

Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmàcia

**Metabolisme lipídic en plantes:  
Caracterització de la  
dehidrodoliquildifosfat sintasa  
i de les proteïnes Arv  
d' *Arabidopsis thaliana***

Oriol Forés del Ruste  
2007

# INTRODUCCIÓ



## **1. BIOSÍNTESIS D'ISOPRENOIDES**

Els isoprenoides o terpenoides constitueixen una família extremadament diversa de compostos que es troben representats en tots els éssers vius, i són essencials per al creixement, el desenvolupament i la supervivència dels mateixos (McCaskill i Croteau, 1998). Actualment s'han identificat fins a 29.000 compostos isoprenoides diferents, que constitueixen la major família de productes naturals coneguda (Chapman i Hill, 2000). Les plantes sintetitzen la gran majoria d'isoprenoides coneguts que, des d'un punt de vista funcional, poden dividir-se en metabolits primaris i secundaris. Segons aquesta classificació, els metabolits primaris són compostos essencials pel creixement i desenvolupament de les plantes, mentre que els metabolits secundaris jugarien un paper important en la interacció de les plantes amb el seu entorn (Chappel, 1995 a i b). En el primer grup trobem compostos que exerceixen funcions en processos tan essencials com el manteniment de la fluïdesa de la membrana (esterols), la fotosíntesi (clorofil·les i carotenoids), el transport electrònic (ubiquinona i plastoquinona), la glicosilació de proteïnes (dolicols), la regulació del desenvolupament (giberel·lines, citoquinines, àcid abscísic i brassinoesteroids) i la prenil·lació de proteïnes. En el segon grup s'inclouen compostos isoprenoides responsables de les interaccions planta-planta, planta-insecte o planta-patògen. Alguns exemples d'aquests compostos són les fitoalexines sesquiterpèniques (funcions de defensa) o diferents pigments i essències (attractants d'insectes que afavoreixen la pol·linització). De fet, és en aquest grup on trobem la major varietat de compostos isoprenoides (Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). Amb freqüència aquests compostos són sintetitzats per grups específics de plantes i/o en etapes molt determinades del desenvolupament de les plantes.

### **1.1. Naturalesa química dels isoprenoides**

El terme isoprenoide s'utilitza per a designar un conjunt de compostos amb estructures molt diverses, que inclouen desde cadenas hidrocarbonades lineals relativament senzilles, fins a algunes de les estructures químiques més complexes conegudes (Chappel, 1995 a). Inicialment, aquests compostos van ser denominats terpenoides, en referència als olis de trementina ("turpentine" en anglès) utilitzats en el segle XIX per aïllar aquets compostos i elucidar la seva estructura química (Chappel, 1995 a, b). No obstant, el 1914 Wallach va formular la regla de l'isoprè, segons la qual la majoria de terpenoides podrien ser construïts

mitjançant la unió repetitiva de les unitats d'isoprè (2-metil-1,3-butadiè). Aquesta hipòtesi va suposar un gran avenç en la química dels terpenoides perquè va aportar per primera vegada el concepte d'una relació estructural comuna entre tots ells. Aquesta idea va ser formulada per Ruzicka en 1953, quan va proposar la regla bisointètica de l'isoprè. Aquesta hipòtesi es basa en consideracions mecanístiques sobre les reaccions bioquímiques involucrades en la biosíntesi d'isoprenoides que impliquen elongacions electrofíliques a partir d'un precursor comú. Així, tots els membres d'una mateixa subclasse d'isoprenoides derivarien d'una molècula parental comuna, i totes les variacions en la configuració de l'esquelet carbonat bàsic s'originarien a través de ciclacions, reordenaments i modificacions de diversos grups funcionals de la molècula parental o els seus derivats. Aquesta regla unificadora és la que dóna el nom actual d'isoprenoides a aquesta família de compostos i reflecteix el seu origen biosintètic comú. En ella, s'inclouen tots aquells compostos que deriven d'una o més unitats d'isoprè.

Per tant, a pesar de l'enorme diversitat estructural i funcional d'aquests compostos, tots ells deriven d'una molècula precursora comuna (**figura 1**), l'isopentenildifosfat (2-metil-1,3-butadièdifosfat; IPP; C<sub>5</sub>). El procés de biosíntesi d'isoprenoides es basa en la condensació seqüencial d'unitats d'IPP sobre el seu isòmer al·lílic, el dimetilal·lilpirofosfat (DMAPP, C<sub>5</sub>), lo que dóna lloc a cadenes hidrocarbonades de longitud creixent mitjançant un mecanisme que serà explicat en detall més endavant. La interconversió reversible d'IPP a DMAPP està catalitzada per l'enzim IPP-DMAPP isomerasa (IDI).

Des d'un punt de vista estructural, els isoprenoides poden classificar-se en funció del nombre d'unitats d'isoprè que han estat necessàries per a construir l'esquelet bàsic de la molècula (**Taula 1**). Així, els isoprenoides més senzills són els denominats hemiterpens (C<sub>5</sub>). A continuació trobem isoprenoides formats per la unió de 2, 3, 4, 6 i 8 unitats d'isoprè, és a dir, els monoterpens (C<sub>10</sub>), que donarien lloc a aquesta nomenclatura, els sesquiterpens (C<sub>15</sub>), els diterpens (C<sub>20</sub>), els triterpens (C<sub>30</sub>) i els tetraterpens (C<sub>40</sub>), respectivament. Finalment, els isoprenoides formats per la unió de més de 8 unitats d'isoprè es denominen, col·lectivament, politerpens.

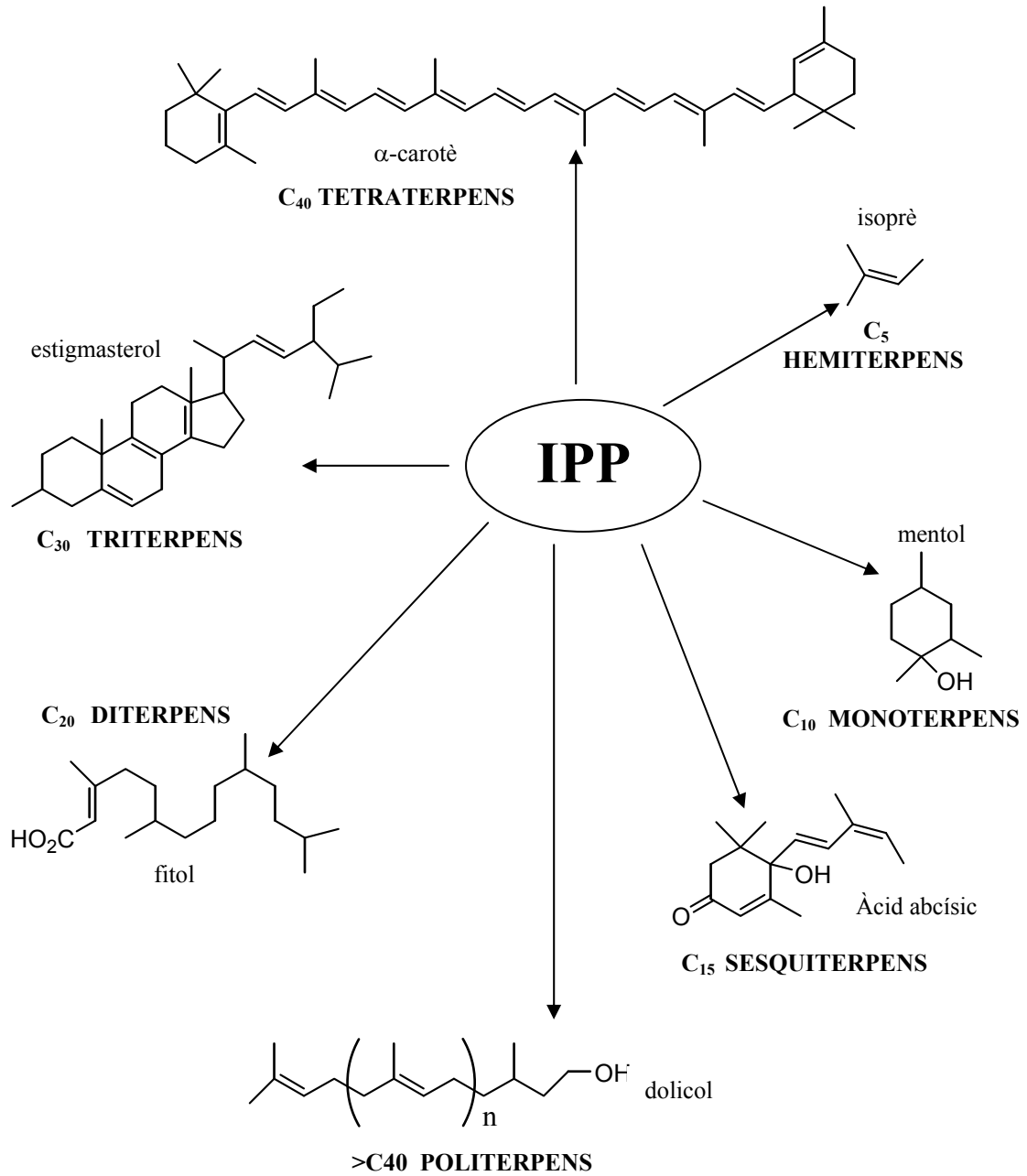


Fig.1. Classificació dels isoprenoides en funció del nombre de carbonis.

Terpenoides		Exemples	Funcions	Distribució en organismes
C <sub>5</sub>	Hemiterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• isopentenil-tRNA</li> <li>• cadena lateral de citoquinines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• traducció proteica</li> <li>• fitohormones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tots els organismes</li> <li>• plantes superiors</li> </ul>
C <sub>10</sub>	Monoterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• essències de flors/plantes (mentol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• comunicació entre plantes/ activitat antimicrobiana/ atraients d'insectes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• plantes superiors i algues</li> </ul>
C <sub>15</sub>	Sesquiterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fitoalexines (capsidiol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dissuasius d'insectes/ micotoxines/ activitat antimicrobiana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• plantes superiors, hepàtiques, molses, fongs, algues</li> </ul>
C <sub>20</sub>	Diterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fitol, grup lateral de la clorofil·la</li> <li>• grup lateral de tocoferol i filoquinones</li> <li>• fitoalexines</li> <li>• gibberel·lines</li> <li>• taxol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cadenes de transport d'electrons</li> <li>• activitat antimicrobiana</li> <li>• fitohormona</li> <li>• agent antimitòtic, defensa de patògens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• plantes superiors, algues</li> <li>• plantes superiors, fongs</li> </ul>
C <sub>30</sub>	Triterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• esterols</li> <li>• brassinoesteroides</li> <li>• altres triterpens (saponina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fluïdesa de membranes</li> <li>• fitohormones</li> <li>• defensa de patògens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tots els organismes</li> <li>• plantes superiors</li> </ul>
C <sub>40</sub>	Tetraterpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• carotenoides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protectors de l'aparell fotosintètic</li> <li>• pigments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• plantes superiors</li> </ul>
C <sub>&gt;40</sub>	Politerpens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ubiquinona</li> <li>• plastoquinona</li> <li>• dolícols</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cadenes de transport d'electrons</li> <li>• glicosilació de proteïnes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tots els organismes</li> <li>• plantes</li> <li>• tots els organismes</li> </ul>

Taula 1. Terpenoides i importància biològica dels exemples més representatius de cada classe.

## 1.2. Síntesis d'isoprenoides

La síntesis d'isoprenoides pot dividir-se en tres parts ben diferenciades. La primera, comprèn la síntesis d'IPP, el precursor estructural comú per a tots els isoprenoides. La segona part inclou les etapes de síntesis dels prenillfosfats que serveixen de motllo per a la síntesis de les diferents classes d'isoprenoides, és a dir de geranildifosfat (GPP), farnesildifosfat (FPP) i geranilgeranildifosfat (GGPP), en una sèrie de reaccions catalitzades per

preniltransferases. Podríem incloure en aquesta part de la via les reaccions de dimerització que originen l'esquelet bàsic de triterpens i tetraterpens a partir de FPP i GGPP respectivament. En la tercera part, s'inclourien totes les ramificacions de la via, que a través de reaccions molt diverses com ciclacions, hidroxilacions, metilacions, desmetilacions, isomeritzacions, reduccions i oxidacions, acaben donant lloc a l'extraordinària varietat d'isoprenoides coneguts (Chappel, 1995 b).

### **1.2.1. VIES DE SÍNTESIS D'IPP**

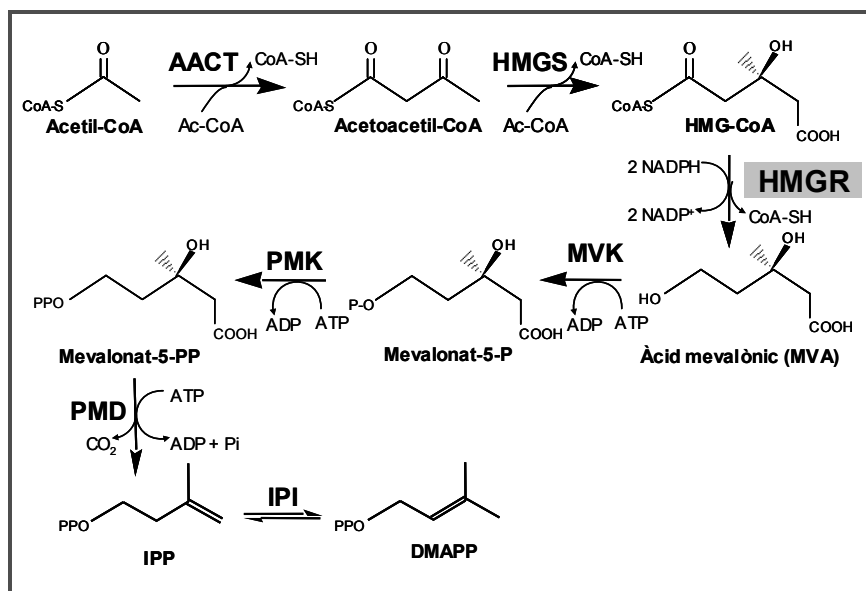
En un principi es va considerar que tots els isoprenoides derivaven de la via del mevalonat (MVA), descoberta en llevats i animals el 1950. En molts casos, però, no es va poder interpretar la síntesi de determinats terpenoides tan sols per aquesta via. Recentment, a la dècada dels 90, experiments de marcatge en bacteris i plantes van permetre identificar una via alternativa per a la síntesi d'isoprenoides, anomenada via del metileritritol 4-fosfat (MEP). Els isoprenoides se sintetitzen en tots els organismes però la gran majoria utilitza tan sols una de les dues vies per a la síntesi de l'IPP i el DMAPP (revisat a Lichtenthaler et al., 1999; Lange et al., 2000; Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002). Sembla que la via del MEP és herència del precursor procariota que va donar lloc als cloroplasts, mentre que la cèl·lula eucariota hoste va adquirir la via del mevalonat, com els organismes heteròtrofs metazous i fongs. La via del MEP és present en la majoria d'eubacteris, en les algues i en alguns protozous com el paràsit de la malària *Plasmodium falciparum*. Els animals, els fongs i els arqueobacteris sintetitzen exclusivament els isoprenoides a partir de la via del mevalonat. La coexistència de les dues rutes es dona en pocs organismes: en algunes algues, en moltes, en algunes soques d'actinomicets i en plantes superiors.

#### **1.2.1.1. Via del mevalonat**

La via del MVA s'origina a partir de la condensació de tres molècules d'acetil-CoA en dues reaccions successives, catalitzades per l'acetoacetil CoA tiolasa (AACT) i l'HMG-CoA sintasa (HMGS). El producte obtingut, l'HMG-CoA, és reduït mitjançant una reacció irreversible a MVA per l'enzim HMGR, que requereix NADPH com a poder reductor i que es considera com un dels principals punts de control de la biosíntesis d'isoprenoides, tant en animals com en llevats i, com s'explica més detalladament en l'apartat 4.4.2, també sembla ser una de les etapes limitants de la biosíntesis d'isoprenoides en plantes. El MVA, de sis carbonis, és posteriorment fosforilat i descarboxilat per generar l'IPP mitjançant els enzims mevalonat quinasa (MVK), mevalonat 5-fosfat quinasa (PMK) i mevalonat 5-



difosfodecarboxilasa (PMD). Finalment, l'enzim isopentenil difosfat isomerasa (IPI) catalitza la conversió d'IPP en els seu isòmer electrofílic DMAPP (**figura 2**). Tots els enzims de la via del MVA són citosòlics exceptuant l'HMGR, que es localitza al sistema endomembranós, tot i que la catàlisi enzimàtica és citosòlica (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey i Croteau, 1995; McCaskill i Croteau, 1998).

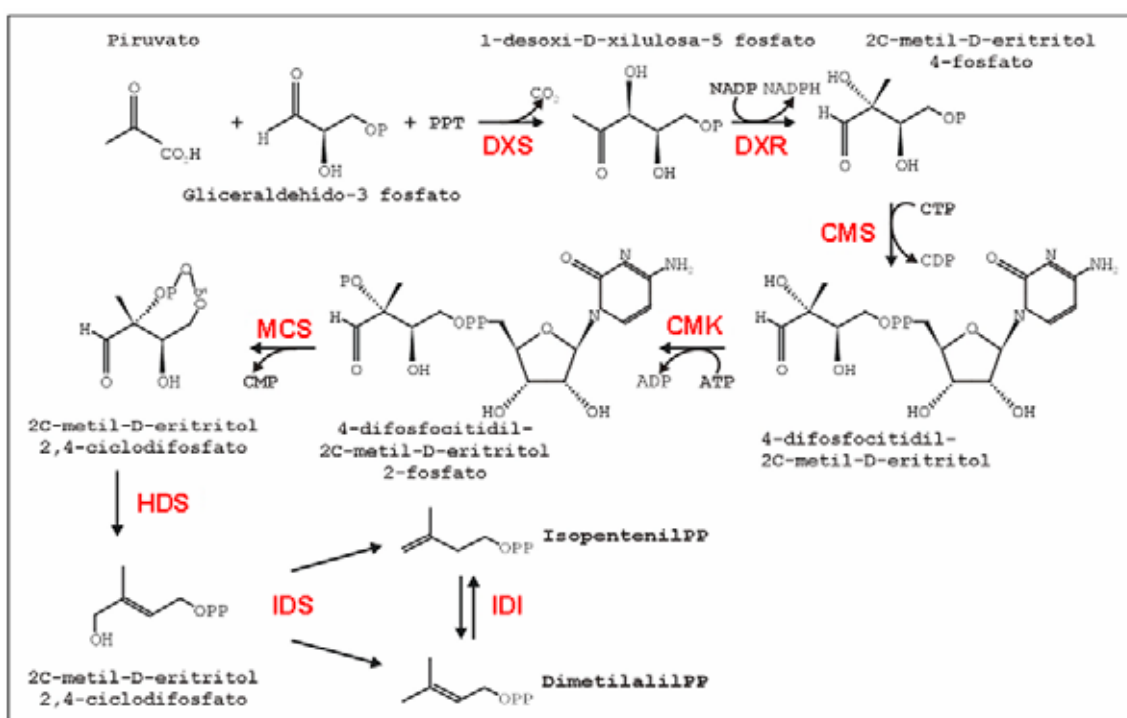


**Fig. 2.** La via del MVA. *AACT*, acetoacetil-CoA tiolasa; *HMGS*, HMG-CoA sintasa; *MVK*, mevalonat quinasa; *PMK*, fosfomevalonat quinasa; *PMD*, difosfomevalonat descarboxilasa; *IPI*, IPP isomerasa (adaptat d'Antolín 2005).

### 1.2.1.2. Via del metileritritol-4-fosfat

La via del MVA era la única via de síntesi d'IPP coneguda fins al 1988 quan a partir d'experiments de marcatge d'hopanoids (esterols trierpènics bacterians) amb  $^{13}\text{C}$ -acetat es va proposar l'existència d'una via de síntesi d'IPP independent del MVA. La nova via incloïa l'addició d'un compost  $\text{C}_2$ , derivat del piruvat, a un  $\text{C}_3$ , una triosa fosfat o derivat (Rohmer et al., 1993). Posteriorment, el piruvat i el gliceraldehid-3-fosfat (GAP) van ser identificats com a precursors directes de l'IPP. Durant els últims anys, aquesta via ha estat completament elucidada a través d'aproximacions molt diverses com la biologia molecular, la química orgànica, la bioquímica, la genètica microbiana o la bioinformàtica (Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002), i actualment ja es coneixen tots els enzims que componen la via MEP. L'existència d'aquesta ruta de síntesi en plantes superiors es va posar de manifest amb experiments duts a terme amb precursors de la via marcats amb  $^{13}\text{C}$  en *G. biloba* (Schwarz, 1994), *Taxus chinensis* (Eisenrich et al., 1996) i *Marrubium vulgare* (Knoss et al. 1997).

El primer pas de la via és la formació de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat (DXP), precursor també de la tiamina i la piridoxina (vitamines B1 i B6 respectivament) (Julliard et al., 1991; Hill et al., 1996), a partir del piruvat i el GAP en una reacció de condensació catalitzada per la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa (DXS). A continuació, a través d'una etapa catalitzada per la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat reductoisomerasa (DXR) i que implica el reordenament intramolecular de la DXP en l'intermediari 2-C-metileritrosa-4-fosfat, que és reduït per donar lloc al 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP), que és el primer compost específic de la via. Les següents etapes que condueixen a la síntesis d'IPP (**figura 3**) s'han identificat a través de diferents sistemes bacterians i posteriorment s'han confirmat en plantes (Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002).



**Fig. 3.** Esquema de la biosíntesis d'IPP a través de la ruta del MEP. Les abreviatures representen els següents enzims: **DXS**, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa; **DXR**, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat reductoisomerasa; **CMS**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa; **CMK**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat quinasa; **MCS**, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat sintasa; **HDS**, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat sintasa; **IDS**, IPP/DMAPP sintasa; **IDI**, IPP isomerasa.

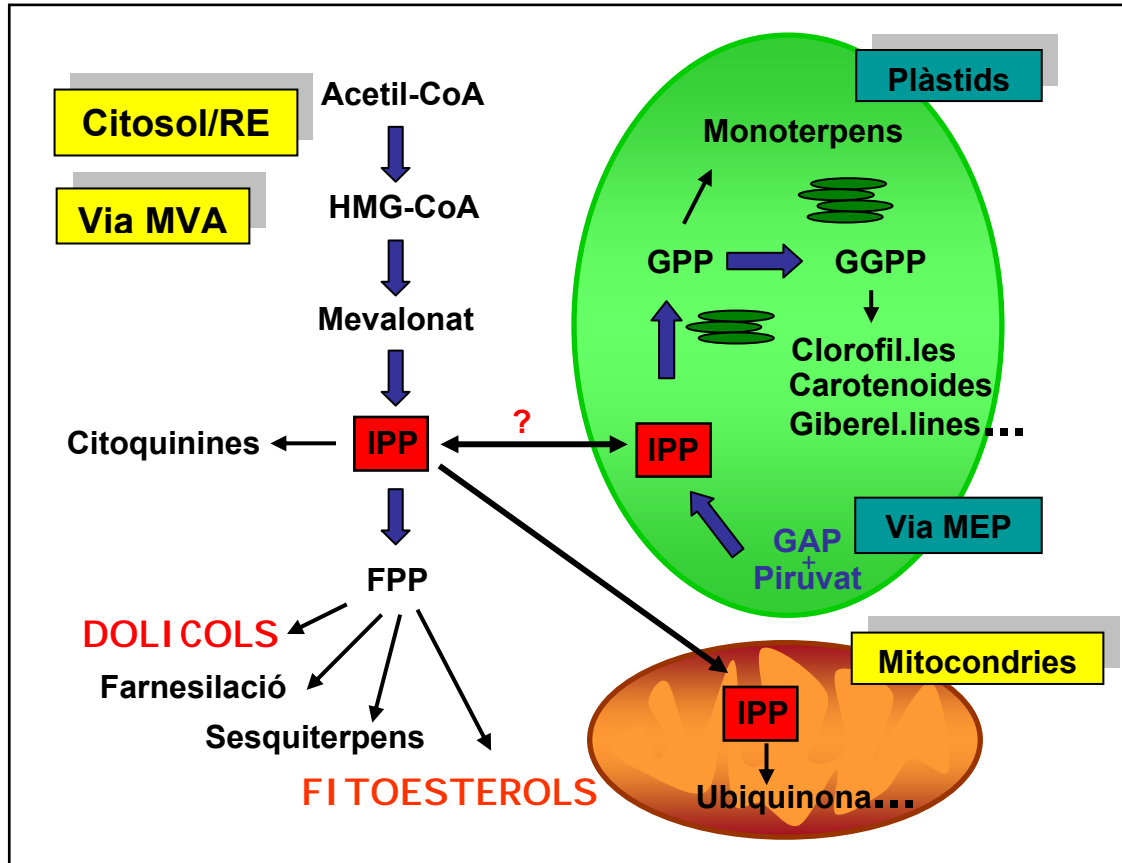
### 1.2.1.3. Distribució subcel·lular de la biosíntesis d'isoprenoides en plantes superiors

En plantes, la síntesi d'isoprenoides es troba compartimentada (**figura 4**). Mentre que la via del MEP sintetitza l'IPP i el DMAPP en els plastidis, a partir dels

quals es sintetitzen isoprenoides com l'isoprè, giberel·lines, àcid abscísic (ABA), carotenoids, tocoferols i les cadenes laterals de les clorofil·les entre d'altres, la via del MVA proporciona l'IPP i el DMAPP en el citoplasma, que serà utilitzat en la síntesis de citoquinines, FPP, dolicol, fitoesterols i brassinoesteroides entre d'altres (revisat a Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002 i Lange i Ghassemian, 2003). El mitocondri importa l'IPP del citosol per a la síntesi d'isoprenoides, com per exemple la ubiquinona, i per a la prenilació de proteïnes. Per assolir aquesta gran complexitat cal una regulació molt eficaç i acurada de les vies de síntesis que donen lloc als diferents terpenoides. Aquesta regulació s'aconsegueix mitjançant la integració de múltiples factors interns i externs en la planta, els quals determinen la síntesis dels isoprenoides necessaris per a satisfer els seus requeriments.

Tot i la compartimentalització de la síntesis d'IPP en plantes, durant els últims anys s'ha posat de manifest l'existència cert bescanvi d'IPP, o d'algun intermediari posterior a aquest, entre el citosol i el cloroplast (revisat a Bouvier et al., 2005). Els primers indicis d'aquest intercanvi es van obtenir dels estudis d'incorporació de  $^{13}\text{C}$ -glucosa als ginkgòlids (compostos diterpènics) en *Ginkgo biloba*. Els patrons de marcatge mostren que tres unitats isoprèniques provenen de la via del MVA, mentre que la quarta ho fa de la via MEP (Schwarz, 1994). Un altre exemple el constitueix la incorporació de  $^{13}\text{C}$ -MVA en el fitol i altres diterpens cloroplastídics en la hepàtica *Heteroscyphus planus* (Nabeta et al., 1997). També s'ha detectat marcatge radioactiu en esterols, tot i que baix, al proporcionar desoxixilulosa (o algun dels seus derivats) en cultius de *Salvia miltiorrhiza* (Broers, 1994) i *Catharantus roseus* (Arigoni et al., 1997). Altres exemples d'interrelació entre les dues vies, inclouen el marcatge de determinats sesquiterpens [1- $^{13}\text{C}$ ]-desoxixilulosa (Thiel i Adam, 2002), i la contribució equivalent de les vies MEP i MVA en la síntesis d'esterols en calls de *Croton sublyraus* (De-Eknamkul i Potduang, 2003). L'existència d'aquest intercanvi també s'ha estudiat mitjançant l'ús d'inhibidors de les dues vies i l'estudi de certs mutants d'*A. thaliana* (revisat a Bouvier et al., 2005). Així, s'ha observat que plantes d'*A. thaliana* (Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002) i cèl·lules de tabac BY-2 (Hemmerlin i Bach, 2003) que tenen bloquejada una de les dues vies de biosíntesis de l'IPP quan són suplementades amb el substrat de la via activa, mostren un restabliment parcial del seu creixement. També s'ha vist que el mutant de fitocrom-b d'*A. thaliana rim-1* presenta un increment de la resistència a la *mevinolina* (inhibidor de la HMGR) i a la *fosmidomicina* (inhibidor de la DXR; Rodríguez-Concepción et al., 2004). Aquest mutant presenta un augment de l'ARNm de la HMGR1 i una activitat HMGR superior, però no incrementen ni els transcrits ni el nivell de proteïna de la DXS i DXP. Aquests resultats suggereixen que en plàntules crescudes en foscor, l'IPP o algun altre precursor dels isoprenoids, seria transportada als etioplasts, però en presència de llum els fitocroms inhibirien la HMGR i es bloquejaria l'entrada del precursor als plastidis. El possible transportador dels precursor entre

el citosol i els cloroplasts encara no es coneix, però recentment s'ha descrit que en la membrana interna del cloroplast aquest transport depèn del gradient electroquímic i que es donava per un mecanisme simport amb protons (Bick i Lange, 2003).

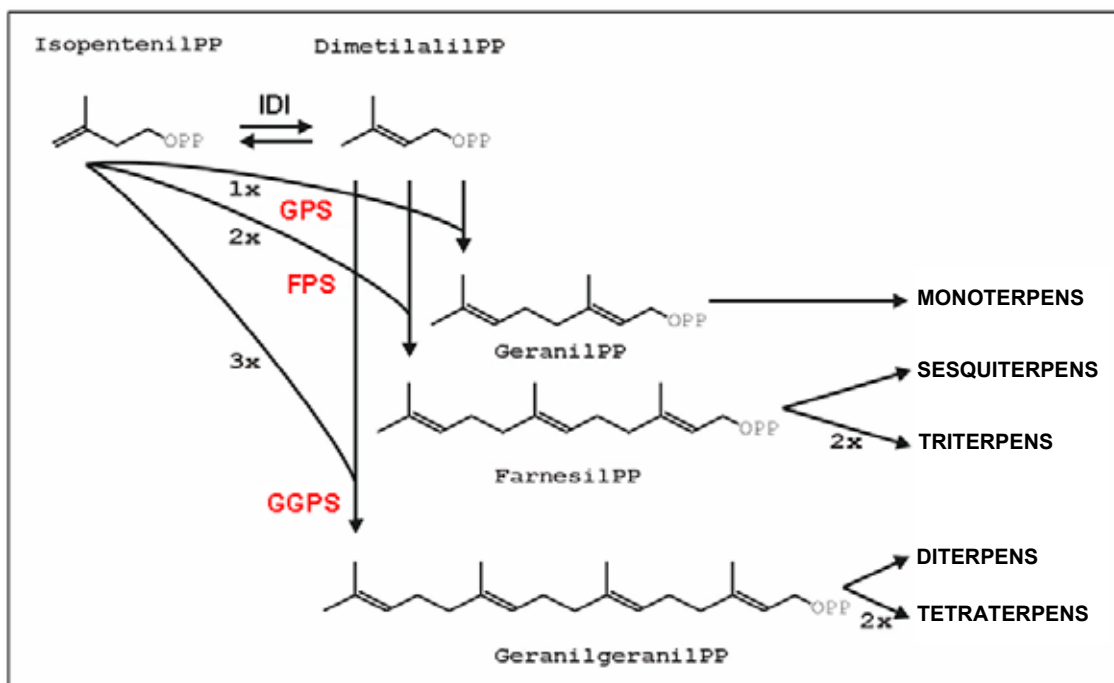


**Fig. 4. Compartimentació de la síntesi d'isoprenoides en cèl·lules vegetals.** En la figura s'indiquen els substrats, intermediaris i productes finals sintetitzats a partir de les dues vies de síntesi de l'IPP: la via del mevalonat (MVA), citosòlica i la via del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP), plastídica. *IPP*, isopentil difosfat; *FPP*, farnesil difosfat; *FPS*, farnesil difosfat sintasa; *GAP*, gliceraldehid 3-fosfat; *GGPP*, geranilgeranil difosfat; *GPP*, geranil difosfat.

### 1.2.2. ETAPES POSTERIORES A LA SÍNTESIS D'IPP

Tal com s'ha indicat anteriorment (apartat 1.2), la segona part de la via de síntesi d'isoprenoides dona lloc als intermediaris isoprenoides GPP, FPP i GGPP. La biosíntesi d'aquests intermediaris isoprenoides es basa en l'addició seqüencial de dues molècules d'IPP sobre el seu isòmer DMAPP mitjançant una reacció de condensació cap-cua en que l'atac d'un carbocatió (àtom de carboni electròfil per la pèrdua del grup difosfat) sobre un àtom ric en electrons del doble enllaç de l'IPP (**figura 5**). Així, la condensació de la primera molècula d'IPP sobre el DMAPP dona lloc al GPP (C<sub>10</sub>), l'addició d'una segona molècula d'IPP dona lloc al FPP (C<sub>15</sub>) i l'addició d'una tercera origina GGPP (C<sub>20</sub>). Aquest procés està catalitzats per les

preniltransferases. A través d'addicions i/o modificacions específiques d'aquests prenilfosfats s'originen la gran varietat d'isoprenodes coneguts. L'IPP s'utilitza directament per a la síntesis d'hemiterpens (isoprè) i el GPP serveix de base per a la síntesis dels monoterpens. El FPP representa un punt de ramificació de la via per a sintetitzar diversos isoprenoides com els dolícols, esterols i sesquiterpens entre d'altres, a més de ser substrat per a la prenilació de proteïnes. El GGPP és el precursor dels diterpens i el substrat per prenilar proteïnes. Finalment s'ha de destacar que molts d'aquests prenildifosfats s'utilitzen en la síntesis de nombrosos compostos de naturalesa mixta, els meroterpens. Per exemple, les citoquinines o alguns ARNt, la cadena lateral dels quals deriva de l'IPP, les clorofil·les, que contenen una cadena lateral diterpènica, les quinones (ubi- i plastoquinona), els grups hemo de tipus a, o les proteïnes prenil·lades.



**Fig.5. Representació esquemàtica de la síntesi de prenilfosfats precursors dels isoprenoides a partir d'IPP i DMAPP.** Mitjançant reaccions de condensació cap-cua entre IPP i diferents substrats al·lílics es generen prenildifosfats de longitud de cadena creixent. Aquestes reaccions catalitzades per les preniltransferases (marcades en vermell). IDI: IPP isomerasa. GPS: Geranildifosfat Sintasa. FPS: Farnesildifosfat Sintasa. GGPS: Geranylgeranildifosfat sintasa.

## 2. PRENILTRANSFERASES

Les preniltransferases són tots aquells enzims que catalitzen les reaccions de condensació de l'IPP amb diferents prenilfosfats al·lílics (Ogura i Koyama, 1998; Liang et al., 2002; Takahashi et al., 2006). La reacció catalitzada per les preniltransferases (**figura 6**) s'inicia

per l'eliminació del grup difosfat de la posició 1 del substrat al·lílic, donant lloc a un catió al·lílic. El carbocatió és atacat per una molècula d'IPP, formant un nou enllaç carboni-carboni i un doble enllaç. Aquesta reacció és una condensació 1'-4 entre el carboni 1 del substrat al·lílic i el carboni 4 de l'IPP. Les preniltransferases repeteixen aquesta condensació entre l'IPP i el prenildifosfat fins a produir un prenildifosfat de longitud i estereoquímica determinades d'acord amb les especificitats de cada enzim (Chappel, 1995 b).



Fig.6. Reaccions catalitzades per cis-preniltransferases (Takahashi et al., 2006).

## 2.1 Classificació de les preniltransferases

Les preniltransferases es classifiquen en dos grans grups, *trans*- o *E*-prenildifosfatsintases i *cis*- o *Z*-prenildifosfatsintases, en funció de l'estereoquímica de la reacció de condensació entre el IPP i el prenildifosfat al·lílic la longitud del producte sintetitzat les subunitats que les componen (Ogura i Koyama 1998 i Koyama 1999) (Figura 7).

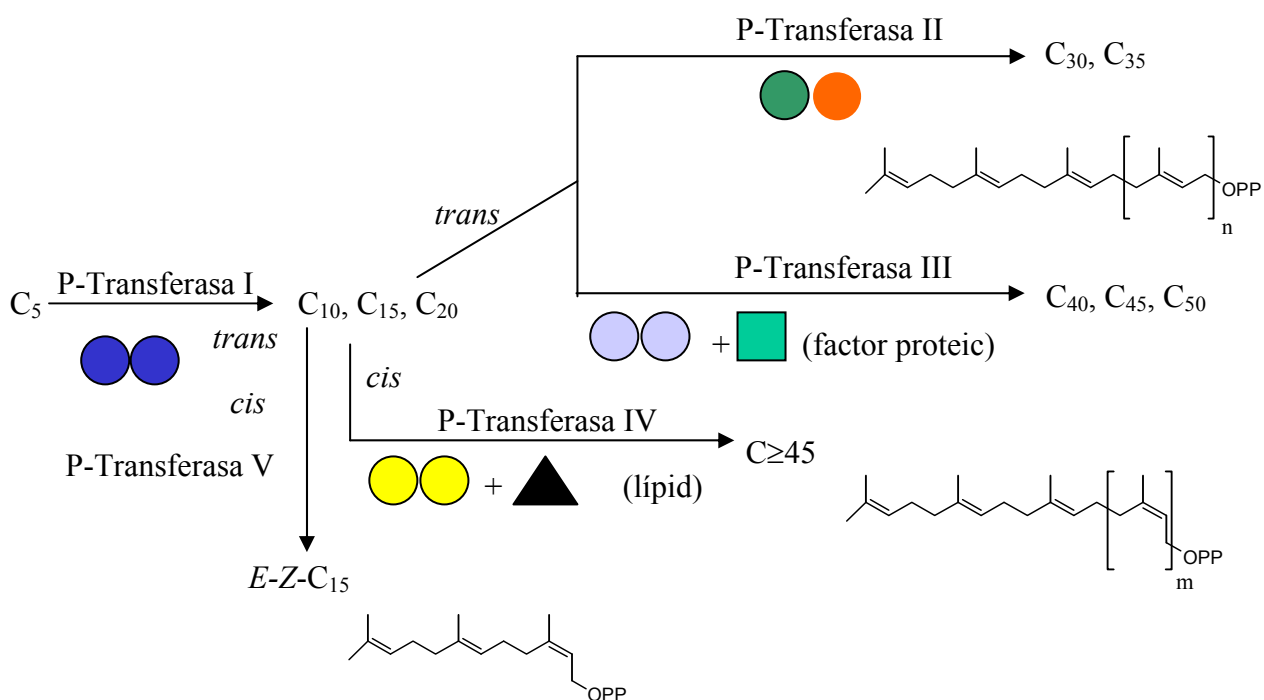


Fig.7. Classificació de les preniltransferases (Adaptada d'Ogura i Koyama, 1998).

### **2.1.1 TRANS-PRENILTRANSFERASES**

Les *trans*-preniltransferases catalitzen l'addició d'IPP en *trans* sobre diferents prenildifosfats al·lílics i es poden dividir en tres grups en funció de la composició de les subunitats i la longitud del producte de reacció.

#### **2.1.1.1 Preniltransferases de tipus I: *trans*-prenildifosfat sintases de cadena curta**

Inclouen els enzims que sintetitzen prenildifosfats de fins a 25 unitats de carboni (C<sub>25</sub>). Hi trobem la GPS, la FPS, la GGPS i la geranilfarnesildifosfat sintasa (GFPS). Són enzims que són actius en forma d'homodímers units entre ells molt estretament. No necessiten cap cofactor excepte cations divalents com el Mg<sup>2+</sup> i el Mn<sup>2+</sup>. Durant la última dècada moltes preniltransferases de tipus I han estat clonades i caracteritzades (Wang i Ohnuma, 2000). Tant la FPS com la GGPS són enzims de distribució universal, ja que els seus productes de reacció, FPP i GGPP formen part de la part troncal de la via de síntesi i són precursors biosintètics de molts isoprenoides essencials. Així, per exemple, existeixen en *A.thaliana* dues FPS (Cunillera et al., 1996) i cinc GPPS (Lange i Ghassemian, 2003). El descobriment de l'estructura terciària de la FPP d'au (**Figura 7**; Tarshis et al., 1994) i estudis estructurals amb aquesta proteïna (Tarshis et al., 1996) i la FPS d'*E.coli* (Hosfield, 2004) han proporcionat molta informació sobre el mecanisme catalític de les *trans*-preniltransferases.

#### **2.1.1.2 Preniltransferases de tipus II: *trans*-prenildifosfat sintases de cadena mitjana**

En aquest grup s'inclouen enzims bacterians com l'hexa-prenildifosfat sintasa (HexPS; Fujii et al., 1982) i l'heptaprenil-difosfat sintasa (HepPS; Takahashi et al., 1980) que a partir de FPP o GGPP catalitzen la síntesi de cadenes preniliques C<sub>30</sub> i C<sub>35</sub>, que s'utilitzen posteriorment per la síntesi de les quinones (Szkopinska, 2000). Són actius en forma d'heterodímers, amb dues subunitats fàcilment dissociables en condicions fisiològiques però on cap de les dues proteïnes té activitat enzimàtica de forma aïllada, i necessiten la presència de cations divalents com el Mg<sup>2+</sup>. Així, en presència de FPP i el Mg<sup>2+</sup> les dues subunitats s'associarien formant l'enzim actiu i es dissociarien un cop s'ha format el producte de reacció.

### **2.1.1.3 Preniltransferases de tipus III: *trans*-prenildifosfat sintases de cadena llarga**

Són enzims com l'octaprenildifosfat sintasa (OPS) i la solanesildifosfat sintasa (SPS) que sintetitzen cadenes preníliques de 40 i 50 àtoms de carboni a partir de FPP o GGPP (Sagami et al., 1977). Són enzims actius en forma d'homodímers, que al igual que les preniltransferases de tipus I són actius per si sols, però a diferència d'aquests últims requereixen un factor proteic, que és un component d'alt pes molecular. Aquest factor proteic facilita el recanvi catalític extraient els productes hidrofòbics del centre catalític, ja que sinó s'inhibiria la reacció (Ohnuma et al., 1991). També necessiten la presència de cations divalents com el  $Mg^{2+}$ .

### **2.1.2. CIS-PRENILTRANSFERASES**

Les *cis*-preniltransferases catalitzen l'addició en *cis* d'unitats d'IPP sobre diferents prenilfosfats al·lílics d'estereoquímica *trans* per donar lloc a productes d'estereoquímica mixta *trans-cis*. Les *cis*-preniltransferases es poden dividir en dos grups en funció de la longitud del producte de reacció.

#### **2.1.2.1. Preniltransferases de tipus IV: *cis*-poliprenildifosfat sintases de cadena llarga**

Inclouen enzims que sintetitzen *cis-trans*-poliprenildifosfats de cadena llarga mitjançant la condensació successiva d'IPP en *cis* sobre el substrat al·lílic *E*-FPP. Són actius en forma d'homodímers i requereixen la presència de cations divalents com el  $Mg^{2+}$ , i d'un component lipídic o detergent per mantenir el recanvi catalític, ja que aquests enzims es troben més o menys associats a fraccions de membrana.

En procariotes s'inclouen *cis*-preniltransferases que han estat identificades com undecaprenildifosfat sintases (UPPS) [Shimizu et al., 1998; Apfel et al., 1999], que juguen un paper essencial en la biosíntesi de la paret cel·lular, ja que són responsables de la formació de l'undecaprenildifosfat ( $C_{55}$ ), que és el precursor directe del compost lipídic que actua com a transportador glicosílic en la biosíntesi de components polisacàrids de la paret cel·lular com els peptidoglicans i els lipopolisacàrids. La determinació de l'estructura de la UPPS de *M. luteus B-P26* (Fujihashi et al., 2001) ha mostrat que l'estructura



terciària de les *cis*-preniltransferases és diferents de les *trans*-preniltransferases i ha donat informació sobre el seu mecanisme enzimàtic.

En eucariotes, un tipus de *cis*-preniltransferases són les dehidrodoliquildifosfat sintases (DPS), implicades en la síntesi del dehidrodoliquildifosfat (dedol-PP), el poliprenildifosfat de cadena llarga que s'utilitza com a precursor en la síntesi del dolicol (Sato et al., 1999), compost que juga un paper clau en la glicosilació de proteïnes. Tot i que fa temps que l'activitat dedol-PP sintasa està descrita (Adair i Keller, 1982; Wong i Lennarz, 1982), el primer gen clonat que codifica per una dedol-PP sintasa eucariota va ser el gen de llevat *RER2* (Return to Endoplàsmic Reticulum; Sato et al. 1999). En eucariotes catalitzen la formació de productes més llargs que els procariotes.

En plantes, existeixen altres *cis*-preniltransferases que sintetitzen dolícols i també poliprenols, compostos que juntament amb els dolícols formen una família d'alcohols poliisoprenílics de cadena llarga que s'han descrit en un gran nombre de plantes i que tenen una gran heterogeneïtat pel que fa a la longitud de la cadena carbonada (Tateyama et al., 1999). Per exemple, s'ha purificat parcialment una preniltransferases de *Morus bombycis* que sintetitza ficaprenols d'entre C40 i C60 (Koyama et al., 1988). Finalment, també són *cis*-preniltransferases els enzims implicats en la síntesi del cauxú (Asawatreratanakul et al., 2003).

#### **2.1.2.2. Preniltransferases de tipus V: *cis*-poliprenildifosfat sintases de cadena curta**

En aquest grup, de moment únicament s'inclou una *cis*-preniltransferasa de cadena curta de *M. tuberculosis* que sintetitza *cis-trans*-FPP (C<sub>15</sub>) mitjançant l'addició en *cis* d'un IPP sobre el GPP en presència de Mg<sup>2+</sup> (Schulbach et al., 2000).

## **2.2. Estructura i funció de les preniltransferases**

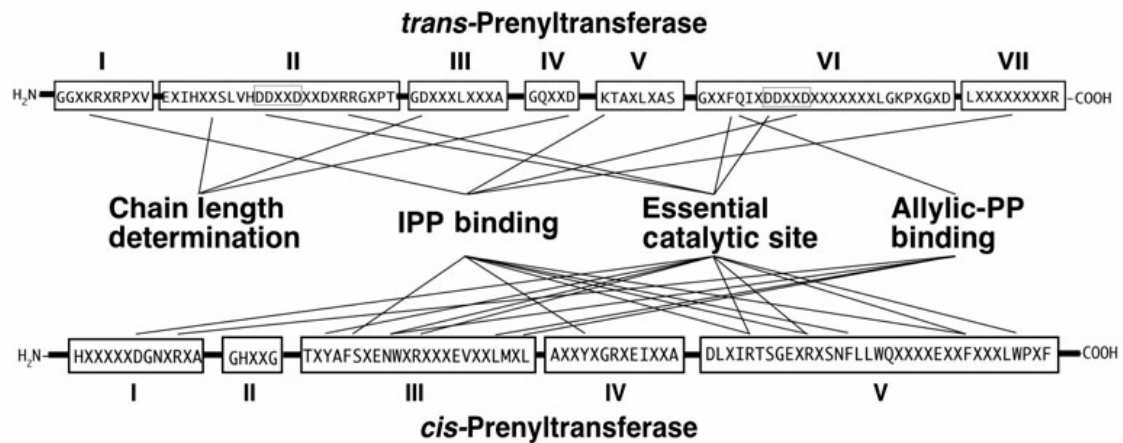
### **2.2.1. *Trans*-preniltransferases**

A partir dels anys 80, s'han clonat i caracteritzat nombrosos gens que codifiquen per molts tipus de *trans*-preniltransferases (Ogura i Koyama 1998). La comparació de les seqüències d'aminoàcids de les *trans*-preniltransferases mostren l'existència de 7 dominis

conservats en totes elles (**figura 8**). En les regions II i VI hi ha dos motius d'aspartats (DDxxD) involucrats en la catàlisi, mitjançant la quelació amb  $Mg^{2+}$ , i en la unió als substrats al·lílics (regió II) i al substrat homoal·lílic (IPP) [regió VI]. També estan conservades dues Lys en les regions I i V implicades en l'afinitat d'unió al IPP i un motiu FQ en la regió VI implicat en la unió dels substrats i en la catàlisi. El mecanisme de les *trans*-preniltransferases per determinar la longitud del producte final ve condicionat per l'estructura que delimita el camí per on el prenilfosfat s'allarga en l'interior de l'enzim, de manera que aminoàcids petits en aquesta estructura permeten la síntesi de productes més llargs i aminoàcids voluminosos aturen l'allargament de la cadena carbonada (Ohnuma et al, 1998).

### 2.2.2. cis-preniltransferases

En contraposició a les *trans*-preniltransferases, la informació disponible sobre els enzims que allarguen les cadenes carbonades dels productes en *cis* era molt escassa fins al clonatge i caracterització de la primera *cis*-preniltransferasa, la de *Micrococcus luteus* B-P 26 (Shimizu 1998), que a més ha estat la primera *cis*-preniltransferasa de la qual s'ha obtingut la seva estructura cristal·lina (Fujihashi 1999). Posteriorment també s'han clonat *cis*-preniltransferases d'altres microorganismes com *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* (Apfel et al 1999) i *Saccharomyces cerevisiae* (Sato et al., 1999). Les *Z*- i *E*-preniltransferases catalitzen condensacions seqüencials entre IPP i difosfats al·lílics amb l'alliberació de pirofosfat inorgànic. Per això s'esperava un alt grau de similitud entre ambdues famílies d'enzims, però sorprenentment no s'ha vist cap similaritat entre elles (Shimizu et al., 1998 ; Wang et al., 2000; Liang et al., 2002). Les *cis*-preniltransferases no tenen els dos dominis d'aspartats, excepte la *cis*-preniltransferasa de cadena curta de *M. tuberculosis* (Schulbach et al., 2000) que conté un únic domini ric en aspartats. En canvi, les *cis*-preniltransferases contenen cinc dominis conservats (**figura 8**). Estudis cristal·logràfics i de mutagènesi (de *E. coli* per Ko et al., 2001; de *M. luteus* per Kharel et al., 2001 i Fujihashi et al., 2001) indiquen que les regions I i II formen un P-loop, similar al d'altres enzims que uneixen grups difosfat, que interacciona amb el grup difosfat del FPP. En la regió I es formaria un pont de magnesi entre un Asp (D) i el grup difosfat del FPP. En la regió II hi ha un domini FSxEN important per la unió del substrat homoal·lílic (IPP) i la catàlisi. També en la regió V existeixen dues Arg (R) i un Glu (E) implicades en la unió a l'IPP i en la catàlisi. Pel que fa referència a la longitud del producte de reacció sembla important que el residu 72 de la regió III de la UPPS de *M. luteus* (A) sigui petit per permetre l'elongació de la cadena carbonada, i que el residu 137 de la regió V de la Upps de *M. luteus* (Lus) sigui gran per aturar la reacció. Per tant sembla que el mecanisme de les *cis*-preniltransferases per determinar la longitud del producte final és similar al de les *trans*-preniltransferases.



**Fig.8. Comparació de les regions conservades entre les *trans*- i *cis*-preniltransferases. S'indiquen les funcions proposades pels residus aminoacídics en les regions conservades en les diferents *trans*- i *cis*-preniltransferases. (Takahashi et al., 2006)**

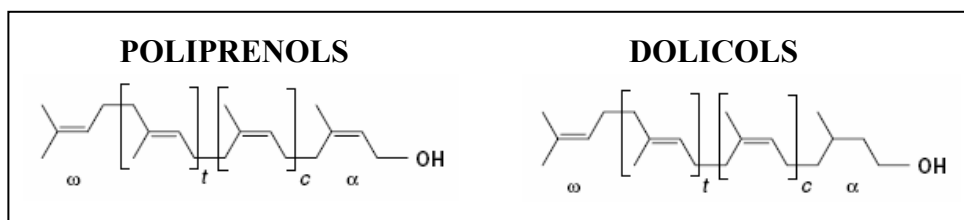
### **3. DOLICOLS i POLIPRENOLS**

Els alcohols poliisoprenílics van ser descoberts en els anys 50 en bacteries, llevat, mamífers i diverses plantes. La busca d'alcohols poliisoprenoides es va iniciar amb la descoberta accidental del solanesol com un lípid acompanyant de la ubiquinona en fulles de tabac (Rowland et al., 1956) i l'aïllament dels poliprenols com a contaminants de la polpa de cel.lulosa utilitzada en la fabricació del paper (Lindgren, 1965). Van ser inicialment caracteritzats com a metabolits secundaris, però amb de la descoberta del paper del seu derivat saturat en posició  $\alpha$ , el dolicol, en la biosíntesis de glicoproteïnes en el fetge de rata (Behrens et al., 1970) i del de l'undecaprenilfosfat en la biosíntesis dels polímers de la superfície de les bacteries (Wright et al., 1967; Higashi et al., 1970), l'interès pel seu estudi va incrementar de forma molt notable.

#### **3.1. Estructura i contingut de dolicoli i poliprenols en plantes**

Els alcohols poliisoprenoides constitueixen un grup de compostos hidrofòbics àmpliament distribuïts en la natura (Swiezewska i Danikiewicz, 2005). Les seves estructures consten de múltiples unitats d'isoprè amb una unió tipus cap-cua, amb un grup hidroxil a un extrem (residu  $\alpha$ ) i un àtom d'hidrògen a l'altre (extrem  $\omega$ ). La hidrogenació del doble enllaç en

el residu  $\alpha$  dona lloc als dolícols (Dol) en contrast amb els poliisoprenols  $\alpha$ -desaturats (Pren) (figura 9).



**Fig.9. Estructura dels poliprenols i dolícols.** *t* i *c* representen el nombre de residus en configuració *trans* o *cis*.  $\alpha$  i  $\omega$  represente els residus isoprenoides inicial i final respectivament.

La conformació dels dobles enllaços en aquestes molècules està estrictament controlades. Segons aquesta conformació els poliisoprenoides es classifiquen en tres subgrups: di-*trans*-poli-*cys*, tri-*trans*-poli-*cys*, i tot-*trans*. L'acumulació de dades describint nombrosos poliprenols i dolícols ha permès generalitzar que els poliprenols de bacteri, els de plantes d'entre 5-9 i de més de 16 unitats isoprenoides i els dolícols pertanyen als di-*trans*-poli-*cys*. Els poliprenols amb una longitud intermitja (9-15 residus) representen els tri-*trans*-poli-*cys*. L'exemple més reconegut d'alcohol all-*trans* és el solanesol (tot-*trans* Pren-9), que es troba sobretot en plantes de la família de les solanàcies, i addicionalment l'espadiol (tot-*trans* Pren-10) aïllat d'*A.maculatum* (Hemming, 1983). L'únic exemple d'un organisme amb una mescla d'alcohols tot-*trans* es dona en les fulles i arrels d'*Eucommia ulmoides*, que conté una família de poliprenols tot-*trans* (Pren 13 a 37, amb predominança del Pren-19), acompanyada d'una família de poli-*cis*-poliprenols (Pren 15 a 20, amb predominança del Pren-16) (Bamba et al., 2001). Cal destacar que els oligoprenilfosfats de cadena curta (GPP, FPP i GGPP) són tots d'estructura tot-*trans*. Si bé els alcohols poliisoprenílics estan conservats en tots organismes eucariotes, la longitud de la cadena carbonada és diferent en cada espècie, i a més en cada espècie no existeix una longitud determinada, sinó una mescla d'alcohols poliisoprenílics de diferent longitud, una de les quals és majoritària.

Pel que respecta al contingut en dolícols i poliprenols la majoria de bacteris només contenen undecaprenol (Pren-11). En canvi, els organismes eucariotes contenen una mescla d'entre 6 i 8 tipus diferents de dolícol, on dominen els Dol-16 en llevat, els Dol-18 en rata i els Dol-19 en humans. En plantes s'ha descrit l'existència de mescles complexes de dolícols i poliprenols de longitud variable, que varien en funció del teixit i/o estadi de desenvolupament de la planta. Així, en *Hevea brasiliensis*, *Gingko biloba* i *Pinus sylvestris* s'ha descrit que el contingut de dolícols i poliprenols és diferent segons el teixit analitzat,

comprentent dolícolos desde Dol-14 a Dol-21 i poliprenols desde Pren-10 a Pren-24 (Tateyama et al., 1999). En les arrels de *Coluria geoides* es troba una família de dolícolos (Dol-15 a 23, amb predominança de Dol 16) amb traces de diferents poliprenols, mentre que en fulles i llavors predominen els poliprenols (amb predominança de Pren-19) amb traces de dolícolos (majoritàriament Dol-17) (Skorupinska et al., 2003). El contingut de dolícolos i poliprenols no només varia en funció del teixit, sinó que també varia en els diferents orgànuls subcel·lulars. Per exemple, en els cloroplasts d'espínacs es troben majoritàriament poliprenols (Pren-11 i 12), glicinoprenols (Pren-11 i 12) i solanesol (Pren-45), mentre que en els microsomes hi ha majoritàriament dolícolos (Dol-14 a 16) (Sakaihara et al., 2000).

### **3.2. Biosíntesi dels poliprenols i dolícolos**

Tot i el paper essencial que juguen aquests isoprenoides en el metabolisme cel·lular, la seva ruta biosintètica encara està poc estudiada. Segons el model acceptat actualment (**figura 10**), deduït fonamentalment a partir d'estudis fets en *S.cerevisiae*, la síntesi del dolícol comença amb successives addicions d'IPP sobre el FPP fins a obtenir un poliprenol-PP de longitud determinada. El dolícol-P (Dol-P) es sintetitza a partir del poliprenil-PP sense formació i ruptura d'enllaços carboni-carboni (Bukhtiyarov et al., 1993). Un cop el poliprenol-PP (dedol-PP) té la longitud determinada és defosforilat per obtenir poliprenol, que és el substrat de l' $\alpha$ -reductasa, enzim que catalitza la formació de dolícol. La dolícol quinasa (Heller et al. 1992) catalitza la conversió final del dolícol en dol-P.

Tot i que l'IPP i el FPP són substrats solubles, tant els productes intermitjos com el dedol-PP final són productes altament hidrofòbics. Per tant, tan bon punt són sintetitzats han de ser inclosos en la bicapa lipídica de les membranes (Schenk et al., 2001). Això implica que la corresponent prenilttransferasa ha d'estar unida a la membrana. La localització de la prenilttransferasa a la membrana concorda amb el fet que des de fa temps està descrita la síntesi de dolícol en microsomes de rata (Adair i Keller, 1982; Wong i Lennarz, 1982). En aquest context, la dedol-PP sintasa de llevat Rer2p (Sato et al., 1999) no conté cap domini hidrofòbic transmembrana, però té a l'extrem carboxiterminal el motiu KKxx, descrit com un senyal de retorn al reticle endoplasmàtic en proteïnes de membrana del RE (Townsend et al., 1994), tot i que no s'ha demostrat la seva funcionalitat experimentalment en Rer2p. A més, l'activitat *cis*-prenilttransferasa en llevat es localitza a la fracció p13.000, que és la fracció on es colocalitzen proteïnes marcadores del RE (Sato et al., 1999). També s'han realitzat estudis de localització de la proteïna Rer2p mitjançant immunofluorescència i fusió de la proteïna Rer2p a la GFP que

indiquen que la proteïna Rer2p es localitza en regions concretes del RE (Sato et al., 2001). Aquestes observacions indiquen que la proteïna Rer2p està unida a les membranes del RE.

El mecanisme que regula la longitud del producte sintetitzat per les *cis*-preniltransferases sembla ser anàleg al de les *trans*-preniltransferases, segons el qual la longitud ve determinada per la mida de la butxaca hidrofòbica de la proteïna en la qual es localitza el producte fins que arriba a la longitud final (revisat a Fuhihashi et al., 2001; Takahashi et al., 2006). Tot i així sembla haver-hi altres mecanismes de regulació de la mida del producte, independents de les característiques de l'enzim. Per exemple, un factor que podria afectar la longitud del producte de les *cis*-preniltransferases és la velocitat d'alliberament del producte sintetitzat. Així, un alliberament lent limita la catàlisi de la UPPS (Liang et al., 2002) i el producte sintetitzat és més curt en presència de detergents com el Tritó (Matsuoka et al., 1991). Addicionalment, s'ha descrit que el producte que es sintetitza en *S. cerevisiae* en presència de membranes del RE és el poliprenol (el producte defosforilat però no reduït) de la mateixa mida que el dolicol final (C80-85), mentre que quan es solubilitza parcialment la preniltransferasa, la part d'aquesta que es solubilitza fabrica poliprenol-PP i a més amb una alta proporció de productes finals amb la cadena carbonada més llarga (C90-95) [Bukhtiyarov et al., 1993; Szkopinska et al., 1996]. Aquests resultats suggereixen que la preniltransferasa i la fosfatasa formen un complex en la membrana del RE dedicat a la fabricació de poliprenols, i que, tot i que la *cis*-preniltransferasa és la principal responsable de determinar la longitud de la cadena carbonada del producte final, la fosfatasa també hi està implicada. Aquests resultats també permeten hipotetitzar l'existència en el RE d'una agrupació enzimàtica responsable de la síntesi del dolicol.

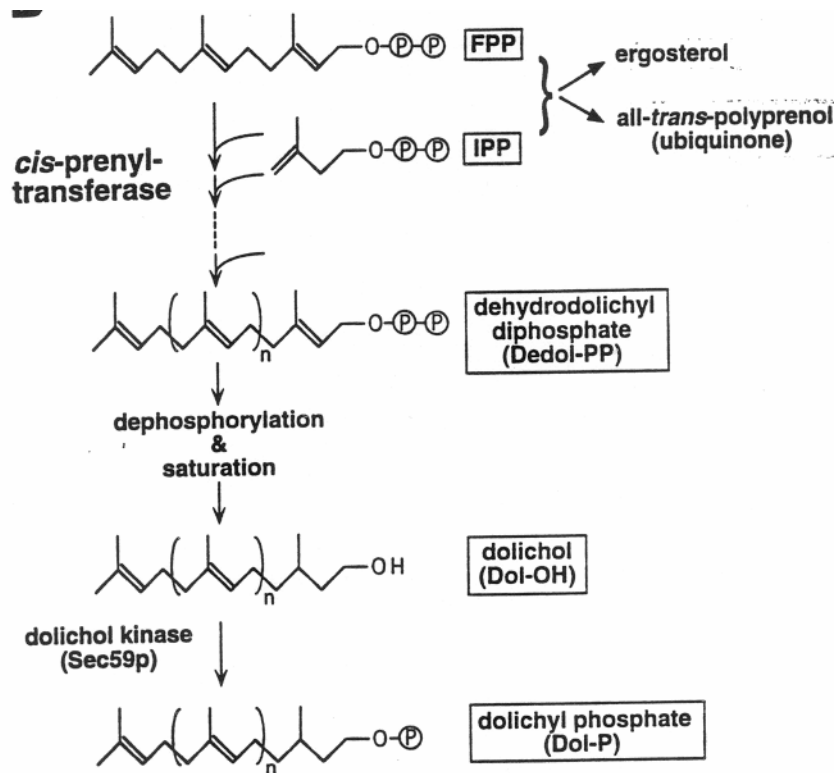


Fig.10. Via de síntesis de poliprenols i dolícols en *S. cerevisiae* (Ogura et al., 1998).

### 3.3. Funcions biològiques dels dolícols i els poliprenols

La funció més ben estudiada del dolícol és la de cofactor en la N-glicosilació de proteïnes (Burda et al. 1999; Schenk et al., 2001). Així, un cop s'ha format el dolícol-P se li afegeixen en la cara citoplasmàtica del RE diversos residus glucídics fins a formar el  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichol}$ , el qual es translocat a la cara luminal del RE on es completa la síntesis del  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichol}$ . Aquest compost és el que la cèl.lula utilitza per glicosilar un gran nombre de proteïnes. Recentment s'ha proposat un paper bifuncional del dolícol en la glicosilació de proteïnes, ja que a part de transportador de residus glucídics, forma part de l'estructura que organitzaria i estabilitzaria els dominis funcionals de les proteïnes del complex multiglucosil transferasa, involucrat en processos de translocació i biosíntesis. Aquest model es basa en el descobriment d'una interacció física directa entre aa específics (seqüència de reconeixement de polisioprenoides) i poliisoprenoides (Zhou et al., 2003). Interaccions entre proteïnes i poliprenols-P també s'ha suggerit que estabilitzarien complexos multipèptidics durant la síntesis de la ubiquinona (Gin et al., 2005).

La disponibilitat del dolicol-P és un dels factors limitants en la síntesi de lipooligosacàrids en eucariotes superiors (Crick et al 1991, Sagami et al 1996 i Carlberg et al 1996). També sembla estar implicat en la formació i correcte funcionament de les membranes (Sato et al., 1999). Els dolícols-P i/o els poliprenols-P es postulen també com a donadors de grups isoprenoides en la prenilació de proteïnes en rata (Thelin et al., 1995), espinacs (Szwiezewska et al., 1993) i *A. thaliana* (Gutkowska et al., 2004). També s'ha vist que el dolicol-P indueix apoptosi en cèl.lules de leucèmia humana (Yasugi et al., 2000). Recentment, s'ha proposat que l'estructura multiinsaturada del dolicol podria actuar com a protector de lípids no saturats de les membranes contra atacs oxidatius mediat per precursors de radicals lliures (Bizzarri et al., 2003).

### **3.4. Regulació de la síntesi de dolícols i poliprenols**

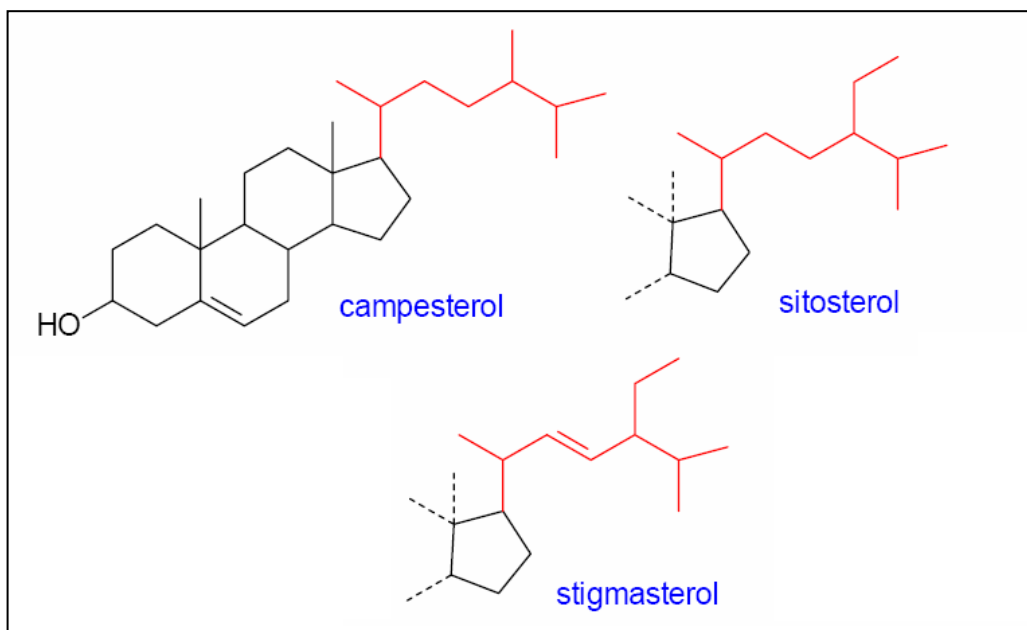
En diferents estudis s'ha vist que els nivells de dolicol-P en el RE són un factor de control important en la biosíntesi de d'intermediaris glicolipídics i com a conseqüència de la glicosilació de proteïnes. Per tant, ha d'existir una estricta regulació de la síntesi de Dol-P. Tot i això, es coneix molt poc sobre la regulació de la síntesi d'aquests compostos. Així s'ha descrit que canvis en el balanç entre fosforilació i desfosforilació del dolícols s'han implicat en el control del nivells de dolicol -P (Baht et al., 1991). Tot i això, l'increment en activitat *cis*-preniltransferasa presenta la millor correlació amb la inducció de la biosíntesi de dolicol-P i la glicosilació de proteïnes en cèl.lules de mamífers. La inducció de l'activitat *cis*-preniltransferasa precedeix a un gran increment en la biosíntesi de dolicol-P, intermediaris glicolipídics i glicosilació de proteïnes en cervell d'embrió de rata (Crick et al., 1994 a), limfòcits B de ratolí (Crick et al., 1994 b) i cèl.lules de coriocarcinoma (Konrad et al., 1996). Un altre enzim que s'ha suggerit que podria ser limitant en la síntesi de dolicol és la poliprenol reductasa, l'enzim que converteix els poliprenols en dolicol, ja que alteracions en aquesta activitat enzimàtica alteren la síntesi de dolicol i intermediaris glicolipídics (Quellhorst et al., 1997; Acosta-Serrano et al., 2004; Szkopinska et al., 2006).



## **4. FITOESTEROLS**

Els esterols es van descriure per primera vegada com a components dels càlculs biliars ja al 1770, mentre que el químic francès Chevreul va aïllar el colesterol de grasses animals l'any 1815. Tot i això, no va ser fins a ben entrat el segle XX que es va definir l'estructura tetracíclica dels esterols (Windaus A., 1932). Els esterols són components ubiqus de tots els teixits animals, vegetals, de fongs i d'insectes, on es localitzen de forma majoritària a les membranes, però no de forma uniforme entre les diferents membranes cel·lulars. La major proporció d'esterols és a la membrana plasmàtica (entre un 30 i un 50%), mentre que la mitocondria i el reticle endoplasmàtic tenen un nivell molt baix d'esterols, i l'aparell de Golgi en conté una quantitat intermitja. Els animals i fongs sintetitzen una alta proporció dels seus requeriments d'esterols, però també poden ingerir-ne i absorbir-ne quantitats apreciables en la dieta. Molts invertebrats, incloent-hi els insectes, no poden sintetitzar-los i els han d'obtenir de la dieta, encara que poden convertir fitoesterols, com el  $\beta$ -sitoesterol, en colesterol que és convertit posteriorment en ecdiesteroids involucrats en el desenvolupament embrional i larval (Svoboda i Weirich, 1995).

Els esterols vegetals formen un grup de triterpens (isoprenoides amb un esquelet de 30 àtoms de carboni) amb una estructura tetracíclica de ciclopentafenantrè i una cadena lateral al carboni C-17. Els esterols majoritaris en plantes (sitoesterol, campesterol i estigmaesterol; **figura 11**) tenen un enllaç doble en C-5 i un substituent d'un o dos carbonis amb estereoquímica variable en la posició C-24 de la cadena lateral. Els fitoesterols també poden tenir un doble enllaç en la cadena lateral que pot tenir una estereoquímica *cis* (com l'isofucoesterol) o *trans* (com l'estigmasterol). Els fitoesterols també es poden dividir en base a la seva estructura o biosíntesis en: 4,4-dimetilesterols (com el cicloartenol), esterols amb dos grups metil a la posició C-4 que són els primers compostos esteroidals de la via de síntesis de fitoesterols, els 4-metilesterols (com l'obtusifoliol i el 24-etildenlofenol entre d'altres), esterols amb un grup metil en C-4 que ocupen el tronc central de la síntesis de fitoesterols i els 4-desmetilesterols (com el campesterol i l'estigmasterol), esterols sense cap substituent en C-4 que són els productes finals de la via de síntesis. A més, els 4-desmetilesterols es poden subdividir en funció de la posició dels dobles enllaços en l'anell B en:  $\Delta^7$ -esterols, amb un sol doble enllaç en posició C-7,  $\Delta^{5,7}$ -esterols, amb dos dobles enllaços, un en C-5 i un altre a C-7, i els  $\Delta^5$ -esterols, amb un sol doble enllaç en posició C-5 i que són els productes finals de la via, incloent-hi els esterols majoritaris (campesterol, sitosterol i estigmasterol).



**Fig.11. Estructura química dels fitosterols majoritaris.** Estructura química del campesterol, sitosterol i l'estigmasterol. L'estructura comuna es mostra només en el cas del campesterol.

Mentre el colesterol és l'esterol majoritari dels vertebrats i l'ergosterol és l'esterol majoritari dels llevats i algunes algues unicel.lulars, la majoria de plantes superiors contenen una mescla complexa d'esterols (fitosterols) on el colesterol és un compost minoritari. En general, les plantes contenen més d'un 60% de 24-etilesterols (sitosterol i estigmasterol) i menys d'un 40% de 24-metilesterols (Benveniste P., 2002). Fins a l'actualitat s'han descrit més de 200 esterols diferents en plantes, si bé la quantitat i proporció relativa de tots ells depenen de cada espècie. En el cas d'*A. thaliana* una mescla típica dels fitosterols majoritaris (**Taula 2**) seria d'un 64% de sitosterol, 11% campesterol, 6% d'estigmaesterol, un 3% de isofucoesterol i un 3% de 24-metilecicloartenol a més d'altres esterols minoritaris (Benveniste P., 2004). Hi ha algunes famílies de plantes que presenten importants diferències en el seu contingut d'esterols. Per exemple, les cariofil·làcies (com els espinacs) contenen quasi exclusivament  $\Delta^7$ -esterols, com l'espinasterol i el  $5\alpha$ -estigmast-7-en- $3\beta$ -ol (Adler et al., 1987), les brassicàcies contenen brassicasterol (Schaeffer et al., 2001), i els grans de cereals són relativament abundants en fitoestanols, esterols completament saturats.

ESTEROL	µg d'esterol / g de pes sec
Sitosterol	1600
Campesterol	275
Estigmasterol	150
24-metilencicloartenol	100
Cicloartenol	75
Isofucosterol	75
Brassicasterol	50
Altres	185

**Taula 2. Perfil d'esterols d'*A. thaliana*.** Dades de Benveniste P., 2002.

La majoria dels esterols vegetals es troben en forma d'esterols lliures. En menor abundància, els esterols poden trobar-se en forma d'esters d'àcids grassos. Aquests esters són ser un sistema de reserva d'esterols, ja que les plantes que sintetitzen grans quantitats d'esterols, com és el cas de les plantes que sobreexpressen diferents formes d'HMGR de diferents espècies, es caracteritzen per acumular-los en forma d'esters en vesícules lipídiques (Chappel et al., 1995; Schaller et al., 1995; González, 2002). En menor abundància, els esterols també es troben en forma de glucòsids i acilglucòsids (Schaller H., 2003), preferentment en la membrana plasmàtica. La regulació de la proporció d'aquestes dues formes no es coneix, però probablement està implicada en el control estricte de la concentració d'esterols lliures (Ullman et al., 1993).

#### **4.1. Biosíntesi dels fitoesterols**

La ruta biosintètica dels fitoesterols (**figura 12**) té molts passos en comú amb la del colesterol, tot i que presenta dues diferències importants. En primer lloc, les plantes ciclel el 2,3-oxidoesqualè en cicloartenol, un esterol pentacíclic amb un anell 9β-19-ciclopropànic, mentre que els animals i els fongs ciclel el 2,3-oxidoesqualè en lanosterol, un esterol tetracíclic. En segon lloc, mentre que la ruta biosintètica del colesterol en animals i ergosterol en llevat és lineal, la ruta biosintètica dels fitoesterols es bifurca en dues branques: una que dona lloc als 24-etilesterols (sitosterol i estigmasterol) i una altra que dona lloc als 24-metilesterols (campesterol).

La ruta biosintètica dels fitoesterols (revisat a Benveniste, 2002) es pot dividir en quatre etapes diferents. En la primera etapa, fonamentalment citosòlica, a través de la via del MVA es sintetitza l'esqualè, el primer producte específic de la via de síntesis d'esterols. La

segona part de la via, que té lloc al RE, inclou les etapes que van des de l'esqualè al 24-metilenlofenol. En aquest punt, la via es divergeix en dues branques. Una branca dóna lloc als 24-etilesterols (sitosterol i estigmasterol) i l'altra als 24-metilesterols (campesterol).

La majoria d'enzims implicats en la via de síntesis d'esterols en *A. thaliana* han estat identificats i clonats durant els últims 10 anys. D'aquests, la majoria han estat identificats i clonats en primer lloc en *A. thaliana* i posteriorment en altres plantes com la soja, el blat, l'arròs i el tabac (revisat a Benveniste P., 2002 i 2004; Schaller H., 2004). Aquesta segment de la via de síntesi dels fitoesterols es pot subdividir en tres subsegments. El primer segment és el tronc comú que dóna lloc al 24-metilenlofenol a partir de l'esqualè. En aquest punt la via es divergeix en dues branques segons si el 24-metilenlofenol és modificat per la C24-metiltransferasa o no. Una branca dóna lloc als 24-etilesterols (sitosterol i estigmasterol) i l'altra als 24-metilesterols (campesterol).

### **4.1.1. Tronc comú de la síntesis de fitoesterols**

El primer pas d'aquest segment de la via de síntesis d'esterols és la oxidació de l'esqualè a 2,3-epoxiesqualè, compost que pateix una ciclació per convertir-se en el primer intermediari esteroidic de la via, el cicloartenol. Aquesta reacció, catalitzada per la cicloartenol sintasa (Benveniste P., 1986), és una de les reaccions més complexes que es coneixen ja que s'han de trencar 11 enllaços i formar-ne 11 de nous per formar el cicloartenol, esterol pentacíclic amb 9 centres quirals. Els esterols de fongs i plantes difereixen dels esterols animals en la presència de grups alquil en la posició C-24. En les plantes superiors existien 24-metil i 24-etilesterols, producte de l'acció de dues metiltransferases diferents (Bouvier-Navé et al., 1997 i 1998). La primera reacció de metilació en C-24 és catalitzada per la SMT1 que incorpora un grup metil al cicloartenol donant lloc al 24-metilcicloartenol. A partir d'aquest punt es produeixen una sèrie de reaccions que inclouen demetilacions, isomeritzacions i reduccions per donar lloc al 24-metilenlofenol, intermediari a partir del qual es bifurca la via de síntesis dels fitoesterols.

En els últims anys s'han identificat en *A. thaliana* mutants de diferents gens d'aquest segment de la via (Clouse S., 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller H., 2004). Així, s'han identificat mutants del gen *SMT1* (Diener et al., 2000; Schrick et al., 2002; Willemsen et al., 2003), de l'esterol C-14 reductasa (Schrick et al., 2000; Souter et al., 2002) i de l'esterol  $\Delta 7-8$  isomerasa (Souter et al., 2002). Aquests mutants, presenten una acumulació dels substrats de l'enzim deficient i una disminució dels nivells d'esterols finals. Tot i que són

gens de còpia única no s'observa una absència total d'esterols finals com seria d'esperar, fet que suggereix l'existència d'altres enzims que poden substituir parcialment la funció dels enzims deficients. A més, presenten una sèrie de fenotips com ara defectes en l'embriogènesis, elongació cel.lular, diferenciació vascular i senyalització hormonal que no són revertits per l'addició de brassinoesteroides, sintetitzats a partir dels 24-metilesterols.

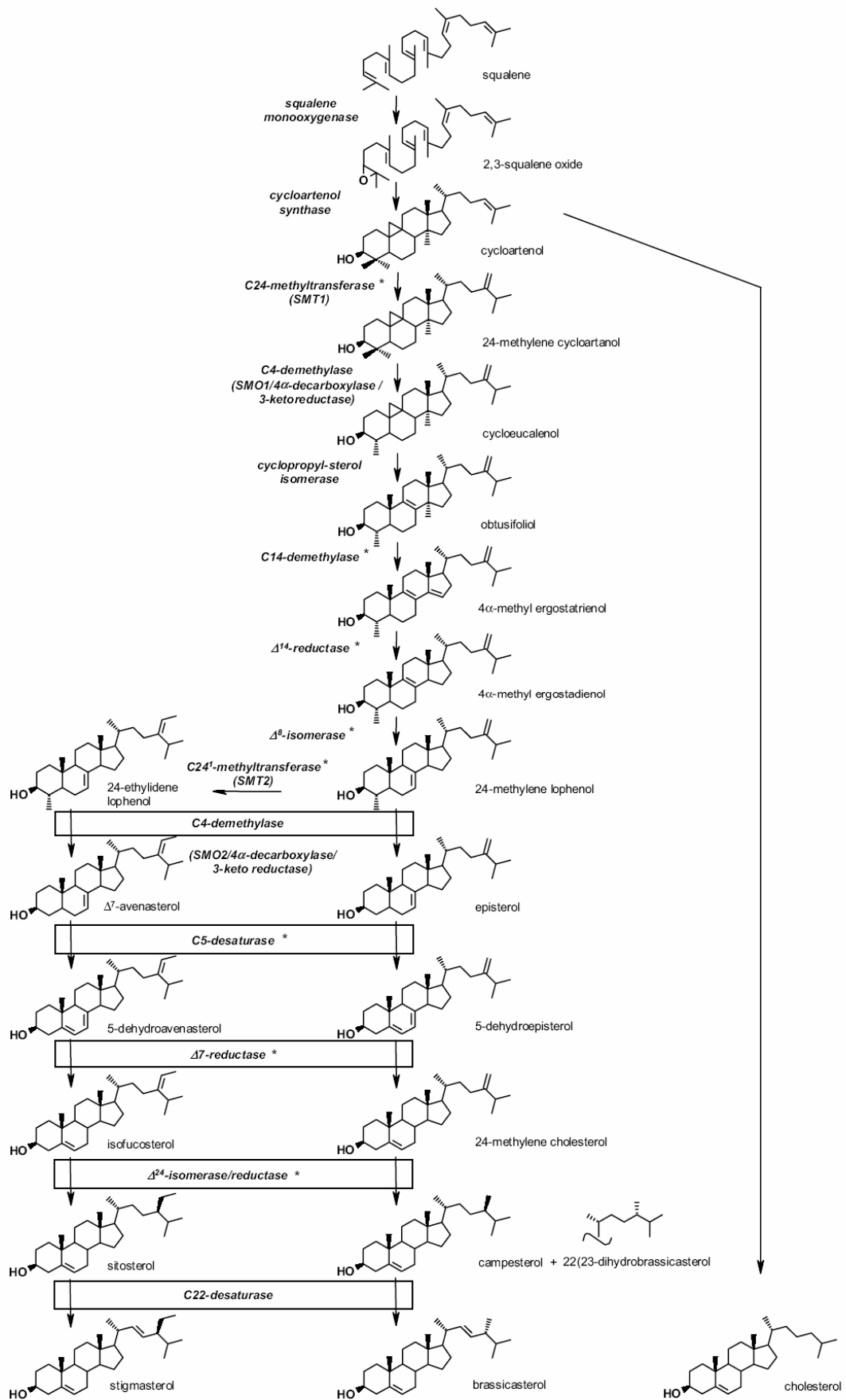
### **4.1.2. Síntesis dels 24-etil i 24-metilesterols**

En aquest punt la via de síntesis de fitoesterols es bifurca per donar lloc d'una banda als 24-estilesterols (majoritàriament sitoesterol i estigmasterol) i per altra banda als 24-metilesterols (majoritàriament campesterol), que són els precursors de les hormones esteroides vegetals, els brassinosteroides.

L'enzim esterol metiltransferasa 2 (SMT2) és el primer enzim de la branca dels 24-estilesterols, i catalitza l'addició d'un grup metil al 24-metilenlofenol per donar lloc al 24-etilidenlofenol. L'SMT2 té un paper crucial en el balanç entre campesterol, esterol precursor dels brassinoesteroides, i el sitosterol per a satisfer els requeriments del desenvolupament de la planta i la integritat de la membrana (Schaeffer et al., 2001). A partir d'aquest punt, les transformacions que pateixen tan els 24-estilesterols com els 24 metilesterols, que inclouen passos de desmetilació, reducció, desaturació i isomerització, són realitzades en ambdós casos pels mateixos enzims, que al utilitzar diferents substrats donen lloc als diferents productes finals.

S'han identificat en *A. thaliana* mutants de diferents gens d'aquest segment de la via (Clouse S., 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller H., 2004). Així, s'han identificat mutants de la  $\Delta 7$ -esterol-C5-desaturasa (Gachotte et al., 1996; Choe et al., 1999b; Catterou et al., 2001 a i b), de la  $\Delta 5,7$ -esterol- $\Delta 7$ -reductasa (Choe et al., 2000) i  $\Delta 24$ -esterol isomerasa/reductasa (Klahre et al., 1998; Choe et al., 1999a). Al igual que els mutants de la part troncal de la via, aquests presenten una acumulació dels substrats de l'enzim deficiència i una disminució dels nivells d'esterols finals. A diferència dels mutants de la part troncal de la via, aquests mutants presenten un fenotip d'enanisme que sí és revertit amb l'addició de brassinoesteroides. L'únic mutant d'un gen de la part inferior de la via que presenta un fenotip no rescatable per brassinoesteroides és del gen *SMT2*. Aquest presenta un fenotip d'enanisme i baixa fertilitat que s'assembla al dels mutants de la part troncal de la via, però a diferència d'aquests no presenta defectes embrionaris.

# Introducció



**Fig.12. Biosíntesis d'esterols en plantes superiors** (Adaptat de Schaller, 2004). Les reaccions enzimàtiques per les quals s'han caracteritzat mutants en *A. thaliana* estan marcades amb un asterisc. Els enzims enmarcats catalitzen reaccions tant de la branca del 24-estilsterols com de la dels 24-metilsterols.

## **4.2.Funcions dels fitoesterols**

En les cèl.lules vegetals els esterols tenen com a funció principal la formació i modulació de la fluïdesa de les membranes al interaccionar amb els altres components lipídics de les membranes, com els fosfolípids i els esfingolípids complexos (Demel et al., 1976). Es creu que el sitoesterol, el campesterol i en menor mesura l'etigmaesterol són capaços de restringir la fluïdesa i permeabilitat de la membrana al restringir la mobilitat de les cadenes d'àcids grassos. En la membrana plasmàtica els fitoesterols s'associen amb glicoesfingolípids per formar "lipid rafts", anàlegs als de les cèl.lules animals (apartat 6.1). S'ha demostrat que modificacions en el contingut d'esterols de la membrana plasmàtica alteren les funcions de proteïnes unides a membranes com enzims, canals, receptors o components de vies de transducció de senyals, com per exemple l'H<sup>+</sup>ATPasa de blat (Grandmougin-Ferjani et al., 1997), la distribució de l'auxina (Willemsen et al., 2003) i la resposta a l'etilè (Souter et al., 2002).

A part del seu paper com a constituents de les membranes, l'altre rol que tradicionalment s'ha donat als esterols és el de ser els precursors de les hormones esteroides vegetals, els brassinoesteroides, que es sintetitzen a partir del campesterol. Els brassinoesteroides juguen un paper essencial en processos vitals de la planta com són l'expansió cel.lular, la diferenciació vascular, l'etiologació i el desenvolupament reproductiu (Clouse et al., 1998; Bishop et al., 2002; Vert et al., 2005). Tot i això, els últims anys l'anàlisi de mutants de la part troncal de la via de síntesis de fitoesterols suggereix un paper essencial dels esterols en processos importants pel desenvolupament de les plantes com l'embriogènesi, l'elongació cel.lular, la diferenciació vascular i la senyalització hormonal, independentment de la seva conversió en BR (Clouse S., 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller et al., 2004). Així els mutants *SMT1*, *FACKEL/HYDRA 2* i *HYDRA1*, que tenen inactivats els enzims SMT1, l'esterol C14-reductasa i l'esterol  $\Delta 7-8$ -isomerasa respectivament, presenten defectes en l'embriogènesi, la diferenciació vascular i són plantes més petites amb múltiples meristems apicals (Diener et al., 2000; Jang et al., 2000; Schrick et al., 2000; Schrick et al., 2002; Souter et al., 2002). Tots aquests fenotips no són rescatables amb l'aplicació de brassinoesteroides. Tot i que una hipòtesis per explicar aquests fenotips seria una alteració de les propietats de les membranes que alteraria la senyalització d'auxina (Willemsen et al., 2003) i etilè (Souter et al., 2004), el fet que la divisió cel.lular bàsica no estigui afectada en el mutant *FACKEL* (Schrack et al., 2000) i que el mutant

de l'esterol C14-reductasa, enzim situat a la part inferior de la via, no presenti aquest fenotip tot i tenir profundament alterat el contingut d'esterols finals (Klahre et al., 1998; Chloe et al., 1999a), suggerien un possible paper dels esterols com a molècules senyal (Clouse S., 2002; Schrick et al., 2004), fet que ja ha estat descrit en humans (Incardona i Eaton, 2000; Duman-Scheel., 2002). Estudis recents donen suport a aquesta hipòtesi. Així, diferents esterols poden afectar l'expressió de gens involucrats en l'expansió i divisió cel·lulars de forma similar als brassinoesteroides (He et al., 2003) i l'obtusifoliol, intermediari de la síntesis de fitoesterols, pot ser transportat a parts distals de la planta (O'Brien et al., 2005).

A part de modular les característiques físico químiques de les membranes i del seu possible paper com a molècules senyals, els fitoesterols són essencials en la correcta construcció de la paret cel·lular, ja que el sitosterol- $\beta$ -glucòsid es postula com un iniciador de la síntesis de la cel·lulosa (Peng et al., 2002) i la sitosterol-ciclodextrina es postula com un intermediari crític en l'assamblatge de les microfibrilles de cel·lulosa (Schrick et al., 2004).

A més de la seva importància biològica per a les plantes, els fitoesterols tenen un interès addicional degut a la seva capacitat per disminuir els nivells de colesterol circulant en humans, en interferir l'absorció intestinal del colesterol de la dieta i les sals biliars (Nguyen 1999; Piironen et al., 2000; Ostlund i Lin, 2006), inhibir el processament del factor de transcripció SREBP-2 i activar els receptors X del fetge (Yang et al., 2004). Així doncs, els fitoesterols s'han d'incloure dins el grup dels nutracèutics, compostos que a més de tenir un valor nutricional tenen activitat farmacològica. Aquest fet és especialment important en les societats occidentals on una bona part de la població té nivells de colesterol circulant per sobre dels 200 mg/dl i on les malalties cardiovasculars són la principal causa de mortalitat (Burnett et al., 2006). Actualment ja existeixen diferents productes (llets i margarines) que incorporen fitoesterols en la seva composició, i que poden arribar a disminuir els valor de colesterol-LDL circulant entre un 10 i un 20%.

### **4.3. Regulació de la biosíntesis de fitoesterols**

La varietat d'esterols sintetitzats per les plantes i la importància de les seves funcions suggereixen l'existència de complexos mecanismes de regulació que permetin la biosíntesis coordinada i precisa dels diferents esterols en diferents situacions ambientals, teixits i/o estadis de desenvolupament. En mamífers, s'ha demostrat que el principal mecanisme de control de la síntesis de colesterol és la regulació de l'expressió de gens implicats en aquest procés per les Sterol Regulatory Elements Binding Proteins o SREBP (McPherson i Gauthier,



2004; Horton, 2002; Eberlé et al., 2004). En llevat, no existeixen homòlegs de les SREBP, però recentment s'han descrit dos factors de transcripció (Upc2p i Ecm22p) que regulen de forma coordinada diferents gens de la via de síntesis d'esterols i que podrien dur a terme les mateixes funcions que les SREBP (Vik i Rine, 2001; German et al., 2005). En plantes, encara no s'ha descobert cap mecanisme de regulació similar. Tot i això, si que es coneixen els principals enzims implicats en la regulació de la via de síntesis de fitoesterols.

#### **4.3.1. Famílies multigèniques**

Una característica important dels enzims implicades en la biosíntesis d'isoprenoides en plantes és la presència de diferents isoenzims per a una determinada activitat catalítica, que estan codificats per petites famílies multigèniques. Per exemple, en *A.thaliana* existeixen 2 gens i dues isoformes d'acetoacetyl-CoA tiolasa (Ahumada-Díaz et al., 2001), 2 gens i 3 isoformes d'*HMGR* (Enjuto et al., 1994; Enjuto et al., 1995; Lumbreras et al., 1995), 2 gens i 3 isoformes d'*FPS* (Cunillera et al., 1996 i 1997) i 2 gens i 2 isoformes de la *SMT2* (Bouvier-Nave et al., 1998). Aquest fenomen no és exclusiu d'*A.thaliana*. Així, per exemple, en el cas de la *HMGR* s'han identificat famílies multigèniques de 3 gens en *Hevea brasiliensis* (Chye et al., 1992), de 4 a 6 gens en cotó (Loguercio et al., 1999), 3 gens en arròs (Ha et al., 2001) i al menys 9 gens en patata (Bhattacharyya et al., 1995).

La presència de famílies multigèniques suposa en si mateixa un mecanisme de regulació de la síntesis d'isoprenoides, ja que tan l'expressió de cada gen, l'activitat de cada isoenzim i la seva localització subcel.lular poden ser regulades de forma independent. Per exemple, nombrosos treballs descriuen la regulació diferencial de l'expressió dels gens que codifiquen per la *HMGR*. Així, el patró d'expressió dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*A.thaliana* mostra que l'ARNm que codifica per a la *HMGR1S* s'expressa en tots els teixits de forma intensa, mentre que els ARNm corresponents a les isoformes *HMGR1L* i *HMGR2* s'expressen només en teixits en divisió activa com plàntules, arrels i inflorescències, fet que suggereix que intervenen en la síntesis d'isoprenoides necessaris en aquests teixits (Enjuto et al., 1994; Lumbreras et al., 1995). En patata s'ha demostrat que l'acumulació d'esterols en el teixit tuberós en resposta a ferida és degut a la inducció del gen *HMG1*, mentre que l'acumulació de fitoalexines deguda al tractament amb àcid araquidònic es correlaciona amb la inducció dels gens *HMG2* i *HMG3* (Choi et al., 1992). Resultats similars s'han obtingut també en tomàquet (Weissenborn et al., 1995) i pebrot (Ha et al., 2003).

A més, l'existència de famílies multigèniques permet la regulació coordinada de diferents isoenzims implicats en la síntesis d'isoprenoides específics. En aquest

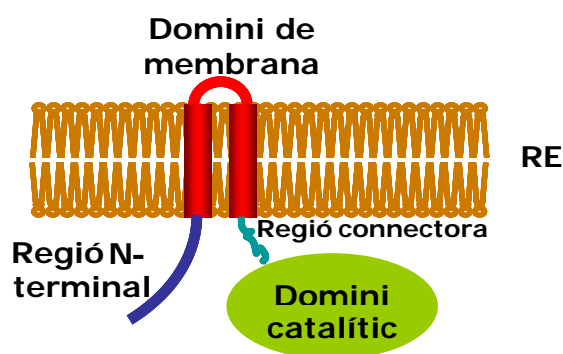
sentit, existeixen evidències de l'existència d'una regulació coordinada de diferents enzims per a modificar el flux a través de diferents branques de la via. S'ha observat que durant el creixement de cultius cel·lulars de tabac s'acumulen esterols i no sesquiterpens, però l'addició d'elicitors fúngics redueix l'acumulació d'esterols al 10 % i s'indueix la síntesis de sesquiterpens. L'addició de l'elicitor redueix la incorporació d'acetat i MVA en els esterols, mentre que l'incrementa en els sesquiterpens (Threlfall et al., 1998; Vögeli et al., 1988). Aquests resultats suggereixen que aquesta regulació és posterior a la HMGR. S'ha correlacionat la disminució en la síntesis d'esterols i la inducció de la de sesquiterpens amb una baixada de l'activitat SQS i un augment de l'activitat sesquiterpè ciclasa. Donat que els dos enzims estan situades immediatament després de l'FPP, punt de ramificació de la via de síntesis d'isoprenoides, la inducció d'un i la inhibició de l'altre s'ha interpretat com un indicador de l'existència d'un mecanisme de control coordinat que regula el flux d'intermediaris metabòlics a través de les diferents branques de la via que donen lloc a la formació de determinats productes finals. S'han obtingut resultats similars en patata (Zook et al., 1991; Choi et al., 1994), cultius cel·lulars de *Tabernaemontana divaricata* (Fulton et al., 1994) i pebrot (Hugueney et al., 1996).

### **4.3.2. Paper de la HMGR**

Molt sovint el flux a través d'una ruta metabòlica és controlat per una o poques etapes compreses per reaccions irreversibles. Els enzims que catalitzen aquestes etapes estan regulats acuradament per determinar el flux adequat a través de la via, com és el cas de la HMGR. L'HMGR catalitza la formació de mevalonat a partir d'HMG-CoA (**figura 2**), que és una etapa limitant en la síntesis d'esterols tan en cèl·lules de mamífer com de llevat (Goldstein i Brown, 1990; Hampton et al., 1996). En les plantes superiors, també s'ha proposat l'HMGR com la principal etapa limitant en la síntesis d'esterols (Stermer, 1994; Hampton et al., 1996; Schaller, 1995). Així en *A. thaliana* la sobreexpressió de la isoforma HMGR1S i del domini catalític dona lloc a un increment en el contingut d'esterols (Manzano et al., 2006).

En totes les plantes estudiades, s'ha identificat una família multigènica d'*HMG* que codifica per a diferents isoformes d'HMGR (Antolín, 2005). Per exemple, *A. thaliana* conté una petita família multigènica composta de dos gens, *HMG1* i *HMG2*, que codifiquen per a tres isoformes diferents, HMGRS1S, HMGR1L i HMGR2. En plantes les HMGR també són enzims localitzats en la membrana del reticle endoplasmàtic (**figura 13**) que contenen una regió N-terminal citosòlica força divergent entre les espècies, una regió de membrana amb dos fragments transmembrana molt conservada en plantes, una regió connectora

molt divergent i el domini catalític citosòlic que és altament conservat en l'escala evolutiva (Campos i Boronat, 1995; Denbow et al., 1996).



**Fig. 13. Topologia de l'HMGR de plantes.** El domini N-terminal inclou una regió N-terminal citosòlica, una regió de membrana molt conservada en plantes, una regió connectora i el domini catalític citosòlic altament conservat en arqueobacteris, animals, llevats i plantes.

En les cèl·lules d'animals i de llevat, la quantitat d'HMGR està regulada per esterols i altres isoprenoides derivats de la via del mevalonat que actuen a nivell de transcripcional, post-transcripcional i post-traducciona (Goldstein i Brown, 1990; Hampton et al., 1996; Gardner i Hampton, 1999). A més, l'activitat HMGR és modulada per fosforilació reversible en un residu del domini catalític (Halford i Hardie, 1998). L'enzim de plantes també és susceptible de ser fosforilat, tot i que la possible significació fisiològica encara està per demostrar (Dale et al., 1995). En mamífers, aquesta regulació multivalent és molt sensible als nivells de colesterol en sang i coordina el metabolisme d'isoprenoides per assegurar la disponibilitat d'esterols i d'altres productes no-esterols (Goldstein i Brown, 1990). En plantes s'ha descrit que la HMGR respon a estímuls externs com la llum, ferida o atac per patògens i a estímuls interns com hormones i productes de la via com els esterols. L'activitat també varia en funció del moment del desenvolupament i del teixit (Stermer et al., 1994). Així, alts nivells d'activitat HMGR estan associats a teixits amb una divisió cel·lular molt activa com els brots de l'àpex i l'arrel, teixits meristemàtics, plàntules joves i fruits en maduració. Aquest efecte s'ha observat en plàntules de pèsol (Stermer, 1994) i patata (Korth et al., 2000), i en fruits en maduració de blat de moro (Moore i Oishi, 1993) i tomàquet (Rodríguez-Concepción et al., 1999). En *A. thaliana* tan l'expressió dels gens *HMG* com l'activitat HMGR és menor en teixits madurs. (Enjuto et al., 1994; Lumbreras et al., 1995; Manzano et al., 2004). Pel que fa a la regulació de l'HMGR per fitohormones, s'ha observat una relació inversa entre els nivells d'àcid abscísic (ABA) i l'activitat HMGR en fruits d'advocat, on la mevastatina provoca un increment en els nivells d'ABA i l'aplicació exògena d'ABA disminueix l'activitat HMGHGR (Cowan et al.,

1997), i en endosperma de blat de moro, on línies mutants amb baixos nivells d'ABA tenen una alta activitat HMGR (Moore et al., 1994). En pèsol també s'ha observat un increment d'activitat HMGR causat per citoquinines i giberel·lines (Russel et al., 1985). També s'ha observat que el calci pot incrementar l'activitat HMGR per un mecanisme depenent de calmodulina (Stermer, 1994) i disminuir-la a través d'algún altre mecanisme (Russel et al., 1985). Una altre factor que afecta l'activitat HMGR és la llum. Així, s'ha observat que plàntules de pèsol, *A.thaliana* i blat de moro presenten una activitat HMGR menor al créixer en presència de llum (revisat a Stermer, 1994) en un fenomen que depèn de la qualitat de la llum (Learned, 1996; Learned, 1997) i en que hi participen els fotoreceptors Cry1 (llum blava) i PhyB (llum vermella) (Rodríguez-Concepción et al., 2004). En plantes s'han descrit diferents casos on l'activitat HMGR és modulada *in vivo* per retroalimentació per productes isoprenoides, com és el cas de les plàntules de pèsol on l'aplicació exògena d'alguns esterols provoca una disminució del 30% en l'activitat HMGR (Russel et al., 1985), l'aplicació d'inhibidors de l'HMGR provoca un augment de l'activitat HMGR en patata (Stermer, 1994) i l'aplicació d'inhibidors de la SQS i la escualè sintasa dona lloc a un increment de l'activitat i l'ARNm de la HMGR en cèl·lules BY-2 de tabac (Hemmerlin et al., 2000; Wentzinger et al., 2002).

Existeixen diferents mecanismes de regulació post-transcripcional de l'HMGR. La proteïna de mamífers i de llevats és fosforilada per serina/treonina quinases de la mateixa família, anomenades SNF1 en llevat i quinases activades per AMP (AMPK) en mamífers, en un residu conservat de serina del centre actiu, i com a conseqüència és inactivada (Halford i Hardie, 1998). Els homòlegs d'aquestes quinases en plantes s'anomenen actualment SNF1-*related* quinasa (SnRKs) i conserven una gran similitud de seqüència amb l'SNF1 i l'AMPK (Halford i Hardie, 1998) (figura 14). En diferents espècies de plantes (col-i-flor, ordi o espinacs) s'han purificat fraccions proteiques capaces de fosforilar el motiu SAMS de pèptids sintètics i que fosforilen i inactiven l'HMGR1S d'*A. thaliana* (Douglas et al., 1997; Halford i Hardie, 1998; Sugden et al., 1999). Les SnRKs de plantes tenen una especificitat similar per proteïnes i pèptids substrat. No obstant, a diferència de les homòlogues de mamífers i de llevats, no s'activen per l'AMP. També s'ha demostrat que l'HMGR es reactiva si es tracta amb la subunitat catalítica de la PP2A bovina (Dale et al., 1995). Recentment en *A. thaliana* s'ha proposat un nou mecanisme de regulació post-transcripcional (Antolín, et al., 2005). Segons aquest model, les isoformes HMGR1S i HMGR1L localitzades a l'RE, estarien fosforilades en un residu de la regió N-terminal, sent en aquestes circumstàncies actives. Una interacció mediada per calci entre una subunitat reguladora de la PP2A i la HMGR es traduiria en una inactivació de la HMGR.

### **4.3.3. Altres punts de regulació de la via de síntesis de fitosterols**

Diferents resultats suggereixen que, tot i que l'activitat HMGR és limitant en la síntesis d'esterols existeixen punts de control addicionals. Un primer punt de regulació seria la reacció catalitzada per la SQS, enzim responsable de la síntesis de l'escualè, el primer intermediari específic de la síntesis d'esterols. Com ja s'ha comentat anteriorment, l'addició d'elicitors fúngics a cèl.lules de tabac provoca una inhibició de la biosíntesis d'esterols correlacionada amb una disminució de l'activitat SQS (Vögeli et al., 1988). Resultats similars s'han obtingut en discs de patata (Zook et al., 1991). Posteriorment, s'ha comprovat que a més de disminuir l'activitat SQS, també disminueixen els nivells de proteïna i ARNm d'SQS (Devarenne et al., 2002).

La SMT1 és un altre enzim pel que suggereixen un paper limitant en la biosíntesis d'esterols en girasol (Nes et al., 1991) i tabac (Holmberg et al., 2003). En aquest últim cas, la sobreexpressió de la SMT1 provoca un augment de l'activitat HMGR, probablement degut a una disminució dels nivells de cicloartenol. Per la seva part, els mutants per pèrdua de funció en el gen *SMT1* d'*A. thaliana* acumulen colesterol a expenses del sitosterol (Diener et al., 2000). L'acumulació de colesterol i no del substrat de la SMT1, el cicloartenol, en les fulles indica que el cicloartenol pot ser el substrat d'altres reaccions a part de la catalitzada per la SMT1. És a dir, la producció d'elevades quantitats de colesterol resulta d'un *by-pass* de la SMT1. En canvi, en tabac, la co-supressió de SMT1, o la generació de plantes antisentit de SMT1, resulta en una acumulació de cicloartenol (Schaeffer et al., 2000). Un resultat que reforça aquesta idea és que la sobreexpressió conjunta de la SMT1 de tabac i del domini catalític de la HMGR de *Hevea brasiliensis* en tabac resulta en una major acumulació d'esterols que la sobreexpressió de les dues proteïnes individualment (Holmberg et al., 2003).

Per últim lloc existeixen estudis que indiquen un paper clau de la SMT2 en el direccionament del flux de la via cap als 24-etilesterols (sitosterol i estigmasterol) o cap als 24-metilesterols (campesterol) ja que el balanç entre els dos tipus d'esterols ha d'estar perfectament regulat per assegurar les necessitats d'esterols de les cèl.lules respecte als requeriments de brassinoesteroids pel creixement (Schaeffer et al., 2001). Per una banda les plantes que sobreexpressen el gen *SMT2:1* acumulen sitoesterol a expenses del campesterol i mostren una estatura reduïda a causa d'una disminució en els nivells de brassinoesteroids. Per altra banda, els mutants de pèrdua de funció d'aquest gen presenten un contingut elevat de

campesterol a expense del sitoesterol i mostren un fenotip, no rescatable per brassinoesteroids, d'estatura reduïda, fertilitat molt baixa i anomalies morfològiques en pètals i sèpals.

## **5. ESFINGOLÍPIDS**

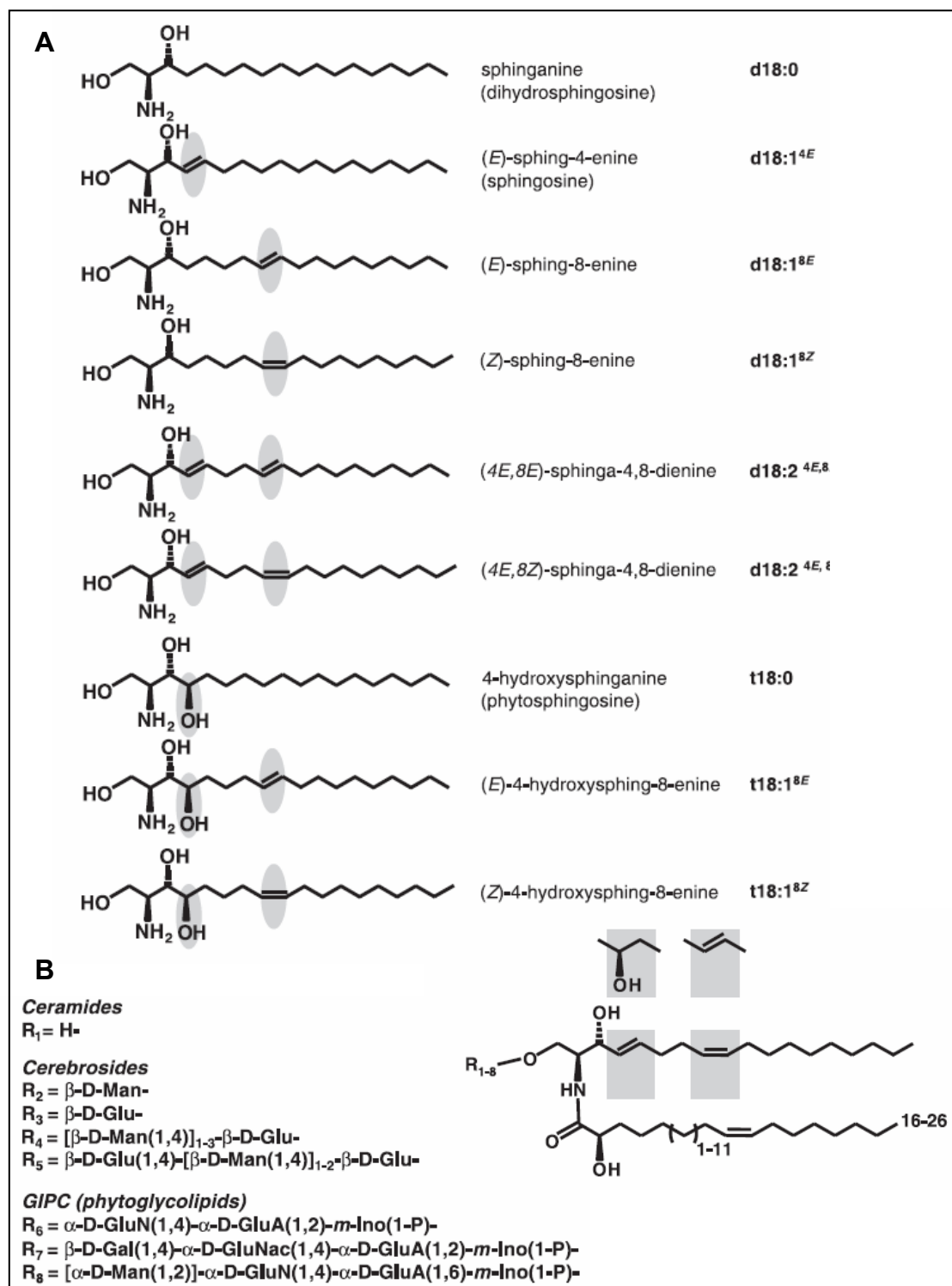
Els esfingolípidos són un grup de molècules estructuralment i funcionalment molt diverses basades en la unió d'un àcid gras a una base esfingoide de cadena llarga (BEL) mitjançant un enllaç tipus amida. Els esfingolípidos es troben en animals, llevat i plantes i s'estima que existeixen entre 300 i 400 espècies moleculars diferents (Hanun i Luberto, 2000). Van ser identificats per primera vegada el 1884 per J.W.L.Thudichum, que els va anomenar esfingolípidos en honor de l'esfinx, personatge mitològic grec, degut a l'enigmàtica naturalesa de les molècules que havia descobert. En molts aspectes les raons per a aquesta denominació continuen sent vàlides més de 120 anys després, especialment en les plantes, on encara existeixen més preguntes que respostes.

### **5.1. Estructura i composició dels esfingolípidos en plantes**

Els esfingolípidos es poden dividir en dos grups: els esfingolípidos simples i els complexos (**figura 14**). Dins del grup dels esfingolípidos simples s'inclouen les bases esfingoides lliures (BEL) i les ceramides, mentre que els esfingolípidos complexos resulten de l'addició de residus de sucres o molècules amb un grup fosfat a les ceramides per formar un cap polar. Les BEL (**figura 14, A**) són la unitat estructural bàsica i característica dels esfingolípidos. Aquestes bases són amines alifàtiques de cadena llarga, que contenen 1 o 2 grups hidroxil i sovint un doble enllaç en trans en posició 4. Les ceramides (**figura 14, B**) resulten de la unió d'una BEL amb un àcid gras mitjançant un enllaç tipus amida. Els esfingolípidos complexos (**figura 14, B**) es poden subdividir en dues classes diferents en funció dels residus que s'afegeixen al grup hidroxil en posició 1 de les ceramides: en els cerebròsids, en que el cap polar només conté diferents residus de sucres, i en les glucosil inositol fosforilceramides (GIPC), en que el cap polar conté diferents residus de sucres i mio-inositol-1-fosfat. Els cerebròsids són fàcilment extrets amb els dissolvents habitualment utilitzats per a l'extracció de lípids de membrana, mentre que les GIPC no s'extreuen fàcilment amb aquests dissolvents degut a la seva molt alta hidrofília i per tant la seva composició exacta encara és desconeguda.

Els esfingolípidos són un grup de molècules molt divers amb centenars de espècies moleculars diferents. Aquesta complexitat deriva de la gran quantitat de possibles caps polars i de les diferències en la longitud de la cadena carbonada, grau de saturació i hidroxilació de les BEL i dels àcids grassos de les ceramides (Sperling et al., 2003; Dunn et al., 2004). En els anàlisis lipídics de plantes els esfingolípidos es veuen freqüentment eclipsats pels galactolípidos dels cloroplastes en les fulles o triglicèridos en les llavors, que són molt més abundants. Tot i això, els esfingolípidos constitueixen fins a un 10 % del contingut lipídic total, per la qual cosa són un component del metabolisme de les plantes que fins fa poc ha estat subestimat i sovint deixat de banda. Els esfingolípidos majoritaris en els mamífers són l'esfingomielina i els glicolípidos neutres i àcids, mentre les inositolfosforilceramides (IPC's) són prevalents en els llevats (Lester et al., 1993). En plantes es creu que la fracció majoritària dels esfingolípidos correspon a una fracció encara no completament caracteritzada d'esfingolípidos complexos (majoritàriament GIPC), mentre que els cerebròsids comprenen entre un 10 i un 30 % dels esfingolípidos complexos de la membrana plasmàtica (Sperling et al., 2005). Tot i la seva importància com a reguladors de diferents processos cel·lulars, les BEL, els seus derivats fosforilats (BEL-P) i les ceramides lliures constitueixen només una proporció molt petita dels esfingolípidos totals.

Existeix una considerable diversitat estructural en els esfingolípidos complexos de diferents teixits vegetals pel que respecta a la seva composició de BEL i àcids grassos (Imai et al., 1995 i 1997; Norberg et al., 1996). Les BEL majoritàries presents en els esfingolípidos complexos en plantes són els isòmers 8-(*E*) i 8-(*Z*) de l'4,8-esfingadienina (d18:2) i de la 4-hidroxiesfinga-8-nina (t18:1), tot i que la fitoesfingosina (PHS; t18:0) i la dihidroesfingosina (DHS; d18:0) són les BEL majoritàries en forma lliure (Sperling et al., 2003; Wright et al., 2003). La BEL majoritària en mamífers, l'esfingosina (SPH; d18:1<sup>4E</sup>), es troba de forma molt minoritària en la majoria de teixits vegetals. En *A. thaliana* els isòmers 8-(*E*) i 8-(*Z*) de la t18:1 són les BEL predominants, amb un 57 i un 32% del total respectivament, mentre que els isòmers de la d18:1 constitueixen menys del 10% del total. Més d'un 90% dels àcids grassos de les ceramides, cerebròsids i GIPC són  $\alpha$ -hidroxi (h) àcids grassos saturats. En *A. thaliana* els àcids grassos predominants, constituïnt més del 55% del total, són 24:1h i 24:0h, amb quantitats menors de 16:0h, 22:0h, 26:1h i 26:0h (<15% de cada un).



**Fig. 14. Estructura dels esfingolípid vegetals** (Adaptat de Sperling et al., 2003). **A: Estructura de les BEL més comunes en plantes.** Per a cada BEL es donen els noms i les denominacions abreujades d'acord amb Karlsson (1970). Per algunes BEL es dona el nom comú entre parèntesis. Els dobles enllaços i els grups hidroxil addicionals que caracteritzen les BEL derivades de l'esfinganine estan marcats en gris. En els cerebrósids de les plantes, els isòmers 8-(*E*) i 8-(*Z*) de l'4,8-esfingadienina i de les 4-hidroxisesfinga-8-enines són les BEL majoritàries. GIPC amb 4-hidroxisesfinganine (fitoesfingosina) i 4-hidroxisesfinga-8-enina han estat aïllades en plantes però la seva composició de BEL encara no ha estat completament assignada. **B. Estructures dels glucòsids de ceramides en plantes.** Les modificacions en l'esquelet de les ceramides es mostren en gris. Les BEL estan unides a més de 10 diferents àcids grassos que varien en longitud, hidroxilacions i grau de saturació. Els cerebrósids es formen per glicosilació del grup hidroxil en C1 de la ceramida (R<sub>1</sub>). Les GIPC aïllades de fulles de tabac (R<sub>6,7</sub>) i blat de moro (R<sub>8</sub>) porten un residu de mio-inositol-1-fosfat unit via un enllaç C2 i/o C6 a C1 d'un residu de α-glucuronosa.

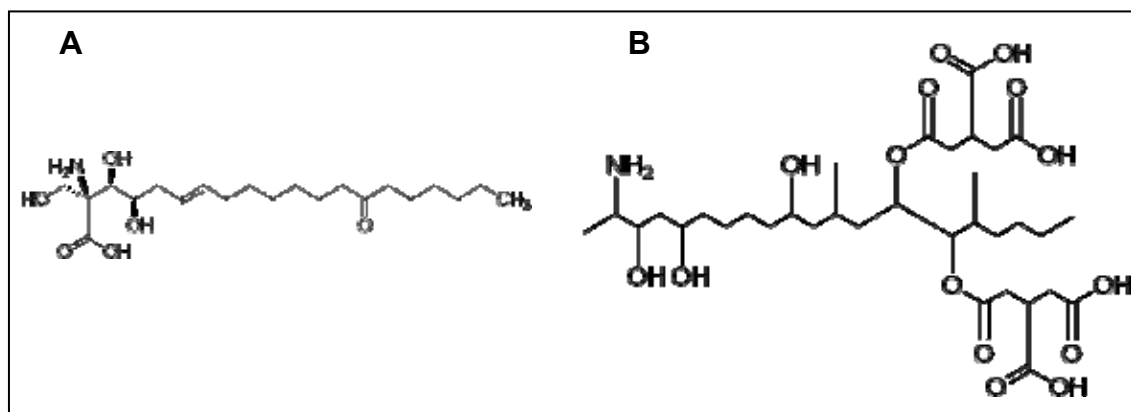


## **5.2. Biosíntesis del esfingolípid en plantes**

La gran majoria de la informació disponible sobre la síntesi d'esfingolípid s'ha obtingut a partir d'estudis en mamífers i llevat. En plantes fins a l'actualitat s'han clonat i estudiat molts pocs gens implicats en la biosíntesi d'aquests compostos (Sperling et al., 2003; Dunn et al., 2004). Tot i això, sembla que existeixen nombroses similituds entre els enzims implicats en el metabolisme d'esfingolípid en plantes, mamífers i llevats, tot i que existeixen diferències estructurals entre els corresponents esfingolípid. Per altra banda, la major complexitat dels esfingolípid de plantes requereix la presència d'enzims addicionals no presents en llevat (Dunn et al., 2004)

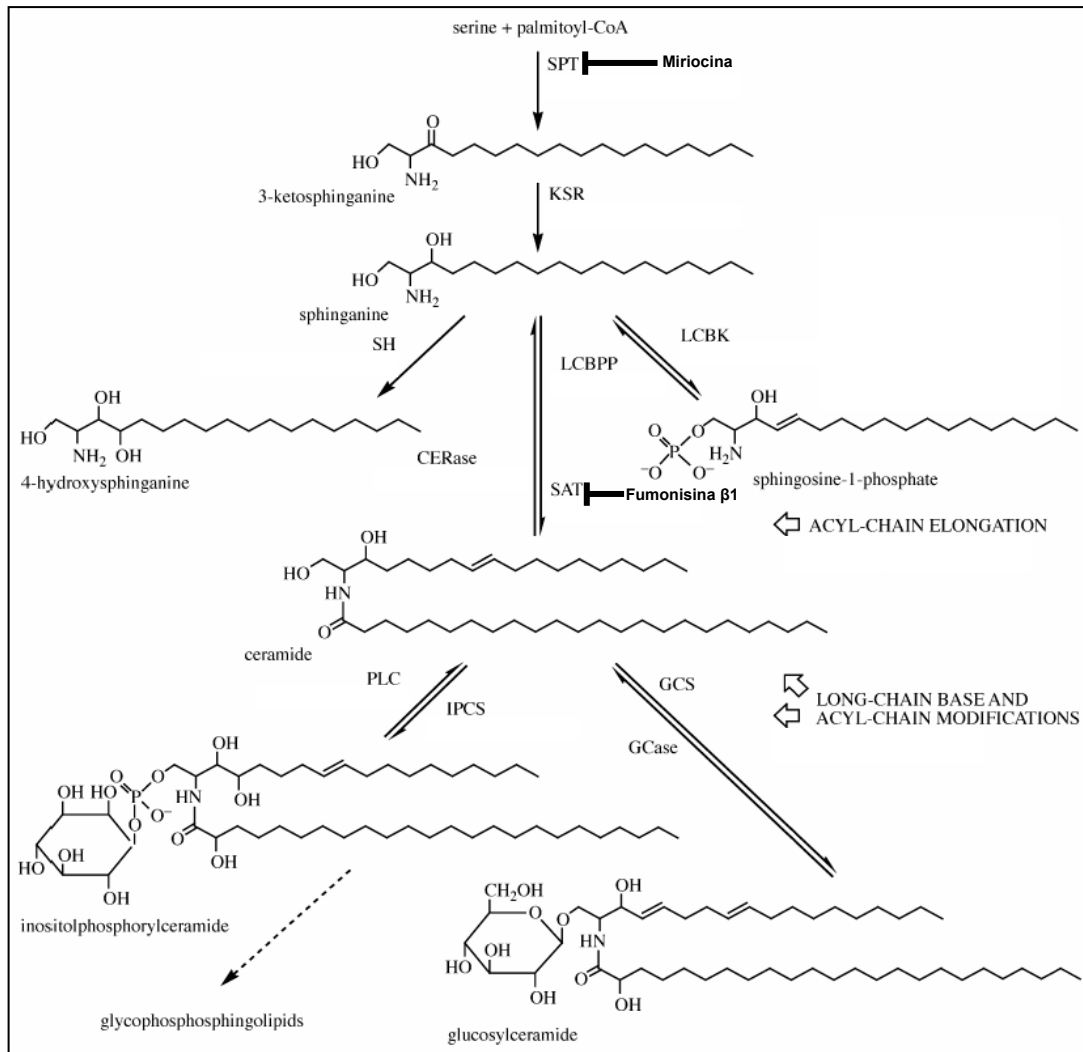
La biosíntesis d'esfingolípid (**Figura 16**) comença amb la condensació de palmitoïl-CoA i L-serina per donar lloc a la 3-cetoefinganina, en una reacció catalitzada per la serina-palmitoïltransferasa (SPT). En llevat, els gens *LCB1* i *LCB2* codifiquen per dues proteïnes que al dimeritzar formen l'enzim SPT actiu. En *A. thaliana* s'han identificat tres gens que codifiquen per les dues subunitats que componen la SPT: un que codificaria per una subunitat *Lcb1p*, i dos per a la subunitat *Lcb2p*, un dels quals (*At5g23670*) ha estat clonat i s'ha demostrat que posseeix activitat SPT (Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2001). Aquest enzim presenta bastantes semblances amb els ortòlegs de mamífers i llevats. Així, en plantes s'ha detectat l'activitat enzimàtica al RE, presenta característiques cinètiques similars i la seva activitat s'inhibeix pels mateixos compostos que la SPT d'altres organismes (Lynch i Fairfield, 1993) com per exemple la miriocina. La miriocina, o ISP-1, (**figura 15**) és un metabolit extret del fong *Mycelia sterilia*, amb una potent activitat immunosupressora que inhibeix de forma potent i específica la SPT. A continuació es redueix la 3-cetoefingosina per donar lloc a la efinganina en una reacció catalitzada per una 3-cetoreductasa. A part de convertir-se en ceramides les BEL poden ser substrat d'altres activitats enzimàtiques. Per exemple, la efinganina és hidroxilada en el carboni 4 per l'efinganina-4-hidroxilasa en *A. thaliana* (Sperling et al., 2001) i en blat de moro (Wright et al., 2003). Les plantes, a diferència dels mamífers i els llevats, contenen dos enzims diferents que introdueixen dobles enllaços en les posicions 4 i 8 de les BEL, les  $\Delta 4$  i  $\Delta 8$ -desaturases (Napier et al., 1999; Sperling et al., 2003). S'han identificat dos gens d'*A. thaliana* (*At2g46210* i *At3g61580*) que codifiquen enzims amb activitat  $\Delta 8$ -desaturasa (Napier et al., 2003). Addicionalment, les BEL també poden ser fosforilades per donar lloc als seus derivats fosforilats, les BEL-P. El balanç entre les BEL i les BEL-P està determinat per les activitats BEL quinasa i fosfatasa (Dunn et al., 2004). En plantes

només s'ha demostrat l'existència de l'activitat quinasa en diferents teixits vegetals (Crowther et al., 1997; Coursol et al., 2003) i caracteritzat parcialment una BEL quinasa d'*A. thaliana* (Nishiura et al., 2000). El següent pas és la formació de les ceramides per una esfinganina-aciltransferasa (SAT) que catalitza la unió d'un grup acil a la esfinganina. S'ha localitzat l'activitat d'aquest enzim al RE i s'ha inhibit amb concentracions nanomolars de fumonisina  $\beta_1$  (**figura 15**), que és una micotoxina extreta de la fermentació del fong *Fusarium moniliforme* que també inhibeix la SAT de llevats i humans (Abbas et al., 1994; Lynch, 2000; Wright et al., 2003). Els substrats d'aquest enzim semblen ser la esfingosina i la esfinganina, però no la 4-hidroxiesfinganina. Un cop formada la ceramida aquesta pot ser modificada mitjançant hidroxilacions i desaturacions de la BEL i la cadena de l'àcid gras (Sperling et al., 2003; Dunn et al., 2004). La formació dels diferents esfingolípids complexos a partir de la ceramida té lloc a l'aparell de Golgi. S'ha demostrat la síntesis de glucosilceramides (cerebròsids) en preparacions de membranes de plantes utilitzant UDP-glucosa (Nakayama et al., 1995) o esterilglucosa (Lynch et al., 1997) com a donadors de glucosa. L'expressió d'una glucosilceramida sintasa de cotó en *P. pastoris* resulta en la formació de glucosilceramida (Hillig et al., 2003). La síntesis de inositolfosfoceramida (IPC), el primer pas en la síntesis de GIPC, s'ha caracteritzat en diferents teixits vegetals (Bromley et al., 2003), tot i que encara no s'ha identificat cap homòleg del gen de llevat en *A. thaliana*.



**Fig.15.** Estructura química de la miriocina (A) i fumonisina  $\beta_1$  (B).

**Fig.16. Ruta biosintètica d'esfingolípids en plantes** (Adaptat de Dunn et al., 2004). Ruta principal de la síntesis d'esfingolípids en plantes. Les modificacions que donen lloc a la gran diversitat d'esfingolípids no es mostren. Les abreviacions corresponen al nom en anglès de l'enzim. SPT: Serina-Palmitoil Transferasa; KSR: 3-CetoEsfingosina Reductasa; SH: Esfinganina Hidroxilasa; LCBK: Base Esfingoide de cadena Llarga (BEL) Quinasa; LCBPP: BEL fosfatasa; SAT: Esfinganina-Acil Transferasa; CERase: Ceramidasa; IPCS: InositolFosforil Sintasa; PLC: FosfoLipasa C; GCS: GlucosilCeramida Sintasa; GCase: GlucosilCeramidasa. Es mostren els enzims que són inhibits per la miriocina i la fumonisina  $\beta_1$ .



### 5.3. Funcions dels esfingolípids.

Actualment igual la informació disponible sobre la funció dels esfingolípids en plantes (Worrall et al., 2003; Sperling et al., 2003; Dunn et al., 2004) és molt limitada en comparació amb la de mamífers i llevats. Els esfingolípids són essencials en el creixement i supervivència dels llevats ja que aturen el creixement en la fase G1 del cicle cel.lular, tenen efectes protectors en l'estrés per calor, inhibeixen l'import de nutrients com el triptòfan o l'uracil, juguen un paper en l'endocitosis i la regulació del citoesquelet d'actina i en el transport de proteïnes unides a glucofosfatidilinositol (GPI), entre d'altres (Obeid et al., 2006; Dickson et al., 2002). Moltes d'aquestes funcions també s'han descrit en mamífers. Recentment, s'han descrit noves funcions dels esfingolípids com és el paper de la ceramida-1-P (Cer1P) en la fagocitosis (Hinkovska et al., 2005), la regulació per ceramides de l'acció de la insulina (Stradford et al.,

2004) o una via de mort cel.lular programada (MCP) independent de caspases mediada per la ceramida (Thon et al., 2005). La ceramida (Cer) i els seus metabolits (Cer1P, SPH i S1P) duen a terme les seves funcions ja sigui activant vies de transducció de senyals intracel.lularment com a missatgers secundaris (Ruvolo, 2003), però la S1P també pot activar extracel.lularment receptors de membrana acoblats a proteïnes G (Sanchez i Hla, 2004). El fet que la ceramida, la esfingosina i els seus corresponents derivats fosforilats siguin fàcilment interconvertibles entre si, ha dut a proposar el model del reostat esfingolípids (Spiegel et al., 2003), segons el qual el balanç entre les diferents espècies d'esfingolípids determina el destí de la cèl.lula. Així, la ceramida i la esfingosina promouen una aturada del cicle cel.lular, apoptosi i senescència cel.lular, mentre que la Cer1P i la S1P promouen la motilitat, supervivència i proliferació cel.lular i la inflamació (Chalfant i Spiegel, 2005; Modrak et al., 2006). Tot i això, evidències recents demostren que aquest model probablement no sigui tan senzill. Per exemple, s'ha observat que la funció de la S1P depèn de localització subcel.lular de la seva producció (Maceyka et al., 2005), i també s'ha observat que les ceramides generades pel catabolisme dels esfingolípids complexos en l'estrès per calor són estructural i funcionalment, diferents de les generades *de novo* (Coward et al., 2006). Finalment com a components de les membranes cel.lulars l'esfingosina i la ceramida modulen les propietats de les membranes cel.lulars (Goñi et al., 2006).

L'evidència d'esfingolípids bioactius en plantes és encara limitada. El 1989 es va demostrar la capacitat de la esfingosina per modular la ferrocianid reductasa de civada en resposta a la llum blava (Dharmawardhane et al., 1989). Recentment s'ha descrit que la S1P i la PHS-1P mobilitzen el calci intracel.lular en resposta a sequera i ABA provocant una reducció de l'obertura dels estomes (Ng et al., 2001; Coursol et al., 2005). En aquest procés estan involucrades proteïnes G heterotrimèriques (Coursol et al., 2003), una de les quals és la única subunitat  $G\alpha$  d'*A. thaliana* (Coursol et al., 2005). També s'han implicat els esfingolípids en processos de MCP en plantes. Així, la disrupció del metabolisme dels esfingolípids amb toxines com la fumonisina  $\beta 1$  (inhibidor de la esfinganina-aciltransferasa) promou l'apoptosi en tomàquet (Wang et al., 1996) i l'acumulació de BEL en diferents teixits (Abbas et al., 1994). En canvi, la inhibició de la síntesis d'esfingolípids amb la miriocina (inhibidor de la SPT) evita l'acumulació de BEL i prevé la MCP induïda per la fumonisina  $\beta 1$  (Spassieva et al., 2002). Aquesta observació suggereix que el balanç entre la ceramida i les BEL lliures és important en el desencadenament de l'apoptosi en plantes. També s'ha descrit que la ceramida indueix la MCP en *A. thaliana* mentre la ceramida-1P la bloqueja parcialment (Liang et al., 2003), inducció que seria dependent d'un increment del calci intracel.lular (Townesley et al., 2005). En els últims anys s'han implicat diferents enzims del metabolisme d'esfingolípids en processos de

MCP, com una posible esfingolipid-BEL transferasa (Broderson et al., 2002), una quinasa de ceramides amb una cadena d'àcid gras curta (Liang et al., 2003) i la SPT (Coupe et al., 2003).

Els cerebròsids altament hidroxilats presents en molts teixits diferents contribueixen a la integritat de les membranes (Boggs, 1987) i també s'han implicat en la tolerància al fred de les plantes (Steponkus i Lynch, 1989; Umemura et al., 1995). Per exemple, s'ha observat que la proporció de cerebròsids en la membrana plasmàtica de plantes tolerants a la gelada en comparació a les sensibles, decreix durant el procés d'aclimatació al fred i que la composició dels cerebròsids canvia durant aquest procés per a contribuir a l'estabilitat de la membrana en condicions d'estrés per fred (Warnecke et al., 2003). La funció dels GIPC en plantes no s'ha investigat. Fins a l'actualitat s'han descrit més de 150 proteïnes unides a GPI en animals i llevats, on funcionen com a receptors, enzims, antígens, etc. En plantes encara hi ha un coneixement molt limitat de les proteïnes unides a GPI (Thompson i Okuyama, 2000). Les proteïnes unides a GPI més abundants en plantes són les proteïnes d'arabinogalactà, proteïnes riques en hidroxiprolina força abundants a la paret cel·lular, tot i que la seva funció encara es deconeix (Svetek i Nothnagel, 1999; Oxley i Bacic, 2006). En plantes les proteïnes unides a GPI tenen el IPC com a ancla lipídica, com és el cas de la proteïna NDR1, implicada en la resistència a patògens (Coppinger et al., 2004). Un estudi bioinformàtic recent ha catalogat el nombre de proteïnes unides a GPI en el genoma d'*A. thaliana* (Borner et al., 2003). Una altra funció dels esfingolípids en plantes és la mediació de les interaccions planta-patògen (Sperling i Heinz, 2003). La resposta contra l'atac per fongs patògens de les plantes comença amb el reconeixement de diferents esfingolípids complexos dels fongs, fet que desencadena la resposta de fitoalexines, proteïnes relacionades amb patògens i defensines (Umemura et al., 2000; Thevissen et al., 2005). En arròs s'ha vist que dues proteïnes G regulen l'activació d'una MAPK induïda per un elicitor de tipus esfingolípids (Lieberher et al., 2005).

### **5.4. Regulació de la biosíntesis d'esfingolípids**

Tot i que les vies bioquímiques de síntesis d'esfingolípids en llevats i humans estan ben descrites, resta molt per descobrir sobre els mecanismes de regulació individuals dels diferents gens i enzims de la via, i encara més important, del flux de la via metabòlica i, particularment, de la regulació en els punts de ramificació on més d'un enzim pot actuar sobre el mateix substrat (Futerman i Hannun, 2003). En plantes el coneixement de la

regulació dels enzims de la via de síntesis d'esfingolípid és inexistent. Recentment s'ha descobert que diferents enzims, tot i pertànyer a la mateixa família, determinen quins àcids grassos són N-acilats sobre les bases esfingoides per a generar diferents espècies de ceramides en humans (Venkatamaran et al., 2002; Riebeling et al., 2003). La distribució tissular d'aquests enzims implica que diferents ceramides poden tenir diferents funcions en diferents teixits. Utilitzant les dades obtingudes a partir d'arrays d'ADN s'ha realitzat un model matemàtic que reproduïx els canvis en els nivells de BEL i ceramides en resposta a l'estrès per calor en llevat (Radivoyevitch, 2001). Aquest model assumeix que els nivells de BEL estan regulats per un sistema de control coordinat. Aquest model prediu un increment transitori de BEL seguit d'un increment permanent en ceramida, i és consistent amb resultats experimentals prèviament obtinguts. S'ha suggerit que la SPT és un enzim clau en la síntesis d'esfingolípid, ja que catalitza la primera reacció de la via metabòlica i de la seva activitat poden dependre els nivells d'intermediaris potencialment tòxics com les BEL i les Cer (Hanada et al., 2003). Els nivells d'ARNm depenen del teixit i de l'estadi de desenvolupament. A més la SPT és regula a nivell transcripcional i/o post-transcripcional en resposta a diferents estímuls com els raigs UVB, àcids grassos, àcid retinoic, etc.

## **6. REGULACIÓ COORDINADA DEL METABOLISME D'ESTEROLS I ESFINGOLÍPIDS**

### **6.1. Lipid rafts**

Actualment es considera que dins de les membranes existeix una estructuració dels diferents tipus de lípids que a la seva vegada imposa una organització de les proteïnes de la bicapa lipídica. Així, s'han identificat subdominis de la membrana plasmàtica enriquits amb colesterol i glucoesfingolípid, anomenats "lipid rafts" (**figura 17**) (Pike, 2003; Riyaz et al., 2005; Hancock, 2006). Les principals forces que permetrien la seva formació serien interaccions lípid-lípid. Els esfingolípid són capaços d'associar-se entre ells mitjançant interaccions entre els seus extrems rics en sucres i les llargues i majoritàriament saturades cadenes hidrocarbonades, mentre que els esterols ocuparien els espais buits entre els esfingolípid (Simons i Ikonen, 1997). Els esterols i els esfingolípid interaccionarien per formar subdominis altament empaquetats, que corresponen a l'anomenada fase líquida-ordenada caracteritzada biofísicament en membranes model i biològiques (Xu et al., 2001). Aquests

"rafts" flotarien en la membrana que els rodeja, la qual és més fluïda (fase líquida-desordenada). Aquests subdominis contindrien un grup específic de proteïnes unides a GPI, mentre que n'exclourien d'altres, i això afectaria la seva funció ja que facilitaria la interacció entre polipèptids homo o heteromèrics i modularia l'activitat de possibles complexes proteics. Evidències experimentals suggereixen que aquests subdominis estan implicats en diferents vies de transducció de senyals, ja que proteïnes com els receptors del factor de creixement epidèrmic es localitzen en aquests subdominis (Pike et al., 2005). Altres funcions en que podrien estar implicats els "lipid rafts" són l'exocitosi (Salaün et al., 2004), l'organització del citoesquelet (Wicström et al., 2003), la MCP (Garcia, 2003) i portals d'entrada de patògens (Rosenberger et al., 2000), entre d'altres. La composició dels "lipid rafts" ha d'estar estrictament regulada perquè la integritat i estructura d'aquests subdominis és essencial per a la seva correcta funcionalitat. Una alteració en el contingut d'esterols o esfingolípid pot alterar-la. Per exemple, un increment dels nivells de ceramida pot desplaçar el colesterol dels "lípid rafts" (London i London, 2004; Nybond et al., 2005) i això molt probablement afecti la seva l'estructura i la funció de les proteïnes residents. Per exemple, un enriquiment en colesterol resulta en una unió no productiva del receptor de la colecistoquinina, una proteïna G, amb el seu lligand, i una disminució en els nivells de colesterol provoca una disminució de la unió amb el lligand. La disminució en els nivells d'esfingolípid afecta la internalització i transport del receptor, però no la unió amb el lligand (Harikumar et al., 2005).

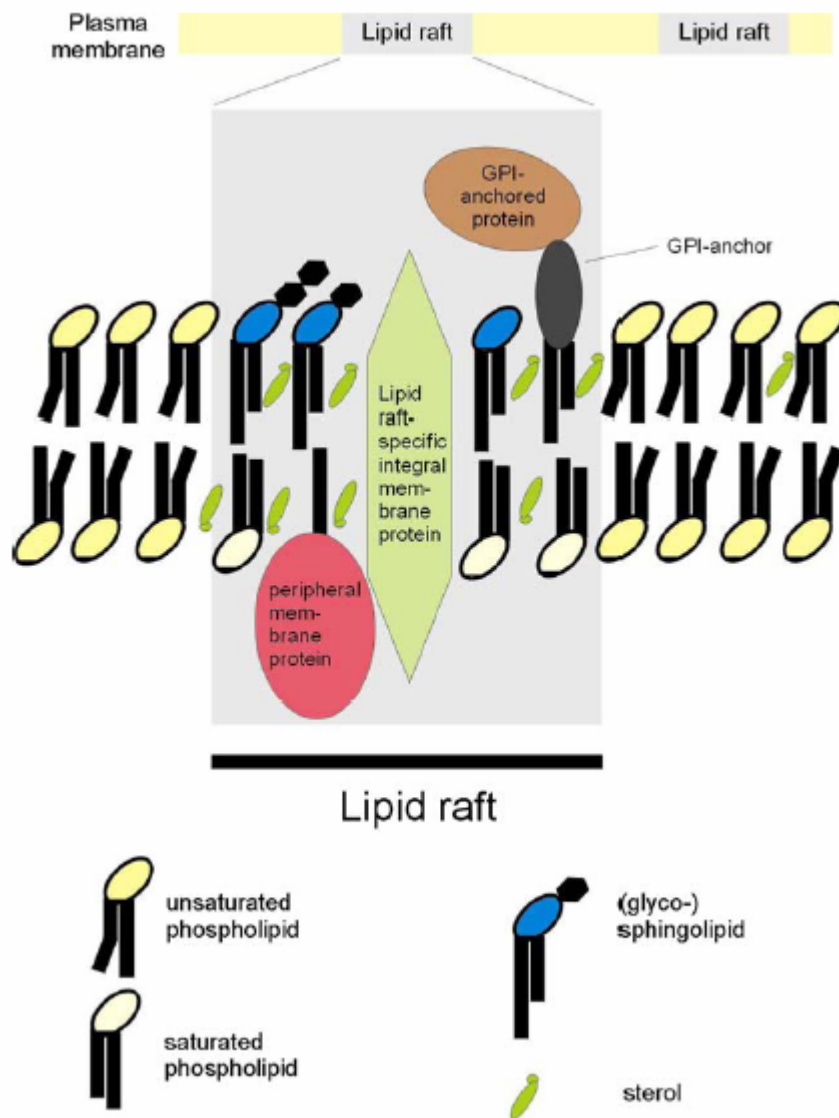
La primera evidència de la possible existència de "lipid rafts" en plantes va ser l'aïllament de fraccions de membrana de tabac insolubles en Tritó X-100 (MRD: Membranes Resistents a Detergents) (Peskan et al., 2000) i la resistència a la solubilització per Tritó X-100 del citocrom  $b_{561}$  d'*A. thaliana* (Bérczi et al., 2001). Posteriorment nous estudis utilitzant tècniques com el FRET i altres tècniques fluorescents han mostrat noves evidències de la seva existència (Vermeer et al., 2004). Les MRD d'*A. porrum* representen el 10-15% de la membrana plasmàtica, mentre que en *A. thaliana* representen només un 2-3% (Laloi et al., 2006), fet que suggereix que el contingut en MRD de la membrana plasmàtica varia en les diferents espècies de plantes. Recentment s'ha descrit que les MRD de plantes estan enriquides en esterols, glucòsids d'esterols, cerebròsids i IPC (Mongrand et al., 2004; Markham et al., 2006; Laloi et al., 2006). La proporció dels diferents esterols en les MRD és similiar a la de la membrana plasmàtica, mentre que la proporció de glucòsids d'esterols és superior, constituint un 7% dels lípids de les MRD d'*A. porrum* i un 15-20% en *A. thaliana*, on són encara més abundants que els cerebròsids (Laloi et al., 2006). També s'ha descrit l'existència de MRD en l'Aparell de Golgi d'*A. porrum* amb la mateixa composició de les MRD de la membrana plasmàtica, suggerint que la formació de les MRD comença a l'Aparell de Golgi (Laloi et al., 2006). En *A. thaliana*

aquests subdominis presenten una proporció d'esterols i esfingolípids respecte les proteïnes quatre o cinc vegades superior a la del promig de les membranes d'*A. thaliana* (Borner et al., 2005). En plantes, al igual que en mamífers i llevats, una alteració en els nivells de lípids altera la formació de les MRD. La inhibició de la síntesis d'esterols amb fenpropimorf, un inhibidor de la cicloeucaulenol-obtusifoliol isomerasa, provoca una acumulació de les MRD a l'Aparell de Golgi i no en la membrana plasmàtica, i en les línies cel·lulars d'*A. thaliana fad2 i Fad3<sup>+</sup>*, que presenten alteracions en el grau de saturació dels àcids grassos, presenten només un 20% de les MRD de les recuperades en les cèl·lules salvatges (Laloi et al., 2006).

En els últims anys s'han obtingut noves evidències de l'existència dels "lipid rafts" en plantes i s'ha avançat en l'estudi de la composició proteica d'aquestes fraccions de membrana (Elortza et al., 2003; Riyaz et al., 2005). Per exemple, s'ha vist que les MRD d'*A. thaliana* i *S. alba* estan particularment enriquides en potencials components de diferents vies de transducció de senyals, com ara receptor-quinases, proteïnes d'unió a GTP i la subunitat  $\beta$  de proteïnes G heterotrimèriques (Shahollari et al., 2004). En tabac han estat identificades en aquestes fraccions diverses  $H^+$ -ATPases i s'ha vist que una NADPH oxidasa és transportada cap a les MRD després d'un tractament amb el·licitors de patògens, al igual que una petita proteïna G que es considera un regulador negatiu de la oxidasa (Mongrand et al., 2004). També s'ha observat la presència en les MRD d'*A. thaliana* d'un homòleg de la flotilina, una proteïna que també s'associa a microdominis lipídics en cèl·lules de mamífers (Salzer i Prohaska, 2001).

**Fig.17. Representació esquemàtica de la pressumible organització dels "lipid rafts"** (Adaptat de Riyaz et al., 2005). Els "lipid rafts" (en caixes grises) es consideren microdominis de les membranes caracteritzats per tenir una composició molecular diferent a la de la resta de la membrana. Estan enriquits en fosfolípids saturats, esterols i esfingolípids, i s'assumeix que contenen un grup de proteïnes associades a membrana, incloent-hi proteïnes unides a GPI i proteïnes de membrana integrals i perifèriques.





## **6.2. Regulació coordinada dels nivells d'esterols i esfingolípid.**

Aquesta estreta relació funcional entre els esfingolípid i els esterols comporta que els seus nivells intracel.lulars han d'estar estretament regulats ja que el balanç entre esterols i esfingolípid ha de ser mantingut per assegurar la correcta funcionalitat dels "lipid rafts". Durant els últims anys s'han publicat nombrosos articles que mostren que les rutes biosintètiques d'esterols i esfingolípid estan estretament relacionades en llevats i humans (revisat a Ridgway, 2000; Veen i Lang, 2005).

El mutant de llevat *erg26*, que no pot sintetitzar ergosterol, té severament desregulada la síntesis de ceramida, així com la seva hidroxilació (Swain et al., 2002). Aquests resultats suggereixen que dos possibles punts de regulació de la biosíntesis d'esfingolípids per l'ergosterol serien el metabolisme de la ceramida i la hidroxilació dels esfingolípids complexos. D'altra banda, la inhibició de la HMGR provoca una disminució de la síntesis d'esterols i esfingolípids, tan de la síntesis de ceramida com de la síntesis d'esfingomielina induïda pel 25-hidroxicolesterol (Storey et al., 1998). En cèl.lules de mamífer, una disminució d'esfingomielina en les membranes resulta en un increment en l'esterificació dels esterols lliures (Slotte i Bierman, 1988) i una acumulació de glucoesfingolípids promou l'acumulació d'esterols (Puri et al., 1999). Una altre connexió entre la biosíntesis d'esterols i esfingolípids s'ha observat el mutant *erg24*, que no sintetitza ergosterol. Aquesta mutació és letal, però en combinació amb la delecció del gen *ELO3*, que codifica per una elongasa d'àcid grassos necessària per a la síntesis d'esfingolípids, no és letal, fet que suggereix que la falta d'esfingolípids compensa la falta d'esterols. En canvi, el mutant *erg6*, que acumula majoritàriament zimosterol i no ergosterol, és viable, però en combinació amb la delecció del gen *ELO3* és letal (Eisenkolb et al., 2002). En contrast amb els esterols metilats que s'acumulen en el mutant *erg24*, el zimosterol sembla que és un component de la membrana dependent de la disponibilitat dels esfingolípids. La mutació *erg2* esdevé letal en combinació amb la mutació dels factors de transcripció UPC2 i ECM22, que codifiquen per factors de transcripció que regulen la biosíntesis d'esterols en llevats (Vik et al., 2001; German et al., 2005). Aquest triple mutant letal és rescatat també per la delecció del gen *ELO3* (Valachovic et al., 2004). Aquest efecte també s'ha observat en altres gens de la via de síntesis d'esterols en llevat (Valachovic et al., 2006). Mitjançant experiments de microarrays per analitzar els efectes dels fungicides azòlics, inhibidors de la síntesis d'ergosterol, s'han observat efectes importants en gens tan de la via de síntesis d'esterols com d'esfingolípids (Bammert i Foster, 2000). Per exemple, els gens que codifiquen per a la BEL hidroxilasa i la SPT tenen l'expressió significativament disminuïda. També s'ha vist que mutacions en la via de síntesis d'esterols en llevats provoquen una disminució en la fosforilació de BEL lliures (Sano et al., 2005).

En plantes existeix molt poca informació sobre la regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids. El tractament de plàntules de porro amb fenpropimorf, inhibidor de la via de síntesis d'esterols, no altera el contingut total d'esterols però sí el perfil d'esterols (Hartmann et al., 2002). Addicionalment també provoca una severa disminució dels nivells de cerebròsids i fosfatidilserina, i un increment del de fosfatidilinositol i triglicèrids. El tractament amb quantitats més grans de fenpropimorf provoca una modificació severa i general en el contingut lipídic de les plantes. Recentment s'ha descrit que aquest tractament provoca una severa i específica disminució de 16-OH glucosilceramida (cerebròsid) en la membrana

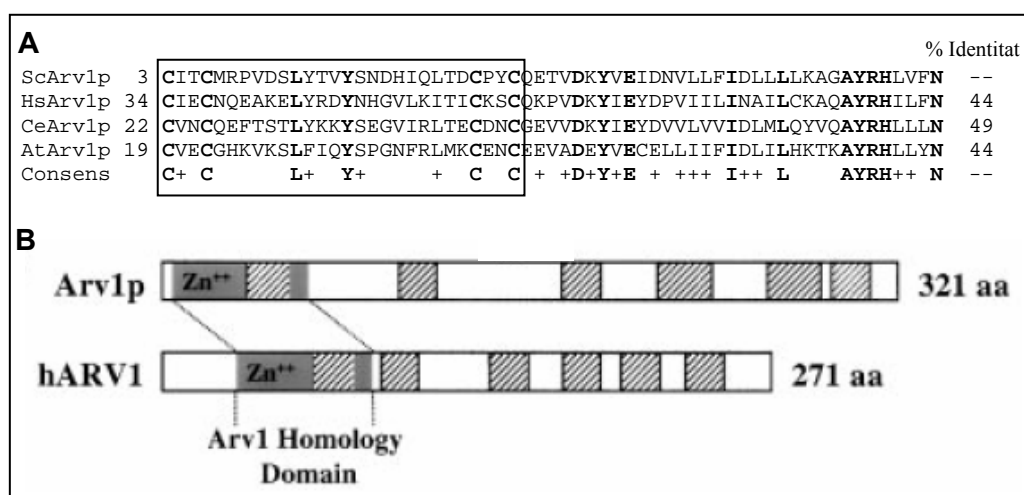
plasmàtica, mentre que s'acumula a l'Aparell de Golgi (Laloi et al., 2006). També s'ha observat una acumulació d'esterols a l'Aparell de Golgi. D'acord amb aquestes observacions s'ha observat en aquestes plàntules una acumulació de les MRD en l'Aparell de Golgi enlloc de la membrana plasmàtica.

Tot i l'evidència d'una regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids, els mecanismes moleculars que ho regulen són encara desconeguts. Es considera que l'Aparell de Golgi és un punt clau en aquesta regulació coordinada en humans ja que intervé en el transport d'esterols entre el RE i la membrana plasmàtica, és on es sintetitzen els esfingolípids complexos i on es formen les MRD (Ridgway et al., 2000). S'ha suggerit que el 25-hidroxicolesterol, que es produeix quan els nivells intracel·lulars d'esterols són elevats, podria participar en aquest procés, ja que incrementen l'esterificació dels esterols i la síntesis d'esfingomielina (Storey et al., 1998). A més el 25-hidroxicolesterol regula la translocació de les OSBP (OxiSterol Binding Proteins) a l'Aparell de Golgi des del citosol/RE i la seva fosforilació, fet que suggereix que les OSBP com un regulador de la síntesis d'esterols i esfingolípids a nivell de l'Aparell de Golgi. Tot i que la funció exacta de les OSBP no és coneguda s'ha vist que faciliten l'endocitosis i afecten la distribució intracel·lulars d'esterols (Beh et al., 2004). Un altre possible mecanisme de regulació seria el canvi de localització d'enzims en resposta a canvis en la composició de les membranes. Per exemple, canvis en el contingut d'esterols en la membrana de llevat altera la localització de la BEL quinasa i disminueix la fosforilació de BEL lliures (Sano et al., 2005). D'altra banda s'ha vist que la síntesis de ceramida es correlaciona amb la generació de SREBP's transcripcionalment actives i la transcripció gènica mediada per ERE (Elements de Resposta a Esterols) i s'ha hipotetitzat que la síntesis de ceramida contribuiria al processament fisiològic de les SREBP, afectant potser el seu trànsit entre el RE i l'Aparell de Golgi (Worgall et al., 2004). Recentment s'ha descrit que els esfingolípids estan implicats en l'esteroideogènesis depenent de la corticotropina. En concret la S1P incrementa l'ARNm del gen *CYP17* promovent el processament i transport al nucli de la SREBP1 (Ozbay et al., 2006).

### **6.3. Identificació i caracterització dels gens *ARV***

En llevat, a part dels homòlegs de la OSBP només s'ha identificat un altre gen que s'ha proposat que està implicat en la regulació coordinada del metabolisme d'esterols i esfingolípids, el gen *ARVI*. Aquest gen va ser identificat per primera vegada en un escrutini per a detectar mutants de llevat inviàbles en absència dels gens que codifiquen per les proteïnes

Are1p i Are2p (ACAT (Acil-CoA AcilTransferasa)-related enzymes), que són les proteïnes responsables d'esterificar l'excés d'esterols intracel·lulars (Tinkelenberg et al., 2000). Els mutants obtinguts es van anomenar *arv* (ARE2 required for viability). El mutant *arv1* és letal a 37°C inclús en presència del gen *ARE2*. En creuaments genètics no s'ha obtingut el triple mutant *arv1Δ*, *are1Δ* i *are2Δ*, indicant que la viabilitat de les soques mutants *arv1Δ* depèn de l'existència de l'esterificació d'esterols. Aquests mutants presenten un increment d'un 50% d'esterols lliures i un 75% en ésters d'esterols, fet consistent amb la seva dependència de l'esterificació per a la viabilitat. Aquest elevat contingut d'esterols explica la seva sensibilitat a la nistatina, un antibiòtic poliènic que al interaccionar amb els esterols provoca la disrupció de les membranes. Aquestes dades suggereixen que l'Arv1p participa en la regulació dels nivells cel·lulars d'esterols. A més, els mutants *arv1Δ* mostren un increment en els nivells d'esterols en les fraccions de membranes del RE i vacuoles, i una disminució en els nivells a la membrana plasmàtica, suggerint un paper de la proteïna Arv1 en la distribució intracel·lular dels esterols. Finalment, també tindria un paper important en la recaptació d'esterols. El gen *ARV1* codifica per una proteïna de 321 aa amb 6 possibles dominis transmembrana. La comparació entre les diferents proteïnes Arv predites mostra que la homologia es concentra en els 61 aminoàcids de l'extrem aminoterminal, que s'ha definit com a domini AHD (Arv Homology Domain; ProDom PD038388; **figura 18, A**) (Tinkelenberg et al., 2000). En aquest domini existeix una seqüència aminoacídica que inclou quatre cisteïnes que podrien formar un dit de zinc, tot i que encara no es coneix la seva funció biològica. Els dits de zinc s'han descrit en factors de transcripció on s'uneixen a l'ADN o medien interaccions proteïna-proteïna (Hahn i Roberts, 2000). També exerceixen diferents funcions en proteïnes de membrana com, per exemple, reclutament de molècules a microdominis de la membrana plasmàtica (Hostager et al., 1999), unió de lípid carregats (Kutateladze et al., 1999) i regulació del transport de petites molècules (Loland et al., 1999). Una busca en bases de dades va revelar que existien homòlegs en humans, *C. elegans* i *A. thaliana*.



**Fig.18.** (Adaptat de Tinkelenberg et al., 2000). **A: Identificació de les Arv1p homòlogues i del domini AHD.** Aliniament dels dominis AHD en l'extrem N-terminal de la Arv1p de *S. cerevisiae* i de les Arv1p d'humans (AA461156), *C. elegans* (CAA88728) i *A. thaliana* (CAB77721). Els aminoàcids idèntics en les quatre seqüències es mostren en negreta i els similars amb el signe +. El requadre mostra la seqüència que podria formar el dit de zinc. El % d'identitat respecte la ScArv1p es mostra a la dreta. **B: Estructura predita de la ScArv1p i de la HsArv1p.** El domini AHD de les dues proteïnes es mostra en caixes grises i els possibles dominis transmembrana en caixes ratllades.

El gen *ARVI* també va ser aïllat en un escrutini independent per a buscar mutants de llevat amb defectes en el metabolisme d'esfingolípids (Swain et al., 2002). Aquest mutant, com ja s'havia descrit abans (Tinkelenberg et al., 2000) presenta un increment en els nivells d'esterols esterificats, però també s'han observat canvis en el perfil d'esterols de les cèl.lules. Tan a 27°C com a 37°C presenten un increment en els nivells de lanosterol i d'intermediaris no identificats i una disminució de zimosterol i ergosterol. A 27°C també s'observa un increment en els nivells d'esqualè i dimetilzimosterol i una disminució d'episterol. A part de les alteracions en el metabolisme d'esterols aquest mutant presenta una severa disminució de la síntesis de tots els esfingolípids complexos. En canvi, tenen nivells normals de les ceramides derivades de la dihidroesfingosina (Ceràmida A i B') i acumulen ceramides derivades de la fitoesfingosina (Ceràmida B i C) en estadi estacionari. A més, presenta una disminució en els nivells d'àcids grassos. Finalment, els nivells dels diferents fosfolípids no varien en condicions en que el gen *ARVI* no és indispensable pel creixement cel.lular, però en condicions en que aquest esdevé essencial també s'alteren els nivells de diferents fosfolípids. Aquests resultats suggereixen un paper essencial de la proteïna Arv1 en el metabolisme d'esterols i esfingolípids, i un paper no essencial en el metabolisme de fosfolípids.

L'expressió de l'ADNc del gen *ARVI* d'humans restaura totes les alteracions lipídiques de la soca *arv1Δ* de llevat, indicant que és l'ortòleg del gen *ARVI* de llevat (Swain et al., 2002). Mitjançant experiments d'expressió en llevat de la fusió GFP-Arv1p, s'ha demostrat que es localitza al RE o a l'Aparell de Golgi de forma depenent de la fase de creixement del cultiu, suggerint una possible localització regulada pel cicle cel.lular. La observació de totes aquestes alteracions en els nivells d'esterols i esfingolípids en el mutant *arv1Δ*, ha portat a proposar que Arv1p pot ser un regulador comú de la homeostasi intracel.lular d'esterols i esfingolípids (Swain et al., 2002).