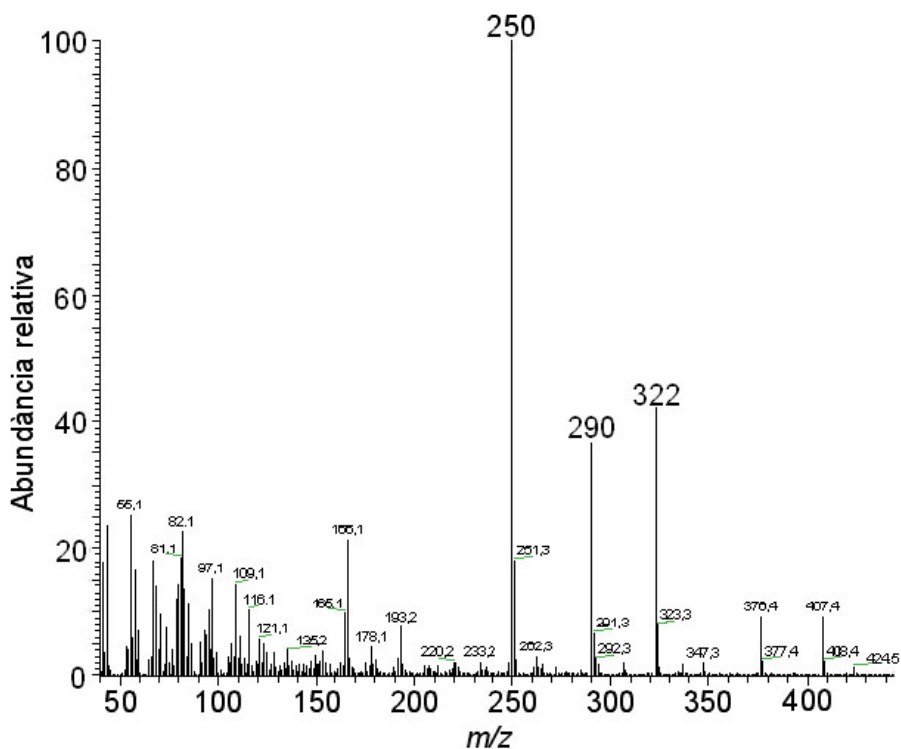
Substrat:	E9:C14	E9:C16	E7:C18	E9:C18	E13:C18	9:C16
Producte:	(E,Z)-9,11:C14	(E,Z)-9,11:C16	(E,Z)-7,11:C18	(E,Z)-9,11:C18	(Z,E)-11,13:C18	9-(Z)-11:C16
YEpOLEX- $\Delta^{11}$ T. <i>mi</i>	1 $\pm$ 0.4	6 $\pm$ 0.4	42 $\pm$ 3	29 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	n.d.
YEpOLEX- $\Delta^{11}$ T. <i>mi</i> /OLEb <sub>5</sub>	3 $\pm$ 0.1	11 $\pm$ 1	41 $\pm$ 1	28 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	n.d.
pYEX- $\Delta^{11}$ T. <i>mi</i>	1 $\pm$ 0.1	15 $\pm$ 3	64 $\pm$ 1	49 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	n.d.
pYEX- $\Delta^{11}$ T. <i>mi</i> /OLEb <sub>5</sub>	1 $\pm$ 0.1	5 $\pm$ 0.3	27 $\pm$ 6	68 $\pm$ 7	52 $\pm$ 4	n.d.

n.d. no determinat degut a interferències cromatogràfiques.



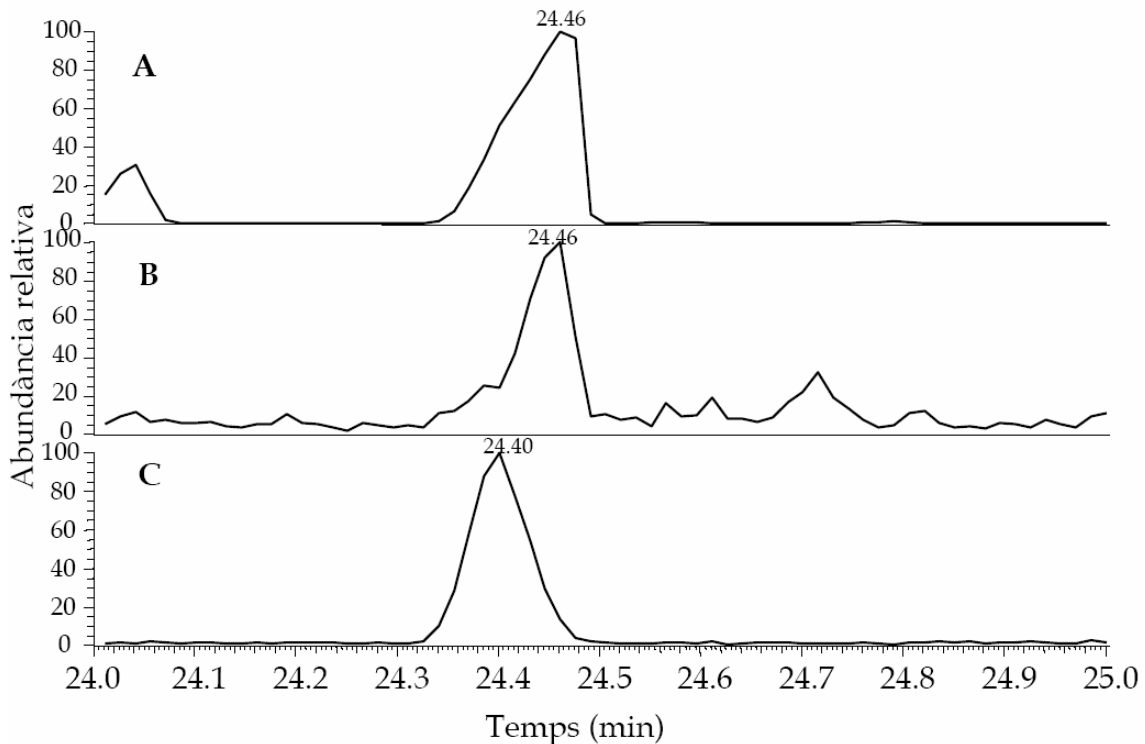
**Figura IIIb.7.** Fragmentacions característiques dels derivats de MTAD dels àcids diènics conjugats i del derivat DMDS de l'èster metílic de l'àcid (*E,Z*)-7,11:C18.

L'expressió de la dessaturasa quimèrica  $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  en cultius suplementats amb els àcids (*E*)-monoinsaturats esmentats no va donar lloc a diferències substancials en la composició dels extractes lipídics, respecte els resultats obtinguts per la dessaturasa salvatge (veure taula IIIb.4).

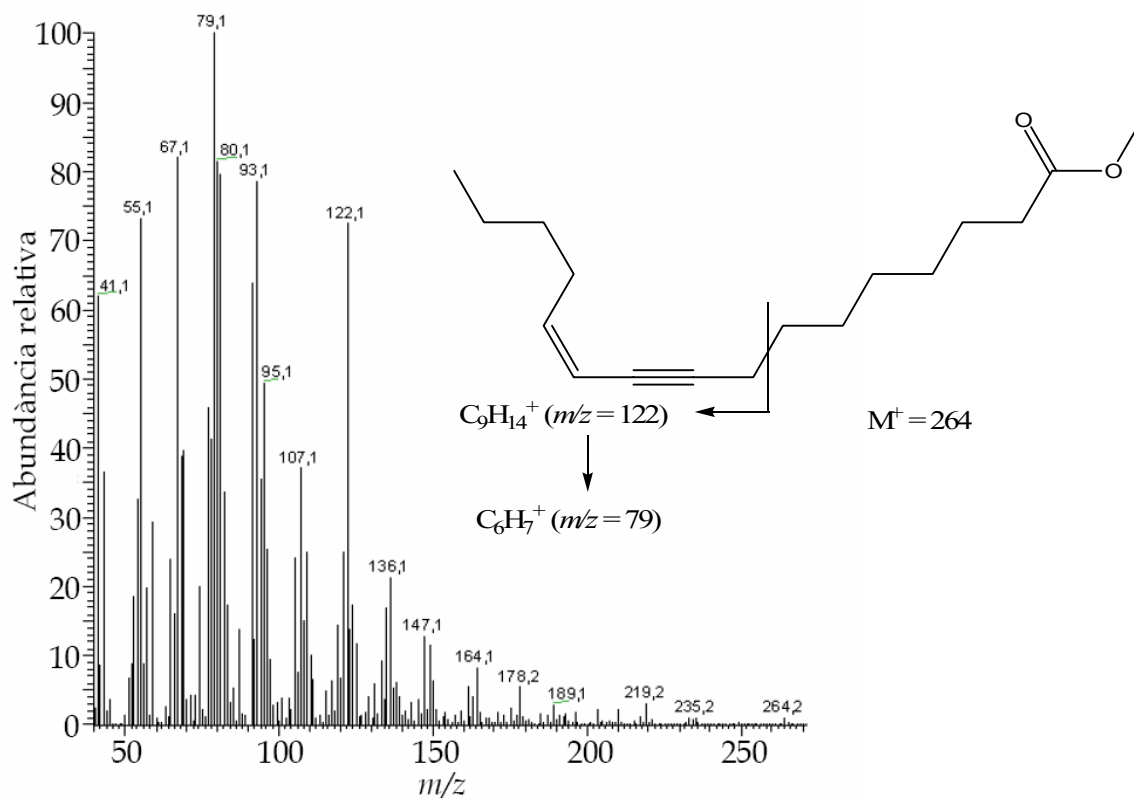


**Figura IIIb.8.** Espectre de masses del derivat de MTAD de l'èster metílic de l'àcid (*E,Z*)-9,11-octadecadienoic, producte de l'incubació del llevat  $\Delta eloI\_AoleI$  transformat amb YE<sub>p</sub>OLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  amb àcid elàidic (*E*)-9-octadecenoic). Es destaquen els pics derivats dels fragments A ( $m/z = 322$  i el fragment A que ha perdut MeOH  $m/z = 290$ ) i B ( $m/z = 250$ ) que es mostren a la figura III.b.7.

En les incubacions realitzades en presència del substrat amb un triple enllaç en posició 9 (9:C16) es detectà un producte que temptativament es va identificar com a l'àcid (Z)-11-hexadecen-9-inoic. Aquesta assignació està basada en consideracions mecanístiques i dades analítiques, com ara el temps de retenció i els fragments de l'espectre de masses ( $m/z=264$  ( $M^+$ ) i ions abundants a  $m/z=79$  i 122) (figures IIIb.9 i IIIb.10). No va ésser possible arribar a quantificar aquest producte donada la baixa proporció en que es trobava i la dificultat per a la seva resol·lució cromatogràfica (figura IIIb.9).



**Figura IIIb.9.** Cromatogrames de GC-MS dels extractes lipídics metanolitzats de llevats *ΔeloI\_ΔoleI* transformats amb pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> i incubats en presència d'àcid 9-hexadecenoic. **A)** cromatograma TIC, **B)** cromatograma obtingut per selecció dels ions a  $m/z=266$  (ió molecular dels hexadecenoats de metil). **C)** cromatograma obtingut per selecció dels ions a  $m/z=264$  (ió molecular dels hexadeceninoats de metil).



**Figura IIIb.10.** Espectre de masses del producte temptativament assignat com a l'èster metílic de l'àcid (Z)-11-hexadecen-9-inoic generat durant l'incubació del llevat *ΔoleI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> amb àcid 9-hexadecinoic.

## IIIb.5. Procediments experimentals.

### IIIb.5.1. Construcció del plasmidi pYEX- $\Delta^{11}$ Sl<sub>s</sub>.

El vector pYEXTHS-BN té les dianes *Bam*HI i *Not*I en el seu lloc de clonatge. El cDNA clonat entre aquestes dianes expressa una proteïna que conté una seqüència de 6 residus d'histidina al seu extrem *N*-terminal i una seqüència *Strep*II en el seu extrem *C*-terminal. Les dianes *Bam*HI i *Not*I van ésser introduïdes en la seqüència codificant de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa d'*S. littoralis* emprant els encebadors Slit(*Bam*HIinici)for i Slit(fin<sub>al</sub>-*Not*I)\_rev (veure taula IIIb.5), utilitzant la DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene). Les condicions de PCR emprades van ésser les següents: activació PCR a 94°C durant 45 s., 30 cicles amb les següents etapes: desnaturalització a 94°C durant 45 s., anellament a



55°C durant 30 s., extensió a 66°C durant 2 min. i una darrera extensió a 68°C durant 10 min.

**Taula IIIb.5.** Encebadors utilitzats per al clonatge de la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis* en el vector pYEXTHS-BN.

Nom encebador	Seqüència 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)
Slit(final-NotI)_rev	GCG CGC GGC CGC GGC GGT GTA GAC TAT TCG CC	>75
Slit(BamHlinici)for	ATG CGG ATC CAT GGC GCA ATG TGT ACA AAC	68.1

El fragment de PCR obtingut tenia una mida d'1.1 Kb i posteriorment es van digerir tant el vector pYEXTHS-BN com el producte de PCR amb les endonucleases de restricció *Bam*HI i *Not*I. Els DNAs digerits es van separar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i els fragments d'interès es van purificar del gel d'agarosa utilitzant el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Els fragments es van lligar utilitzant T4 DNA lligasa (New England Biolabs) obtenint-se la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Sl de 8.2 Kb.

### IIIb.5.2 Estudi de la formació dels productes hidroxilats procedents de la dessaturació incompleta.

Es va emprar un procediment per a l'extracció i metanolització dels àcids grassos dels cultius, que diferia lleugerament del procediment general descrit a l'apartat de Materials i Mètodes. D'aquesta manera es centrifugaven 200 mL de cultiu de llevat amb una  $O.D._{600nm} > 1$  i el residu s'introduïa en un baló de 250 mL i es sotmetia a reflux sota  $N_2$  amb KOH en etanol 2 N durant 3 hores. La solució resultant es deixava refredar i s'acidificava amb  $H_2SO_4$  3 M i seguidament s'extreïa tres vegades amb 40 mL de  $CH_2Cl_2$ . La fase orgànica es rentava amb dissolució saturada de NaCl i s'assecà amb  $Na_2SO_4$  anhidre. S'evaporava el dissolvent i el residu es ressuspenia en 10 mL de MeOH.

La solució metanòlica es transferia a un baló de 50 mL i s'hi addicionava 1 mL de  $BF_3$  en  $Et_2O$ . La solució resultant s'escalfava a reflux durant 1 h sota

atmosfera de  $N_2$ . Després de refredar el volum es reduïa fins a 2 mL en un rotavapor. S'hi afegia aigua i després es feien tres extraccions amb 20 mL de  $CH_2Cl_2$  i les fases orgàniques combinades es passaven a través de  $Na_2SO_4$  anhidre i s'evaporava fins a pes constant (aproximadament 25 mg).

Alíquotes d'1 a 2 mg de les fraccions resultants del procés anterior es tractaven amb un excés de bis(trimetilsilil)-acetamida/piridina (10 min, 40°C) i 1 microlitre d'aquesta solució s'analitzava per GC-MS.

**IIIc. CLONATGE I EXPRESSIÓ FUNCIONAL  
D'UNA DESSATURASA IMPLICADA EN LA  
BIOSÍNTESI DE LA FEROMONA SEXUAL  
DE *Thaumetopoea pityocampa*.**

---

---



### IIIc.1. *Thaumetopoea pityocampa*.

L'arna *Thaumetopoea pityocampa*, també comunament coneguda com a processionària del pi, és una plaga particularment nociva a les pinedes de la zona mediterrània. El nom comú de processionària és degut a un dels seus trets de comportament més característics, la formació de fileres (com les processons) d'insectes en el seu estadi d'eruga just abans de passar a l'estadi de pupa. La processionària del pi és un lepidòpter de la família Thaumetopoeidae que s'alimenta en fase d'eruga, de les fulles dels pins, on forma les característiques bosses blanques amb les que s'identifica tradicionalment aquesta plaga.



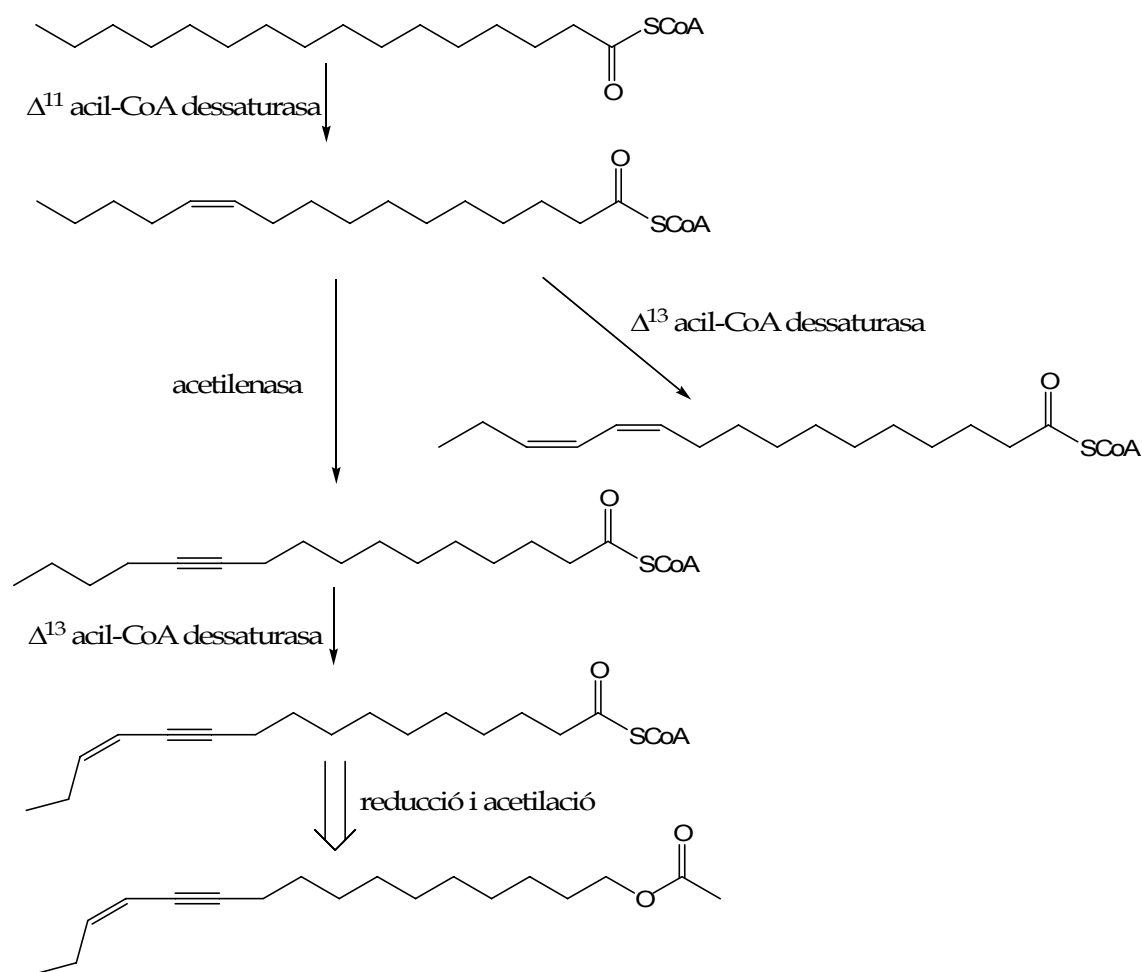
**Figura IIIc.1.** Exemples de femella (A) i mascle (B) de l'espècie *Thaumetopoea pityocampa* en el seu estadi adult.

En el gènere *Thaumetopoea*, atenent a l'estructura química de la feromona sexual, podem classificar les espècies en dos grups (Rodríguez, 2003; Villorbina et al., 2003a):

- les espècies que tenen com a component majoritari de la feromona un diè conjugat, com és el cas de *T. processionea*, *T. bonjeani*, *T. pinivora* i *T. solitaria*
- les espècies que tenen com a feromona un ení conjugat, com és el cas de *T. pityocampa*, *T. wilkinsoni* i *T. jordana*.

La feromona de la processionària del pi va ésser identificada com l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil per Guerrero et al. l'any 1981 (Guerrero et al., 1981).

En posteriors estudis es va elucidar la biosíntesi d'aquest compost en la glàndula de l'insecte (Fabriàs et al., 1989; Arsequell et al., 1990; Barrot et al., 1994). Aquest compost és biosintetitzat a partir de l'àcid palmític per reaccions seqüencials d'insaturació en la posició 11, posterior acetilenació i insaturació en la posició 13 seguides d'una reducció (a través d'una reductasa) i una acetilació (mitjançant una acetiltransferasa) finals (figura IIIc.2).



**Figura IIIc.2.** Esquema de la biosíntesi de la feromona sexual de *T. pityocampa*.

### IIIc.2. Acetilenases.

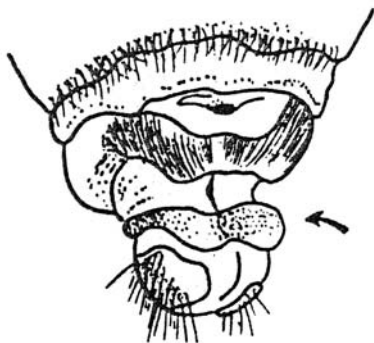
La deshidrogenació d'una olefina per donar lloc a un compost acetilènic representa un exemple excel·lent de com els enzims trenquen les "normes" de la química orgànica clàssica (Buist, 2004b).

Existeixen més de 600 compostos acetilènics naturals coneguts, la majoria dels quals es troben en plantes superiors i molses. Alguns gens clonats de dessaturases de plantes que estan molt relacionats amb  $\Delta^{12}$  dessaturases microsomals s'ha vist que catalitzen reaccions no usuals, com ara hidroxilacions, epoxidacions i acetilacions (Lee et al., 1998; Sperling et al., 2000). Les acetilenases són gens evolutivament molt relacionats amb les dessaturases (Lee et al., 1998; Cahoon et al., 2003). La reacció d'acetilenació que es produeix en algunes espècies de plantes i de molses ha estat poc estudiada, si bé es coneix que la reacció, tal com passa normalment amb les dessaturases, s'inicia en l'àtom de carboni més proper al grup carboxil (Reed et al., 2003; Carlsson et al., 2004). Aquest és el cas de l'acetilenasa de la molsa *Ceratodon purpurea*, que forma un enllaç acetilènic a partir d'un doble enllaç en un àcid gras de 18 àtoms de carboni (Lee et al., 1998; Carlsson et al., 2004).

El primer enzim acetilenasa clonat fou el procedent de la planta *Crepis alpina*, que fou expressat en *S. cerevisiae*. En aquest entorn s'observà que el compost acetilènic no era present en les cèl·lules control, però en canvi, sí que hi havia compost acetilènic en les cèl·lules incubades en presència del precursor (àcid linolènic) (Lee et al., 1998).

### **IIIc.3. Aïllament de les dessaturases implicades en la biosíntesi de la feromona sexual de *Thaumetopoea pityocampa*.**

Com s'ha esmentat abans, l'únic component de la feromona sexual de la processionària del pi és l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil. (Guerrero et al., 1981). Aquest compost és únic en feromones d'insecte. La seva estructura conté un triple enllaç, cosa que implica la necessitat d'un enzim amb activitat acetilenasa. D'altra banda, la presència d'un doble enllaç (Z)-13 feia pensar en l'acció catalítica d'una  $\Delta^{13}$  dessaturasa. Cap d'aquests enzims havien estat descrits prèviament a la literatura. Per aquests motius es plantejà l'aïllament de les dessaturases implicades en la biosíntesi d'aquesta feromona.

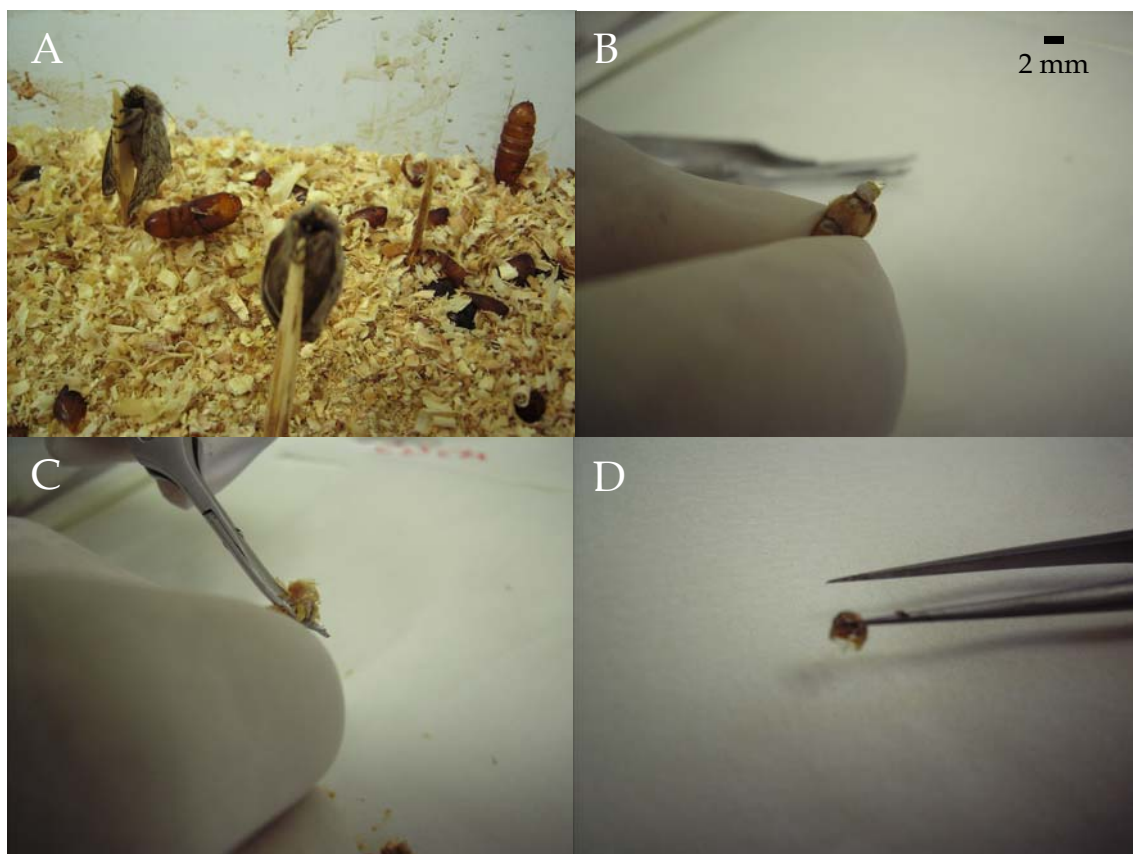


**Figura IIIc.3.** Esquema de la localització de la glàndula feromonal de l'espècie *Thaumetopoea pityocampa*, que es troba indicada per la fletxa. Es tracta de l'anella que envolta l'ovipositor.

Per abordar aquest objectiu, com a material biològic s'empraren glàndules feromonals que es disseccionaren de femelles verges adultes de 2 a 48 hores d'edat. Les glàndules feromonals de la processionària del pi són petites estructures de teixit situades a la part terminal de l'abdomen, on formen un anell al voltant de l'ovipositor (figura IIIc.3). Les glàndules, netejades acuradament d'altres teixits, es congelaren immediatament en  $N_2$  líquid per tal de mantenir l'integritat de l'RNA. El procés de dissecció és molt delicat i es mostra a la figura IIIc.4.

A partir de les glàndules feromonals es va aïllar l'RNA total. D'aquest RNA total es va fer una transcripció inversa i una posterior amplificació dels cDNAs de les possibles dessaturases presents. S'optà per un mètode que permeté realitzar les dues reaccions (transcripció inversa i amplificació) en un mateix tub.



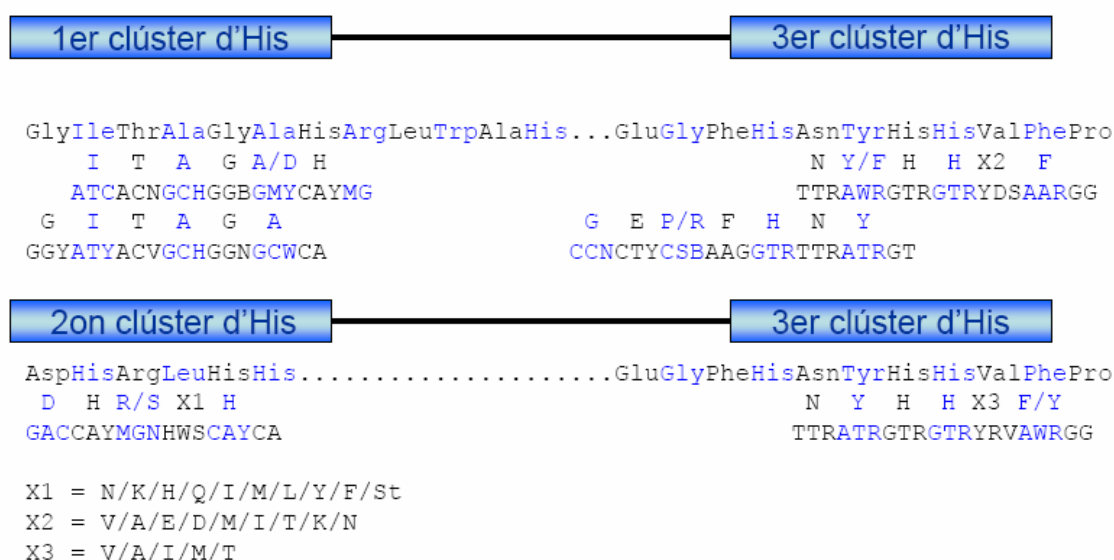


**Figura IIIc.4.** Imatges del procés de dissecció de la glàndula feromonal. **A)** Femelles de processionària del pi acabades d'emergir de la pupa. **B)** Abdomen de la femella de la processionària del pi pressionat per a fer visible la glàndula feromonal. **C)** Escissió de l'ovipositor de la femella i **D)** ovipositor acabat d'escindir, del qual se'n disseccionarà la glàndula feromonal, que es netejarà de cos gras i d'altres teixits aliens. El material biològic es congela immediatament en N<sub>2</sub> líquid.

Per a identificar totes les possibles dessaturases presents en les glàndules feromonals de la processionària del pi, es van utilitzar uns encebadors degenerats dissenyats per identificar els dominis altament conservats entre les dessaturases dels lepidòpters (veure taula IIIc.1). Aquests encebadors ja havien estat descrits i utilitzats anteriorment (Hao et al., 2002a; Hao et al., 2002b; Liu et al., 2002a; Liu et al., 2002b; Roelofs et al., 2002; Liu et al., 2004; Rodríguez et al., 2004b).

**Taula IIIc.1.** Encebadors degenerats utilitzats per l'aïllament de la dessaturasa de *T. pityocampa* amb la seva ubicació dins la seqüència de la dessaturasa. Les bases degenerades són: W= A o T; S=C o G; R=A o G; Y= C o T; M=A o C; B=C, G o T; D=A, G o T; H=A, C o T; V=A, C o G i N=A, C, G o T. Els encebadors han estat dissenyats en base a les seqüències conegudes d'acil-CoA dessaturases aïllades prèviament. Els blau i negre s'utilitzen per diferenciar els diferents codons entre ells.

Nom encebador	Seqüència 5' → 3'
PR1	ATCACNGCHGGBGMYCAYMG
PR2	GGRAASDYRTGRTGRWARTT
PR3	GGYATYACVGCHGGNGCWCA
PR4	TGRTARTTRTGGAABSCYTCNCC
PR5	GACCAYMGNHWSCAYCA
PR6	GGRWAVRYRTGRTGRTARTT



Els productes de les PCR van ésser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa i s'observà la presència d'una sola banda d'uns 550 bp en tots els casos. Aquest fragment (Tpi-PG-CR) es va purificar de l'agarosa i es clonà en un vector pTZ57R/T, aprofitant que una de les característiques de la *Taq* DNA polimerasa emprada en la reacció de PCR és la introducció de residus addicionals d'adenina en els extrems 3' del fragment de PCR degut a la seva activitat desoxinucleotidil transferasa (TdT). El vector pTZ57R/T és un vector obert que ha estat tractat amb desoxinucleotidil transferasa terminal per crear residus addicionals 3'-dT als dos extrems. Quan un fragment de PCR amb extrems 3'-dA es lliga en el vector aquest queda tancat. El producte final circular es pot utilitzar directament per transformar cèl·lules d'*E. coli* amb una

alta eficiència. La presència dels extrems dT permet que el vector sigui incapaç de recircularitzar de manera que es minimitza la presència de falsos positius. Aquest vector conté encebadors universals que permeten la seqüenciació dels fragments inserits en el seu lloc d'unió i a més, disposa d'una seqüència que conté múltiples llocs de restricció per posteriors digestions.

Un cop unit el fragment Tpi-PG-CR al vector pTZ57R se n'obtingué una seqüència que, assumint que es tractava d'una dessaturasa, tindria la seqüència d'aminoàcids que s'indica a la figura IIIc.5.

```

CGTCTTT GGACACATAA ATCTTACAAA GCCAAGTTGC CTTTGAAAT
R L W T H K S Y K A K L P L E I
TTTCCTCATG GTGCTGAATT CTGTTGCGTT CCAAAACACG GCCACTGACT
F L M V L N S V A F Q N T A T D W
GGGTGAGAGA TCATCGGCTG CACCATAAGT ACAGCGACAC GGACGCGGAT
V R D H R L H H K Y S D T D A D
CCTCACAACG CTGCGCGAGG GCTGTTCTTC TCTCATGTCG GGTGGCTGCT
P H N A A R G L F F S H V G W L L
CGTCCGGAAG CACGACGAAG TCAAGAAGCG CGGGAAGTTT ACCGATATGT
V R K H D E V K K R G K F T D M S
CAGATATATA CAACAATCCT GTGTTGAAGT TCCAGAAGAA ATATGCCATA
D I Y N N P V L K F Q K K Y A I
CCGTTTCATAG GTGCCGTTTG TTTTATCTTA CCGACGGTGA TCCCGATGTA
P F I G A V C F I L P T V I P M Y
CTTTTGGGGC GAGAGTCTCA ACAACGCCTG GCACATCTGT ATACTTCGGT
F W G E S L N N A W H I C I L R Y
ATGCGATGAA CCTCAACGTC ACGTTCTCGG TGAACA
A M N L N V T F S V N ?

```

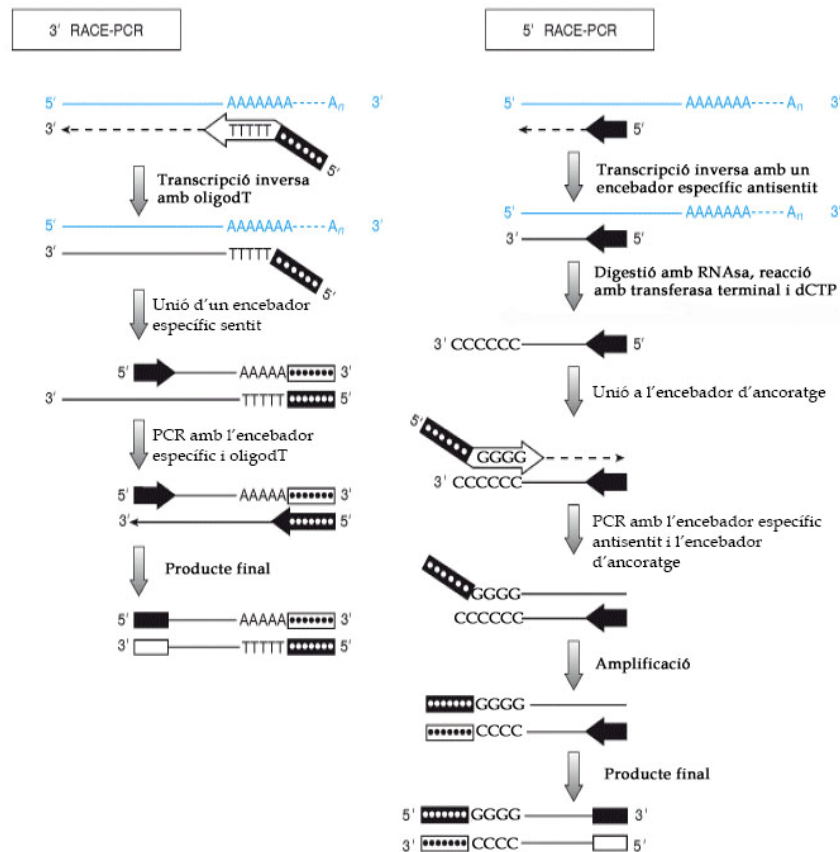
**Figura IIIc.5.** Seqüència de la regió central de la possible dessaturasa aïllada de l'RNA extret de les glàndules feromonals de la processonària del pi. De les possibles seqüències d'aminoàcids s'escollí la que presentava el domini central d'histidina (ressaltat en verd). Els primers cinc aminoàcids de la seqüència (subratllats) pertanyen al primer domini d'histidines d'una dessaturasa de la que s'indica la seqüència d'aminoàcids deduïda de la seqüència de bases.

Aquesta fou l'única seqüència obtinguda a partir de l'RNA total aïllat de les glàndules feromonals de la processonària del pi, malgrat l'anàlisi de més d'una dotzena de clons diferents i independentment de la parella d'encebadors emprats.

Un cop coneguda la regió central del gen, es varen poder dissenyar encebadors específics per estendre la seqüència cap als extrems 3' i 5' fins aconseguir completar el gen de la potencial dessaturasa. L'extensió cap a l'extrem 3' es realitzà emprant el mètode anomenat 3' RACE-PCR (figura IIIc.6),

que aprofita una característica comuna de tots els mRNAs, que és la presència d'una cua de poli-(A) en el seu extrem 3'. Així, mitjançant una transcriptasa inversa i utilitzant com a encebador una cua d'oligo-dT, és possible obtenir la corresponent cadena de cDNA complementària, que inclourà la regió central del gen, de la qual ja s'ha determinat la seqüència prèviament. En aquest punt, utilitzant com a encebadors un oligonucleòtid específic d'aquesta regió (Tpi(395-417), veure apartat IIIc.5.4) i l'oligo-dT, va ser possible amplificar el fragment que inclou l'extrem 3' del gen mitjançant una reacció de PCR. D'aquesta manera, emprant les condicions que es descriuen a l'apartat IIIc.5.4, s'obtingué un fragment de DNA de doble cadena d'aproximadament 450 bp que correspon a l'extrem final 3' del gen.

L'extensió cap a l'extrem 5' es realitzà utilitzant el mètode de 5' RACE-PCR (figura IIIc.6). La primera etapa va consistir en una transcripció inversa del mRNA a cDNA monocadena emprant un encebador específic dissenyat a partir de la seqüència coneguda de la regió central del gen (Tpi (224-202), veure apartat IIIc.5.4). Posteriorment es va fer l'eliminació del mRNA, mitjançant una digestió amb RNAsa, i addició d'una cua de oligo-dC fent una reacció amb dCTP catalitzada per una transferasa terminal. Finalment, aquest fragment de DNA es va amplificar amb una reacció de PCR utilitzant un oligonucleòtid amb cua de poli-G i l'oligonucleòtid específic com a encebadors. D'aquesta manera s'aconseguí aïllar un fragment de DNA de doble cadena d'aproximadament 600bp que incloïa l'extrem 3' del gen.



**Figura IIIc.6.** Esquema de les reaccions d'extensió del gen de la dessaturasa cap als seus extrems 3' i 5'. Les seqüències en color blau corresponen al mRNA original.

Per seqüenciació d'aquests fragments 5' i 3', juntament amb la seqüència prèviament obtinguda per a la regió central, es va poder esbrinar la seqüència total, que tenia una mida de 1194 bp, dels quals 1044 bp corresponien a la seqüència codificant d'una proteïna resultant de 347 aminoàcids (aproximadament 40 kDa), que presentava la seqüència que s'indica a la figura IIIc.7.

```

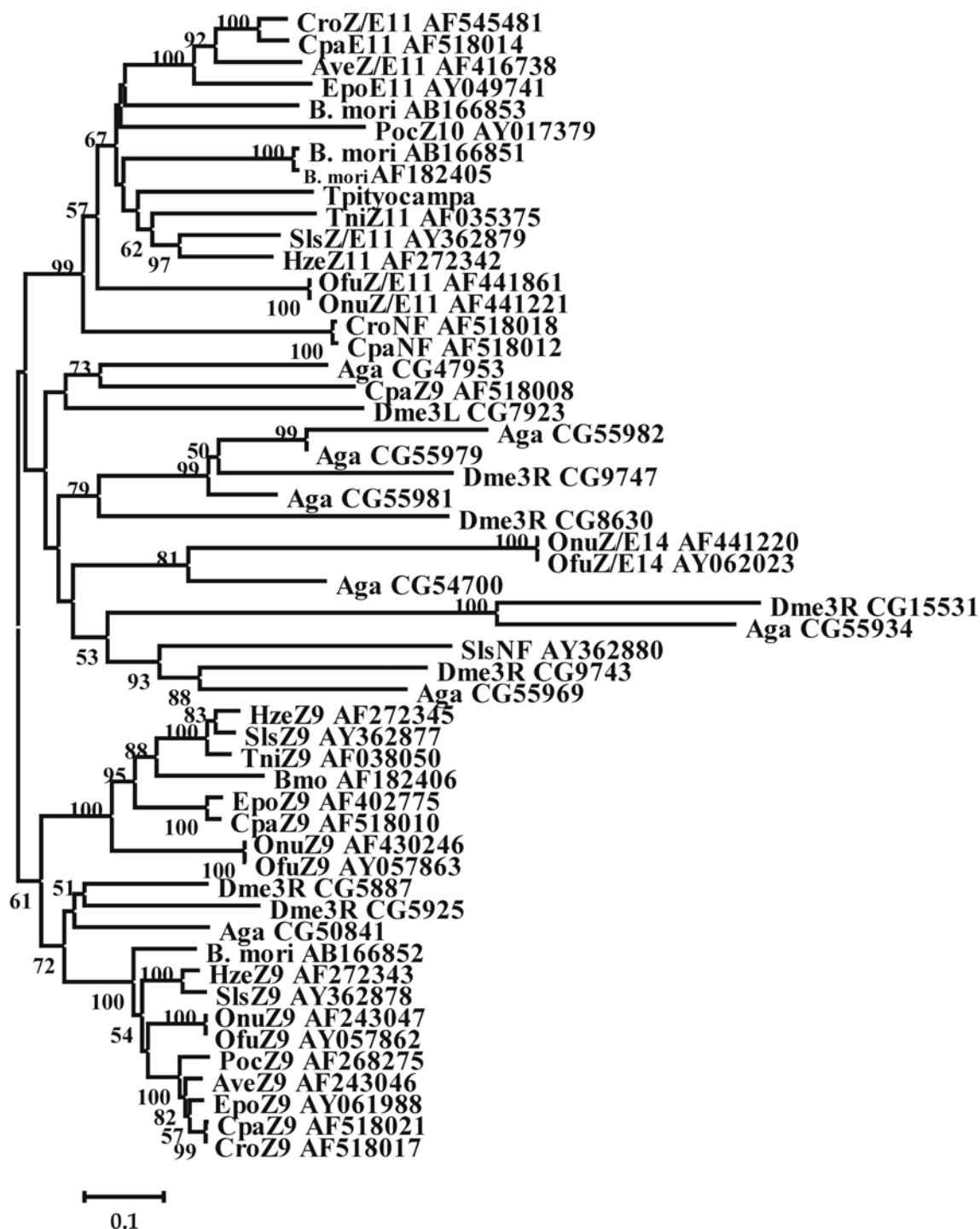
1 ATGGCGCCGA ACACACGAGA GAACGAGACG ATATACGATG AAGTTGAACA
  M A P N T R E N E T I Y D E V E H
51 TAAGCTGGAG AAACCTCGTGC CGCCGCAAGC GGGCCCCTGG AACTACAAAA
  K L E K L V P P Q A G P W N Y K I
101 TAGTTTATCT GAACCTACTG ACCTTCTCTT ACTGGCTTAT CGCCGGCGCC
  V Y L N L L T F S Y W L I A G A
151 TACGGGTAT ATTTGTGTTT TACATCAGCA AAATGGGCCA CAATTATTTT
  Y G L Y L C F T S A K W A T I I F
201 CGAATTCATC TTATTCTTTT TCGCCGAGAT GGGCATCACG GCAGGTGCTC
  E F I L F F F A E M G I T A G A H
251 ACCGTCTTTG GACACATAAA TCTTACAAAG CCAAGTTGCC TTTGGAAATT
  P L W T E K S Y K A K L P L E I
301 TTCCTCATGG TGCTGAATTC TGTTGCGTTC CAAAACACGG CCACTGACTG
  F L M V L N S V A F Q N T A T D W
351 GGTGAGAGAT CATCGGCTGC ACCATAAGTA CAGCGACACG GACGCGGATC
  V R D H R L R K Y S D T D A D P
401 CTCACAACGC TGC GCGAGGG CTGTTCTTCT CTCATGTCGG GTGGCTGCTC
  H N A A R G L F F S H V G W L L
451 GTCCGGAAGC ACGACGAAGT CAAGAAGCGC GGAAGTTTA CCGATATGTC
  V R K H D E V K K R G K F T D M S
501 AGATATATAC AACAACTCTG TGTTGAAGTT CCAGAAGAAA TATGCCATAC
  D I Y N N P V L K F Q K K Y A I P
551 CGTTCATAGG TGCCGTTTGT TTTATCTTAC CGACGGTGAT CCCGATGTAC
  F I G A V C F I L P T V I P M Y
601 TTTTGGGGCG AGAGTCTCAA CAACGCCTGG CACATCTGTA TACTTCGGTA
  F W G E S L N N A W H I C I L R Y
651 TGCGATGAAC CTCAACGTCA CGTTCCTCGGT GAACAGTCTG GCGCATATTT
  A M N L N V T F S V N S L A H I W
701 GGGGCAATAA GCCTTACGAC AAGGATATAA AACCGGCTCA GAACCTCGGT
  G N K P Y D K D I K P A Q N F G
751 GTTACATTAG CGACCTTCGG CGAAGGGTTT CACAACATC ACCACGTGTT
  V T L A T F G E G F L N P E E V F
801 CCCTTGGGAC TATCGTACGT CTGAACTCGG CGACAACAAG TTCAATTTC
  P W D Y R T S E L G D N K F N F T
851 CGACGAAAT CATAAATTC TTTGAACGGA TCGGCTTAGC GTATGATCTG
  T K F I N F F E R I G L A Y D L
901 AAGACTGTTT CGGATGACGT TATCGCGCAA AGAGCCAAAA GAACCGGTGA
  K T V S D D V I A Q R A K R T G D
951 TGGTACACAT CTTTGGGATT GTGCCGATAA GAATAATAAC GATGTTGTTT
  G T H L W D C A D K N N N D V V Q
1001 AAACGAAAAGC GCAAATAGAT ACTTTATGTA CAAAACATGA ATAAATTGTC
  T K A Q I D T L C T K H E *
1051 ATCGCTAAAC AAAAAAAAAA AAAAAA

```

**Figura IIIc.7.** Seqüència de nucleòtids del cDNA aïllat de les glàndules feromonals de *T. pityocampa*. La seqüència d'aminoàcids deduïda per la proteïna es dona a sota de la del cDNA. Els dominis d'histidina s'han ressaltat en verd i la seqüència de localització al reticle endoplasmàtic s'ha subratllat.

La seqüència completa de la possible dessaturasa de *T. pityocampa* es va analitzar utilitzant el programa BLAST i s'obtingueren les màximes homologies amb  $\Delta^{11}$  dessaturases d'altres lepidòpters, essent les més properes les de les espècies *Helicoverpa zea* (Rosenfield et al., 2001), *S. littoralis* (Rodríguez et al., 2004b), *Choristoneura rosaceana* (Hao et al., 2002b), *Epiphyas postvittana* (Liu et

al., 2002a), *Choristoneura parallela* (Liu et al., 2004), *Argyrotaenia velutinana* (Liu et al., 2002b) i *T. ni* (Knipple et al., 1998).

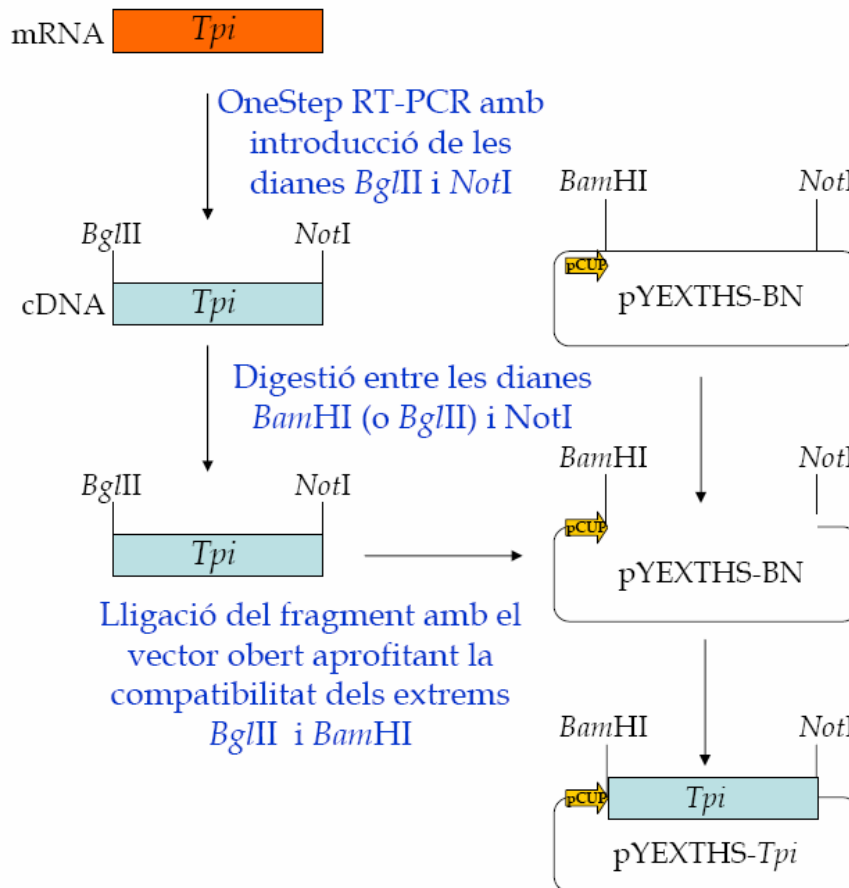


**Figura IIIc.8.** Filogènia dels gens de les dessaturases de diverses espècies d'arnes i dípters. Es va utilitzar el programa informàtic MEGA2 (Kumar et al., 2001) per reconstruir l'arbre de les seqüències aminoacídiques deduïdes utilitzant el mètode *neighbor-joining* (Saitou and Nei, 1987). Els números al llarg de les branques indiquen el suport *bootstrap* de 1500 rèpliques. Els números d'accés de les seqüències s'indiquen després de les abreviatures de l'espècie, que provenen d'estudis publicats prèviament (Roelofs et al., 2002; Roelofs and Rooney, 2003). La seqüència caracteritzada de nou de *T. pityocampa* s'ha abreujat com a *Tpityocampa*. Alguns enzims no han estat

caracteritzats bioquímicament. En el cas de *D. melanogaster*, els números que segueixen a l'abreviatura de l'espècie són els corresponents a les designacions de gens trobades en la base de dades de la seqüència del genoma complet, que és accessible via GenBank. L'arbre està originat en el grup D(16418), basat en estudis previs (Roelofs et al., 2002; Roelofs and Rooney, 2003). Les espècies s'han abreujat com a Aga, *Anopheles gambiae*; Ave, *Argyrotaenia velutinana*; Bmori o Bmo, *Bombyx mori*; Cpa, *Choristoneura parallela*; Cpo, *Cydia pomonella*; Cro, *Choristoneura rosaceana*; Dme, *Drosophila melanogaster*; Epo, *Epiphyas postvittana*; Hze, *Helicoverpa zea*; Ofu, *Ostrinia furnacalis*; Onu, *Ostrinia nubilalis*; Sli, *Spodoptera litura*; Sls, *Spodoptera littoralis*; Tni, *Trichoplusia ni*; Tpitocampa, *Thaumetopoea pityocampa*.

Tot i que els resultats de la comparació de seqüències suggerien que el mRNA procedent de les glàndules de processionària del pi codificava una  $\Delta^{11}$  dessaturasa, calia confirmar aquest supòsit experimentalment mitjançant l'anàlisi funcional. Per aquest motiu es plantejà el clonatge del gen en el vector pYEXTHS-BN. Un problema que sorgí en aquest punt va ser que la seqüència codificant de la possible dessaturasa contenia una diana *Bam*HI, la qual cosa complicava la utilització d'aquesta diana de restricció. Per aquest motiu, es va pensar en introduir una diana *Bgl*II, compatible amb *Bam*HI, en l'extrem 5' de la seqüència codificant. D'aquesta manera, es va realitzar una reacció de RT-PCR utilitzant el mRNA aïllat com a motlle i els oligonucleòtids TpiBglII i TpiNotIend (apartat IIIc.5.5) com a encebadors, per obtenir el cDNA del gen sencer.





**Figura IIIc.9.** Esquema del clonatge del gen de la dessaturasa aïllada de *T. pityocampa* en el vector d'expressió en llevat pYEXTHS-BN.

El producte de la PCR amb el lloc de restricció alternatiu, *BglII*, té una mida d'aproximadament 1.2 Kb. Es digerí utilitzant les endonucleases de restricció *BglIII* i *NotI*, mentre que el vector pYEXTHS-BN es va digerir utilitzant les endonucleases de restricció *BamHI* i *NotI*. Posteriorment es féu una reacció de lligació entre el vector obert amb extrems *BamHI* i *NotI* i el fragment de PCR digerit amb *BglIII* i *NotI* (figura IIIc.9). El producte de lligació es transformà en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$ . El control dels plasmidis aïllats es va fer per digestió amb *EcoRI*, que havien de donar lloc a un fragment de 800 bp i un altre de 7.3 Kb, i seqüenciació. La construcció resultant s'anomenà pYEX- $\Delta^{11}Tpi$ .

Amb aquesta construcció es transformà la soca de llevat  *$\Delta elo1 \Delta ole1$* . La presència de la construcció pYEX- $\Delta^{11}Tpi$  va ésser capaç de conferir al llevat transformat la capacitat de sobreviure en un medi complet en absència d'àcids

grassos monoinsaturats, tot i que en aquest cas el creixement del llevat no fou tan favorable com en els casos d'altres dessaturases estudiades en aquesta tesi (*S. littoralis* i *T. ni*).

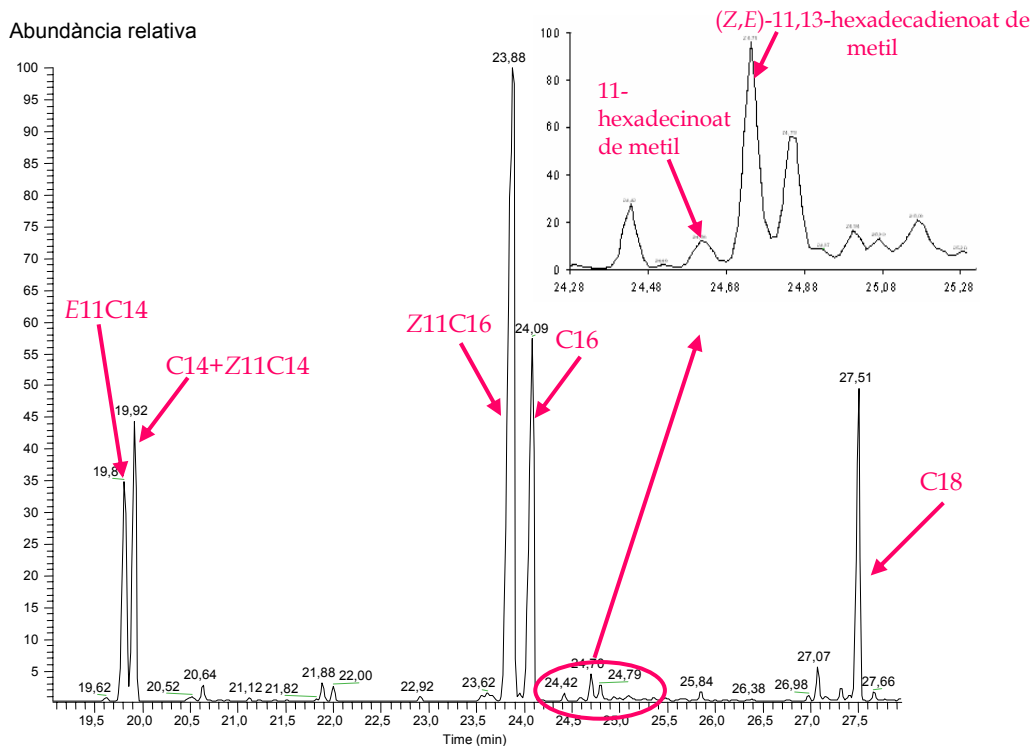
L'extracció de lípids dels llevats transformats amb el gen de la dessaturasa de la processionària del pi, seguida de metilació i anàlisi dels extractes resultants per GC-MS mostrà la presència d'èsters metílics d'àcids grassos monoinsaturats. La situació del doble enllaç en la posició 11 de la cadena dels àcids grassos es va comprovar mitjançant l'anàlisi dels extractes derivatitzats utilitzant DMDS, que dona lloc a una fragmentació característica  $m/z$  245 per un doble enllaç en la posició 11 de la cadena carbonada. Els productes més abundants foren els èsters metílics dels àcids (*E*)-11-tetradecenoic, (*Z*)-11-tetradecenoic i (*Z*)-11-hexadecenoic en les proporcions que es mostren a la taula IIIc.2. Aquest resultat ens va permetre concloure que el gen aïllat de la glàndula feromonal de la processionària del pi corresponia en efecte a una  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa, d'acord amb el que s'havia predit després de l'anàlisi filogenètic.

**Taula IIIc.2.** Proporcions de cadascun dels àcids monoinsaturats produïts per la soca de llevat *Δelol\_Δolel* transformada amb el vector pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi.

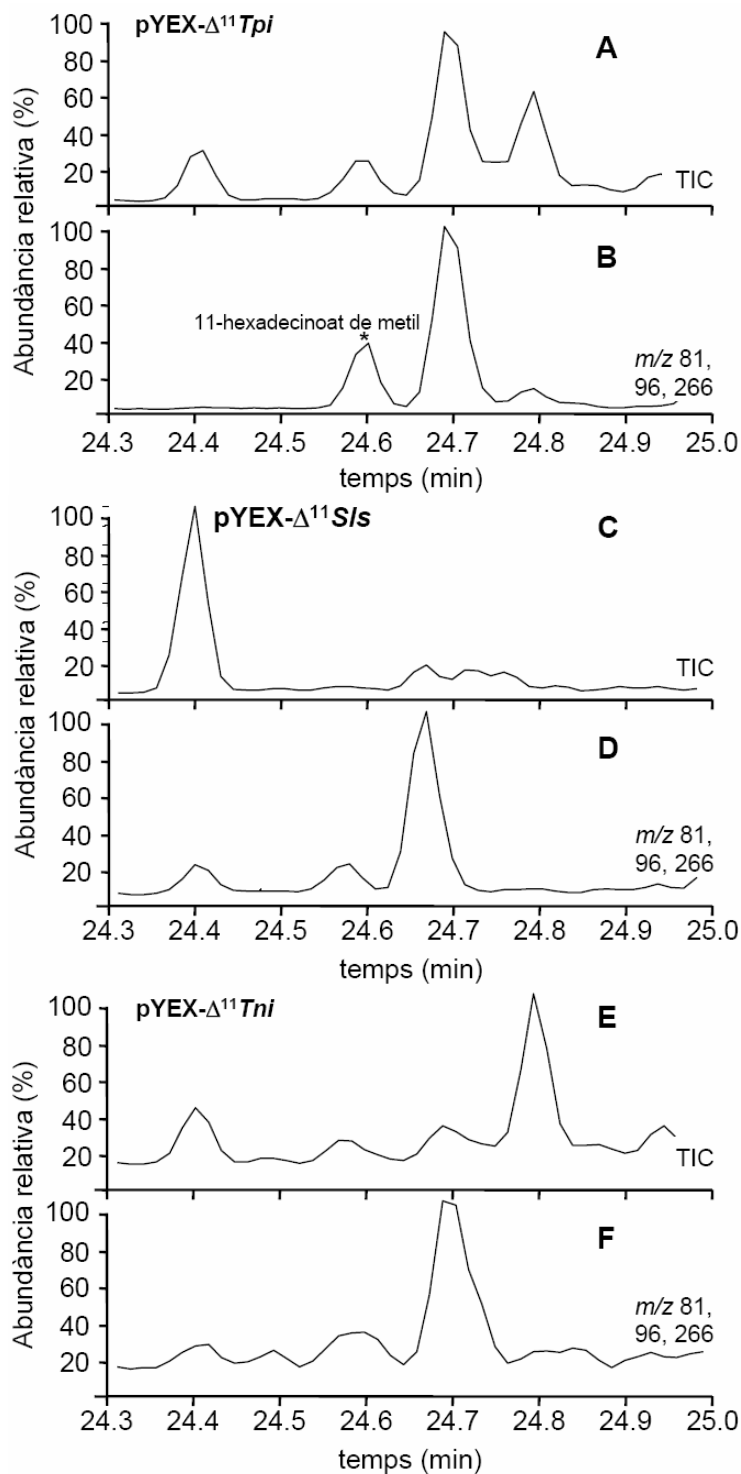
Àcid gras	%
E11:C14	14
Z11:C14	5
Z11:C16	81
Z11:C18	no detectat

Quan s'analitzaren detingudament els cromatogrames obtinguts es pogué observar la presència d'un compost que presentava un temps de retenció i un espectre de masses idèntics als de l'èster metílic de l'àcid 11-hexadecenoic (figures IIIc.10, IIIc.11 i IIIc.12). L'esmentat espectre mostra el pic d'ió molecular a  $m/z = 266$ , així com els pics a  $m/z = 81$  i  $96$  corresponents als fragments que s'indiquen a la figura IIIc.12. Aquestes observacions constitueixen una evidència experimental que l'enzim clonat de *T. pityocampa*

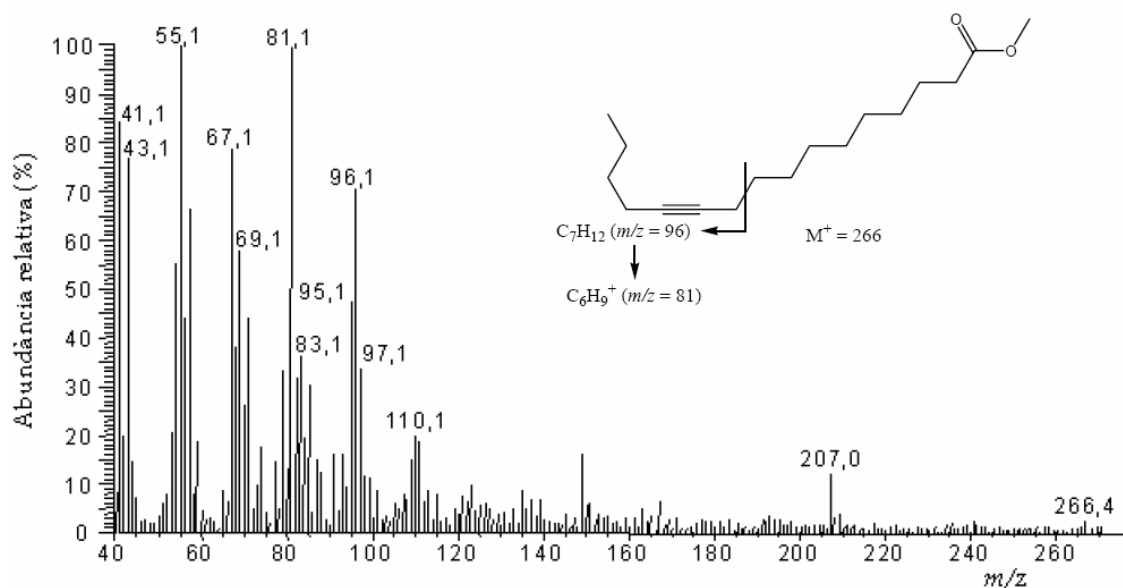
presenta activitat acetilenasa, a més de l'activitat  $\Delta^{11}$  dessaturasa. Per a fer la comparació, en la figura IIIc.11 es mostren els cromatogrames TIC i amb selecció d'ions a  $m/z = 266$  per als extractes aïllats dels cultius amb llevats transformats amb pYEX- $\Delta^{11}SlS$  i pYEX- $\Delta^{11}Tni$ . Aquests cromatogrames fan pal·lesa l'absència d'un pic amb el mateix temps de retenció que l'observat pel cas dels cultius que expressen la dessaturasa  $\Delta^{11}Tpi$ , fet que suggereix que aquesta activitat acetilenasa no és comuna a totes les dessaturases, ni tan sols a les que són relativament properes evolutivament.



**Figura IIIc.10.** Cromatograma (TIC) de GC-MS en mode *scan* corresponent a un extracte lipídic metanolitzat de cèl·lules de *ΔeloI\_ΔoleI* transformades amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}Tpi$ . La zona encerclada amb color rosat s'amplifica a la figura IIIc.11.



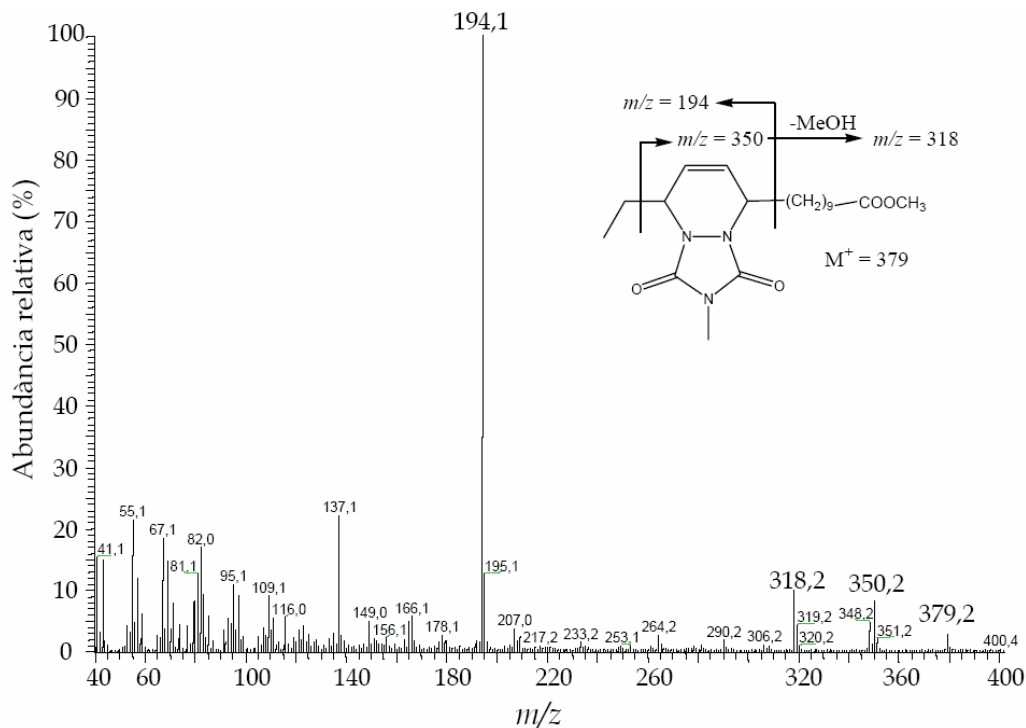
**Figura IIIc.11.** Cromatogrames de GC-MS dels extractes lipídics del llevat transformat amb la dessaturasa de *Thaumetopoea pityocampa*. **A)** cromatograma TIC de l'extracte lipídic del llevat transformat amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi, **B)** cromatograma TIC del mateix extracte seleccionant els ions  $m/z$  81,96 i 266, **C)** cromatograma TIC de l'extracte lipídic del llevat transformat amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ SIs, **D)** cromatograma TIC del mateix extracte seleccionant els ions  $m/z$  81,96 i 266, **E)** cromatograma TIC de l'extracte lipídic del llevat transformat amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Tni i **F)** cromatograma TIC del mateix extracte seleccionant els ions  $m/z$  81,96 i 266.



**Figura IIIc.12.** Espectre de masses de l'11-hexadecinoat de metil format en la soca de llevat transformada amb pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi.

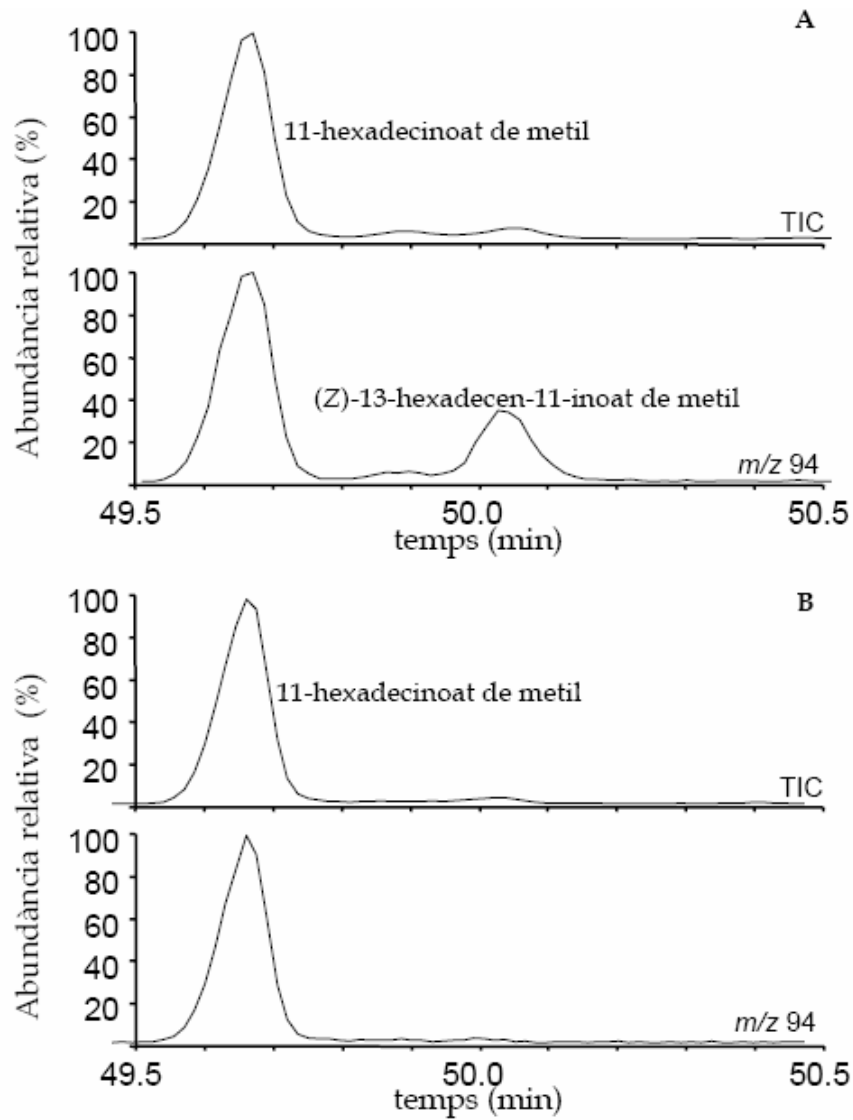
A més de l'acetilè esmentat, els extractes lipídics dels llevats transformats amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi mostraren la presència d'un producte més abundant que l'acetilè, que presentava un espectre de masses característic d'un hexadecadienoat de metil conjugat, amb pics a  $m/z=266$  ( $M^+$ ), 95, 81 i 67. La derivatització utilitzant 4-metil-1,2,4-triazolina-3,5-diona (MTAD) indicà que es tractava del diè conjugat 11,13 (veure figura IIIc.13). Com que l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic és un metabolit que es produeix durant la biosíntesi de la feromona, es pensà que l'hexadecadienoat identificat corresponia a aquest isòmer. Malgrat tot, el temps de retenció en GC-MS (49.92 min) no coincidia amb el del compost sintètic (50.10 min), per la qual cosa ha de tractar-se d'un dels altres tres isòmers. Basant-nos en consideracions biosintètiques (l'intermedi diènic prové del monoènic (*Z*)-11) hauria de tractar-se de l'isòmer (*Z,E*)-11,13, si bé aquesta hipòtesi està pendent de confirmació. La presència de l'11,13-hexadecadienoat de metil en els extractes de les cèl·lules transformades amb la construcció pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi induïa a pensar que la dessaturasa expressada tenia activitat  $\Delta^{13}$  dessaturasa addicional. Com a tal, era esperable que el mateix enzim produís el sistema enínic a partir de l'acetilènic. Aquesta idea estava recolzada pel fet que no s'hagués detectat cap altre cDNA codificant de

dessaturasa en la glàndula feromonal de l'insecte tot i havent-hi tres reaccions de dessaturació en la biosíntesi de la feromona sexual.

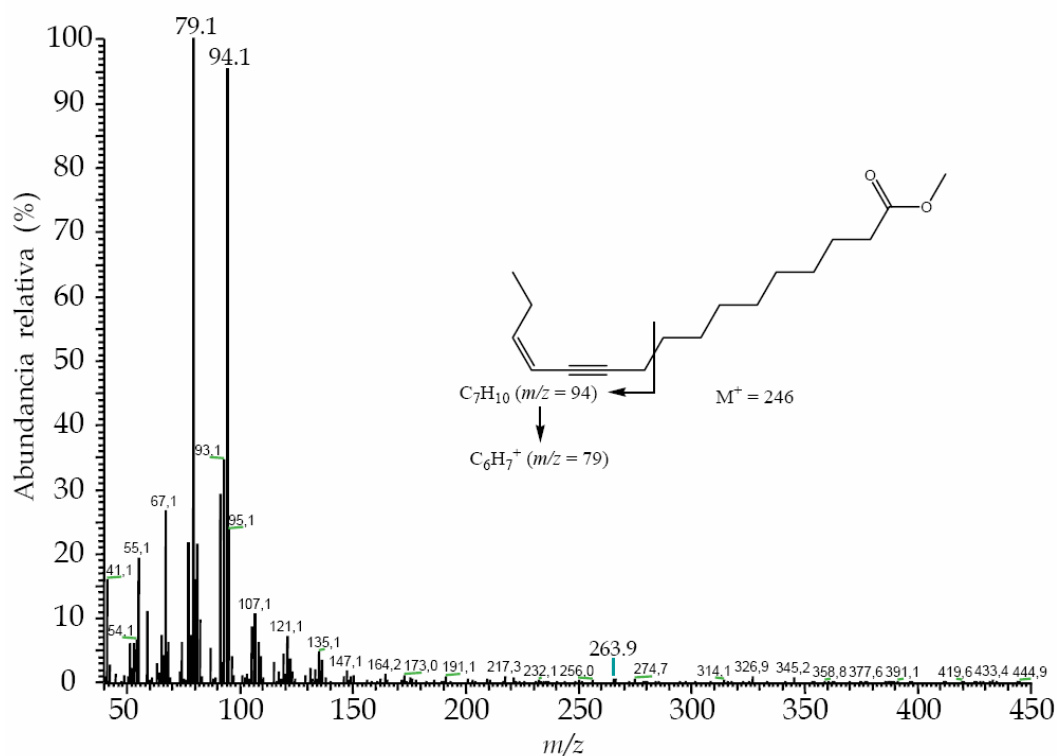


**Figura IIIc.13.** Espectre de masses del pic corresponent al derivat MTAD de l'èster metílic de l'àcid (Z,E)-11,13-hexadecadienoic.

Tot i que es feren nombroses anàlisis (GC-MS) dels extractes lipídics dels mutants transformats en condicions de màxima sensibilitat, no s'aconseguí detectar la presència de l'ení de forma unequivoca. Com que la quantitat d'àcid acetilènic precursor produïda pels mutants incubats en condicions estàndard era molt baixa, les cèl·lules de *ΔeloI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}Tpi$  es feren créixer en presència d'àcid 11-hexadecinoic en una concentració final de 0.5 mM. Aquests cultius varen créixer sense problemes i en l'anàlisi dels extractes per GC-MS s'observà clarament un pic corresponent a l'èster metílic de l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic ( $m/z = 264$  ( $M^+$ ), 94 i 79), precursor immediat de la feromona (figures IIIc.14 i IIIc.15). Aquest resultat demostrava que la dessaturasa identificada en la glàndula feromonal de la processionària del pi presentava una activitat addicional  $\Delta^{13}$  dessaturasa, que no presenta la dessaturasa de *S. littoralis* (figura IIIc.14).



**Figura IIIc.14.** Cromatogrames de GC-MS d'extractes lipídics metanolitzats de llevats transformats amb les construccions **A)** pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi i **B)** pYEX- $\Delta^{11}$ Sls. A la part superior es presenta el cromatograma TIC i el cromatograma de la part inferior correspon al generat per selecció de l'ió  $m/z = 94$ . Es pot veure clarament que l'ení només es forma en el cas del llevat que expressa la dessaturasa de la processionària del pi i no en el que expressa la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *S. littoralis*.



**Figura IIIc.15.** Espectre de masses del pic corresponent l'èster metílic de l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic.

Per tant, els resultats obtinguts indiquen que l'enzim clonat a partir de la glàndula feromonal de *T. pityocampa* és capaç de dur a terme les tres reaccions de dessaturació ( $\Delta^{11}$  dessaturació,  $\Delta^{13}$  dessaturació i acetilenació) implicades en la ruta biosintètica de la feromona d'aquest insecte.

#### IIIc.4. Discussió.

La feromona sexual de *T. pityocampa* no és cap mescla de components sinó que es tracta d'un compost únic amb una estructura que conté un sistema de tipus ení conjugat, únic en les feromones dels lepidòpters (Guerrero et al., 1981; Quero et al., 1997).

La biosíntesi d'aquest compost s'inicia amb la introducció de la primera insaturació en la posició (Z)-11 de l'àcid palmític. Posteriorment, aquest àcid (Z)-11-hexadecenoic es transforma, per acció d'un enzim amb activitat acetilenasa, en l'àcid 11-hexadecinoic, que finalment és convertit a l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic per un enzim amb activitat  $\Delta^{13}$  acil-CoA dessaturasa (Fabriàs et al., 1989; Arsequell et al., 1990; Barrot et al., 1994). En principi, la ruta



biosintètica feia pensar en l'existència de dessaturases diferents encarregades de la biosíntesi de la feromona sexual de l'insecte: (Z)-11 i (Z)-13 dessaturasa i 11-acetilenasa.

De l'RNA obtingut de les glàndules feromonals de *T. pityocampa* se n'aïllà un sol cDNA de dessaturasa. La seqüència d'aminoàcids deduïda d'aquest gen presenta els tres motius rics en histidines descrits com a seqüència consens per les dessaturases (Shanklin et al., 1994). La proteïna conté una senyal de retenció a reticle endoplasmàtic a l'extrem C-terminal de tipus KKXX, que confirma la seva possible integració en la membrana d'aquest orgànu cel·lular on té lloc l'activitat dessaturasa (Thiede and Strittmatter, 1985).

Seguint la classificació descrita per Knipple i col. (Knipple et al., 2002) la dessaturasa aïllada de l'insecte processionària del pi presenta un motiu de signatura del tipus xxxQ, que es dona en diversos organismes. El motiu concret CPTQ és el mateix que el present en el gènere *Ostrinia*: *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* (Roelofs et al., 2002) i *Ostrinia scapulalis* (Fukuzawa et al., 2005).

La seqüència codificant de la dessaturasa aïllada de les glàndules feromonals de processionària del pi té elevada homologia (~ 80 %) amb  $\Delta^{11}$  dessaturases de lepidòpters: *Helicoverpa zea* (83 %), *S. littoralis* (82 %), *Trichoplusia ni* (77 %), *Choristoneura rosaceana* (79 %), *Epiphyas postvittana* (80 %), *Argyrotaenia velutinana* (78 %) i *Choristoneura parallela* (79 %). D'acord amb l'activitat de  $\Delta^{11}$  dessaturasa predita en base a aquesta homologia, l'expressió del gen en la soca de *S. cerevisiae*  $\Delta$ eloI\_ $\Delta$ oleI conduí a la formació dels àcids grassos monoinsaturats (E)- i (Z)-11-tetradecenoic i (Z)-11-hexadecenoic. Per tant es podia afirmar que la dessaturasa aïllada de la glàndula feromonal de *T. pityocampa* és una  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa. Aquest enzim, però, no accepta l'àcid esteàric com a substrat, de manera que els llevats transformats amb aquesta dessaturasa no produïen l'àcid (Z)-11-octadecenoic. Aquest fet també s'observa amb les  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturases d'*Helicoverpa zea* (Rosenfield et al., 2001), *S. littoralis* (Serra et al., 2006), *Choristoneura rosaceana* (Hao et al., 2002b), *Choristoneura parallela* (Liu et al., 2004) i *Argyrotaenia velutinana* (que tampoc

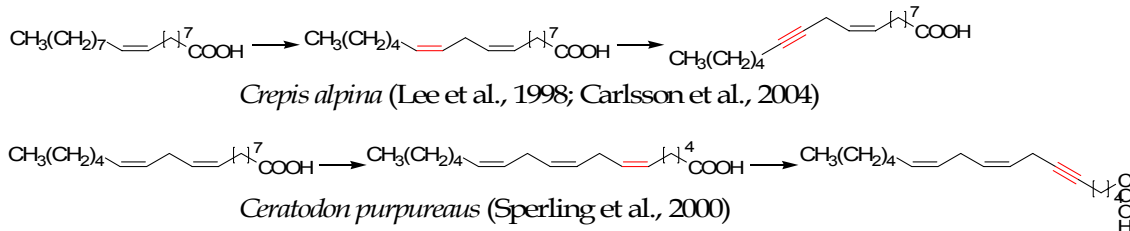
dóna producte del precursor de C16) (Liu et al., 2002b). En canvi, sí que es produeix àcid (Z)-11-octadecenoic amb la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* (Knipple et al., 1998).

La manca d'activitat de la dessaturasa de *T. pityocampa* sobre l'àcid esteàric suggereix que la cavitat d'unió al substrat d'aquest enzim no és prou gran per encabir un àcid gras tan llarg.

Un altre fet a comentar en aquest tipus d'enzims és la producció d'àcids grassos de 14 àtoms de carboni monoinsaturats en la posició 11. En el cas de la dessaturasa de *T. pityocampa*, es produeix preferiblement l'àcid (E)-11-tetradecenoic respecte al (Z)-11-tetradecenoic (taula IIIc.2), a l'igual que succeeix en *S. littoralis* (Pinilla et al., 1999; Rodríguez et al., 2004b). En canvi, en espècies com *T. ni* el producte preferent d'insaturació és l'àcid (Z)-11-tetradecenoic respecte l'àcid (E)-11-tetradecenoic. Novament aquestes dades experimentals suggereixen diferències en les estructures tridimensionals dels llocs d'unió de substrat a l'enzim.

La dessaturasa identificada en *T. pityocampa* també produeix àcid 11-hexadecinoic. La formació d'aquest àcid no és sorprenent, ja que és un precursor de la biosíntesi de la feromona de l'insecte. Aquest resultat demostra que la dessaturasa de *T. pityocampa* presenta activitat acetilenasa, essent aquest el primer exemple d'aquest tipus d'activitat enzimàtica en un organisme animal. La reacció catalitzada per una acetilenasa és una transformació extremadament difícil en termes mecànics, ja que la deshidrogenació d'alquens per donar lloc a alquins només té lloc quan el material de partida és atacat per bases molt fortes (Reed et al., 2003). Ara bé, l'acetilenació sí que es pot produir enzimàticament. En l'espècie vegetal *Crepis alpina* existeix una dessaturasa bifuncional que prenent com a substrat l'àcid oleic és capaç de d'introduir una segona insaturació donant lloc als isòmers (Z) i (E) en la posició 12 i a més, és capaç de transformar l'àcid linoleic i produir en l'àcid crepenínic ((Z)-9-octadecen-12-inoic) (Lee et al., 1998; Carlsson et al., 2004). També s'ha clonat un enzim d'aquest tipus en la molca *Ceratodon purpureus* que al mateix temps que introdueix un doble enllaç (Z) en la posició 6 de l'àcid linoleic ((Z,Z)-

9,12-octadecadienoic) per a formar àcid  $\gamma$ -linolènic ((Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatrienoic), pot actuar com a acetilenasa sobre la posició 6 d'aquest per produir el sistema de diení (Sperling et al., 2000)(figura IIIc.14).

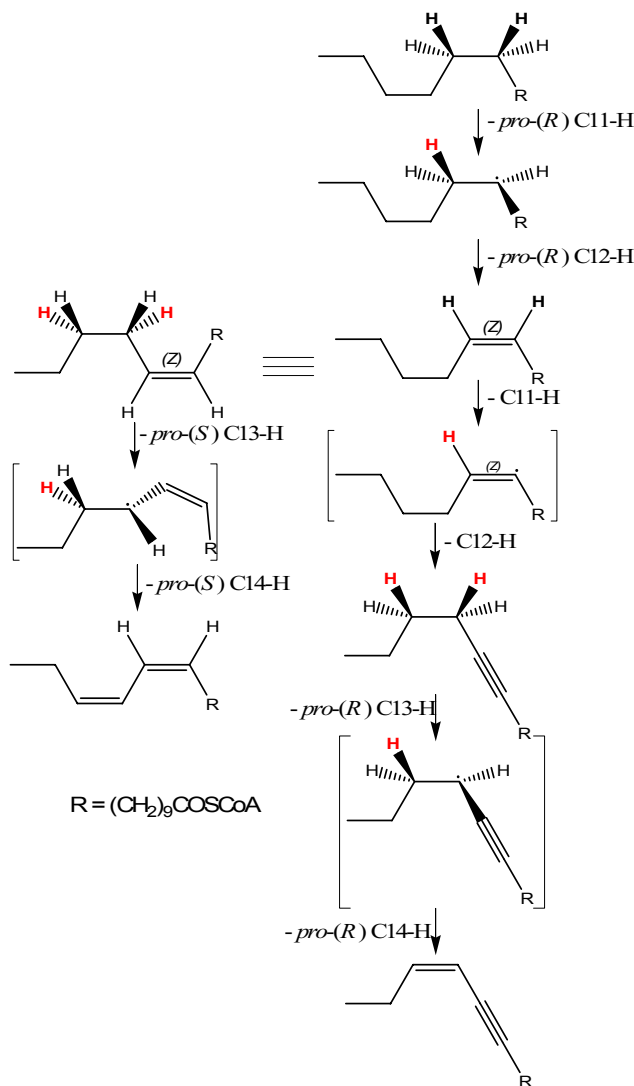


**Figura IIIc.14.** Esquema de reacció dels enzims bifuncionals dessaturasa/acetilenasa en les espècies *Crepis alpina* (angiosperma) i *Ceratodon purpureus* (molsa).

Una de les característiques més remarcables de l'enzim de *T. pityocampa* és que presenta també activitat  $\Delta^{13}$  dessaturasa, constituint el primer exemple descrit d'una dessaturasa multifuncional d'aquest tipus. L'explicació pot estar en el fet que el precursor (Z)-11-hexadecenoic té més tendència a passar a formar el diè 11,13 que a donar lloc a l'alquí 11-hexadecinoic, de manera que no hi ha gairebé alquí disponible per donar lloc a l'ení.

El conjunt de resultats obtinguts indiquen la participació d'una sola dessaturasa multifuncional en la biosíntesi de la feromona sexual de la processionària del pi. Perquè un sol enzim sigui capaç de transformar l'àcid palmític en àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic, el centre actiu de l'enzim hauria de tenir prou plasticitat per encabir tres possibles substrats: l'àcid palmític, l'àcid (Z)-11-hexadecenoic i l'àcid 11-hexadecinoic. A més, el centre catalític de Fe hauria de poder atacar tant la posició 11 com la posició 13 de la cadena hidrocarbonada. Això podria suposar una certa mobilitat del lloc d'unió del substrat, a fi de permetre l'orientació adequada dels hidrògens que s'eliminen respecte el centre catalític. En estudis previs (Pinilla et al., 1999), es demostrà que la primera posició de l'àcid palmític que s'oxida per donar lloc a l'àcid (Z)-11-hexadecenoic és el C-11, formant-se un intermedi altament inestable que reacciona ràpidament donant lloc al compost olefínic (figura IIIc.15.) L'estudi de la criptoregioquímica de la formació del compost acetilènic indica que la reacció transcorre amb oxidació inicial de l'àtom de carboni vinílic C-11, seguida

d'eliminació ràpida de l'hidrogen en C-12 per originar l'intermedi d'11-hexadecinoat (Abad et al. 2006). Pel que fa a l'activitat  $\Delta^{13}$  dessaturasa, la reacció s'inicia amb el trencament de l'enllaç C-H al lílic en C-13, seguit de la pèrdua ràpida de l'hidrogen en C-14 (Abad et al. manuscrit en avaluació).



**Figura IIIc.15.** Model mecànic de les reaccions de dessaturació produïdes per la dessaturasa de *T. pityocampa*. S'observa la formació del primer doble enllaç en l'àcid palmític i la posterior formació dels àcids acetilènic i enínic. En la branca lateral s'indica la reacció que dona lloc al compost diènic.

Aquesta criptoregioquímica opera en la dessaturació (Z)-13 tant del 11-hexadecinoat com del (Z)-11-hexadecenoat. Ara bé, mentre que en el primer cas la reacció presenta una estereoquímica *pro-(R)/pro-(R)*, en el segon s'eliminen els dos hidrògens *pro-(S)* del substrat monoinsaturat (figura IIIc.15.).

Amb totes aquestes dades, s'està elaborant un model *in silico* de l'estructura de la zona d'unió de l'enzim al substrat. Per a la construcció

d'aquest model, s'han considerat també resultats obtinguts en estudis precedents, com ara: (i) l'activitat  $\Delta^{13}$  dessaturasa no es produeix sobre substrats saturats (Arsequell et al., 1990); (ii) l'activitat acetilenasa no té lloc sobre l'intermedi diènic (Z,Z)-11,13 (Barrot et al., 1994). Totes les dades que es coneixen sobre el mecanisme d'acció de les dessaturases indiquen que entre una reacció de dessaturació i l'altra, l'enzim ha de regenerar el seu centre actiu de Fe. La regeneració del centre actiu es produeix entre la sortida del producte i l'entrada d'una nova molècula de substrat, i implica una reorganització dels electrons i de tota la cadena de transport electrònic.

### **IIIc.5. Procediments experimentals.**

#### **IIIc.5.1. Extracció de glàndules feromonals de *Thaumetopoea pityocampa*.**

Les pupes de les femelles de *Thaumetopoea pityocampa* van ésser recollides al camp per personal d'ICONA (Instituto para la Conservación de la Naturaleza) i mantingudes a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en un fotoperíode de 16h:8h llum:fosc. Les glàndules feromonals es disseccionaren, amb cura, de femelles verges d'1 o 2 dies i es guardaren a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **IIIc.5.2. Aïllament de RNA.**

L'extracció de l'RNA total de les glàndules feromonals de *T. pityocampa* es va efectuar utilitzant el kit de RNAqueous®-4PCR (Ambion) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit permet la recuperació eficient de quantitats mesurables de RNA en petites quantitats de teixit (d'1 a 75 mg). Les glàndules aïllades dels insectes pesen menys d'1 mg cadascuna de manera que es procedí a fer l'extracció d'una vintena de glàndules en cada cas. Tot el procediment d'extracció es va fer amb cura i sobre una superfície de treball neta per evitar la presència de RNAses que poguessin provocar degradació del RNA

acabat d'aïllar. La quantitat de RNA present en cada mostra es mesura espectrofotomètricament ( $Abs_{260nm}=1$  equival a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA).

### IIIc.5.3. Determinació de la seqüència central del gen.

Per tal d'aïllar els possibles cDNAs que codificaven les regions centrals de les dessaturases de la processionària del pi s'havia d'agafar el RNA total i fer una transcripció inversa a DNA, per posteriorment fer una reacció de PCR utilitzant els oligonucleòtids degenerats PR1-PR6 (veure taula IIIc.1). S'optà en aquest cas per fer les dues reaccions de manera seqüencial en un mateix tub. Per aquest motiu s'emprà el kit One-Step RT-PCR (Qiagen), que amb una sola preparació es transformava el RNA a DNA i posteriorment s'amplificaven els cDNAs als que s'unien els encebadors degenerats. En el tub de reacció s'introdueixen dNTPs (400  $\mu\text{M}$  de cadascun), els dos encebadors (amb una concentració final de 0.6  $\mu\text{M}$  de cadascun), tampó de reacció (que dona lloc a una concentració final de  $\text{MgCl}_2$  de 2.5 mM), RNA motlle (5, 20 o 50 ng) i els enzims, que són dues transcriptases inverses, *Omniscript* i *Sensiscript*, i una polimerasa, la *HotStart Taq* DNA polimerasa. Les condicions de la reacció de RT-PCR varen ser les següents: pre-escalfar el termociclador a 50°C, transcripció inversa a 50°C durant 30 min, activació de la PCR a 95°C durant 15 min seguit de 35 cicles amb les següents etapes: desnaturalització a 94°C durant 30 s ; anellament a 50°C durant 30 s (parella PR3+PR4) o 45°C durant 30 s (per les parelles d'encebadors PR1+PR2 i PR5+PR6) seguit d'una extensió a 72°C durant 1 min. Al final dels cicles hi hagué una extensió final durant 10 min a 72°C. Els productes de PCR es purificaren en gels d'agarosa a l'1.5 o 2% en tampó TAE 1x. Els fragments aïllats es van clonar en el vector pTZ57R/T del kit comercial InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) seguint les instruccions del fabricant, i es van seqüenciar.

### IIIc.5.4. Identificació de les seqüències dels extrems 3' i 5'.

De la reacció anterior s'aconsegueix una regió central del gen que es compara amb les seqüències conegudes d'altres dessaturases d'insecte. Aquesta seqüència s'utilitza com a motlle per a dissenyar encebadors específics per a l'amplificació dels extrems del gen. Per a l'amplificació de l'extrem 3' s'utilitza el kit One-Step RT-PCR (Qiagen) amb l'encebador (oligodT) del kit 3'RACE (Invitrogen) i un encebador específic de la regió central coneguda de la dessaturasa. En primer lloc, es va realitzar una reacció de transcripció inversa utilitzant Omniscript RT™ i oligodT i s'incuba a 37°C durant 1 h. Posteriorment utilitzant el cDNA obtingut en la reacció anterior es va fer una reacció de PCR amb els oligonucleòtids Tpi (395-417) i oligodT, utilitzant Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Les condicions de la reacció de polimerització en cadena foren: pre-escalfar el termociclador a 94°C, activació de la PCR a 94°C durant 2 min, seguit de 35 cicles compostos per les següents etapes: desnaturalització a 94°C durant 30 s, anellament a 55°C durant 30 s i extensió a 72°C durant 1 min, seguit d'una extensió addicional durant 10 min a 72°C. El producte d'aquesta PCR es va introduïr en el vector pTZ57R/T i es va seqüenciar.

Amb l'objectiu d'esbrinar quina és la seqüència de l'extrem 5' del gen es va haver de seguir un procediment una mica més complex. Es va utilitzar el kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Agafant com a motlle l'RNA total, un encebador Tpi (224-204) i la transcriptasa inversa SuperScript™ II RT (Invitrogen) es féu una síntesi de cDNA monocadena a 42°C durant 50 min, acabant a 70°C durant 15 min. Per eliminar l'RNA que pogués quedar es féu una digestió amb RNAsa lliure de DNAses. El cDNA monocadena produït es purificà utilitzant les columnes del kit i posteriorment s'hi afegiren una sèrie de nucleòtids extres en l'extrem 3' mitjançant una reacció catalitzada per la transferasa terminal de deoxinucleòtids (TdT), en la que es va afegir una cua homopolimèrica de residus de citosina a aquest extrem. Finalment es féu una reacció de PCR amb els encebadors Tpi(224-204) i Abridged Anchor Primer

((AAP) subministrat amb el kit) amb les següents condicions: activació de la PCR 2 min a 94°C, seguida per 35 cicles amb les següents etapes: desnaturalització a 94°C durant 30 s, anellament a 55°C durant 30 s i extensió a 72°C durant 1 min i finalment una extensió final a 72°C durant 10 min. El producte de PCR es va introduir en un vector per a la seva seqüenciació per determinar l'extrem 5' del gen.

**Taula IIIc.3.** Encebadors utilitzats durant el procés de reconstrucció de la seqüència de DNA i clonatge de la dessaturasa identificada en *T. pityocampa*. Es mostren subratllades les seqüències de reconeixement pels enzims de restricció *Bgl*III i *Not*I en els encebadors TpiBglIII i TpiNotIend, respectivament.

Nom oligo	Seqüència 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)
Tpi(395-417)	GCCTGGCACATCTGTATACTTCG	62.4
Tpi_(224-204)	GGACGAGCAGCCACCCGACAT	65.7
OligodT	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTT TTTTT	66.1
TpiBglIII	GACTA <u>AGATCT</u> ATGGCGCCGAACACACGAG AGAAC	71.8
TpiNotIend	CATGG <u>CGGCCG</u> CGCCCTATTACCTATCAAC CGTCG	76.5

### IIIc.5.5. Clonatge de la dessaturasa de la processionària del pi en el vector pYEXTHS-BN.

Es varen utilitzar els encebadors TpiBglIII i TpiNotIend (seqüències descrites a la taula IIIc.3) per fer una RT-PCR de l'RNA total de les glàndules amb les següents condicions: pre-escalfament a 50°C, transcripció inversa a 50°C durant 30 min, activació de la PCR a 95°C durant 15 min seguit de 60 cicles compostos per un pas de desnaturalització a 94°C durant 30 s, un pas d'anellament a 55°C durant 30 s i un darrer d'extensió a 72°C durant 2 min. Al final dels cicles es féu una extensió final a 72°C durant 10 min.. El fragment de PCR es va digerir utilitzant les endonucleases de restricció *Bgl*III i *Not*I mentre que el vector es va digerir utilitzant les endonucleases de restricció *Bam*HI i *Not*I. Els fragments digerits es purificaren per electroforesi de DNA en gels d'agarosa i es va fer una reacció de lligació utilitzant dianes complementàries:



l'extrem *Bgl*III del fragment es va lligar a l'extrem *Bam*HI del vector de manera que desapareix la diana mentre que els extrems *Not*I es varen unir entre ells. Posterior digestió de la construcció assolida (pYEX-*Tpi*) utilitzant *Bam*HI demostrà que l'única diana d'aquest tipus que quedava en tot el vector era la que es troba en la seqüència de la dessaturasa. La correcta disposició del cDNA de la dessaturasa de la processionària en el vector es comprovà per seqüenciació.



**IIIId. INFLUÈNCIA DE LES CONDICIONS  
DE CULTIU EN EL CREIXEMENT DE  
MUTANTS DE LLEVAT QUE EXPRESSEN  
DESSATURASES EXÒGENES.**

---

---



### III d.1. Lípids, dessaturases i membranes cel·lulars.

Anomenem lípids (del grec *lipos*, que significa greix) a tots aquells compostos orgànics que presenten com a principal característica una elevada hidrofòbicitat i solubilitat en dissolvents orgànics. Els lípids dins els organismes vius poden tenir diverses utilitats: com a reserva d'energia, com a elements estructurals i com a hormones o missatgers químics.

Les membranes exerceixen diferents papers en les cèl·lules (Hazel and Williams, 1990):

- c) controlen la difusió lliure de soluts i catalitzen les reaccions específiques d'intercanvi que determinen les composicions químiques dels compartiments cel·lular i subcel·lular
- d) guarden l'energia en forma de gradients iònics i soluts i regulen el nivell de dissipació d'energia
- e) organitzen una sèrie de compartiments per a l'assemblatge de diferents vies metabòliques
- f) governen la transferència d'informació entre els compartiments que separen mitjançant receptors específics de membrana.

Els àcids grassos són els elements acilants de les estructures lipídiques. Des del punt de vista estructural, són cadenes llargues hidrocarbonades, generalment amb un nombre parell d'àtoms de carboni, i a l'extrem de les quals hi ha un grup carboxilat.

La longitud de la cadena i el grau d'insaturació dels àcids grassos influencien el grau d'ordre i la fluïdesa de les membranes sota una gran varietat de circumstàncies ambientals. La fluïdesa de la membrana modula l'activitat de certs enzims i altres proteïnes de membrana que experimenten canvis conformacionals i de desplaçament necessaris per la seva activitat biològica. Qualsevol canvi en les propietats físiques de la membrana pot ésser crucial en la

regulació de la síntesi, integració i/o solubilització d'aquestes proteïnes (Tung et al., 1991). S'han descrit nombrosos exemples d'adaptació de microorganismes als canvis de les temperatures ambientals. L'adaptació involucra modificacions de la composició dels lípids de les membranes (Los and Murata, 1998). Dins d'aquestes modificacions, la variació en les proporcions entre grups acil saturats i insaturats juga un paper essencial.

En *Saccharomyces*, com en d'altres organismes eucariotes, es manté una proporció equilibrada d'àcids grassos saturats i insaturats en els lípids de membrana sota un ampli marge de condicions fisiològiques (Choi et al., 1996). La  $\Delta^9$  dessaturasa de llevat presenta un paper central en la formació dels lípids de membrana i en el control de les propietats físiques de les bicapes lipídiques (Vemula et al., 2003).

En microorganismes, incloent els llevats, les temperatures ambientals altes generalment produeixen un augment en el grau de saturació dels lípids de membrana, per tal que les membranes siguin menys fluides i més resistents (Swan and Watson, 1997). Per contra, les disminucions de temperatura causen l'efecte contrari: augmenten els nivells d'àcids grassos insaturats i disminueixen els de saturats. Per exemple, en el fetge de carpa sotmès a baixa temperatura hi ha un gran augment de l'activitat  $\Delta^9$  dessaturasa, perquè es produeix un augment important del transcrit corresponent a la dessaturasa, que és el resultat d'un augment de transcripció del mRNA. Una disminució de la fluïdesa de la membrana estimula la transcripció dels gens que codifiquen la dessaturasa (Vigh et al., 1993). Aquesta estimulació de la dessaturació també es produeix per una activació d'una dessaturasa latent preexistent mitjançant reaccions de: fosforilació, miristoïlació o *N*-glicosilació (Tiku et al., 1996).

S'han realitzat aproximacions per a l'estudi del paper de les dessaturases en l'aclimatació dels microorganismes als canvis de temperatura ambiental. En els estudis sobre la modulació de la  $\Delta^9$  dessaturasa de *Synechocystis sp.* PCC 6803 s'ha observat que la insaturació en la posició 9 en aquest tipus de microorganisme sembla ser essencial per la transició de la membrana des de l'estat de gel fins a l'estat de líquid cristal·lí a temperatures fisiològiques. La

mutagènesi del gen de la  $\Delta^{12}$  dessaturasa de *Synechocystis sp.* PCC 6803 i *Synechococcus sp.* PCC 7002 va provocar canvis dramàtics en la composició d'àcids grassos. Les soques resultants es caracteritzen per una elevada sensibilitat a baixes temperatures (Los and Murata, 1998), probablement per incapacitat d'adaptar-s'hi augmentant els nivells d'àcids poliinsaturats de la membrana.

En estudis sobre els canvis produïts per l'addició d'àcid decanoic en el medi de cultiu en llevat, s'ha pogut observar que en augmentar les quantitats d'àcid decanoic en el medi disminueix significativament l'anisotropia i augmenta la fluïdesa de la membrana dels protoplasts (àcids grassos de cadena més curta provoquen una fluidificació de la membrana). La composició lipídica de les membranes cel·lulars presenta modificacions en la distribució dels fosfolípids i els esterols en cèl·lules crescudes en presència d'àcid decanoic respecte les cèl·lules control. A més, la presència d'àcid decanoic en el medi de cultiu provoca una acidificació d'aquest que indueix un increment en l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa, que allibera protons a través de la membrana plasmàtica (Alexandre et al., 1996).

Existeixen certes propietats de les membranes que poden ésser alterades segons la longitud dels àcids grassos que formen part dels fosfolípids de la bicapa i que depenen de la seva composició, és a dir, la seva permeabilitat, estabilitat i les interaccions que aquestes mantenen amb les proteïnes que es troben incorporades en les membranes (Esfahani et al., 1981; Zakim et al., 1992; Lee, 2004 ). Les proteïnes integrals de membrana poden patir l'efecte de la disminució de gruix de la bicapa lipídica que les envolta alterant-se la seva estructura terciària. Aquesta alteració pot provocar fins i tot pèrdua d'activitat d'aquest tipus d'enzims (Lee, 2004).

### **III d.1.1. Regulació de la dessaturació.**

La dessaturasa de llevat està regulada per un complex sistema de controls a nivell de transcripció i d'estabilitat del mRNA (Vemula et al., 2003). La presència d'àcids grassos en el medi disminueix considerablement

l'estabilitat del mRNA. Sembla ser que aquest enzim està finament regulat, responenent a estímuls fisiològics i nutricionals. Una part d'aquesta regulació inclou la seva resposta a àcids grassos exògens (González and Martin, 1996). L'addició d'àcids palmitoleic i oleic, de manera conjunta o individual, al medi de cultiu reprimeix fortament l'activitat  $\Delta^9$  dessaturasa, mentre que l'addició d'àcids grassos saturats al medi provoca una lleugera estimulació d'aquesta activitat enzimàtica  $\Delta^9$  dessaturasa (Bossie and Martin, 1989).

L'anàlisi del promotor de la dessaturasa de llevat indica que la formació d'àcids grassos insaturats està fortament regulada a nivell de transcripció pels àcids grassos de la dieta a través d'una regió, precedent a l'inici de transcripció, de 111 bp que s'anomena FAR (fatty acid regulated). Aquesta zona conté els elements reguladors als extrems 5' i 3' de l'element FAR (Choi et al., 1996). A més, aquest promotor conté uns elements anomenats LORE que responen a baixes concentracions d'oxigen de manera que l'expressió de la dessaturasa es veu incrementada en condicions de baixa tensió d'O<sub>2</sub>. Aquests elements també responen a la presència en el medi de cultiu de metalls de transició, com ara cobalt i níquel, sota condicions aeròbiques (Jiang et al., 2001; Vasconcelles et al., 2001; Jiang et al., 2002).

### **III d.2. Efecte de diferents àcids grassos saturats en el medi de cultiu en llevats *ΔeloI\_ΔoleI* transformats amb diferents dessaturases de lepidòpter.**

Un dels objectius plantejats en aquest treball va ser l'estudi de l'efecte de l'addició al medi de cultiu de diferents àcids grassos saturats sobre el creixement de la soca de llevat *ΔeloI\_ΔoleI* transformada amb les següents construccions de  $\Delta^{11}$  dessaturases:

YEp352-4.8OLE

YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni

YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>

pYEX- $\Delta^{11}$ Tni



pYEX- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub>

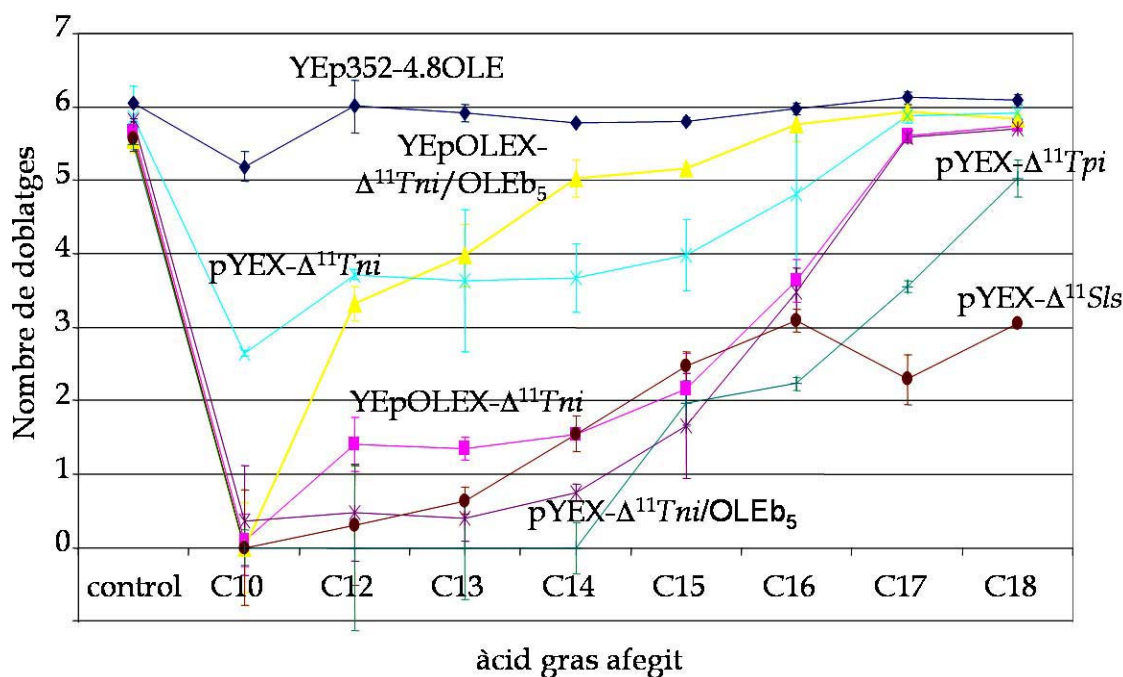
pYEX- $\Delta^{11}Sls$

pYEX- $\Delta^{11}Tpi$

Cadascun dels mutants transformats s'incubà amb els àcids làuric, tridecanoic, mirístic, pentadecanoic, palmític, heptadecanoic i esteàric. La concentració final de cada àcid gras en el medi de cultiu fou de 0.5 mM i els cultius es deixaren créixer a 30°C i 250 rpm durant 48 hores, començant les incubacions a una densitat òptica de 0.05. Al final de cada incubació es mesurà la densitat òptica dels cultius i es calculà el nombre de doblatges per cada soca en cadascuna de les condicions d'incubació.

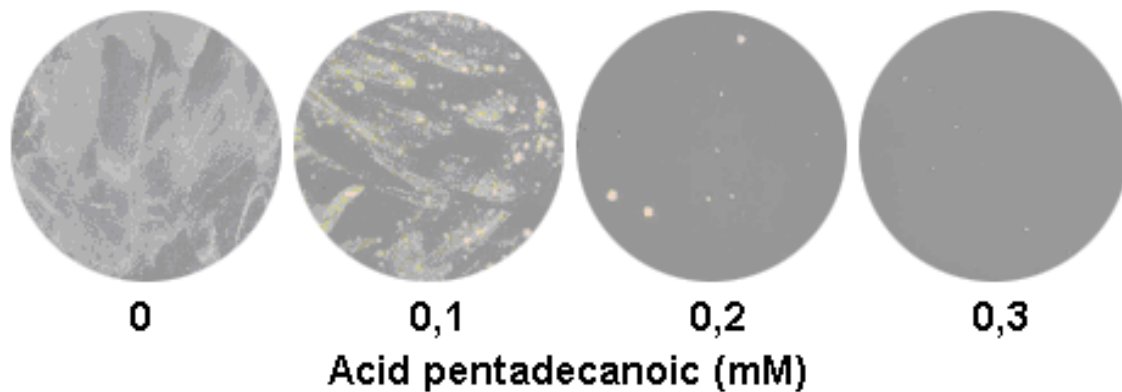
Tal com es pot observar en la Fig. III d.2., la presència d'àcids grassos de cadena curta/mitjana (C12 fins a C15) afecta a la capacitat de creixement de la soca  $\Delta eloI_{\Delta oleI}$  quan aquesta expressa de forma constitutiva la dessaturasa de *T.ni*, però aquest efecte no és tan important quan les cèl·lules expressen la dessaturasa fusionada al domini citocrom b<sub>5</sub>. En canvi, l'efecte d'aquests àcids sobre el creixement dels mutants que expressen les mateixes proteïnes en un vector induïble és el contrari, alterant-se el creixement de manera apreciable amb la proteïna quimèrica i menys, amb la salvatge.

També s'observà inhibició del creixement per als casos dels llevats  $\Delta eloI_{\Delta oleI}$  pYEX- $\Delta^{11}Sls$  i  $\Delta eloI_{\Delta oleI}$  pYEX-  $\Delta^{11}Tpi$ , essent aquests darrers mutants els que presentaren les inhibicions més dramàtiques. Les cèl·lules proliferaren normalment, independentment de l'àcid gras present en el medi de cultiu, quan la dessaturasa expressada era la pròpia del llevat en un entorn constitutiu.



**Figura III d.2.** Efecte dels àcids grassos saturats sobre la proliferació cel·lular. Com a mesura de la proliferació cel·lular es considera el nombre de doblatges en 48 h. Les mesures corresponen a la mitjana de tres determinacions i s'indica la SD. Els símbols corresponen a: ◆ *ΔeloI\_ΔoleI* YEp352-4.8OLE, ■ *ΔeloI\_ΔoleI* YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni, ▲ *ΔeloI\_ΔoleI* YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>, × *ΔeloI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}$ Tni, \* *ΔeloI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>, ● *ΔeloI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}$ Sls i + *ΔeloI\_ΔoleI* pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi. Els cultius han crescut en medi complet YPAD que contenia tergitol NP-40 (1%) com a tensioactiu i 0.5 mM de l'àcid gras corresponent durant 48 h a 30°C i 250 rpm. Com a control s'ha utilitzat el mateix medi de cultiu exceptuant l'àcid gras. En el cas de les construccions induïbles s'induí l'expressió a t=0 amb l'addició de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en una concentració final 0.5 mM.

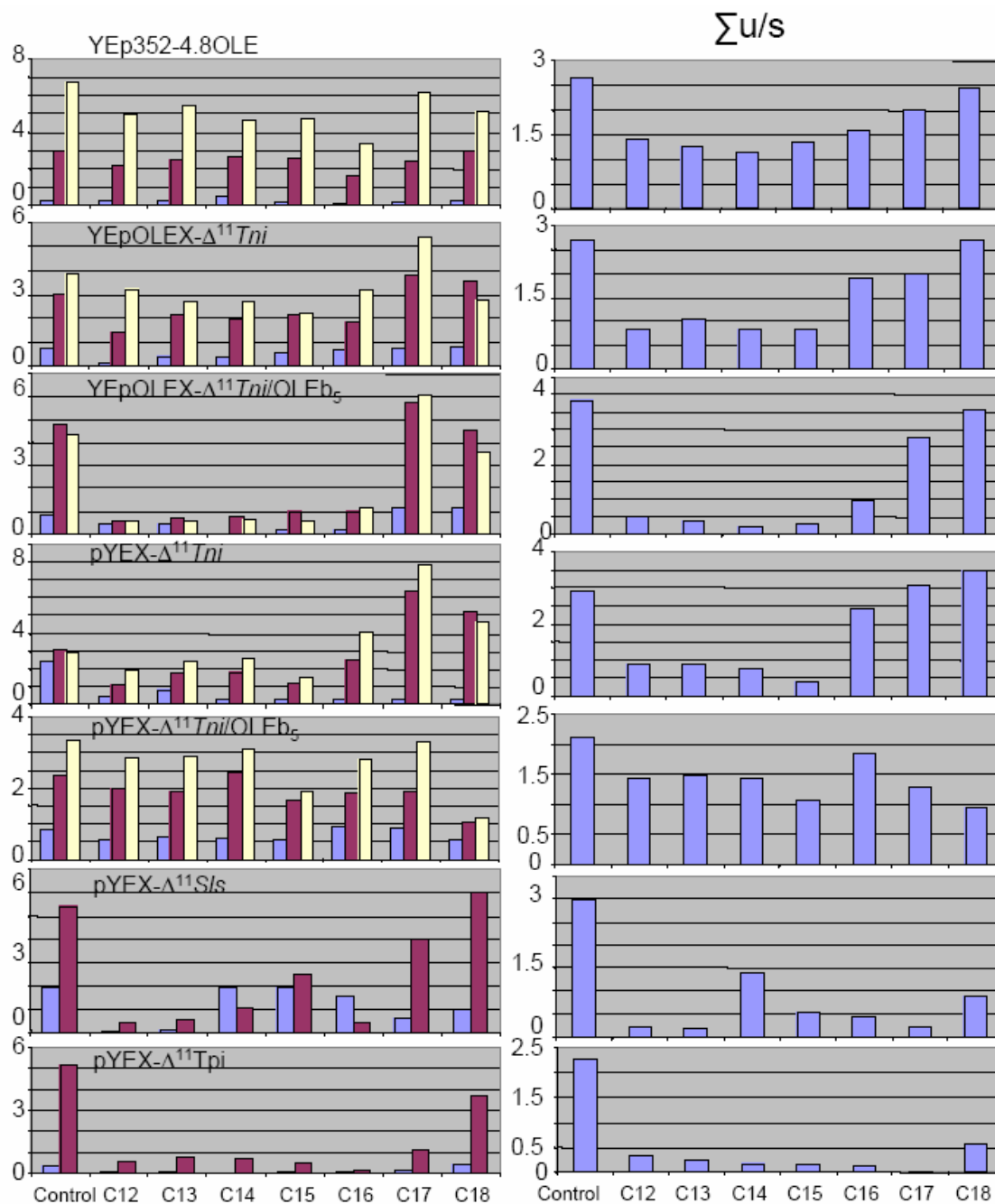
Per tal de confirmar els resultats obtinguts en medi líquid, alguns experiments es van dur a terme en medi sòlid. Així, els mutants transformats amb les construccions YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni i YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> van créixer normalment en plaques de medi mínim en presència d'àcid palmític. En canvi, en presència d'àcid pentadecanoic s'observà en ambdós casos una inhibició del creixement depenent de la concentració (Figura III d.3.)



**Figura III d.3.** Creixement del mutant *ΔeloI\_ΔoleI* YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub> en medi sòlid en presència de diferents concentracions d'àcid pentadecanoic.

Per tal d'investigar la possible correlació entre els efectes observats sobre el creixement i la composició en àcids grassos de les membranes, es van extreure els lípids i es va analitzar la seva composició tal com ja s'ha descrit en els capítols previs per GC-MS, amb la corresponent metanolització dels extractes (Annex I, Figura III d.4.). En aquest sentit, es van detectar, a més dels derivats insaturats en C11 i C9 de 14,16 i 18 àtoms de carboni que ja s'han descrit al llarg d'aquesta tesi, els corresponents derivats insaturats de 13,15 i 17 àtoms de carboni. Aquests compostos van ésser identificats mitjançant la derivatització DMDS dels corresponents extractes metanolitzats. La detecció no esperada d'alguns d'aquests àcids imparells, per exemple els de 15 o 17 àtoms de carboni quan el que s'afegí al medi era l'àcid de C13 es va atribuir a una certa activitat elongasa residual de la soca.

Tal com s'ha esmentat en capítols anteriors, les dessaturases de *S. littoralis* i *T. pityocampa* no dessaturen l'àcid esteàric (Figura III d.4.), però sí el mirístic i el palmític, essent aquest últim el substrat preferent. L'addició d'àcids grassos exògens provoca una disminució en les proporcions d'àcids insaturats, que és menor a mesura que augmenta la longitud de la cadena de l'àcid gras administrat. Aquesta tendència es correlaciona amb l'augment de la proliferació cel·lular (figura III d.2).



**Figura IIIId. 4.** Efecte de l'addició d'àcid grassos exògens sobre la relació entre àcids grassos insaturats i saturats en cèl·lules de llevat *Δ<sup>ole1</sup>Δ<sup>ole1</sup>* transformades amb diferents dessaturases. Les gràfiques corresponen a les relacions entre la quantitat d'àcids (Z)-11 (o (Z)-9) insaturats i els corresponents àcids saturats de 14 (blau), 16 (morat) i 18 (groc) àtoms de carboni. A la dreta es mostra la relació entre la suma total d'insaturats ( $\Sigma u$ ) i la suma total de saturats ( $\Sigma s$ ). Les construccions emprades s'indiquen a sobre de cada gràfica.

Pel que fa a les dessaturases de *T.ni* salvatge i fusionada al domini OLE<sub>b5</sub>, a la Fig. IIIId.4. es pot observar una tendència a l'augment en les proporcions d'àcids grassos insaturats a mesura que augmenta la longitud de la

cadena de l'àcid gras administrat, en tots els casos excepte en el cas del mutant transformat amb la proteïna quimèrica en el vector induïble pYEX, que mostra un perfil amb una dependència més baixa respecte l'àcid gras administrat. Fins i tot, en el cas de l'addició de l'àcid esteàric s'observa una disminució en la proporció d'àcids insaturats. Cal notar que va ser en aquest cas que es va observar una major sensibilitat en el creixement del llevat enfront de l'addició d'àcids grassos en el medi de cultiu, essent aquest creixement gairebé nul quan s'addicionaven àcids de menys de 15 àtoms de carboni. No ha estat possible interpretar aquests resultats de manera satisfactòria.

Respecte a les altres construccions que expressen les dessaturases de *S. cerevisiae*, *T. ni* i, sobretot, en el cas de les que expressen les de *S. littoralis* i *T. pityocampa*, l'efecte de suplementar el medi de cultiu amb àcids grassos saturats de cadena curta (sobretot de C10 a C14) sembla ser una reducció en la proporció d'insaturats a saturats, mentre en suplementar amb àcids de cadena llarga (sobretot C17 i C18) aquesta proporció augmenta fins a apropar-se en alguns als nivells dels controls crescuts en medi sense suplementar. Aquesta observació correlaciona amb la inhibició del creixement cel·lular observada en suplementar el medi amb els àcids de cadena curta.

En els casos en els que s'expressen les dessaturases d'insecte utilitzant el promotor de la dessaturasa (OLE1P) la transcripció d'aquest enzim pot estar regulada per la concentració d'àcids grassos saturats o insaturats en el medi de cultiu fent que augmenti o disminueixi la quantitat de mRNA de la dessaturasa, respectivament (Bossie and Martin, 1989).

En cap dels experiments realitzats amb àcid dodecanoic s'observa la formació de producte dessaturat, per la qual cosa l'efecte d'aquest àcid sobre el creixement de les cèl·lules de llevat no és degut a la formació d'un àcid gras olefínic terminal. Es coneix que la deficiència de l'enzim elongasa en aquesta soca de llevat provoca una deficiència de creixement en un medi suplementat amb àcid miristoleic, però aquest efecte no s'observa amb àcid palmitoleic (Schneiter et al., 2000).

L'absència d'activitat elongasa fa que els àcids grassos de cadena mitjana (C12-C14) no puguin metabolitzar-se a àcids de cadena més llarga (C16-C18) que permetin la formació de fosfolípids de membrana estructuralment més similars als naturals, mantenint les característiques físicoquímiques d'aquesta.

Tots aquests experiments realitzats amb els cultius que expressen les dessaturases d'insecte en medi de cultiu complet que conté un determinat àcid gras saturat ens mostren que la presència d'aquest àcid gras saturat altera d'alguna manera el creixement normal de les cèl·lules que expressen les dessaturases d'insecte. Es va descartar que aquest efecte fos produït per la presència del tensioactiu en el medi de cultiu perquè assaigs realitzats en medi complet en presència de tensioactiu i fins i tot, de l'etanol utilitzat per solubilitzar l'àcid gras mostren un creixement normal de les cèl·lules de llevat. Aquestes dades suggereixen, més probablement, que aquests àcids podrien actuar com a inhibidors de les tres dessaturases d'insectes estudiades, i en menor mesura de la de llevat tot i que en aquest cas no provoca una alteració en els nivells de creixement. Aquesta inhibició dificultaria el processament normal dels seus substrats naturals (C16 i C18) perturbant per tant el creixement dels llevats.

En aquest sentit en assajos inicials, duts a terme amb la soca  $\Delta oleI$ , que presenta activitat elongasa, els efectes sobre el creixement no van ser tan dràstics (resultats sense mostrar). A la vista d'aquests resultats més recents això es podria interpretar com que aquesta activitat permetria convertir els àcids inhibidors en àcids de cadena més llarga que són substrats de l'enzim.

La possibilitat que una alteració de la composició de les membranes cel·lulars pogués provocar efectes com ara un plegament incorrecte de les proteïnes que es troben imbuïdes en aquestes estructures cel·lulars es va descartar degut a que la presència d'àcids grassos saturats en el medi de cultiu només provoquen problemes de creixement en les soques que expressen les  $\Delta^{11}$  dessaturases de les diferents espècies de lepidòpters amb les que s'ha treballat però no amb la  $\Delta^9$  dessaturasa de llevat.

Existeix un nombre d'altres possibles efectes que podrien donar lloc als resultats observats. Per exemple, el canvi de la posició del doble enllaç en els àcids grassos podria causar una alteració de la fluïdesa de les membranes i un canvi en les seves propietats fisicoquímiques. D'altra banda es coneix que en llevat la biosíntesi *de novo* dels àcids grassos saturats requereix de l'acció del complex format per la acetil-CoA carboxilasa i la sintasa d'àcids grassos (FAS). La presència en el medi de cultiu d'àcids grassos saturats fa disminuir l'activitat d'aquests dos enzims entre un 50% i un 70% i a més disminueixen el seus nivells de transcripció (Trotter, 2001). Intentar confirmar qualsevol d'aquestes hipòtesis requereix un treball molt més en profunditat que queda molt lluny dels objectius d'aquesta tesi.

### **III d.3. Efecte de la temperatura de cultiu sobre el creixement i composició d'àcids grassos en llevats $\Delta eloI_{\Delta oleI}$ transformats amb les diferents $\Delta^{11}$ dessaturases d'insecte.**

Un altre dels aspectes estudiats en aquesta tesi ha estat l'efecte de la temperatura sobre el creixement de cadascun dels mutants de llevat obtinguts per transformació amb les diferents dessaturases estudiades. De la mateixa manera que s'ha descrit en l'apartat III d.2., es prepararen cultius en medi complet YPAD (amb presència de  $Cu^{2+}$  0.5 mM en els casos que fou necessari) amb un inòcul de densitat òptica a 600 nm de 0.05. Les cèl·lules s'incubaren a 18, 25, 30, 34 i 37°C i, passades 48 h després de l'inòcul, es mesurà la densitat òptica a 600 nm i se'n calculà el nombre de doblatges. Tal com es presenta en la figura III d.5., el nombre de doblatges per tots els mutants fou màxim (ca 6) i similar entre tots ells a 30°C. Ara bé, mentre la soca que expressa la  $\Delta^9$  dessaturasa de llevat va créixer normalment a totes les temperatures, excepte a 37°C, el creixement dels altres mutants es va veure afectat per les modificacions de la temperatura d'incubació. L'efecte més dramàtic es produí a 18°C, en que totes les soques presentaren dificultats de creixement, especialment les

transformades amb les construccions YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i pYEX- $\Delta^{11}Tpi$ . Els altres tipus cel·lulars, transformats amb els plasmidis pYEX- $\Delta^{11}Tni$ , pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$ , YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  i pYEX- $\Delta^{11}Sls$ , foren més resistents, si bé el nombre de doblatges fou aproximadament 1/3 del produït a 30°C. A 37°C tots les soques presentaren problemes de creixement, essent els aparentment més resistents els mutants pYEX- $\Delta^{11}Tni/OLEb_5$  i pYEX- $\Delta^{11}Sls$  i el menys resistent, el pYEX- $\Delta^{11}Tpi$ . En totes les soques, excepte la portadora de la dessaturasa de *T. pityocampa*, per la qual no es va observar creixement a 37°C, que sembla estar relacionat amb un alentiment del metabolisme ja que els cultius a 37°C van continuar creixent fins arribar al nombre de doblatges assolits a 30°C (figura III d.6) al cap de 7 dies.

Si es comparen els perfils de les gràfiques, el marge de resistència a la variació de la temperatura d'incubació és menor en el cas dels mutants YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$  i pYEX- $\Delta^{11}Tpi$ . A més, s'observa que les transformacions amb la dessaturasa de *T. ni* fusionada al domini OLE<sub>5</sub> confereix una certa resistència a les modificacions de la temperatura, especialment en el cas del vector constitutiu.

Per tal de determinar si els efectes de la temperatura sobre el creixement observats estaven relacionats amb variacions en la composició d'àcids grassos de les membranes, es van fer extraccions de lípids cel·lulars, aquests extractes es varen metanolitzar i els conjunts d'èsters metílics resultants s'analitzaren per GC/MS. A partir dels perfils cromatogràfics, es determinaren les proporcions entre el total d'àcids grassos monoinsaturats de geometria Z i el total d'àcids grassos saturats, obtenint-se els resultats que es representen en la Fig. III d.5. Com pot observar-se, la soca portadora de la dessaturasa de llevat (YEp352-4.8OLE) respon a la disminució de temperatura augmentant les proporcions d'àcids monoinsaturats, afavorint així un augment de la fluïdesa de la membrana. Per contra, la proporció d'àcids monoinsaturats Z disminueix a 34°C, amb la qual cosa la cèl·lula respon a l'increment de la temperatura augmentant la proporció d'àcids saturats (disminuint la fluïdesa de la membrana). A 37°C no s'observa modificació de la relació entre els àcids



insaturats Z i els saturats. Això sembla indicar que les cèl·lules que no són capaces de respondre a l'augment de la temperatura no poden créixer.

Aquestes modificacions en la composició en àcids grassos en funció de la temperatura no s'observen en els mutants transformats amb les diverses  $\Delta^{11}$  dessaturases, la qual cosa podria explicar la major sensibilitat d'aquestes soques a les variacions de la temperatura d'incubació.

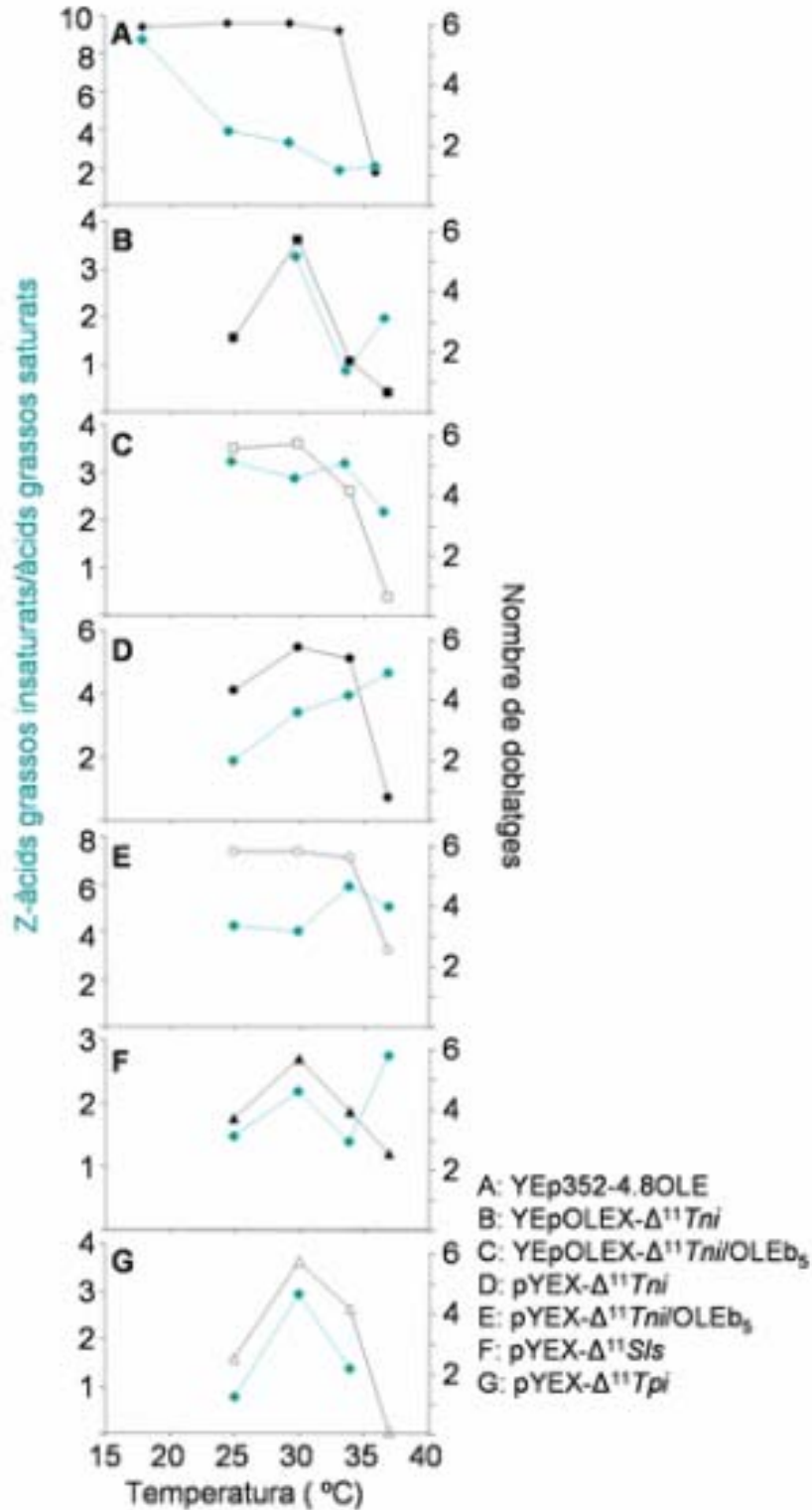
Els lípids que formen part de les membranes, principalment fosfolípids, són polimòrfics i presenten comportaments de fase i propietats físiques complexes i altament sensibles a modificacions de les condicions ambientals (temperatura, pressió, pH...). Les perturbacions de les estructures de membrana degudes a factors ambientals poden provocar una disrupció significativa de les funcions fisiològiques (Hazel and Williams, 1990). Els fosfolípids que contenen àcids grassos insaturats presenten una temperatura de transició de fases més baixa que els que contenen àcids grassos saturats, ja que les cadenes d'acil saturades formen estructures més compactes que les cadenes monoinsaturades de geometria Z, que presenten un empaquetament molt menys eficient (Cronan and Gelmann, 1973; Mansilla and de Mendoza, 2005). Per això, en la majoria d'organismes, a temperatures inferiors a les habituals les membranes cel·lulars esdevenen rígides. Un descens en la fluïdesa de les membranes suposa una alteració de les activitats cel·lulars, com ara una menor difusió lateral de les proteïnes de membrana, un descens de l'activitat dels enzims associats a les membranes i una reducció del transport a través de les membranes cel·lulars (Vigh et al., 1998). Com a conseqüència, si l'organisme no s'adapta al canvi de fluïdesa, mor. Molts organismes són capaços d'aclimatar-se a les modificacions de temperatura per una reestructuració dels lípids de membrana, augmentant el percentatge d'àcids grassos insaturats, i així aconsegueixen sobreviure. Això és el que s'observa en el cas de la soca de llevat YEp352-4.8OLE com es pot observar en la gràfica A de la figura III d.5, però no en les altres 6 estudiades.

El fet que els mutants portadors de  $\Delta^{11}$  dessaturases no creixin a 18 °C fa pensar que el canvi de posició del doble enllaç des de (Z)-9 a (Z)-11 transforma el llevat en sensible al fred de forma selectiva. No s'ha trobat cap precedent en

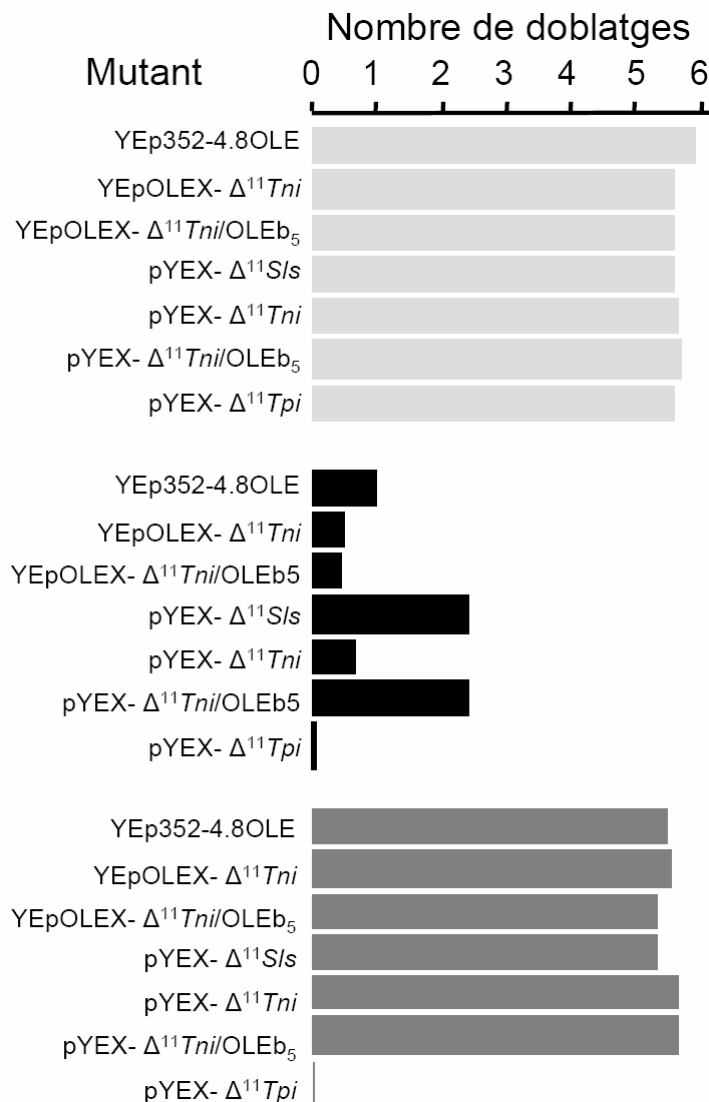
la bibliografia on es descriguin els efectes de la posició dels dobles enllaços en els àcids grassos sobre la viscositat o la fluïdesa de la membrana.

L'absència de productes insaturats de 18 àtoms de carboni en les soques pYEX- $\Delta^{11}$ Sls i pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi també pot ésser un factor que afecti negativament al creixement del llevat a baixes temperatures. Les membranes cel·lulars de llevat estan formades principalment per dos tipus d'àcids grassos: l'àcid oleic i el palmitoleic, que suposen aproximadament el 70 % dels àcids grassos presents en els lípids de membrana (Bossie and Martin, 1989). En les soques de llevat transformades amb les dessaturases d'*S. littoralis* i *T. pityocampa* es produeix l'equivalent a l'àcid palmitoleic, l'àcid (Z)-11-hexadecenoic, però no te lloc la síntesi de l'equivalent de l'àcid oleic i és possible que qualsevol canvi ambiental pugui afectar molt més a la viabilitat de les cèl·lules. Es coneix que l'addició en el medi de cultiu d'un únic àcid gras causa canvis destacables en la composició d'àcids grassos en els fosfolípids (Bossie and Martin, 1989).

D'altra banda, les dessaturases d'*S. littoralis* i de *T. pityocampa* produeixen àcids grassos insaturats poc habituals, com són diènics i, en el cas de *T. pityocampa*, també acetilènics i de naturalesa enínica. Es pot pensar que la presència d'aquests grups acil (tot i que es troben en quantitats molt petites) en els lípids de les membranes podria conferir a les cèl·lules una major sensibilitat als canvis ambientals i afectar a la viabilitat cel·lular. No hi ha cap estudi sobre l'efecte dels lípids diènics, acetilènics o enínics sobre els comportaments de fase de les membranes.



**Figura IIIId.5.** Efecte de la temperatura sobre el nombre de doblatges en 48 hores i sobre la composició en àcids grassos de les membranes cel·lulars de les soques de llevat  $\Delta elol\_ \Delta olel$  transformades amb diferents dessaturases. La relació entre el total d'àcids grassos insaturats respecte al total d'àcids grassos saturats, analitzats en forma d'èsters metílics, es dona a l'ordenada de l'esquerra. A 37°C la composició d'àcids grassos es calculà a 7 dies de creixement.



**Figura III d.6.** Creixement de les soques de llevat  $\Delta_{eloI} \Delta_{oleI}$  transformades amb diferents dessaturases durant 48 h a 30°C (gris clar) i 37°C (negre), i durant 7 dies a 37°C (gris fosc).

#### III d.4. Assaigs d'activitat acil-CoA dessaturasa efectuats en microsomes de llevat.

La preparació de microsomes de llevat per a mesurar l'activitat acil-CoA dessaturasa va ésser descrita per Bossie et al. (Bossie and Martin, 1989), però aquest mètode no s'ha utilitzat en els últims anys per a la mesura de l'activitat acil-CoA dessaturasa *in vitro*, malgrat l'ús habitual de llevat com a hoste per a la biosíntesi d'aquests enzims i posteriors assaigs d'activitat.

Per evidenciar les diferències d'activitat entre la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* i aquesta mateixa dessaturasa fusionada al domini OLEb<sub>5</sub> necessitàvem

un mètode d'assaig *in vitro*, en el que l'activitat enzimàtica no resultés emmascarada per possibles respostes de l'organisme dirigides a mantenir l'homeostasi de les membranes, que sí que es produïen en les cèl·lules en cultiu.

Les primeres preparacions de microsomes aconseguides seguint la metodologia descrita per Bossie et al. (Bossie and Martin, 1989) no donaren lloc a activitat dessaturasa mesurable. Es buscà una altra metodologia per preparar microsomes de llevat. A la literatura s'ha descrit una metodologia alternativa (Taton et al., 2000; Darnet and Rahier, 2003), emprada per a la determinació d'activitat  $\Delta^7$ -esterol-C5(6)-dessaturasa i 4-metil oxidasa. Els microsomes preparats per aquest mètode presentaven activitat dessaturasa detectable, tot i que a uns nivells baixos. Aquesta metodologia va ésser posada en marxa gràcies a una estada al grup del Prof. Peter H. Buist (Carleton University, Ottawa, ON, Canada).

L'assaig d'activitat dessaturasa es va realitzar emprant com a substrat l'èster de coenzim A de l'àcid heptadecanoic, ja que es tracta d'un substrat imparell no natural de fàcil anàlisi per GC-MS, i NADH com a cofactor (Bossie and Martin, 1989). Les activitats es determinaren mitjançant anàlisi per GC-MS d'extractes lipídics de les membranes microsomals adequadament metanolitzats.

**Taula III d.2.** Percentatge d'àcid 11-heptadecenoic respecte el total d'heptadecanoil-CoA incorporat a les membranes microsomals de llevat.<sup>a</sup>

	<b>30°C</b>	<b>37°C</b>	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>	<b>20 µM</b>	<b>40 µM</b>
$\Delta^{11}$ <i>Tni</i> (%)	8.4 ± 1.8	3.5 ± 0.8	5.8 ± 0.4	3.1 ± 1.0	7.5 ± 3.0	3.2 ± 1.0
$\Delta^{11}$ <i>Tni</i> /OLEb <sub>5</sub> (%)	4.6 ± 2.1	2.9 ± 1.4	3.5 ± 0.3	1.6 ± 0.5	4.7 ± 2.0	2.2 ± 1.3

<sup>a</sup>Es comparen els resultats obtinguts en diferents condicions d'assaig. Les condicions estàndard són: 30°C, 1 h de reacció i 20 µM d'heptadecanoil-CoA. Només s'ha canviat una de les condicions en cada cas. Les dades (mitjana ± SD, n=2) corresponen a la mitjana de 3 determinacions independents.

Com s'observa a la taula III d.2., de les diferents condicions de temperatura i temps d'incubació i concentració de substrat, els millors resultats

de dessaturació es van obtenir en els assaigs realitzats utilitzant 20  $\mu\text{M}$  d'heptadecanoïl coenzim A i 1 hora de temps de reacció a 30°C.

La procedència del producte com a resultat de l'activitat enzimàtica es demostra en assaigs realitzats en les mateixes condicions, però emprant microsomes de la soca de llevat  $\Delta\text{eloI}_{\Delta\text{oleI}}$  sense transformar. En aquest cas, no s'observa la presència de producte monoinsaturat.

La fusió del domini OLEb<sub>5</sub> a la  $\Delta^{11}$  dessaturasa de *T. ni* no sembla produir una millora de l'activitat respecte de la dessaturasa salvatge (taula III d.2); per contra, s'aprecia una davallada en la quantitat de producte dessaturat format en totes les condicions assajades. La diferència més gran s'observa en incubacions a 30°C durant 4 h (20  $\mu\text{M}$  de substrat), mentre que l'activitat de les dues proteïnes és similar en les incubacions a 37°C (1 h, 20  $\mu\text{M}$  de substrat). Aquests resultats no foren els esperats, ja que la presència del domini OLEb<sub>5</sub> enllaçat a la dessaturasa s'assumia que podria facilitar un transport electrònic més eficient, agilitzant la reacció de dessaturació (Sayanova et al., 1997; Sperling and Heinz, 2001; Buist, 2004b). A més, contrasten amb els obtinguts en els experiments *in vivo*, en els que els llevats transformats amb la dessaturasa quimèrica produïen més producte monoinsaturat que la dessaturasa salvatge quan es partia de substrats exògens de cadena curta (C13 a C15), si bé amb substrats més llargs (C16 a C18) el percentatge de productes insaturats produïts pels dos llevats transformats era similar. Es pot plantejar que la presència del domini OLEb<sub>5</sub> en l'extrem C-terminal de la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *T. ni* pot ocasionar un canvi conformacional en l'enzim afectant l'estructura d'unió al substrat i que aquesta sigui més assequible per als substrats més curts, però al mateix temps dificulta l'entrada dels àcids grassos més llargs.

El promotor OLE1 de la dessaturasa de llevat que es troba en el vector YEpOLEx conté un element LORE (low oxygen response element). Aquest element provoca que en condicions d'hipòxia s'incrementi l'expressió de mRNA (Jiang et al., 2001; Vasconcelles et al., 2001; Jiang et al., 2002). Així i tot,

experiments preliminars efectuats en condicions de baixa concentració d'oxigen, l'activitat dessaturasa no augmentà de forma significativa.

### **IIIId.5. Procediments experimentals.**

#### **IIIId.5.1. Preparació de microsomes de llevat.**

Es fan créixer cultius de llevats transformats (0.5 L) fins a una O.D. a 600 nm = 1. Es centrifuga a 10000xg i a 4°C durant 15 min i es descarta el sobrenedant. A continuació es ressuspèn el residu en 15 mL de tampó de lisi (fosfat potàssic 100 mM pH 7.5, L-glutació reduït 1.5 mM i nicotinamida 30 mM) i s'afegeix un volum igual de boles de vidre (0.45 mm) prèviament rentades i refredades a 4°C. S'homogeneïtza mitjançant agitació durant 1 min a 4°C, deixant reposar 1 min en gel i aquest procés es repeteix 8 vegades. S'obtingué l'extracte cel·lular per centrifugació a 10000xg durant 20 min. Es van obtenir els microsomes per centrifugació del sobrenedant de l'extracte cel·lular a 100000xg durant 90 min. El residu microsomal final s'homogeneïtza acuradament en tampó de ressuspensió (fosfat potàssic 100 mM pH 7.5, L-glutació reduït 3 mM i glicerol 20% (v/v)). La suspensió microsomal pot guardar-se a -80°C per un temps màxim d'un mes.

#### **IIIId.5.2. Mètode de Bradford per a la determinació de proteïna.**

Per a la determinació de proteïna s'utilitza el mètode descrit per Bradford (Bradford, 1976). L'assaig de Bradford es basa en el canvi d'absorbància màxima d'una solució àcida de Coomassie Brilliant Blue G-250 des de 465 nm fins a 595 nm quan aquest compost s'enllaça a les proteïnes. S'utilitza com a patró una solució d'albúmina 1 mg/mL de la que es preparen dilucions de concentració variable des de 2.5 ng/ $\mu$ L fins a 150 ng/ $\mu$ L. S'utilitza com a reactiu el Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories), que es prepara per dilució d'1 mL de Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate amb 4 mL d'aigua destil·lada i desionitzada. En una placa de 96 pous s'apliquen 20  $\mu$ L de cadascuna de les concentracions de patró o de

les mostres a analitzar (o les corresponents dilucions de les mostres que s'analitzen) i tot seguit s'afegeixen 150  $\mu$ L del reactiu diluït. Es deixa reaccionar durant un mínim de 5 min i un màxim de 30 min. Tot seguit es determina l'absorbància a 595 nm.

### **IIIId.5.3. Assaig d'activitat dessaturasa.**

La mescla de reacció consisteix en tampó fosfat potàssic 100 mM a pH 7.2, NADH 1 mM, n-heptadecanoïl coenzimA 20  $\mu$ M i 3 mg de proteïna microsomal, determinada segons el mètode de Bradford descrit en l'apartat anterior, en un volum final d'1 mL. La reacció es duu a terme en un tub de vidre a 30°C durant 1 hora amb agitació suau (150 rpm).

### **IIIId.5.4. Extracció dels àcids grassos de la suspensió de microsomes.**

Per aturar la reacció s'afegeix 1 mL de KOH 2 N en EtOH i s'escalfa a 100°C durant 20 min. Es deixa refredar i s'acidifica amb HCl fins a pH 2.0. S'extreu sis vegades amb 1 mL d'hexà per anàlisi i la fase orgànica es filtra a través de NaSO<sub>4</sub> anhidre. Finalment s'evapora el dissolvent i el residu es metila amb diazometà dissolt en èter etílic. Els extractes s'analitzen per GC-MS.



## **IV. CONCLUSIONS**

---



Del treball presentat en aquesta tesi es poden extreure les conclusions següents:

- I. La introducció del domini homòleg al citocrom  $b_5$  de la  $\Delta^9$  acil-CoA dessaturasa de *Saccharomyces cerevisiae* a la  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *Trichoplusia ni* no modifica de forma significativa l'activitat de l'enzim salvatge. Ambdues proteïnes són capaces d'introduir la insaturació en la posició 11 dels àcids grassos de cadena lineal, des de l'àcid tridecanoic fins a l'esteàric. Ara bé, en cèl·lules en suspensió, la proteïna de fusió mostra una activitat dessaturasa més elevada que la nativa sobre substrats de cadena curta/mitjana (C12-C15), mentre que la nativa és lleugerament més activa sobre els de cadena llarga (C16-C18). Tot i que es tracta de resultats preliminars, la proteïna de fusió presenta una major producció d'àcids grassos insaturats.
- II. La  $\Delta^{11}$  acil-CoA dessaturasa de *Spodoptera littoralis* és un enzim bifuncional amb activitats  $\Delta^{11}$  i  $\Delta^{10,12}$  dessaturasa. Aquesta última activitat és responsable de la formació d'àcids grassos 10,12-dienoics a partir de substrats insaturats en (Z)-11. L'estereoquímica de la reacció depèn de la longitud de la cadena del substrat monoènic. Així, mentre que l'àcid (Z)-11-tetradecenoic produeix àcid (E,E)-10,12-tetradecadienoic, l'àcid (Z)-11-hexadecenoic es transforma en àcid (E,Z)-10,12-hexadecadienoic.
- III. La glàndula feromonal de les femelles de *Thaumetopoea pityocampa* conté una acil-CoA dessaturasa multifuncional, amb activitats  $\Delta^{11}$  dessaturasa,  $\Delta^{13}$  dessaturasa i  $\Delta^{11}$  acetilenasa.
- IV. Les  $\Delta^{11}$  dessaturases de les glàndules feromonals d'*Spodoptera littoralis* i *Thaumetopoea pityocampa* no són actives sobre l'àcid esteàric.

- V. Les dessaturases de *Trichoplusia ni* i *Spodoptera littoralis* tenen activitat hidroxilasa residual i catalitzen la transformació d'àcids grassos saturats en àcids grassos hidroxilats. El grup hidroxil està unit exclusivament a l'àtom de carboni on s'inicia la reacció de dessaturació. Aquest resultat referma la hipòtesi de que les acil-CoA dessaturases són potencials hidroxilases.
- VI. L'activitat enzimàtica de les  $\Delta^{11}$  dessaturases de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera littoralis* i *Thaumetopoea pityocampa* provoca en el llevat  $\Delta eloI\_AoleI$  una sensibilització enfront als àcids grassos exògens. Mentre les cèl·lules que expressen la  $\Delta^9$  estearoïl-CoA dessaturasa creixen normalment en presència d'àcids grassos de longitud variable (dodecanoic a octadecanoic) en el medi, la soca  $\Delta eloI\_AoleI$  transformada per expressar les dessaturases exògenes estudiades presenta inhibició del creixement sobretot en àcids grassos de cadena curta. El grau d'inhibició depèn de la construcció utilitzada.
- VII. L'activitat enzimàtica de les  $\Delta^{11}$  dessaturases de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera littoralis* i *Thaumetopoea pityocampa* en el llevat  $\Delta eloI\_AoleI$  provoca una sensibilització de l'organisme a les baixes temperatures. Mentre les cèl·lules que expressen la  $\Delta^9$  estearoïl CoA dessaturasa no mostren diferències significatives de creixement entre 18 i 34°C, els mutants transformats presenten una forta inhibició del creixement a 18°C i, en menor grau, a 25°C. Els resultats obtinguts indiquen que aquest efecte està relacionat amb la composició en àcids grassos saturats i insaturats de les membranes.
- VIII. Tots els resultats recollits en aquesta tesi indiquen que la composició d'àcids grassos de les membranes és un factor determinant per a la viabilitat de les cèl·lules del llevat, per tant, qualsevol modificació que alteri aquesta composició pot afectar al creixement del llevat o fins i tot, fer-lo inviable. Aquest és un factor fonamental a tenir en compte per a la producció biotecnològica d'aquests productes insaturats en cèl·lules vives.

## **V. MATERIALS I MÈTODES**

---



Per a realitzar aquest treball s'han emprat diverses tècniques per a l'ús de les quals s'han seguit les instruccions dels manuals de protocols : "Molecular Cloning: A laboratory manual" (Sambrook et al., 1989) i "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al., 1995).

## V.1. Procediments generals.

### V.1.1. Equipament i instrumentació.

Termociclador:	Mastercycler Personal (Eppendorff).
Sistema d'electroforesi:	Font PowerPac 300 amb cubetes IBI QS 710 (DNA) (Shelton Scientific) o MiniProtean® 3 (SDS-PAGE) (BioRad).
Sistema d'adquisició d'imatges:	Transiluminador Ecogen amb càmera de vídeo COHU High Performance CCD Camera, pantalla National Electronics M900X i impressora de gels Mitsubishi P91.
<i>Western blot</i> :	Mini Trans-Blot Cell (BioRad).
Incubador:	Agitador orbital Novotron TR-225 (Infors-HT®).
Agitador orbital:	Rotamax-120 (Heidolph Instruments).
Centrífugues i microcentrífuga:	Beckman J2-HS i TJ-6, i Eppendorff 5415D
Ultracentrífuga:	Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman)
Espectrofotòmetres:	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) i Spectra Max Plus Microplate spectrophotometer (Molecular Devices)
Sistema de purificació d'aigua:	Arius 611 (Sartorius)

Cromatògraf de gasos:	Trace GC de ThermoQuest o bé, HP 5980 Series 2 emprant heli com a gas portador.
Espectròmetre de masses:	Trace MS ThermoQuest sèrie 2000 amb ionització per impacte electrònic i analitzador de tipus quadrupol o bé, Kratos Concept 1H (Kratos Analytical) acoblats al cromatògraf de gasos.
Columna per GC:	HP-5MS de 30 m de llargada, 0.25 mm de diàmetre intern i 0.25 $\mu\text{m}$ de gruix de fase estacionària (ThermoQuest).

### V.1.2. Reactius.

Els reactius comercials emprats van ser de qualitat per a anàlisi i van ser adquirits a Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Pronadisa (components dels medis de cultiu) o Fisher Scientific. Les solucions aquoses es van preparar emprant aigua ultrapura miliQ (resistivitat  $\geq 18\text{M}\Omega$ ).

### V.1.3. Procediments d'esterilització.

Com a norma general, els medis de cultiu i dissolucions es van esterilitzar en autoclau durant 20 min a 120 °C. Com a procediment alternatiu per a la esterilització de solucions sensibles a la temperatura (galactosa, triptòfan,...) es va utilitzar l'esterilització per filtració a través de filtres de 0.22  $\mu\text{m}$  Millex-GS (Millipore).

### V.1.4. Cultius cel·lulars.

#### V.1.4.1. Soques d'*E. coli*.

**DH5 $\alpha$**  (F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ -) (Invitrogen) utilitzada per a l'amplificació de tots els plasmidis d'aquest treball.



**BL21(DE3)pLysS** ( $F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm \lambda(DE3) [pLysS Cam^R]$ ) (Novagen) emprada per a l'expressió en un sistema procariota de les construccions del vector pET28a(+).

#### V.1.4.2. Medis de cultiu de cultius d'*E. coli*.

S'emprà com a medi habitual per al cultiu de *E. coli* el medi LB. En ocasions puntuals s'utilitzà el medi SOC. La composició d'aquests medis és la següent:

Medi LB: 0.5 % NaCl, 1 % triptona bacteriològica, 0.5 % extracte de llevat, 2 % agar.

Medi SOC: 2 % triptona bacteriològica, 0.5 % extracte de llevat. Ajustar el pH a 7.0 i afegir posteriorment: 20 mM glucosa, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### V.1.4.3. Soques d'eucariotes.

Soques de *Saccharomyces cerevisiae*:

**W303a** diploide (MATa *ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 can1-100 [psi+]*) adquirida al servei Euroscarf

$\Delta eloI \Delta oleI$  (MATa *elo1::HIS3 ole1::LEU2 ade2 his3 leu2 ura3*) cedida pel Dr. Wendell L. Roelofs (Cornell University, NY, USA).

$\Delta eloI$  (MAT $\alpha$  *elo1::HIS3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-2,112 ura3-1*) cedida pel Dr. Charles E. Martin (Rutgers University, NJ, USA)

$\Delta oleI$  (MATa *ole1::LEU2 ade2 his3 leu2-2 ura3*) subministrada pel Dr. Charles E. Martin).

La primera soca s'ha utilitzat com a control de creixement i de les reaccions de dessaturació en certes condicions. Les altres tres soques s'han utilitzat per a l'expressió funcional de les dessaturases de lepidòpters en un sistema eucariota.

#### **V.1.4.4. Medis de cultiu de *S. cerevisiae*.**

Medi YPD: 1 % peptona bacteriològica, 1 % extracte de llevat, 2 % glucosa, 2 % agar (per plaques). En certes soques (les que tenen la deficiència *ade3*) s'addicionen 40 mg/L de sulfat d'adenina. Ajustar el pH a 7.0.

Medi YEP+Galactosa: 1 % peptona bacteriològica, 1 % extracte de llevat, 1 % galactosa, 1 % rafinosa i si fa falta, 40 mg/L sulfat d'adenina.

Medi SD: 1.7 g/L de base nitrogenada de llevat, 2 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 % d'agar (per plaques), 2 % de glucosa, 10 mg/L de sulfat d'adenina, 0.01 mg/L de triptòfan, 1 g/L d'aminoàcids de digerits de caseïna. En el cas de soques *ade3* deficients 40 mg/L de sulfat d'adenina enlloc de 10 mg/L.

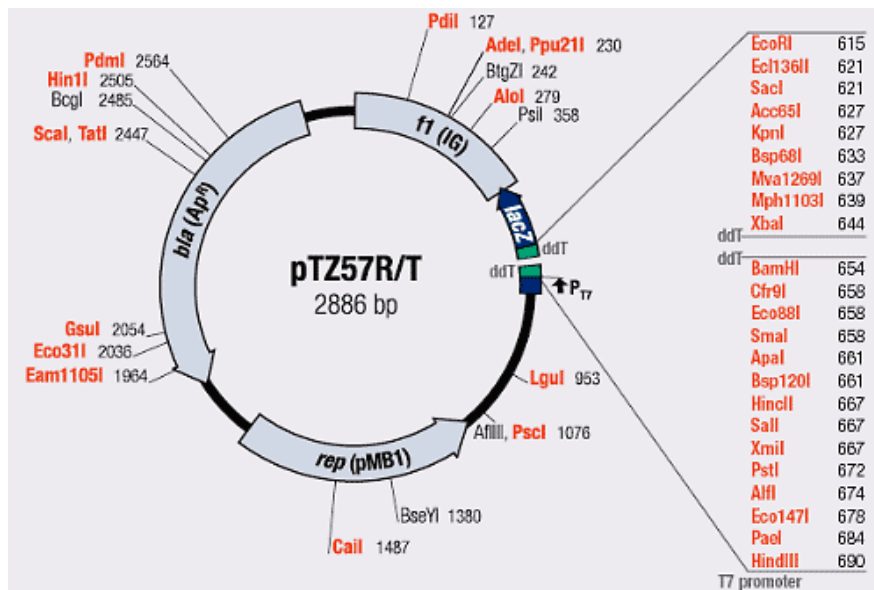
Plaques FOA: 1.7 g/L de base nitrogenada de llevat sense aminoàcids, 0.5 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.5 % d'agar. Autoclavar i refredar fins a  $\sim 65^\circ\text{C}$ . Posteriorment s'afegeix (per 100 mL): 50 mL de solució d'àcid 5-fluorooròtic 2x (d'una solució de concentració 1.8 mg/mL) esterilitzat per filtració, 2 % de glucosa, 500  $\mu\text{L}$  d'uracil a l'1%. En els casos necessaris s'addiciona tergitol fins a l'1% i àcids oleic i palmitoleic en una concentració final de 0.5 mM. S'utilitzen aquestes plaques de medi mínim que contenen a més dels components habituals l'àcid 5-fluorooròtic (FOA) per aconseguir treure un plasmidi d'unes cèl·lules transformades i recuperar la soca original.

## **V.2. Mètodes de biologia molecular.**

### **V.2.1. Vectors i construccions.**

#### **V.2.1.1. Vectors de clonatge.**

El vector utilitzat en el clonatge de la dessaturasa de processonària del pi fou pTZ57R/T (MBI Fermentas). Aquest vector permet el clonatge de productes de PCR que contenen residus d'adenina addicionals als extrems 3'. Aquests residus extrems són introduïts per la *Taq* DNA polimerasa i altres polimerases termoestables que no tenen correcció d'errors.



**Figura V.1.** Esquema del vector de clonatge pTZ57R/T en el que s'introdueixen els productes de PCR dels que es desconeix la seqüència.

#### V.2.1.1. Vectors de d'expressió.

Per a l'expressió de proteïna s'empraren diferents vectors dependent de l'organisme hoste i de l'entorn desitjat, induïble o constitutiu:

**pET28a(+)** (Novagen) que s'utilitza en l'intent d'expressar les desaturases en un sistema procariota d'*E. coli*. Aquest vector presenta un lloc de clonatge múltiple amb un gran nombre de llocs de restricció únics propers al promotor T7lac que permet la inducció per IPTG.

**YEpOLEX** (Stukey et al., 1990). Aquest sistema prové del vector d'expressió en llevat Yep352 (Hill et al., 1986), en el que es va inserir el promotor de la desaturasa del llevat. Aquest vector s'amplifica autònomament en *S. cerevisiae* i *E. coli*, conté el gen de la  $\beta$ -lactamasa que li dona resistència a ampil·lina i els gens LEU2 i URA3 permetent la selecció amb aquests marcadors en *S. cerevisiae*.

**pYEXTHS-BN**, cedit per la Dra. C. Holz (Holz et al., 2002). Aquest vector està basat en el plasmidi episomal pYEXbx (Clontech). Aquest sistema conté el promotor pCUP1 d'una metal·lotioneïna que s'activa en

presència de  $\text{Cu}^{2+}$ . En aquest vector hi ha dues seqüències específiques (6His o fragment *StrepII*) que permeten la detecció i purificació de les proteïnes expressades.

**pYES2** (Invitrogen) dissenyat per a l'expressió induïda per galactosa, de la proteïna d'interès en *S.cerevisiae*. Conté el gen URA3 per a la selecció del llevat i l'origen de replicació  $2\mu$  per aconseguir un alt número de còpies. Aquest vector conté el promotor GAL1 que està reprimat per glucosa i la transcripció s'activa pel canvi a galactosa com a font de carboni. Per a efectuar el canvi de font de carboni s'utilitza rafinosa que no afecta la transcripció però permet l'activació més ràpida per galactosa.

## V.2.2. Protocols d'introducció de DNA plasmídic a cèl·lules.

### V.2.2.1. Preparació i transformació de cèl·lules d'*E. coli* competents.

#### **Protocol de Hanahan.**

S'utilitza el mètode de Hanahan (Hanahan, 1983) per a la preparació de cèl·lules supercompetents. El procediment consisteix en partir d'un cultiu (O/N, 30°C) de la soca d'*E. coli* corresponent en 5 mL en medi SOB. 0.5 mL d'aquest s'utilitzen per inocular un subcultiu de 200 mL de SOB disposats en un erlenmeyer d'1 L, els quals s'incuben a la mateixa temperatura fins arribar a una  $\text{OD}_{550} = 0.5$ . Després de recollir les cèl·lules per centrifugació, es resuspenen en 20 mL de tampó TFB (10 mM MES pH 6.2, 100 mM RbCl, 45 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3 mM  $(\text{NH}_3)_6\text{CoCl}_3$ ) a 4 °C i s'incuben en gel durant 15 min. S'hi afegeixen 700  $\mu\text{L}$  de DMSO agitant suaument i es mantenen en gel durant 10 min. Seguidament, s'afegeixen 700  $\mu\text{L}$  més de DMSO i després d'incubar en gel durant 5 min addicionals, es fan alíquotes de 0.5 mL en tubs d'1.5 mL, les quals s'emmagatzemen a -80 °C.

**Transformació per xoc tèrmic de cèl·lules d'*E. coli* competents.**

La transformació de les cèl·lules supercompetents es realitza emprant el mètode del xoc tèrmic. Les suspensions de cèl·lules es descongelen i es mantenen a 0°C. Seguidament, s'incuben amb el DNA plasmídic desitjat en un bany de gel durant 15 min. A continuació, es duu a terme el xoc tèrmic incubant a 37 °C durant 5 min i posteriorment en un bany de gel durant 2 min. S'hi afegeixen 800 µL de medi SOC i el cultiu es sembrà en plaques de LB amb selector (ampicil·lina o kanamicina), que s'incuben un mínim de 16 h. Aquest protocol es va modificar en alguns casos, d'acord amb les recomanacions indicades a la documentació proveïda pels *kits* o productes comercials emprats: *Subcloning Efficiency*<sup>TM</sup> DH5α<sup>TM</sup> *Competent Cells* (Invitrogen) i *InsTAclone*<sup>TM</sup> *PCR Cloning Kit* (MBI Fermentas).

**V.2.2.2. Preparació i transformació de cèl·lules de llevat competents.*****Mètode de l'acetat de liti.***

La transformació de les cèl·lules de llevat es realitza seguint el mètode descrit per Ito i col. (Ito et al., 1983) Per tal de transformar les soques *ΔeloI\_ΔoleI* i *ΔoleI* de llevat es genera un cultiu de 50 mL en medi complet que contingui tergitol al 2 %, per dissoldre els àcids oleic i palmitoleic (dissolucions mare 1 M en EtOH) a una concentració final de 0.5 mM. Aquest cultiu s'incuba a 30°C amb agitació a 250 rpm. fins a una densitat òptica d'entre 0.5 i 1 (aquesta densitat òptica s'aconsegueix entre 36 i 48 h després de l'inòcul). Es centrifuga i el residu cel·lular es renta amb 10 mL de tampó TE estèril i tot seguit amb 10 mL de LiOAc a l'1% (150 mM LiOAc, 10 mM Tris, 1 mM EDTA a pH 7.5). El residu es ressuspèn en 1 mL de solució de LiOAc i tot seguit s'afegeixen 100 µL de DNA d'esperma de salmó monocadena. A continuació, s'addicionen 100 µL de la suspensió cel·lular a les construccions de DNA que s'han de transformar i després d'agitar s'afegeixen a cada tub 700 µL de solució LiOAc/PEG acabada de preparar barrejant 9 parts de PEG-3350 al 50% i 1 part de LiOAc 10x (1.5 M LiOAc, 100 mM Tris, 10 mM EDTA a pH 7.5). S'incuba a 30°C durant 30 min en

agitació i posteriorment es fa un xoc tèrmic a 37°C durant 15 min. El residu cel·lular es renta amb TE estèril (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA i ajustar el pH a 8.0) i finalment es reparteix en plaques de medi SAD+tergitol+MUFAs (1.7 g/L de base nitrogenada de llevat, 2% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% d'agar, 2% de glucosa, 40 mg/L de sulfat d'adenina, 0.01 mg/L de triptòfan, 1 g/L d'aminoàcids de digerits de caseïna, 2.5% tergitol i 0.5 mM d'àcids oleic i palmitoleic).

### V.2.3. Preparació de DNA plasmídic d'*E. coli*.

En general, totes les preparacions de DNA plasmídic es van realitzar a partir de cultius d'*E. coli* DH5 $\alpha$  transformats amb el plasmidi corresponent. Per a la purificació de minipreps de DNA es va fer servir el kit Quantum Prep MiniPrep Kit (Bio-Rad) seguint les instruccions del fabricant partint de 5 mL de cultiu crescut durant 16 h a 37°C. Per a la purificació de quantitats més grans de DNA plasmídic es van utilitzar dos tipus de metodologia: una emprant un *kit* comercial (QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen)) seguint les indicacions del fabricant i una segona metodologia utilitzant el procediment de lisi alcalina. Aquest darrer procediment consisteix en seleccionar colònies de cèl·lules transformades per iniciar cultius (5 mL) en medi LB+Amp. Aquests cultius s'incuben durant unes 16 h a 37°C, i a continuació s'empren 0.5 mL per inocular un subcultiu de 50 mL de medi LB+Amp, que es deixava créixer tota la nit en les mateixes condicions. Les cèl·lules es recol·lecten per centrifugació i es ressuspenen en 2.5 mL de TEG (Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). S'hi afegeixen 5 mL d'una dissolució 0.2 M de NaOH-1 % SDS i després d'agitar-ho, es deixa durant 5 min en gel. A continuació s'afegeixen 2.75 mL d'una dissolució 6.2 M de NH<sub>4</sub>OAc pH 5.6 i es deixa durant 10 min en gel. Al sobrenedant resultant de la centrifugació de la solució anterior, s'hi afegeixen 6.9 mL d'alcohol isopropílic i es deixa reposar durant 10 min a temperatura ambient. El precipitat recuperat per centrifugació d'aquesta solució es renta dues vegades amb EtOH 70 % fred. Un cop sec, es redissol en 1.2 mL de TE estèril (Tris - HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM) i es transvasa a un tub d'1.5

mL de tipus Eppendorf. A continuació s'incuba amb 10 µL de RNAsa (DNAsa *free*, 500 µg/mL, Roche) a 37 °C durant 1 h. Posteriorment es purifica el DNA per extracció amb fenol:cloroform (1:1) i precipitació amb etanol. El residu de DNA plasmídic, un cop sec, es ressuspèn en tampó TE o H<sub>2</sub>O estèril.

L'obtenció del DNA desitjat es confirma per digestió amb els enzims de restricció adients en cada cas i posterior electroforesi en gel d'agarosa al 0.8%. La concentració de DNA plasmídic es determina espectrofotomètricament a partir del valor de l'absorbància a 260 nm ( $Abs_{260} = 1$  correspon a una concentració 50 µg/mL de dDNA).

#### **V.2.4. Purificació de DNA plasmídic de *S. cerevisiae*.**

Es feia créixer un cultiu dens de llevat ( $O.D._{600nm} > 1.5$ ) i es centrifugava durant 10 min a 3000xg i a 4°C. Després de rentar el residu amb tampó fosfat potàssic 50 mM a pH=7.5 es ressuspèn el residu en 500 µL d'aquest tampó i s'addicionaven 500 µL de liticasa (1 mg/mL en tampó fosfat potàssic) i RNAsa (1 µL d'una solució 20 mg/mL). S'incubava la mostra una hora a 37°C. Després es centrifugava a 14000xg durant 1 min i a continuació es ressuspèn el residu en 750 µL de tampó de lisi (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM, SDS al 2%) acabat de preparar. S'afegien 150 µL KOAc/HOAc 5 M pH=4.8 i s'incubava durant 1 h en gel. Es centrifugava durant 15 min a 14000xg i es purificava el DNA rentant amb fenol:cloroform i posterior precipitació amb dos volums d'etanol. S'eliminava el dissolvent i es dissolia el residu en tampó TE estèril.

#### **V.2.5. Reaccions de modificació de DNA.**

##### **V.2.5.1. Digestió amb enzims de restricció.**

En general, les mesclades de reacció per les digestions contenien 1 U/µg dels enzims de restricció adequats en cada cas, en un volum final de 10 µL 1x o 2x del tampó de reacció adient, i es deixaven reaccionar durant 4-6 h a 37 °C. En certs casos va ésser necessari dur a terme les digestions dobles de forma

seqüencial, de manera que es va fer una primera digestió amb 1 U/ $\mu$ g de DNA de l'enzim menys eficient en cada cas, generalment O/N a 37°C, i a continuació s'hi afegia 1 U/ $\mu$ g de DNA de la segona endonucleasa de restricció, que es deixava reaccionar durant 4-6 h a 37°C. L'eficiència de la reacció de digestió es va comprovar per electroforesi en gel d'agarosa (de concentració variable depenent de la mida del fragment a separar) d'una alíquota d'1  $\mu$ L de la mescla de reacció.

#### V.2.5.2. Reaccions de desfosforilació.

En alguns casos, al cru de digestió dels vectors s'hi va addicionar 1 U de fosfatasa alcalina *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (1 U/ $\mu$ L, MBI Fermentas) i 5  $\mu$ L del corresponent tampó de reacció. Es va deixar reaccionar durant 30 min a 37°C i es va inactivar l'enzim per tractament tèrmic a 85 °C durant 30 min. Per evitar que pogués quedar fosfatasa alcalina activa que inactivés la reacció de lligació es purificaren els fragments oberts i defosforilats per electroforesi en gel d'agarosa. La concentració de DNA en aquestes mostres es va mesurar espectrofotomètricament.

#### V.2.5.3. Reaccions de lligació.

Les reaccions de lligació es varen efectuar amb T4 DNA lligasa (Invitrogen i New England Biolabs). La quantitat d'insert i de vector emprades es va determinar segons l'equació següent (Sambrook et al., 1989):

$$\text{ng insert} = \{(\text{ng vector} \times \text{mida insert (kb)}) / \text{mida vector (kb)}\} \times \text{relació molar (insert/vector)}$$

Les reaccions es van fer emprant una relació molar 4:1 d'insert respecte vector. Per cada 50 ng de vector s'utilitzà 1 U de T4 DNA lligasa en un volum final de reacció de 20  $\mu$ L amb el tampó adequat. L'incubació es realitzà O/N a 16°C. 10  $\mu$ L de la mescla de reacció s'empraren per a transformar 100  $\mu$ L de cèl·lules *E. coli* DH5 $\alpha$  o 50  $\mu$ L d' *E. coli* *Subcloning Efficiency*<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> *Competent Cells* (Invitrogen).



#### V.2.5.4. Mutagènesi dirigida.

Totes les reaccions de mutagènesi dirigida s'han realitzat amb el *QuickChange<sup>TM</sup> Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), basat en la DNA polimerasa termoestable *PfuTurbo*. Es van seguir totes les recomanacions dels protocols especificats en el *kit* amb petites modificacions. Els oligonucleòtids emprats com a encebadors es van adquirir a MWG-Biotech GmbH, amb puresa HPSF i en quantitats de 0.2 µmol.

Les barreges de reacció es prepararen seguint les instruccions indicades pel fabricant del *kit*, per tal d'assegurar-ne la correcta utilització. El darrer component que s'afegí a la mescla de reacció era 1 µL *PfuTurbo* DNA polimerasa (2.5 U/µL, Stratagene). En general, es feien reaccions emprant 5 ng, 20 ng i 50 ng de DNA motlle i en paral·lel es feien reaccions de control, on no s'hi afegia el DNA motlle. Els paràmetres de la reacció de PCR per a l'obtenció dels mutants van ser els indicats pel fabricant, tot i que es van haver d'ajustar els temps i les temperatures corresponents a l'etapa d'extensió, en funció de la llargada del fragment a amplificar i de la  $T_m$  de l'encebador emprat en cada cas.

Per tal de seleccionar els DNA dels mutants, els crús de les reaccions es tractaren amb 1 µL de *DpnI* (10 U/µL, Stratagene) durant 1 h a 37°C. La *Pfu* polimerasa produeix cadenes de DNA desmetilat. L'endonucleasa *DpnI* es un enzim que destrueix el DNA metilat i semimetilat i permet eliminar de forma selectiva el DNA motlle utilitzat. La introducció de les dianes es va confirmar en cada cas per digestió i posterior seqüenciació del DNA obtingut en fer les corresponents preparacions plasmídiques (veure apartat VII.2.3).

#### V.2.5.5. Reaccions de PCR.

En alguns casos, enlloc de fer les reaccions de mutagènesi dirigida utilitzant *PfuTurbo*® DNA polimerasa s'han fet reaccions de PCR utilitzant la polimerasa Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Les reaccions de PCR es van realitzar utilitzant les condicions indicades pel fabricant: 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de cada encebador, 1 U per reacció de PCR de

DNA polimerasa i 5, 20 i 50 ng de DNA motlle depenent de la reacció. En general, el programa de temperatures emprat consistia en : activació de la PCR durant 2 min a 94°C seguida d'entre 25 o 35 cicles consistent en desnaturalització durant 30 s. a 94°C, anellament durant 30 s. a 55°C (tot i que ser menor en funció de la  $T_m$  dels encebadors utilitzats) i extensió a 72°C durant 1 min per cada kb del fragment a amplificar. Tot seguit es va realitzar una extensió final a 72°C durant 10 min. En general, els crús de reacció es van analitzar per electroforesi en gels d'agarosa, com es descriu a l'apartat següent.

#### **V.2.5.6. Electroforesi de DNA.**

Es van emprar gels d'agarosa (*Medium EEO, for electrophoresis* (Sigma)) de concentracions variables des del 0.8 % fins al 2 %, depenent de la mida del fragment d'interès, en tampó TBE 1x (Tris base 89 mM, àcid bòric 89 mM, EDTA 2 mM) o TAE 1x (Tris base 40 mM, àcid acètic 20 mM a pH 8.0, EDTA 1 mM) els quals contenen 0.5 µg/mL de bromur d'etidi (Sigma). En cada cas, es preparà una mostra addicional amb el marcador de pes molecular *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (0.5 mg/mL) o bé *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus* (0.5 mg/mL) (MBI Fermentas). Les mostres es preparen per l'addició de la quantitat adequada de tampó de càrrega blau de bromofenol (6x) fins a una concentració final 1x. Un cop aplicades les mostres, les electroforesis es desenvoluparen en TAE 1x o bé TBE 1x a un voltatge d'entre 40 i 90 V, depenent del fragment a separar, fent servir com a referència el front de blau de bromofenol.

#### **V.2.5.7. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa.**

Per purificar els fragments separats per electroforesi s'utilitzà el kit d'extracció *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguint les instruccions del fabricant. Quan va ser necessari, es va afegir un pas de precipitació etanòlica i redissolució en aigua o tampó TE estèril. Les concentracions finals de DNA en les mostres es va determinar espectrofotomètricament.

### **V.3. Extracció d'àcids grassos dels cultius de llevat i metanolització.**

Es centrifuguen 2 mL de cultiu de llevat a 3000 rpm durant 5 min i a temperatura ambient. Es descarta el sobrenedant. Al residu s'addiciona 1 mL d'H<sub>2</sub>O milliQ, s'agita, es centrifuga a 1000xg durant 5 min i es descarta el sobrenedant. Es repeteix aquest pas una segona vegada procurant eliminar l'H<sub>2</sub>O al màxim. Per extreure els àcids grassos, el residu de cèl·lules es tracta amb 1 mL d'una barreja de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1) durant 1 hora i en agitació. Tot seguit, es centrifuga a 14000xg durant 5 min i es transvasa el sobrenedant a un vial net i s'evapora el dissolvent amb corrent de nitrogen. Sobre el residu resultant s'afegeixen 0.5 mL de KOH en MeOH (0.5 M) i es deixa reaccionar durant 30 min. S'acidifica emprant HCl 1 N i s'addiciona el patró intern (acetat de dodecil 0.5 µg) i s'extreu emprant hexà. Es transvasa la fase orgànica a un nou vial, s'evapora el dissolvent amb nitrogen i es posteriorment es fa un tractament amb diazometà per tal de metilar els àcids grassos.

### **V.4. Anàlisi dels extractes lipídics.**

#### **V.4.1. Preparació de derivats DMDS.**

L'extracte lipídic metanolitzat es tracta amb 10 µl de I<sub>2</sub> (60 mg/ml) i 50 µl de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub> durant 36-48 h i a 50°C (Buser et al., 1983). Finalitzat el temps de reacció, s'elimina l'excés de I<sub>2</sub> afegint NaHSO<sub>3</sub> i posteriorment es fan rentats amb H<sub>2</sub>O miliQ. Els lípids s'extreuen emprant hexà i s'analitzen per GC-MS.

#### **V.4.2. Preparació d'adductes de MTAD.**

Sobre 10 µl d'extracte lipídic metanolitzat dissolt en hexà s'addicionen 2.5 µl de 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (1.2 mg/ml dissolta en èter etílic). La reacció és gairebé immediata (Dobson, 1998). Aquest extracte s'analitza directament per GC-MS.

### **V.4.3. Anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses.**

S'analitzaren les mostres en un equip de GC-MS, Trace MS ThermoQuest equipat amb una columna HP-5MS i emprant heli com a gas portador. El volum injectat era d'1  $\mu\text{L}$  en mode *splitless*. L'injector es trobava a una temperatura de 280°C amb el següent programa de temperatures del forn: 80°C, 5°C/min fins a 300°C i 300°C durant 10 min. Aquest programa de temperatures es modificà per analitzar els extractes dels llevats transformats amb la dessaturasa de *T. pityocampa* de manera que la rampa començava a 80°C a 2°C/min fins a 300°C i 300°C durant 10 min. Paràmetres del detector: voltatge 350 V, temps d'escombratge de 0.9 segons i rang de masses d'escombratge de 40 a 450 amu.

Per a l'anàlisi dels derivats de MTAD i DMDS s'empraren unes condicions cromatogràfiques diferents. La temperatura inicial del forn va ser de 80°C amb una primera rampa des de 80°C a 200°C a 5°C/min, una segona rampa des de 200°C a 300°C a 10°C/min i 300°C durant 20 min. El rang de masses utilitzat emprat en aquest cas va ser de 40 a 550 amu.

## **V.5. Anàlisi d'expressió de la dessaturasa en llevat i bacteri.**

### **V.5.1. Extracció de proteïnes de llevat.**

Per a fer l'electroforesi en gel SDS-PAGE dels cultius de *S. cerevisiae*  $\Delta\text{elo1}\Delta\text{ole1}$ , transformats per expressar dessaturases d'insecte, un cop centrifugats es ressuspensia el residu cel·lular amb tampó de lisi preparat recentment (per a 5 mL es barrejaren 0.5 mL de SDS 20% (p/v), 1 mL de glicerol al 50% (v/v), 25  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 N, 20  $\mu\text{L}$  EDTA 0.5 M, 0.25 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, 50  $\mu\text{L}$  de PMSF i fins a 5 mL amb H<sub>2</sub>O miliQ). Es portava a ebullició al voltant de 100°C durant 5 min i a les mostres s'hi afegien 4.5  $\mu\text{L}$  d'HCl 1 N per cada 100  $\mu\text{L}$  de tampó de lisi. Es centrifugava i es transferia el sobrenedant a un nou tub. S'hi afegien 2-3  $\mu\text{L}$  de blau de bromofenol i les mostres s'aplicaven directament al gel d'acrilamida.

### V.5.2. Extracció de proteïnes de bacteri.

Es van fer créixer cultius fins a una O.D. a 600 nm de 0.6 i tot seguit s'addicionà IPTG fins a una concentració final d'1 mM. S'agafaren mostres d'1 mL a diferents temps d'inducció des de t=0 fins a t=6 h en intervals de 2 h. Les mostres es centrifugaren a 3800xg durant 5 min i a 4°C i es guardaren els precipitats cel·lulars a -20°C. Es preparà una dissolució de 2 mL de NETN (0.05% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) amb 2 µL de DTT 1000x i 2 µL d'inhibidors de proteases 1000x (0.5 mg/mL leupeptina, 0.5 mg/mL aprotinina, 0.5 mg/mL quimostatina, 0.5 mg/mL antipaina i 0.5 mg/mL pepstatina en 1 mL de DMSO). Les mostres es tractaren amb 100 µL d'aquesta dissolució de NETN i es congelaren en N<sub>2</sub> líquid. Immediatament es posaren les mostres a 42°C per descongelar-les completament. Es repetí quatre vegades més el procés de congelació i descongelació per aconseguir un trencament òptim de les cèl·lules d'*E. coli*. S'addicionà a les mostres tampó 2X SDS-PAGE (2.5 mL de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 0.4 g de SDS, 2 mL de glicerol, 0.2 mL de β-mercaptoetanol o DTT i 0.1 mg de blau de bromofenol i H<sub>2</sub>O miliQ fins a 10 mL) i al voltant de 15 µL de mostra es varen aplicar a un gel d'acrilamida per a la separació de proteïnes.

### V.5.3. Electroforesi SDS-PAGE.

L'aparell utilitzat fou un Miniprotean (BioRad). Es van analitzar alíquotes d'uns 15 µL de l'extracte proteic. Per a la preparació dels gels, el tampó del gel concentrador era Tris-HCl 1 M a pH 6.5 i el gel concentrador al 5% tenia la següent composició (per a preparar dos gels de 0.75 mm de gruix): 0.625 mL de tampó, 0.833 mL d'acrilamida/bisacrilamida al 30 % (29 : 1), 5 µL de TEMED, 50 µL d'APS al 10% (p/v) i H<sub>2</sub>O miliQ fins a 5 mL). El tampó del gel separador era Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8. El gel separador es va preparar al 12 % amb la següent composició (per dos gels de 0.75 mm de gruix): 2.5 mL de tampó, 4 mL d'acrilamida/bisacrilamida al 30 % (29 : 1), 5 µL de TEMED, 100

$\mu\text{L}$  d'APS al 10% (p/v), 100  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% (p/v) i  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ fins a un volum de 10 mL).

La composició del tampó d'electroforesi era la següent: 1.92 M de glicina, 0.25 M de Tris-HCl 0.25 M a pH entre 8.3 i 8.8 i SDS al 10%. La separació es realitza a 100 mA en el gel concentrador i a 200 mA en el gel separador.

#### **V.5.4. Tinció amb blau de Coomassie.**

Aquesta tinció va ser utilitzada per a la detecció de proteïnes en els gels d'acrilamida (Ausubel et al., 1995). Es fixaren les proteïnes durant 15 min amb blau de Coomassie al 0.18% en una solució al 25 % de metanol i al 10 % d'àcid acètic glacial. Es destenyí el gel amb metanol al 25 % i àcid acètic al 10 % fins a observar bé les bandes proteiques.

#### **V.5.5. Anàlisi per *Western blot*.**

Una vegada realitzada la separació de les proteïnes per electroforesi, aquestes es van de transferir des de gels d'acrilamida a membranes de nitrocel·lulosa (0.45  $\mu\text{m}$ ). S'emprà el sistema de transferència en fase líquida Mini Trans-Blot Cell (BioRad). S'equilibra el gel durant 15 min en tampó de transferència (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM i metanol al 20%), la qual es va fer a 350 mA durant 1 h a 4°C. El tampó ha d'estar en agitació constant per tal d'evitar l'escalfament.

##### **V.5.5.1. Immunodetecció.**

Es va incubar la membrana de nitrocel·lulosa que conté les proteïnes transferides durant 30 min amb un 10 % de llet en pols desnatada en PBST (10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl i Tween 20 al 0.1% (v/v)) a temperatura ambient o bé O/N a 4°C i a continuació es va fer un rentat durant 5 min amb PBST. Després s'incubà amb l'anticòs primari anti-6His (Amersham Biosciences) en dissolució 1:3000 en 3% de llet en pols en PBST

durant 1 h a temperatura ambient i seguidament es van fer tres rentats de 5 min amb PBST. Tot seguit es va incubar amb l'anticòs secundari anti-IgG (Amersham Biosciences) de ratolí lligat a peroxidasa de rave picant en dissolució 1:10000 en 3 % de llet en pols en PBST durant 45-60 min a temperatura ambient. Es van fer tres rentats de 5 min amb PBST. La detecció es va fer amb el *kit* ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant.





## **VI. BIBLIOGRAFIA**

---

---



- Abad, J.L., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Is hydrogen tunneling involved in acyl-CoA desaturase reactions? The case of a delta-9 desaturase that transforms (*E*)-11-tetradecenoic acid into (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic acid. *Angew Chem* **39** (2000) 3279-3281.
- Abad, J.L., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Stereospecificity of the (*Z*)-9 desaturase that converts (*E*)-11-tetradecenoic acid into (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic acid in the biosynthesis of *Spodoptera littoralis* sex pheromone. *Insect Biochem Mol Biol* **31** (2001) 799-803.
- Abad, J.L., Villorbina, G., Fabriàs, G. and Camps, F.:** Synthesis of fluorinated analogs of myristic acid as potential inhibitors of Egyptian armyworm (*Spodoptera littoralis*) delta-11 desaturase. *Lipids* **38** (2003) 865-71.
- Abad, J.L., Villorbina, G., Fabriàs, G. and Camps, F.:** Synthesis and use of stereospecifically deuterated analogues of palmitic acid to investigate the stereochemical course of the delta-11 desaturase of the processionary moth. *J Org Chem.* **69** (2004) 7108-13.
- Alexandre, H., Mathieu, B. and Charpentier, C.:** Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H(+)-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology.* **142** (1996) 469-75.
- Ando, T., Ikemoto, K., Ohno, R. and Yamamoto, M.:** Stereochemistry of delta-11 desaturation and inhibitors of delta-10,12 desaturation in the biosynthesis of bombykol, sex pheromone of the female silkworm moth, examined with deuterated precursors. *Arch Insect Biochem Physiol* **37** (1998) 8-16.
- Ando, T., Inomata, S. and Yamamoto, M.:** Lepidopteran sex pheromones, *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I.* Springer, Berlin / Heidelberg, 2004, pp. 51-96.
- Arsequell, G., Fabriàs, G. and Camps, F.:** Sex pheromone biosynthesis in the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by delta-13 desaturation. *Arch Insect Biochem Physiol.* **14** (1990) 47-56.
- Arsequell, G., Fabriàs, G., Gosalbo, L. and Camps, F.:** Synthesis of inhibitors of a delta-11 desaturase in the moth *Spodoptera littoralis*. *Chem Phys Lipids* **63** (1992) 149-158.
- Attygalle, A., Blankespoor, C., Eisner, T. and Meinwald, J.:** Biosynthesis of a defensive insect alkaloid: Epilachnene from oleic acid and serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994) 12790-12793.
- Attygalle, A.B., Svatos, A., Veith, M., Farmer, J.J., Meinwald, J., Smedley, S., Gonzalez, A. and Eisner, T.:** Biosynthesis of epilachnene, a macrocyclic defensive alkaloid of the Mexican bean beetle. *Tetrahedron* **55** (1999) 955-966.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.:** Short Protocols in Molecular Biology, 3th Edition ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- Barrot, M., Fabriàs, G. and Camps, F.:** Synthesis of [16,16,16-2H<sub>3</sub>] 11-hexadecynoic acid and [15,15,16,16,16-2H<sub>5</sub>] (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic acid and their use as tracers in a key step of the sex pheromone biosynthesis of the processionary moth. *Tetrahedron* **50** (1994) 9789-9796.
- Behrouzian, B. and Buist, P.H.:** Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Curr Opin Chem Biol* **6** (2002) 577-82.
- Behrouzian, B., Savile, C.K., Dawson, B., Buist, P.H. and Shanklin, J.:** Exploring the hydroxylation-dehydrogenation connection: novel catalytic activity of castor stearyl-ACP Delta(9) desaturase. *J Am Chem Soc* **124** (2002) 3277-3283.
- Berger, R.S.:** Isolation identification and synthesis of sex attractant of cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Ann Entomol Soc Am.* **59** (1966) 767-771.
- Bjostad, L.B., Linn, C.E., Du, J.W. and Roelofs, W.L.:** Identification of new sex-pheromone components in *Trichoplusia ni*, predicted from biosynthetic precursors. *J Chem Ecol* **10** (1984) 1309-1323.
- Bjostad, L.B. and Roelofs, W.L.:** Sex pheromone biosynthesis in *Trichoplusia ni*: key steps involve delta-11 desaturation and chain-shortening. *Science* **220** (1983) 1387-1389.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. and Fink, G.R.:** 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154** (1987) 164-75.
- Bossie, M.A. and Martin, C.E.:** Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J Bacteriol* **171** (1989) 6409-13.
- Bradford, M.M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72** (1976) 248-54.
- Broadwater, J.A., Whittle, E. and Shanklin, J.:** Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. *J Biol Chem* **277** (2002) 15613-20.
- Buist, P.H.:** Catalytic diversity of fatty acid desaturases. *Tetrahedron: Asymmetry Integrating Biocatalysis into Organic Syntheses* **15** (2004a) 2779-2785.
- Buist, P.H.:** Fatty acid desaturases: selecting the dehydrogenation channel. *Nat Prod Rep* **21** (2004b) 249-62.
- Buist, P.H. and Behrouzian, B.:** Deciphering the cryptoregiochemistry of oleate delta-12 desaturase: A kinetic isotope effect study. *J Am Chem Soc* **120** (1998) 871-876.
- Buser, H.R., Arn, H., Guerin, P. and Rauscher, S.:** Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimetil disulfide adducts. *Anal Chem* **55** (1983) 818-822.
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D. and Hecker, E.:** Uber den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori* - Reindarstellung und

- konstitution. Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete **14** (1959) 283-284.
- Butenandt, A. and Hecker, E.:** Synthese des bombykols, des sexual-lockstoffes des seidenspinners, und seiner geometrischen isomeren. Angew Chem Int Ed Engl **73** (1961) 349-353.
- Butler, C.G.:** The scent of Queen honeybees (*A. Mellifera* L) that causes partial inhibition of Queen rearing. J Insect Physiol **7** (1961) 258-264.
- Cahoon, E.B., Carlson, T.J., Ripp, K.G., Schweiger, B.J., Cook, G.A., Hall, S.E. and Kinney, A.J.:** Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. Proc Natl Acad Sci U S A **96** (1999) 12935-12940.
- Cahoon, E.B., Ripp, K.G., Hall, S.E. and Kinney, A.J.:** Formation of conjugated delta-8, delta-10 double bonds by delta-12 oleic-acid desaturase-related enzymes - Biosynthetic origin of calendic acid. J Biol Chem **276** (2001) 2637-2643.
- Cahoon, E.B., Schnurr, J.A., Huffman, E.A. and Minto, R.E.:** Fungal responsive fatty acid acetylenases occur widely in evolutionarily distant plant families. Plant J **34** (2003) 671-83.
- Carlsson, A.S., Thomaes, S., Hamberg, M. and Stymne, S.:** Properties of two multifunctional plant fatty acid acetylenase/desaturase enzymes. Eur J Biochem **271** (2004) 2991-7.
- Carvalho, F., Gauthier, L.T., Hodgson, D.J., Dawson, B. and Buist, P.H.:** Quantitation of hydroxylated byproduct formation in a *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 desaturating system. Org Biomol Chem. **3** (2005) 3979-83.
- Choi, J.Y., Stuke, J., Hwang, S.Y. and Martin, C.E.:** Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. J Biol Chem **271** (1996) 3581-9.
- Cronan, J.E., Jr. and Gelmann, E.P.:** An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of *Escherichia coli*. J Biol Chem **248** (1973) 1188-1195.
- Dailey, H.A. and Strittmatter, P.:** Structural and functional properties of the membrane binding segment of cytochrome b5. J Biol Chem **253** (1978) 8203-9.
- Darnet, S. and Rahier, A.:** Enzymological properties of sterol-C4-methyl-oxidase of yeast sterol biosynthesis. Biochim Biophys Acta **1633** (2003) 106-17.
- Dobson, G.:** Identification of conjugated fatty acids by gas chromatography mass spectrometry of 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione adducts. J Am Oil Chem Soc **75** (1998) 137-142.
- Dunkelblum, E. and Kehat, M.:** Sex pheromone precursors in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Biochem **17** (1987) 877-881.
- Esfahani, M., Kucirka, E.M., Timmons, F.X., Tyagi, S., Lord, A.E., Jr. and Henry, S.A.:** Effect of exogenous fatty acids on growth, membrane

- fluidity, and phospholipid fatty acid composition in yeast. *J Supramol Struct Cell Biochem.* **15** (1981) 119-28.
- Etcheverry, T.:** Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. *Methods Enzymol.* **185** (1990) 319-29.
- Fabriàs, G., Arsequell, G. and Camps, F.:** Sex-pheromone precursors in the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Thaumetopoeae). *Insect Biochem* **19** (1989) 177-181.
- Fabriàs, G., Barrot, M. and Camps, F.:** Control of the sex pheromone biosynthetic pathway in *Thaumetopoea pityocampa* by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Insect Biochem Mol Biol* **25** (1995) 655-660.
- Fabriàs, G., Marco, M.P. and Camps, F.:** Effect of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide on sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis* isolated glands. *Arch Insect Biochem Physiol* **27** (1994) 77-87.
- Fabriàs, G., Rodríguez, S., Camps, F. and B., P.:** Method of producing polyunsaturated fatty acids with yeasts through the incorporation of olefinic or acetylenic substrates. CONSEJO SUP DE INVEST CIENTIFI (ES), España, 2004.
- Fang, N.B., Teal, P.E.A., Doolittle, R.E. and Tumlinson, J.H.:** Biosynthesis of conjugated olefinic systems in the sex-pheromone gland of female tobacco hornworm moths, *Manduca sexta* (L). *Insect Biochem Mol Biol* **25** (1995) 39-48.
- Foster, S.P. and Roelofs, W.L.:** Sex pheromone biosynthesis in the tortricid moth, *Ctenopseustis herana* (Felder & Rogenhofer). *Arch Insect Biochem Physiol* **33** (1996) 135-147.
- Fox, B.G., Lyle, K.S. and Rogge, C.E.:** Reactions of the diiron enzyme stearoyl-acyl carrier protein desaturase. *Acc Chem Res* **37** (2004) 421-9.
- Fox, B.G., Shanklin, J., Ai, J., Loehr, T.M. and Sanders-Loehr, J.:** Resonance Raman evidence for an Fe-O-Fe center in stearoyl-ACP desaturase. Primary sequence identity with other diiron-oxo proteins. *Biochemistry.* **33** (1994) 12776-86.
- Fox, B.G., Shanklin, J., Somerville, C. and Munck, E.:** Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** (1993) 2486-90.
- Fukuzawa, M., Fu, X., Tatsuki, S. and Ishikawa, Y.:** cDNA cloning and in situ hybridization of delta-11 desaturase, a key enzyme of pheromone biosynthesis in *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J Insect Physiol* **14** (2005) 14.
- Geeraert, L., Mannaerts, G.P. and van Veldhoven, P.P.:** Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J.* **327** (1997) 125-32.
- González, C.I. and Martín, C.E.:** Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript. *J Biol Chem* **271** (1996) 25801-9.

- Gosalbo, L., Fabrias, G., Arsequell, G. and Camps, F.: Inhibition of sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis* by cyclopropene fatty acids. *Insect Biochem Mol Biol* **22** (1992) 687-690.
- Guerrero, A., Camps, F., Coll, J., Riba, M., Einhorn, J., Descoins, C. and Lallemand, J.Y.: Identification of a potential sex-pheromone of the processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Notodontidae). *Tetrahedron Lett* **22** (1981) 2013-2016.
- Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166** (1983) 557-80.
- Hao, G., Liu, W., O'Connor, M. and Roelofs, W.: Acyl-CoA Z9- and Z10-desaturase genes from a New Zealand leafroller moth species, *Planotortrix octo*. *Insect Biochem Mol Biol* **32** (2002a) 961-6.
- Hao, G., O'Connor, M., Liu, W. and Roelofs, W.L.: Characterization of Z/E11- and Z9-desaturases from the obliquebanded leafroller moth, *Choristoneura rosaceana*. *J Insect Sci* **2** (2002b) 1-7.
- Hazel, J.R. and Williams, E.E.: The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res.* **29** (1990) 167-227.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A.: Yeast/*E.coli* Shuttle Vectors with Multiple Unique Restriction Sites. *Yeast* **2** (1986) 163-167.
- Holz, C., Hesse, O., Bolotina, N., Stahl, U. and Lang, C.: A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **25** (2002) 372-8.
- Iglesias, F., Marco, P., Francois, M.C., Camps, F., Fabrias, G. and Jacquín-Joly, E.: A new member of the PBAN family in *Spodoptera littoralis*: molecular cloning and immunovisualisation in scotophase hemolymph. *Insect Biochem Mol Biol* **32** (2002) 901-8.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153** (1983) 163-8.
- Jeong, S.E., Rosenfield, C.L., Marsella-Herrick, P., Man You, K. and Knipple, D.C.: Multiple acyl-CoA desaturase-encoding transcripts in pheromone glands of *Helicoverpa assulta*, the oriental tobacco budworm. *Insect Biochem Mol Biol* **33** (2003) 609-22.
- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Gilooly, L., McDaid, K., Oh, C.-S., Martin, C.E. and Goldberg, M.A.: Mga2p Processing by Hypoxia and Unsaturated Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Impact on LORE-Dependent Gene Expression. *Eukaryotic Cell* **1** (2002) 481-490.
- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E. and Goldberg, M.A.: MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21** (2001) 6161-9.
- Jurenka, R.: Insect pheromone biosynthesis, *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*. Springer, Berlin/Heidelberg, 2004, pp. 97-131.
- Kennedy, J.S. and Thomas, A.A.G.: Behavior of some low-flying aphids in wind. *Ann Appl Biol* **76** (1974) 143-159.
- Knipple, D., Rosenfield, C., Miller, S.J., Liu, W., Tang, J., Ma, P.W.K. and Roelofs, W.L.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a

- pheromone gland-specific acyl-CoA  $\Delta^{11}$ -desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) 15287-15292.
- Knipple, D.C. and Roelofs, W.L.:** Molecular biological investigations of pheromone desaturases. In: Blomquist, G.J.V., Richard G. (Ed.), Insect pheromone biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromone and plant volatiles. Elsevier; Amsterdam, Boston etc., 2003.
- Knipple, D.C., Rosenfield, C.L., Nielsen, R., You, K.M. and Jeong, S.E.:** Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. Genetics **162** (2002) 1737-52.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M.:** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. **17** (2001) 1244-5.
- Lee, A.G.:** How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta. **1666** (2004) 62-87.
- Lee, M., Lenman, M., Banas, A., Bafor, M., Singh, S., Schweizer, M., Nilsson, R., Liljenberg, C., Dahlqvist, A., Gummeson, P.O., Sjodahl, S., Green, A. and Stymne, S.:** Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. Science **280** (1998) 915-8.
- Levene, H.:** Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I. (Ed.), Contributions to probability and statistics. Stanford University Press, Palo Alto, CA, 1960, pp. 278-292.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G. and Shanklin, J.:** Crystal structure of delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. Embo J. **15** (1996) 4081-92.
- Liu, W., Jiao, H., Murray, N.C., O'Connor, M. and Roelofs, W.L.:** Gene characterized for membrane desaturase that produces (*E*)-11 isomers of mono- and diunsaturated fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A **99** (2002a) 620-4.
- Liu, W., Jiao, H., O'Connor, M. and Roelofs, W.L.:** Moth desaturase characterized that produces both *Z* and *E* isomers of delta-11 tetradecenoic acids. Insect Biochem Mol Biol **32** (2002b) 1489-95.
- Liu, W., Ma, P.W., Marsella-Herrick, P., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. and Roelofs, W.:** Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA delta 9-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Insect Biochem Mol Biol **29** (1999) 435-43.
- Liu, W., Rooney, A.P., Xue, B. and Roelofs, W.L.:** Desaturases from the spotted fireworm moth (*Choristoneura parallela*) shed light on the evolutionary origins of novel moth sex pheromone desaturases. Gene **342** (2004) 303-11.
- Löfstedt, C. and Bengtsson, M.:** Sex-pheromone biosynthesis of (*E,E*)-8,10-dodecadienol in codling moth *Cydia pomonella* involves *E9* desaturation. J Chem Ecol **14** (1988) 903-915.
- Los, D.A. and Murata, N.:** Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochim Biophys Acta **1394** (1998) 3-15.



- Lyle, K.S., Moenne-Loccoz, P., Ai, J., Sanders-Loehr, J., Loehr, T.M. and Fox, B.G.: Resonance Raman studies of the stoichiometric catalytic turnover of a substrate-stearoyl-acyl carrier protein delta-9 desaturase complex. *Biochemistry* **39** (2000) 10507-13.
- Mahfouz, M.M., Valicenti, A.J. and Holman, R.T.: Desaturation of isomeric *trans*-octadecenoic acids by rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*. **618** (1980) 1-12.
- Mansilla, M.C. and de Mendoza, D.: The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol* **183** (2005) 229-35.
- Martínez, T., Fabriàs, G. and Camps, F.: Sex pheromone biosynthetic pathway in *Spodoptera littoralis* and its activation by a neurohormone. *J Biol Chem* **265** (1990) 1381-7.
- Miller, S.J., Knipple, D.C. and Roelofs, W.L.: New isolated acyl-CoA desaturase - obtained from the pheromone glands of insects, used for the production of unsaturated fatty acyl-CoA products which can be used for pheromone production. CORNELL RES FOUND INC (CORR), United States, 1999.
- Mitchell, A.G. and Martin, C.E.: A novel cytochrome b(5)-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase. *J Biol Chem* **270** (1995) 29766-29772.
- Mitchell, A.G. and Martin, C.E.: Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. *J Biol Chem* **272** (1997) 28281-8.
- Mitoma, J. and Ito, A.: The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum. *Embo J.* **11** (1992) 4197-203.
- Moto, K.i., Suzuki, M.G., Hull, J.J., Kurata, R., Takahashi, S., Yamamoto, M., Okano, K., Imai, K., Ando, T. and Matsumoto, S.: Involvement of a bifunctional fatty-acyl desaturase in the biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*, sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004) 8631-8636.
- Navarro, I., Font, I., Fabriàs, G. and Camps, F.: Stereospecificity of the (E)- and (Z)-11 myristoyl-CoA desaturases in the biosynthesis of *Spodoptera littoralis* sex pheromone. *J Am Chem Soc* **119** (1997a) 11335-11336.
- Navarro, I., Mas, E., Fabriàs, G. and Camps, F.: Identification and biosynthesis of (E,E)-10,12-tetradecadienyl acetate in *Spodoptera littoralis* female sex pheromone gland. *Bioorg Med Chem* **5** (1997b) 1267-74.
- Ntambi, J., Buhrow, S., Kaestner, K., Christy, R., Sibley, E., Kelly, T., Jr and Lane, M.: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* **263** (1988) 17291-17300.
- Ohnishi, A., Hull, J.J. and Matsumoto, S.: Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006) 4398-4403.

- Patlak, M.:** Insect Pheromones: Chemicals of Communication, National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 2003.
- Pinilla, A., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Cryptoregiochemistry of the delta-11 myristoyl-CoA desaturase involved in the biosynthesis of *Spodoptera littoralis* sex pheromone. *Biochemistry* **38** (1999) 15272-15277.
- Que, L. and Dong, Y.:** Modeling the Oxygen Activation Chemistry of Methane Monooxygenase and Ribonucleotide Reductase. *Acc Chem Res* **29** (1996) 190-196.
- Quero, C., Malo, E.A., Fabrias, G., Camps, F., Lucas, P., Renou, M. and Guerrero, A.:** Reinvestigation of female sex pheromone of processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*): No evidence for minor components. *J Chem Ecol* **23** (1997) 713-726.
- Rahier, A.:** Deuterated delta-7-cholestenol analogues as mechanistic probes for wild-type and mutated delta-7 sterol-C5(6)-desaturase. *Biochemistry* **40** (2001) 256-267.
- Reed, D.W., Polichuk, D.R., Buist, P.H., Ambrose, S.J., Sasata, R.J., Savile, C.K., Ross, A.R.S. and Covello, P.S.:** Mechanistic study of an improvable reaction: alkene dehydrogenation by the  $\Delta^{12}$  acetylenase of *Crepis alpina*. *J Am Chem Soc* **125** (2003) 10635-40.
- Rodríguez, F., Hallahan, D.L., Pickett, J.A. and Camps, F.:** Characterization of the delta-11 palmitoyl-CoA desaturase from *Spodoptera littoralis* (lepidoptera: noctuidae). *Insect Biochem Mol Biol* **22** (1992) 143-148.
- Rodríguez, S.:** Dessaturases de membrana: estudis mecànistics, clonatge i aplicacions biotecnològiques, Departament de Química Orgànica Biològica. Universitat de Barcelona, Barcelona, 2003, pp. 324.
- Rodríguez, S., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Synthesis of gem-dideuterated tetradecanoic acids and their use in investigating the enzymatic transformation of (Z)-11-tetradecenoic acid into (E,E)-10,12-tetradecadienoic acid. *J Org Chem* **66** (2001) 8052-8.
- Rodríguez, S., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Inhibition of the acyl-CoA desaturases involved in the biosynthesis of *Spodoptera littoralis* sex pheromone by analogs of 10,11-methylene-10-tetradecenoic acid. *Insect Biochem Mol Biol*. **34** (2004a) 283-9.
- Rodríguez, S., Clapes, P., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Stereospecificity of an enzymatic monoene 1,4-dehydrogenation reaction: Conversion of (Z)-11-tetradecenoic acid into (E,E)-10,12-tetradecadienoic acid. *J Org Chem*. **67** (2002) 2228-2233.
- Rodríguez, S., Hao, G., Liu, W., Piña, B., Rooney, A.P., Camps, F., Roelofs, W.L. and Fabriàs, G.:** Expression and evolution of delta-9 and delta-11 desaturase genes in the moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem Mol Biol* **34** (2004b) 1315-1328.
- Roelofs, W., Comeau, A., Hill, A. and Milicevic, G.:** Sex attractant of the codling moth: Characterization with electroantennogram technique. *Science* **174** (1971) 297-299.
- Roelofs, W.L.:** Chemistry of sex attraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1995) 44-9.

- Roelofs, W.L., Liu, W., Hao, G., Jiao, H., Rooney, A.P. and Linn, C.E., Jr.: Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002) 13621-6.
- Roelofs, W.L. and Rooney, A.P.: Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003) 9179-9184.
- Rosenfield, C.L., You, K.M., Marsella-Herrick, P., Roelofs, W.L. and Knipple, D.C.: Structural and functional conservation and divergence among acyl-CoA desaturases of two noctuid species, the corn earworm, *Helicoverpa zea*, and the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Mol Biol* **31** (2001) 949-64.
- Saitou, N. and Nei, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4** (1987) 406-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Savile, C.K., Fabriàs, G. and Buist, P.H.: Dihydroceramide delta-4 desaturase initiates substrate oxidation at C-4. *J Am Chem Soc* **123** (2001) 4382-5.
- Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W.W., Shewry, P.R. and Napier, J.A.: Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b<sub>5</sub> domain results in the accumulation of high levels of  $\Delta^6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 4211-4216.
- Schneider, D.: Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia* **13** (1957) 89-91.
- Schneiter, R., Tatzler, V., Gogg, G., Leitner, E. and Kohlwein, S.D.: Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 delta-9 to C16:1 delta-11 fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182** (2000) 3655-60.
- Serra, M., Piña, B., Bujons, J., Camps, F. and Fabriàs, G.: Biosynthesis of 10,12-dienoic fatty acids by a bifunctional delta-11 desaturase in *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem Mol Biol.* **36** (2006) 634-41.
- Shanklin, J. and Cahoon, E.B.: Desaturation and related modification in fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49** (1998) 611-641.
- Shanklin, J., Whittle, E. and Fox, B.G.: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33** (1994) 12787-94.
- Shorey, H.H., Gaston, L.K. and Saario, C.A.: Sex pheromones of noctuid moths .14. Feasibility of behavioral control by disrupting pheromone communication in cabbage loopers. *J Econ Entomol* **60** (1967) 1541-45.
- Shu, L., Nesheim, J.C., Kauffmann, K., Munck, E., Lipscomb, J.D. and Que, L., Jr.: An Fe<sub>2</sub>IVO<sub>2</sub> diamond core structure for the key intermediate Q of methane monooxygenase. *Science* **275** (1997) 515-518.
- Sperling, P. and Heinz, E.: Desaturases fused to their electron donor. *Eur J Lipid Sci Technol* **103** (2001) 158-180.

- Sperling, P., Lee, M., Girke, T., Zahringer, U., Stymne, S. and Heinz, E.:** A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b<sub>5</sub> superfamily. *Eur J Biochem* **267** (2000) 3801-11.
- Sperling, P., Zahringer, U. and Heinz, E.:** A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome b<sub>5</sub> fusion protein. *J Biol Chem* **273** (1998) 28590-6.
- Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M.J., Setlow, B. and Redline, R.:** Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **71** (1974) 4565-9.
- Strittmatter, P., Thiede, M.A., Hackett, C.S. and Ozols, J.:** Bacterial synthesis of active rat stearyl-CoA desaturase lacking the 26-residue amino-terminal amino acid sequence. *J Biol Chem* **263** (1988) 2532-5.
- Student:** The probable error of a mean. *Biometrika* **6** (1908) 1-25.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M. and Martin, C.E.:** Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264** (1989) 16537-16544.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M. and Martin, C.E.:** The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\Delta^9$  fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* **265** (1990) 20144-20149.
- Swan, T.M. and Watson, K.:** Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can J Microbiol.* **43** (1997) 70-7.
- Taton, M., Husselstein, T., Benveniste, P. and Rahier, A.:** Role of highly conserved residues in the reaction catalyzed by recombinant delta-7 sterol-C5(6)-desaturase studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39** (2000) 701-11.
- Tegoni, M., Campanacci, V. and Cambillau, C.:** Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem Sci.* **29** (2004) 257-64.
- Thiede, M., Ozols, J. and Strittmatter, P.:** Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem* **261** (1986) 13230-13235.
- Thiede, M. and Strittmatter, P.:** The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA. *J Biol Chem* **260** (1985) 14459-14463.
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J. and Cossins, A.R.:** Cold-induced expression of delta-9 desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science.* **271** (1996) 815-8.
- Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A. and Blomquist, G.J.:** Insect pheromones-an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem Mol Biol* **29** (1999) 481-514.
- Toke, D.A. and Martin, C.E.:** Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271** (1996) 18413-22.

- Tung, B., Unger, E., Levin, B., Brasitus, T. and Getz, G.:** Use of an unsaturated fatty acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae* to modify the lipid composition and function of mitochondrial membranes. *J Lipid Res.* **32** (1991) 1025-1038.
- Vasconcelles, M.J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C.E. and Goldberg, M.A.:** Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J Biol Chem* **276** (2001) 14374-84.
- Velick, S.F. and Strittmatter, P.:** The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. *J Biol Chem* **221** (1956) 265-276.
- Vemula, M., Kandasamy, P., Oh, C.S., Chellappa, R. and Martin, C.E.:** Maintenance and regulation of mRNA stability of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene requires multiple elements within the transcript that act through translation-independent mechanisms. *J Biol Chem* (2003).
- Vergeres, G. and Waskell, L.:** Cytochrome b<sub>5</sub>, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* **77** (1995) 604-20.
- Vigh, L., Los, D.A., Horvath, I. and Murata, N.:** The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** (1993) 9090-4.
- Vigh, L., Maresca, B. and Harwood, J.L.:** Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci.* **23** (1998) 369-374.
- Villorbina, G., Rodríguez, S., Camps, F. and Fabriàs, G.:** Comparative sex pheromone biosynthesis in *Thaumetopoea pityocampa* and *T. processionea*: a rationale for the phenotypic variation in the sex pheromone within the genus *Thaumetopoea*. *Insect Biochem Mol Biol* **33** (2003a) 155-61.
- Villorbina, G., Roura, L., Camps, F., Joglar, J. and Fabriàs, G.:** Enzymatic desaturation of fatty acids: delta-11 desaturase activity on cyclopropane acid probes. *J Org Chem* **68** (2003b) 2820-9.
- Wallar, B.J. and Lipscomb, J.D.:** Dioxygen activation by enzymes containing binuclear non-heme iron clusters. *Chem Rev.* **96** (1996) 2625-2658.
- Wolf, W.A., Bjostad, L.B. and Roelofs, W.L.:** Correlation of fatty-acid and pheromone component structures in sex-pheromone glands of 10 lepidopteran species. *Environ Entomol* **10** (1981) 943-946.
- Wolf, W.A. and Roelofs, W.L.:** Properties of the delta-11 desaturase enzyme used in cabbage-looper moth sex-pheromone biosynthesis. *Arch Insect Biochem Physiol* **3** (1986) 45-52.
- Xia, Z.X. and Mathews, F.S.:** Molecular structure of flavocytochrome b<sub>2</sub> at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* **212** (1990) 837-63.
- Zakim, D., Kavecansky, J. and Scarlata, S.:** Are membrane enzymes regulated by the viscosity of the membrane environment? *Biochemistry.* **31** (1992) 11589-94.



## **VII. ANNEXOS**

---





## ANNEX I.

Percentatge de cadascun dels àcids grassos incorporats en llevats que han crescut en presència de diferents àcids grassos saturats en el medi de cultiu. En cadascun dels quadres s'indica quina construcció ha estat introduïda en la soca de llevat *ΔeloI\_ΔoleI* (Schneiter et al., 2000). En totes les taules es mostra a la columna de l'esquerra l'àcid gras afegit i a la resta les proporcions determinades per a cada àcid gras que es mostra en color blau a l'encapçalament de la columna.

### YEp352-4.8OLE

	C12	E9:C13	Z9:C13	C13	Z9:C14	C14
Control					2.1 ± 0.4	7.7 ± 1.4
C12	18 ± 4				0.9 ± 0.2	3.8 ± 0.3
C13		0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	23 ± 2	0.9 ± 0.1	3.3 ± 0.4
C14					18 ± 0.5	35.4 ± 1
C15					0.5 ± 0.3	2.6 ± 1.1
C16					0.2 ± 0.1	3.1 ± 0.4
C17					1.5 ± 0.5	7.6 ± 0.6
C18					2.1 ± 0.1	10.1 ± 0.5

	Z9:C15	C15	Z9:C16	C16	Z9:C17	C17
Control			49 ± 3	16 ± 2		
C12			32 ± 1	14,8 ± 1		
C13	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	29.5 ± 3	12 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1
C14			22 ± 1	8.4 ± 0.2		
C15	31.5 ± 6	31.2 ± 4	13 ± 5	5.0 ± 1.9	3.8 ± 0.1	2.2 ± 0.5
C16			52 ± 1	33 ± 0.5		
C17			34 ± 9	14 ± 3	15.4 ± 11	9.1 ± 5.3
C18			39 ± 1	13 ± 1		

	Z9:C18	C18
Control	22 ± 1	3.2 ± 0.4
C12	25,4 ± 2	5.1 ± 0.2
C13	22.5 ± 2	4.2 ± 0.7
C14	13.3 ± 0.7	2.9 ± 0.1
C15	8.5 ± 2	1.8 ± 0.5
C16	9.2 ± 0.3	2.8 ± 0.2
C17	16 ± 3	2.6 ± 0.8
C18	30 ± 0.7	5.9 ± 1

**YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni**

	<b>C12</b>	<b>C13</b>	<b>E11:C13</b>	<b>Z11:C13</b>	<b>E11:C14</b>	<b>Z11:C14</b>
<b>Control</b>					2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.6
<b>C12</b>	16.5 ± 5				0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2
<b>C13</b>		26 ± 3	2.8 ± 0.3	5.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<b>C14</b>					5.4 ± 0.6	8 ± 1
<b>C15</b>					0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2
<b>C16</b>					0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2
<b>C17</b>					1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1
<b>C18</b>					1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1

	<b>C14</b>	<b>Z11:C15</b>	<b>C15</b>	<b>Z11:C16</b>	<b>C16</b>	<b>Z11:C17</b>
<b>Control</b>	6.2 ± 0.8			45 ± 3	15 ± 0.5	
<b>C12</b>	13 ± 16			27 ± 7	19 ± 3	
<b>C13</b>	3.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	27 ± 1	13 ± 1	0.3 ± 0.1
<b>C14</b>	39 ± 5			21 ± 2	11 ± 1	
<b>C15</b>	2.1 ± 0.4	23 ± 9	40 ± 14	14 ± 3	6.8 ± 0.4	0.5 ± 0.3
<b>C16</b>	2.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	54 ± 3	29 ± 3	
<b>C17</b>	4.4 ± 0.5	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	33 ± 1	8.7 ± 1.1	14 ± 3
<b>C18</b>	5.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	42 ± 2	12 ± 0.2	

	<b>C17</b>	<b>Z11:C18</b>	<b>C18</b>
<b>Control</b>		23 ± 2	5.9 ± 1.4
<b>C12</b>		17 ± 7	5.3 ± 5.1
<b>C13</b>	0.8 ± 0.1	14 ± 1	5.1 ± 0.4
<b>C14</b>		11 ± 2	4.2 ± 1.1
<b>C15</b>	2.1 ± 0.2	6.1 ± 1.2	2.8 ± 0.3
<b>C16</b>		10 ± 0.1	3.1 ± 0.6
<b>C17</b>	17 ± 2	16 ± 1.1	3.0 ± 0.6
<b>C18</b>		27 ± 1	9.7 ± 0.8

YEpOLEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>

	C12	C13	E11:C13	Z11:C13	E11:C14	Z11:C14
Control					1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.3
C12	7.6 ± 0.7				2.2 ± 0.2	3.5 ± 0.3
C13		42 ± 6	3.3 ± 2.2	3.7 ± 2.6	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C14					0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C15					0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
C16					0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
C17					2.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1
C18					2.0 ± 0.2	2.6 ± 0.2

	C14	Z11:C15	C15	Z11:C16	C16	Z11:C17
Control	4.4 ± 0.4			53 ± 0.1	11 ± 0.1	
C12	13 ± 1.2			16 ± 1	27 ± 0.9	
C13	2.6 ± 0.5	0.1 ± 0.1	1.6 ± 0.7	11 ± 1.7	15 ± 1.3	
C14	67 ± 3.1			10 ± 0.5	12 ± 1.2	
C15	2.3 ± 0.2	9.8 ± 1	60 ± 2	8 ± 0.8	8 ± 0.6	
C16	1.4 ± 0.1			44 ± 3.2	47 ± 3.1	
C17	4.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	35 ± 0.5	6.1 ± 0.1	22 ± 0.5
C18	4.1 ± 0.2			44 ± 1	9.6 ± 0.2	

	C17	Z11:C18	C18
Control		23 ± 1.1	5.3 ± 0.3
C12		11 ± 0.8	19 ± 0.1
C13	1.9 ± 1.7	6.5 ± 0.9	12 ± 3.3
C14		4.2 ± 0.6	6.5 ± 1.1
C15	2.6 ± 0.2	3.3 ± 0.1	5.6 ± 0.4
C16		3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.3
C17	14 ± 0.1	11 ± 0.6	1.8 ± 0.2
C18		30 ± 1.1	8.2 ± 0.3

pYEX- $\Delta^{11}$ Tni

	C12	C13	E11:C13	Z11:C13	E11:C14	Z11:C14
Control					3 ± 0.5	7.1 ± 1.2
C12	16 ± 7.4				0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2
C13		28 ± 14	2.0 ± 1.7	3.5 ± 2.6	0.7 ± 0.6	1.5 ± 1.5
C14					3.7 ± 0.9	8.7 ± 2.2
C15					0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C16					0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C17					0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1
C18					0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1

	C14	Z11:C15	C15	Z11:C16	C16	Z11:C17
Control	4.2 ± 1.1			47 ± 1.6	15 ± 3	
C12	3.4 ± 0.1			26 ± 3.3	24 ± 1.7	
C13	2.7 ± 0.5	0.6 ± 0.2	1.8 ± 1.3	25 ± 10	15 ± 1.7	
C14	42 ± 10			21 ± 8.3	12 ± 1.1	
C15	3.0 ± 0.5	14 ± 1.4	59 ± 1.7	9 ± 0.3	7.4 ± 0.3	
C16	2.7 ± 0.5			59 ± 3.3	24 ± 6.7	
C17	6.8 ± 0.1			39 ± 0.8	6.1 ± 0.8	17 ± 0.8
C18	7.1 ± 0.3			43 ± 0.7	8.3 ± 0.7	

	C17	Z11:C18	C18
Control		18 ± 2.5	6.1 ± 0.9
C12		19 ± 2.1	10 ± 1.6
C13	0.9 ± 0.6	13 ± 0.6	5.2 ± 0.5
C14		9.4 ± 3.3	3.6 ± 0.8
C15		4.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1
C16		11 ± 2.4	2.6 ± 0.5
C17	9.5 ± 0.6	17 ± 0.3	2.2 ± 0.1
C18		32 ± 0.8	6.8 ± 0.3

pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>

	C12	C13	E11:C13	Z11:C13	E11:C14	Z11:C14
Control					2.8 ± 0.4	4.1 ± 0.6
C12	11 ± 4				1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.4
C13		11 ± 2	2.6 ± 0.8	3.6 ± 1.3	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.2
C14					5.8 ± 0.9	8.6 ± 1.3
C15					0.7 ± 0.4	1.1 ± 0.6
C16					1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1
C17					2.6 ± 0.3	3.9 ± 0.4
C18					2.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1

	C14	Z11:C15	C15	Z11:C16	C16	Z11:C17
Control	8 ± 1			42 ± 2	18 ± 5	
C12	4.4 ± 0.2			39 ± 2	20 ± 3	
C13	3.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	34 ± 3	18 ± 5	
C14	24 ± 4			30 ± 0.3	12 ± 1	
C15	3.2 ± 0.8	25 ± 3	29 ± 3	17 ± 1	10 ± 1	0.6 ± 0.1
C16	4.3 ± 0.7			50 ± 2	27 ± 6	
C17	7.4 ± 1.2			31 ± 4	17 ± 6	7.5 ± 4.7
C18	11.8 ± 0.2			30 ± 4	29 ± 2	

	C17	Z11:C18	C18
Control		19 ± 3	5.5 ± 0.3
C12		18 ± 2	6.2 ± 1.2
C13		16 ± 0.7	5.7 ± 0.6
C14		14 ± 2	4.6 ± 0.4
C15	2.0 ± 0.4	6.7 ± 0.1	3.5 ± 0.6
C16		11 ± 4	3.9 ± 0.2
C17	16 ± 0.9	11 ± 0.8	3.3 ± 1.3
C18		12 ± 0.2	11 ± 1.9

pYEX- $\Delta^{11}$ SlS

	C12	C13	E11:C13	Z11:C13	E11:C14	Z11:C14
Control					6.2 ± 1.5	4.9 ± 1.2
C12	3.3 ± 0.4				0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
C13		44 ± 3.5	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
C14					26 ± 3.2	21 ± 2.5
C15					0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C16					0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.4
C17					0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.2
C18					2.3 ± 1.5	1.8 ± 1.2

	C14	Z11:C15	C15	Z11:C16	C16	C17
Control	5.6 ± 1.3			64 ± 3.5	12 ± 0.7	
C12	6.0 ± 0.9			18 ± 2.7	40 ± 3.3	
C13	4.2 ± 0.1			14 ± 1.7	26 ± 2.9	
C14	24 ± 3			12 ± 2.1	12 ± 2.9	
C15	0.7 ± 0.1	26 ± 2	57 ± 2.6	8.3 ± 0.7	3.3 ± 0.4	2.0 ± 0.1
C16	0.4 ± 0.3			29 ± 39	68 ± 40	
C17	1.7 ± 1.0			16 ± 10	3.9 ± 2.0	75 ± 14
C18	4.3 ± 2.0			43 ± 8.5	7.1 ± 1.0	

	C18
Control	7.7 ± 0.5
C12	33 ± 1.6
C13	10 ± 1.4
C14	6.3 ± 4.1
C15	1.6 ± 0.2
C16	2.0 ± 0.6
C17	2.6 ± 0.5
C18	42 ± 12

**pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi**

	<i>E11:C13</i>	<i>Z11:C13</i>	<i>C13</i>	<i>E11:C14</i>	<i>Z11:C14</i>	<i>C14</i>
<b>Control</b>				3.0 ± 1.1	1.1 ± 0.4	2.8 ± 1.0
<b>C12</b>				1.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	8.4 ± 1.2
<b>C13</b>	1.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1	29 ± 1.1	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	6 ± 1
<b>C14</b>				3.9 ± 0.6	1.5 ± 0.2	65 ± 3
<b>C15</b>				0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<b>C16</b>				0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<b>C17</b>				0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2
<b>C18</b>				4.1 ± 0.8	1.5 ± 0.3	3.4 ± 0.5

	<i>Z11:C15</i>	<i>C15</i>	<i>Z11:C16</i>	<i>C16</i>	<i>C17</i>	<i>C18</i>
<b>Control</b>			65 ± 2	13 ± 0.2		15 ± 0.7
<b>C12</b>			23 ± 0.8	40 ± 1		27 ± 0.2
<b>C13</b>		2.7 ± 0.2	17 ± 3	24 ± 1	1.7 ± 0.1	16 ± 1.2
<b>C14</b>			8.9 ± 1.1	13 ± 0.7		8.2 ± 0.8
<b>C15</b>	10 ± 2.5	78 ± 4	2.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	0.8 ± 0.1	4.1 ± 0.8
<b>C16</b>			11 ± 7.2	84 ± 8		3.8 ± 0.2
<b>C17</b>			3.1 ± 0.8	2.8 ± 0.8	90 ± 2.2	3.0 ± 0.5
<b>C18</b>			31 ± 7	8.3 ± 1.4		52 ± 9

## ANNEX II.

Percentatge de cadascun dels àcids grassos en llevats que han crescut a diferents temperatures de cultiu. En cadascun dels quadres s'indica quina construcció ha estat introduïda en la soca de llevat  $\Delta eloI\_AoleI$ . (Schneiter et al., 2000)

## YEp352-4.8OLE

	Z9:C14	C14	Z9:C16	C16	Z9:C18	C18
18°C	0.6 ± 0.8	1.6 ± 1.3	58 ± 13	6.6 ± 1.2	31 ± 13	2.1 ± 0.4
25°C	1.8 ± 0.1	4.1 ± 0.2	56 ± 1.8	12 ± 0.7	21 ± 0.4	4.2 ± 0.6
30°C	1.6 ± 0.8	4.6 ± 2.0	53 ± 5.8	14 ± 0.2	23 ± 2.5	3.8 ± 1.3
34°C	1.1 ± 0.1	6.8 ± 0.2	36 ± 0.1	21 ± 0.4	28 ± 0.2	7.4 ± 0.3
37°C	0.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	36 ± 1.1	20 ± 0.6	31 ± 1.3	6.4 ± 0.2

YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ 

	E11:C14	Z11:C14	C14	Z11:C16	C16	Z11:C18	C18
18°C							
25°C							
30°C	2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1	5.6 ± 0.3	48 ± 3	12 ± 1.4	23 ± 0.7	5.0 ± 1.1
34°C	0.7 ± 0.5	1.1 ± 0.7	6.5 ± 0.2	28 ± 12	32 ± 9	15 ± 5.4	17 ± 10
37°C	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	6.8 ± 1.3	42 ± 4	20 ± 3.5	23 ± 1.6	6.5 ± 0.7

YEpOLEX- $\Delta^{11}Tni$ /OLEb<sub>5</sub>

	E11:C14	Z11:C14	C14	Z11:C16	C16	Z11:C18	C18
18°C							
25°C	1.4 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.7 ± 0.4	50 ± 0.4	14 ± 1.2	22 ± 1.6	5.7 ± 0.7
30°C	1.0 ± 0.3	2.3 ± 0.6	3.8 ± 0.8	46 ± 4	15 ± 2.1	25 ± 1.5	6.6 ± 0.6
34°C	1.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.6 ± 0.7	46 ± 1.1	14 ± 0.9	25 ± 0.6	6.3 ± 0.4
37°C	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.3	5.9 ± 0.5	44 ± 1.4	20 ± 2.5	23 ± 2.3	6.1 ± 0.2

**pYEX- $\Delta^{11}$ Tni**

	<i>E11:C14</i>	<i>Z11:C14</i>	<i>C14</i>	<i>Z11:C16</i>	<i>C16</i>	<i>Z11:C18</i>	<i>C18</i>
<b>18°C</b>							
<b>25°C</b>	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.4	5.8 ± 1.2	45 ± 7.5	20 ± 3.4	18 ± 0.9	8.7 ± 3.1
<b>30°C</b>	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	3.9 ± 0.6	47 ± 1.5	12 ± 0.6	27 ± 0.3	6.5 ± 0.3
<b>34°C</b>	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4	3.0 ± 0.7	45 ± 2.4	11 ± 0.1	32 ± 2.9	6.4 ± 0.8
<b>37°C</b>	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	47 ± 0.1	9.4 ± 0.2	34 ± 0.2	5.0 ± 0.2

**pYEX- $\Delta^{11}$ Tni/OLEb<sub>5</sub>**

	<i>E11:C14</i>	<i>Z11:C14</i>	<i>C14</i>	<i>Z11:C16</i>	<i>C16</i>	<i>Z11:C18</i>	<i>C18</i>
<b>18°C</b>							
<b>25°C</b>	1.4 ± 0.2	1.9 ± 0.2	3.5 ± 0.3	51 ± 0.5	10 ± 0.5	27 ± 0.9	4.9 ± 0.2
<b>30°C</b>	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.7 ± 0.2	48 ± 4.0	11 ± 1.0	29 ± 3.0	6.3 ± 1.4
<b>34°C</b>	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.5	46 ± 0.2	7.0 ± 0.9	37 ± 2.3	5.3 ± 0.3
<b>37°C</b>	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	47 ± 0.8	8.7 ± 0.1	35 ± 1.1	5.2 ± 0.1

**pYEX- $\Delta^{11}$ Sls**

	<i>E11:C14</i>	<i>Z11:C14</i>	<i>C14</i>	<i>Z11:C16</i>	<i>C16</i>	<i>C18</i>
<b>18°C</b>						
<b>25°C</b>	2.6 ± 0.8	1.5 ± 0.5	9.3 ± 2.4	56 ± 15	18 ± 10	12 ± 3.5
<b>30°C</b>	3.0 ± 0.3	1.7 ± 0.2	7.5 ± 0.8	65 ± 1.5	11 ± 0.9	12 ± 0.6
<b>34°C</b>	1.9 ± 0.7	1.0 ± 0.4	7.4 ± 2.1	56 ± 14	19 ± 11	15 ± 2.0
<b>37°C</b>	1.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	5.7 ± 0.1	71 ± 0.2	9.1 ± 0.2	11 ± 0.2

**pYEX- $\Delta^{11}$ Tpi**

	<i>E11:C14</i>	<i>Z11:C14</i>	<i>C14</i>	<i>Z11:C16</i>	<i>C16</i>	<i>C18</i>
<b>18°C</b>						
<b>25°C</b>	4.1 ± 0.8	1.6 ± 0.3	9.0 ± 0.4	39 ± 4.5	32 ± 2.2	14 ± 3.8
<b>30°C</b>	6.8 ± 0.9	2.7 ± 0.4	4.9 ± 0.4	66 ± 2.6	11 ± 1.4	7.8 ± 0.4
<b>34°C</b>	5.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	11 ± 1.2	53 ± 0.9	22 ± 1.2	7.8 ± 1.4
<b>37°C</b>						