

Universitat de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió IV

**BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES:
CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA FARNESILDIFOSFAT
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana*.**

Núria Cunillera i Segarra
Barcelona, 1999

Tampó d'hibridació 5x:

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 250 mM |
| MgCl ₂ | 50 mM |
| DTT | 5 mM |

3. Síntesi de la doble cadena.

| | | |
|--------------------------------|-------|-----------------------|
| Reacció d'extensió i lligació: | 4 µl | reacció d'hibridació |
| | 3 µl | tampó PNK 10x |
| | 3 µl | dNTPs 10 mM cada un |
| | 3 µl | ATP 10 mM |
| | 3 µl | Klenow 2 U/µl |
| | 1 µl | T4 DNA lligasa 3 U/µl |
| | 13 µl | H ₂ O |

La reacció s'incuba 4 h a 23°C.

4. Precipitar la mostra afegint 1/10 del volum d'acetat sòdic 3 M i 2 volums d'etanol.

Recuperar el DNA centrifugant 30 min a 4°C a màxima velocitat en una microcentrífuga. Rentar el sediment amb etanol al 70%, assecar-lo i resuspendre'l en 10 µl H₂O.

5. Transformar la soca XL1-Blue amb una al·líquota del DNA. Confirmar la mutació per seqüenciació de DNA obtingut a partir de cultius de diverses colònies transformades.

8.3. Construccions i encebadors utilitzats en la mutagènesi dirigida.

GENERACIÓ DE pBI221GUSMut.

Es disposava del plasmidi pBI221, un derivat del vector pUC que conté el gen *uidA* d'*Escherichia coli*, que codifica la proteïna β-glucuronidasa (GUS), sota el control del promotor del gen 35S del virus del mosaic de la coliflor (35SCaMV).

El fragment *EcoRI-BamHI* del plasmidi pBI221, que conté el gen *uidA*, va ser clonat en els llocs corresponents del plasmidi pBluescript, per generar el plasmidi pGUS. Amb el plasmidi pGUS es va dur a terme la mutagènesi dirigida, utilitzant com a encebador l'oligonucleòtid ATCGUS, que es mostra a continuació:

5'-GTCAGTCCCTTATCTTACGTCCTGTAG-3'

Aquest oligonucleòtid conté una mutació puntual (nucleòtid subratllat) respecte la seqüència del plasmidi pBI221. Es va generar així el plasmidi pGUSMut, on s'havia substituït al triplet ATG codificant per la metionina inicial de la proteïna GUS pel triplet ATC, codificant per isoleucina. El fragment *EcoRI-*

*Bam*HI del plasmidi pBI221 va ser substituït pel fragment *Eco*RI-*Bam*HI del plasmidi pGUSMut, per donar lloc al plasmidi pBI221GUSMut.

GENERACIÓ DEL cDNA FPS1LM

El fragment *Sac*II-*Sa*I del plasmidi pcNC3, que conté el cDNA FPS1L d'*Arabidopsis*, va ser clonat en els llocs corresponents del plasmidi pBluescript per donar lloc al plasmidi pcBNC3. Mitjançant mutagènesi dirigida del plasmidi pcBNC3 utilitzant l'encebador ATCPROXIMAL (posicions +46/+ 68 del gen *FPS1*)

5'-GCTCTTCAATCGAGACCGATCTC-3'

el triplet ATG proximal, codó d'inici per la isoforma FPS1S, va ser convertit en un codó ATC, codificant per isoleucina. El plasmidi resultant va ser anomenat pcBNC3Mut.

GENERACIÓ DE pgNC3MutDis

El fragment *Hind*III-*Hind*III (-1476/+ 2701 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*) va ser clonat en la posició *Hind*III del vector pBluescript. El plasmidi resultant, pgNC3, va ser utilitzat per dur a terme la mutagènesi dirigida, amb l'oligonucleòtid ATCDISTAL (posició -81/-54 del gen *FPS1*)

5'-GAAGGAGGAATATCAGTGTGAGTTGTTG-3'

en el que el triplet ATG distal, codó d'inici per la isoforma FPS1L, va ser convertit en un codó ATC, codificant per isoleucina. El plasmidi resultant va ser anomenat pgNC3MutDis.

9. COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE MUTANTS DE LLEVAT.

9.1. Soques i vectors.

Les soques de llevat utilitzades en aquest treball són soques derivades de *Saccharomyces cerevisiae*. Les soques i les seves característiques genotípiques es presenten a la taula 1, i els vectors d'expressió en llevat utilitzats en aquest treball es presenten en la taula 2. Les soques de llevat FL100, FL200, CC25 i LB311 han estat cedides pel Dr. Francis Karst, Université de Poitiers, França, així com també el vector pDD62. La soca de llevat WSR i les construccions preparades en un derivat del vector pFL38 (pYCOX i pYACOX, veure més endavant) han estat cedides pel Dr. Ian Small, Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, França.

Taula 1. Genotip de les soques de *Saccharomyces cerevisiae*.

| Soca | Genotip |
|-------|---|
| FL100 | ATCC28383, Mat a. (Soca salvatge) |
| FL200 | ATCC28383, Mat α . (Soca salvatge) |
| CC25 | Mat a, <i>erg12-2</i> , <i>erg20-2</i> , <i>ura3-1</i> , <i>trp1-1</i> |
| LB311 | Mat a/ α , <i>erg20::URA3/ERG20</i> , <i>ura3-1/ura3-1</i> , <i>trp1-1/trp1-1</i> |
| NC1 | <i>erg20::URA3</i> , <i>ura3-1</i> , <i>trp1-1</i> [pNCFPS2]* |
| WSR | Mat α , <i>his3-11</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>can1-100</i> , Δ COXIV::LEU2 |

*S'han generat les soques Mat a i Mat α .

El gen *ERG20* codifica l'enzim farnesildifosfat sintasa de *S. cerevisiae*. La mutació *erg20-2* va ser descrita per Blanchard i Karst (1993).

El gen COXIV codifica per la subunitat IV de la citocrom c oxidasa mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Taula 2. Vectors d'expressió en llevat.

| Nom i referència | Marcador de selecció | | Promotor present |
|------------------|----------------------|------------------|------------------------------|
| | Llevat | Bacteri | |
| pDD62 (1) | <i>TRP1</i> | Amp ^R | Fosfoglicerat quinasa (PGK) |
| pFL38 (2) | <i>URA3</i> | Amp ^R | Alcohol deshidrogenasa (ADH) |

(1) pDD62 deriva del plasmidi pFL61 (Minet *et al.*, 1992), i conté el marcador de selecció *TRP1* enlloc del marcador *URA3*.

(2) Bonneaud *et al.*, 1991

9.2. Condicions de cultiu.

Les soques de llevat poden ser cultivades en medi líquid o sòlid, i si no s'indica una altra temperatura, són crescudes a 28°C.

La preparació dels medis s'ha dut a terme seguint les recomanacions del manual de laboratori *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997).

COMPOSICIÓ DELS MEDIS

Els medis s'esterilitzen autoclavant 20 min a 120°C.

Quan hi ha glucosa en el medi, aquesta s'afegeix en condicions estèrils a partir d'un estoc de glucosa 200 g/l. Aquest estoc de glucosa s'esterilitza autoclavant 20 min a 120°C.

Els medis sòlids es preparen afegint agar 15 g/l als medis líquids.

Medi complet (YPG):

| | |
|--------------------|--------|
| Peptona | 10 g/l |
| Extracte de llevat | 10 g/l |
| Glucosa | 20 g/l |
| pH 7 amb NaOH | |

Medi mínim (YNB):

| | |
|--|---------|
| Yeast Nitrogen Base sense aminoàcids i sense sulfat d'amoni | 1,7 g/l |
| Sulfat d'amoni | 5 g/l |
| Glucosa | 10 g/l |
| pH 7 amb NaOH | |

Medi d'esperulació:

| | |
|-------------------|--------|
| Acetat de potassi | 10 g/l |
|-------------------|--------|

Medi no fermentable (N3):

| | |
|---------------------------|----------|
| Extracte de llevat | 10 g/l |
| Peptona | 10 g/l |
| Glicerol | 2% (v/v) |
| Acetat de potassi pH 6,25 | 50 mM |

NUTRIENTS COMPLEMENTARIS

Els aminoàcids i les bases púriques i pirimidíniques necessaris per complementar les auxotrofies de les soques de llevat s'afegeixen en pols al medi mínim abans d'autoclavar. La concentració final de cada nutrient és la següent:

| | |
|-------------|----------|
| - Histidina | 20 µg/ml |
| - Triptòfan | 40 µg/ml |
| - Adenina | 40 µg/ml |
| - Uracil | 50 µg/ml |

L'ergosterol s'utilitza a la concentració final de 80 µg/ml en medi sòlid i a 4 µg/ml en medi líquid. S'afegeix als medis un cop aquests estan autoclavats. L'ergosterol es prepara a una concentració 4 mg/ml en una solució de Tergitol NP40-etanol (1:1 v/v).

9.3. Construccions utilitzades per la complementació funcional de mutants de llevat.

pNCFPS2

El cDNA FPS2, alliberat per digestió *SacII-SacI* del plasmidi pcNC2, va ser fet rom i clonat en el vector pDD62, prèviament digerit amb *NotI* i fet també roms els seus extrems. El plasmidi resultant és pNCFPS2.

pYCOX

Aquest plasmidi conté el gen *COXIV* salvatge de *S.cerevisiae* clonat en el vector pFL38.

pYACOX

Aquest plasmidi, preparat en el vector pFL38, conté una versió truncada del gen *COXIV*, en la qual s'ha eliminat la regió codificant per la seqüència del pèptid de trànsit a mitocondries.

pFPS1Ltp-YACOX

Aquest plasmidi codifica una proteïna quimèrica formada per l'extrem de 41 aminoàcids aminoterminals de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* fusionat amb la versió truncada (sense pèptid de trànsit) de la proteïna del gen *COXIV*.

El fragment de cDNA codificant pels 41 aminoàcids aminoterminals de la isoforma FPS1L va ser generat per amplificació per PCR del plasmidi pcSPNC3, utilitzant com a encebadors els oligonucleòtids següents:

- sentit: 5'-GGGAATTCAAAAATGICTGTGAGTTGTTGTTGTAGG-3'

S'extén de la posició -74 a -47 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*. A l'extrem 5', s'ha afegit la diana *EcoRI*, que es mostra en cursiva, per facilitar el posterior clonatge. S'han introduït quatre canvis en la seqüència de l'encebador (nucleòtids subratllats) a fi de convertir l'entorn del codó ATG inici de traducció d'*Arabidopsis* (GAATATGAG) en el consensus descrit com inici de traducció en llevat (AAAAATGTC). Els canvis efectuats en el segon triplet del cDNA d'*Arabidopsis* no alteren el residu aminoacídic codificat (Ser).

- antisentit: 5'-AGCTCAGATGAAGAGCTTTGGATACG-3'

Complementari a les posicions +36 a +53 del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*. A l'extrem 5', es va afegir la diana *XbaI*, que s'indica en cursiva, per facilitar el posterior clonatge.

El fragment de DNA amplificat va ser digerit amb *EcoRI-XbaI* i clonat en els corresponents llocs del plasmidi pYACOX, per generar el plasmidi pFPS1Ltp-YACOX.

Els plasmidis es van replicar en la soca DH5 α , fins el moment de transformar *S. cerevisiae*.

9.4. Transformació de llevats.

El mètode de transformació de llevats s'ha dut a terme segons el procediment d'acetat de liti descrit per Gietz *et al.* (1992), amb algunes adaptacions.

1. Preparar un cultiu en 10 ml de medi de la soca que es desitgi transformar, i deixar-lo créixer durant una nit a 28°C. Al matí, la seva DO₆₀₀ sol estar compresa entre 0,6-1 udo.
La soca CC25 es va créixer en medi YPG suplert amb ergosterol.
La soca LB311 es va créixer en medi YPG.
La soca WSR es va créixer en medi YPG suplert amb adenina.
2. Traspasar tot el pre-cultiu a 50 ml de medi fresc. Deixar créixer fins que DO₆₀₀ sigui aproximadament 0,8 udo (hi haurà un total de 10⁹ cèl.lules)
3. Centrifugar 10 min a 3.000 rpm a temperatura ambient per recollir les cèl.lules.
4. Rentar les cèl.lules amb 10 ml de la solució 1.
5. Centrifugar 10 min a 3.000 rpm a temperatura ambient per recollir les cèl.lules.
6. Resuspendre els llevats en 500 µl de solució 1, i incubar 1 hora a 28°C.
7. Per cada transformació, en un tub eppendorf, afegir seguint l'ordre indicat i assegurant-se de mesclar bé:
 - 1 µg DNA plasmídic (en 5 µl TE)
 - 50 µg DNA d'esperma de salmó preparat
 - 50 µl de la suspensió de llevat del pas 6 (aproximadament 10⁸ cèl.lules)

Cal tenir present que en cada procés de transformació cal realitzar un control:

 - 5 µl TE
 - 50 µg DNA d'esperma de salmó preparat
 - 50 µl de la suspensió de llevat del pas 6 (aproximadament 10⁸ cèl.lules)

Incubar 10 min a temperatura ambient.
8. Afegir 300 µl de la solució 2, i incubar 30 min a temperatura ambient.
9. Incubar 5 min a 42°C.
10. Centrifugar 5 segons a 1.300 rpm per recollir els llevats, i descartar el sobrenedant.
11. Resuspendre els llevats en 200 µl de TE pH 8.
12. Plaquejar en el medi selectiu adequat perquè només creixin les cèl.lules transformades (el medi que posi de manifest el marcador de selecció del vector utilitzat).
La soca CC25 transformada amb el plasmídic pNCFPS2 va ser plaquejada en medi YNB suplert amb ergosterol i uracil.
La soca LB311 transformada amb el plasmídic pNCFPS2 va ser plaquejada en medi YNB.
La soca WSR transformada amb els plasmídics pYCOX, pYΔCOX o bé pFPS1Ltp-YΔCOX va ser plaquejada en medi YNB suplert amb histidina, triptòfan i adenina.
Els controls del procés de transformació de les soques CC25, LB311 i WSR van ser plaquejats en els mateixos medis que les respectives soques transformades, però no van créixer.
Incubar a 28°C fins que apareguin colònies (2-3 dies).

Un cop s'ha comprovat la presència del plasmidi en la soca de llevat, es pot procedir a analitzar si hi ha o no complementació funcional del mutant.

COMPROVACIÓ DE LA TRANSFORMACIÓ

Per comprovar que la soca de llevat ha estat transformada amb el plasmidi desitjat, s'obté DNA plasmídic a partir del cultiu d'una de les colònies transformades i s'utilitza per retrotransformar *E. coli*.

Obtenció de DNA plasmídic de llevat

1. Preparar un cultiu de 2 ml de la soca transformada.
2. Recollir les cèl.lules per centrifugació.
3. Resuspendre les cèl.lules en 200 µl de solució de lisi.
4. Afegir sorra de vidre de 0,45 µm de diàmetre fins arribar al menisc format per la suspensió de cèl.lules, i agitar per trencar les cèl.lules.
5. Fer una extracció amb fenol-cloroform.
6. Utilitzar 5 µl de la fase aquosa per retrotransformar *E. coli*.

Per comprovar que la complementació funcional de la soca de llevat és deguda a la presència del plasmidi, es provoca la pèrdua del plasmidi del llevat transformat, a fi de tornar a posar de manifest la deficiència funcional. La forma més habitual de provocar la pèrdua del plasmidi és sembrar el llevat de forma successiva en medi suplert amb el marcador de selecció del vector.

SOLUCIONS

Solució 1:

Sorbitol 1 M
 Acetat de liti 0,1 M
 Aquestes dues solucions es preparen en TE pH 7,5.
 Esterilitzar amb autoclau.

Solució 2:

PEG 4000 40%
 Acetat de liti 0,1 M

Solució de lisi:

Tritó X-100 2% (v/v)
 SDS 1% (v/v)
 NaCl 100 mM
 Tris-HCl pH 8 10 mM
 EDTA pH 8 1 mM
 Esterilitzar amb autoclau.

DNA d'esperma de salmó:

Preparar una solució de DNA d'esperma de salmó 20 mg/ml en aigua. Sonicar-lo fins que la solució perdi la viscositat. Bullir la solució i passar-la a través d'una agulla de xeringa per desnaturalitzar-la. Guardar a -20°C. Abans d'usar, tornar a bullir i passar la solució per una agulla de xeringa.

9.5. Assaig de complementació funcional.

Un cop s'ha comprovat la presència del plasmidi en la soca de llevat, es procedeix a estudiar si l'expressió de la proteïna codificada pel plasmidi complementa funcionalment la mutació del llevat.

COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LA SOCA CC25

A causa de la mutació *erg20-2*, la soca CC25 és un mutant termosensible auxotròfic per l'ergosterol a 36°C. Perquè la soca CC25 pugui créixer a 36°C, cal suplir el medi complet amb ergosterol. D'altra banda, la soca CC25 pot créixer a 28 °C en medi YPG amb o sense suplement d'ergosterol.

Per comprovar si el plasmidi pNCFPS2 complementa la soca CC25, cal sembrar la soca transformada en medi complet amb suplement d'ergosterol i sense suplement, tant a 28°C com a 36°C. Si hi ha complementació funcional, la soca transformada créixerà a 36°C sense suplement d'ergosterol. Paral·lelament i com a control, cal plaquejar també la soca CC25 sense transformar, per comprovar que creix a 28°C amb o sense suplement d'ergosterol, i que no creix a 36°C sense suplement d'ergosterol.

Com que l'ergosterol s'ha de preparar en Tergitol (veure apartat 9.2), cal tenir en compte el possible efecte del Tergitol sobre el creixement de la soca de llevat CC25. Per aquest motiu, les plaques de medi YPG no suplertes amb ergosterol han de ser suplertes amb la quantitat equivalent de Tergitol.

COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LA SOCA LB311

La soca diploide LB311 (*erg20::URA3/ERG20, ura3-1/ura3-1, trp1-1/trp1-1*) conté una única còpia del gen *ERG20*. Com a conseqüència, quan la soca esporula, només dues de les quatre espores formades són viables, que són les que segreguen amb l'al·lel *ERG20*. Aquestes espores són, a més, Ura⁻ Trp⁻. Les espores portadores de la còpia interrompuda del gen *ERG20* no són viables, perquè no tenen activitat farnesilpirofosfat sintasa.

Per comprovar si el plasmidi pNCFPS2 complementa la mutació de la soca LB311, cal provocar que la soca esporuli, induir la germinació de les espores (veure apartat més endavant, 9.6), i seleccionar les soques haploides amb fenotip Ura⁺ Trp⁺ (que seran les que creixin en medi mínim). El fenotip Ura⁺ és indicatiu de la presència de l'al·lel mutat *erg20::URA3*, i el fenotip Trp⁺ és indicatiu de la presència del plasmidi pNCFPS2. Tenint en compte que només les soques que continguin simultàniament l'al·lel *erg20::URA3* i el plasmidi pNCFPS2 mostraran fenotip Ura⁺ Trp⁺, l'existència d'una soca haploide que creixi en medi mínim indica inequívocament que el plasmidi complementa la interrupció del gen *ERG20*.

COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL DE LA SOCA WSR

A causa de la interrupció en el gen *COXIV*, la soca WSR només pot créixer en medis fermentables, ja que la cadena de transport d'electrons necessària per la respiració no és funcional. Per tant, en un medi no fermentable com és N3, la soca no pot créixer.

Per comprovar si el plasmidi amb què es transforma complementa la mutació de la soca WSR, cal plaquejar la soca transformada en medi N3 i observar si recupera la capacitat de créixer. Si la soca transformada creix en medi N3, indica que hi ha hagut complementació funcional.

9.6. Anàlisi genètica de llevats.

DETERMINACIÓ DEL SIGNE SEXUAL

Una soca haploide de *S. cerevisiae* pot ser de signe sexual a o α . Aquestes dues soques són de signe sexual oposat, i posades en contacte creuen i donen lloc a formes diploides. Quan les soques a i α es creuen, formen de manera transitòria els zigots, que tenen una morfologia característica que pot ser observada al microscopi.

Per determinar el sexe d'una soca haploide, aquesta es creua de forma independent amb soques de referència a i α , i s'observa amb quina de les dues hi ha creuament. El procediment del test de creuament és el següent:

1. Cultivar les soques (les de referència i les que es desitgi analitzar) en medi complet durant una nit.
2. Extendre una petita quantitat de cada soca en el mateix medi complet, i incubar 1 hora a 28°C.
3. Mesclar bé cada soca referència per separat amb cada soca problema, i incubar 3-4 hores a 28°C.
4. Observar al microscopi part de cada creuament per determinar la presència dels zigots.

GENERACIÓ DE FORMES HAPLOIDES A PARTIR DE LA SOCA LB311

Per generar la soca haploide NC1 a partir de la soca LB311 transformada amb les diferents construccions, es va seguir el següent protocol:

1. Sembrar la soca diploide en medi complet i deixar-la créixer 24 hores a 28°C.
2. Transferir l'extensió a una placa amb medi d'esperulació, i incubar de 3 a 5 dies a 28°C. Cal comprovar l'esperulació observant part de l'extensió al microscopi, per apreciar l'aparició de les espores retingudes dins les asques (tetrades). La soca LB311 no esporula gaire bé; per aquesta raó, en

observar al microscopi apareixen poques formes esporulades, i algunes d'elles són formes d'esporulacions parcials, i formes diploides.

3. Amb la nansa de Henle, prendre una mica de l'extensió i introduir-la en un tub que contingui 1 ml d'aigua estèril. Agitar vigorosament.
4. Afegir 1 ml d'èter i agitar amb força, a fi de dissoldre les asques que protegeixen les espores.
5. Deixar reposar durant 10 min a temperatura ambient.
6. Retirar l'èter, i conservar la fase aquosa, que conté espores alliberades i algunes formes diploides.
7. Preparar dilucions 1:10 i 1:100 de la suspensió, i sembrar en plaques de medi complet 100 µl de cada una de les tres dilucions. En aquest medi, les espores germinaran i donaran lloc a colònies.
8. Per seleccionar les colònies provinents de les soques (haploides o diploides) que continguin el plasmidi, cal fer una rèplica de la placa en un medi selectiu adequat (en aquest cas és medi mínim).
9. Realitzar un test de creuament de diverses colònies escollides a l'atzar, per tal de detectar soques haploides i determinar-ne el signe sexual.

10. ASSAIG D'ACTIVITAT FPS.

L'assaig d'activitat farnesildifosfat sintasa que es descriu a continuació ha estat posat a punt en el laboratori del Dr Francis Karst, de la Universitat de Poitiers, França.

10.1. Preparació de l'extracte cel.lular.

1. A partir d'una extensió en placa, inocular 100 ml de medi mínim líquid (suplert amb els nutrients necessaris) i deixar créixer a 28°C en agitació aproximadament unes 20 hores, que és el temps necessari perquè el cultiu assoleixi l'estat estacionari.

La soca CC25 es fa créixer en medi mínim suplert amb uracil, triptòfan i ergosterol.

La soca CC25[pNCFPS2] es fa créixer en medi mínim suplert amb uracil.

La soca haploide NC1 es fa créixer en medi mínim.

2. Recollir les cèl.lules centrifugant 5 min a 5.000 rpm a 4°C.
3. Rentar les cèl.lules amb 10 ml de tampó fosfats 50 mM pH 7 dues vegades.
4. Resuspèndre les cèl.lules en 1,5 ml de tampó fosfats 50 mM pH 7.
5. Passar les cèl.lules a un tub de vidre. Afegir sorra de vidre freda de 0,45 µm de diàmetre fins arribar al menisc format per la suspensió de cèl.lules.
6. Mantinent sempre freda la mostra, agitar durant 1 min. Per evitar escalfar la mostra, posar-la en gel durant 2 min, i repetir una segona agitació d'1 min.
7. Recuperar la fase líquida amb una pipeta Pasteur, i traspasar-la a un tub Eppendorf.
8. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm a 4°C per eliminar les restes cel.lulars.
9. Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo durant 30 min a 12.000 rpm i a 4°C.

10. Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo durant 35 min a $105.000\times g$ i a 4°C .

En aquesta centrifugació s'elimina la fracció microsomal, ja que conté fosfatases que podrien interferir posteriorment en l'assaig d'activitat.

11. Recuperar el sobrenedant i mantenir-lo en gel fins el moment de dur a terme l'assaig d'activitat FPS.

La mostra no es pot conservar a -20°C , ja que perd activitat FPS. Per tant, cal obtenir extracte nou cada vegada que es desitgi determinar l'activitat FPS.

10.2. Quantificació de les proteïnes.

La quantificació de proteïnes en extractes lliures de cèl·lules de llevat (sobrenedant $105.000\times g$ obtingut al pas 11 de l'apartat anterior) s'ha dut a terme segons el mètode de detecció a l'UV. La tècnica és relativament senzilla, i consisteix en determinar l'absorció d'una dilució de l'extracte a 228,5 i 234 nm. Per cada extracte, les mesures es realitzen per diferents dilucions (1/400, 1/300 i 1/200). La concentració de proteïnes, expressada en mg/ml, ve definida per la relació següent:

$$\text{Concentració (mg/ml)} = (A_{228,5} - A_{234}) \times \text{dilució} \times 0,317$$

En les condicions descrites, l'extracte $105.000\times g$ té una concentració de proteïna aproximada de 10 mg/ml.

10.3. Assaig d'activitat FPS.

La tècnica utilitzada per mesurar l'activitat de l'enzim farnesildifosfat sintasa és la descrita per Chambon *et al.* (1990), amb algunes modificacions. Malgrat que la mesura d'activitat FPS es duu a terme en extractes provinents de llevat, les condicions de l'assaig han estat modificades a fi de treballar en les condicions adequades per l'enzim d'*Arabidopsis*. Cal remarcar que l'assaig d'activitat es realitza en presència de dimetilaminoetilidifosfat (DMAEPP), un inhibidor de l'enzim IPP isomerasa (Muelbacher i Poulter, 1988). Les concentracions de substrat utilitzades són $2K_m$, tant pel substrat fred (DMAPP) com pel substrat radioactiu (IPP).

Les condicions en les que es duu a terme l'assaig d'activitat són:

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| Proteïna fracció $105.000\times g$ | 100 μg |
| DMAEPP | 10 μM |
| DMAPP | 60 μM |
| [^{14}C]IPP | 11 μM |
| MgCl_2 | 1 mM |
| tampó fosfats 50 mM pH 7 q.s.p. | 100 μl |

PROCEDIMENT

1. En un tub d'assaig de 2 ml, introduir, per aquest ordre:

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| tampó fosfats 50 mM pH 7 q.s.p. | 100 µl |
| DMAEPP | 10 µM |
| fracció 105.000×g | 100 µg proteïna |

 Incubar 6 min a 37°C.
2. Passar els tubs a gel, i afegir la resta de components:

| | |
|---------------------------------------|-------|
| MgCl ₂ | 1 mM |
| DMAPP | 60 µM |
| [¹⁴ C]IPP (58,4 mCi/mmol) | 11 µM |

 Incubar 15 min a 37°C.
3. Col·locar les mostres en gel per aturar la reacció.
4. Defosforilar els productes de la reacció mitjançant tractament amb fosfatasa alcalina. Per fer-ho, afegir als 100 µl de reacció

| |
|------------------------------------|
| 100 µl Tris-glicina 0,15 M pH 10,5 |
| 0,2 u de fosfatasa alcalina |

 Incubar 30 min a 37°C.
5. Diluir la mostra amb 600 µl H₂O.
6. Afegir una punta d'espàtula de NaCl i extreure els productes de reacció defosforilats amb 1 ml d'hexà. [¹⁴C]IPP no és extret per l'hexà.
7. Afegir una punta d'espàtula de sulfat sòdic anhidre a la fase hexànica per deshidratar-la.
8. Centrifugar i separar la fase hexànica.
9. Comptar una al·líquota de 50 µl de la fase hexànica en un comptador d'escintil·lació.
L'activitat específica de la FPS es pot expressar en quantitat d'IPP transformat en productes extrets per l'hexà per mg de proteïna i per minut.

10.4. Anàlisi dels productes de reacció.

Els productes de reacció generats per l'activitat farnesildifosfat sintasa i defosforilats per acció de la fosfatasa alcalina poden ser identificats mitjançant cromatografia i posteriorment quantificats.

PROCEDIMENT

1. Afegir a cada fase hexànica (obtinguda al pas 8 de l'apartat 10.3)

| |
|---------------------------|
| 0,1 mg de geraniol |
| 0,1 mg de farnesol |
| 0,1 mg de geranilgeraniol |

 Aquests alcohols serveixen com a estàndard intern i eviten l'evaporació dels alcohols marcats radiactivament, ja que a aquesta concentració precipiten.
2. Concentrar totalment les mostres amb l'ajut de l'Speed-Vac.
3. Resuspendre el sediments amb 20 µl d'hexà.

4. Realitzar la cromatografia amb plaques HPTLC RP-18 (Merck) i utilitzant una mescla de metanol/aigua (95:5) com a dissolvent.
5. Visualitzar la posició dels prenialcohols utilitzant vapors de iode.
6. Quantificar la radioactivitat incorporada a cada fracció utilitzant un analitzador Automatic TLC linear analyzer Berthold LB2832.

11. EXPERIMENTS DE TRANSCRIPCIÓ-TRADUCCIÓ *IN VITRO*.

11.1. Descripció de les construccions utilitzades.

Les construccions utilitzades per ser transcrits i traduïdes han estat preparades totes en el vector pSP65 (Promega), ja que aquest conté el promotor de l'RNA polimerasa del fag SP6, que permet transcriure amb gran eficiència els cDNA clonats. Els cDNA han estat clonats de manera que no s'ha introduït cap codó ATG no corresponent al cDNA.

pcSPNC2:

El plasmidi pcNC2, que conté el cDNA FPS2, va ser digerit amb els enzims de restricció *SacII-SacI*, i el seu insert va ser clonat en els llocs corresponents del vector pBluescript. El plasmidi resultant (pcBNC2) va ser digerit amb *SacI-SalI*, i el cDNA FPS2 va ser clonat en les posicions corresponents del vector pSP65, per generar la construcció pcSPNC2.

pcSPNC3:

El plasmidi pcNC3, que conté el cDNA FPS1L, va ser digerit amb els enzims de restricció *SacII-SacI*, i el seu insert va ser clonat en els llocs corresponents del vector pBluescript. El plasmidi resultant (pcBNC3) va ser digerit amb *SacI-SalI*, i el cDNA FPS1L va ser clonat en les posicions corresponents del vector pSP65, per generar la construcció pcSPNC3.

pcSPNC3Mut:

El plasmidi pcBNC3Mut (veure apartat mutagènesi dirigida) va ser digerit amb els enzims de restricció *SacI-SalI* per alliberar el cDNA FPS1LMut. Aquest cDNA FPS1LMut va ser clonat en les posicions corresponents del vector pSP65, per generar la construcció pcSPNC3Mut.

pSPrps10:

El cDNA que codifica el precursor de la proteïna ribosomal S10 (RPS10) va ser clonat en el vector pBluescript. El cDNA va ser alliberat per digestió amb *EcoRI-XhoI* i va ser clonat en els llocs *EcoRI-SalI* del vector pSP65 per generar la construcció pSPrps10.

11.2. Sistemes de transcripció-traducció *in vitro*.

Les transcripcions i traduccions *in vitro* es van dur a terme utilitzant els sistemes acoblats de transcripció i traducció de Promega, tant el sistema d'extracte de germen de blat (TNT™ Coupled Wheat Germ Extract Systems) com el sistema de lisat de reticulòcits (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems), seguint les recomanacions indicades, i utilitzant [³⁵S]-metionina.

| | | |
|----------|--|-------|
| Reacció: | TNT Coupled System | 25 µl |
| | TNT tampó | 2 µl |
| | TNT SP6 RNA polimerasa | 1 µl |
| | Mescla d'aminoàcids sense metionina, 1 mM | 1 µl |
| | [³⁵ S]-metionina (1.000 Ci/mmol) 10 mCi/ml | 4 µl |
| | RNasin® 40 u/µl | 1 µl |
| | DNA motllo circular | 1 µg |
| | H ₂ O sense nucleases q.s.p. | 50 µl |

La reacció s'incuba 2 hores a 30°C.

Cas de desitjar-ho, les reaccions es poden dur a terme amb la meitat de volum (25 µl), corregint proporcionalment totes les quantitats.

Els productes de transcripció/traducció *in vitro* van ser analitzats per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS, seguint el mètode descrit per Laemmli (1970). Després de l'electroforesi, els gels es preparen per fluorografia per posar de manifest la presència de les proteïnes marcades radiactivament.

12. EXPERIMENTS D'IMPORTACIÓ DE PROTEÏNES A MITOCÒNDRIES

L'obtenció de mitocòndries de patata i l'assaig d'importació *in vitro* de precursors proteics a mitocòndries purificades s'ha dut a terme segons s'ha descrit a Wischmann *et al.* (1995). El protocol va ser posat a punt en el laboratori del doctor Wolfgang Schuster, i s'ha seguit amb algunes modificacions.

12.1. Purificació de mitocòndries de patata.

Es recomana realitzar l'obtenció de mitocòndries de patata a partir de tubercles de *Solanum tuberosum* varietat Bintje.

1. Pelar i tallar a trossos petits 1 Kg de patates. Rentar amb aigua.

A partir d'aquest punt, cal treballar sempre a 4°C (bé en una cambra freda, bé mantenint les mostres en gel), amb totes les solucions estèrils i fredes, i amb el material fred, per evitar tant com sigui possible l'oxidació de les mitocondries.

2. Afegir 2 ml tampó d'homogenització/g teixit.

És important que el tampó d'homogenització no contingui PMSF, ja que aquest compost pot impedir que tingui lloc la importació.

3. Homogenitzar el teixit utilitzant un Waring Blender.

Condicions de l'homogenització: fer 4 polsos de 3 segons de duració a màxima velocitat de l'aparell. Entre els polsos d'homogenització, fer pauses de 10 segons. Com que tota la mostra no cap simultàniament en el recipient d'homogenització, cal repartir la mostra i el tampó equitativament, en tantes fraccions com sigui necessari.

Si l'homogenització és bona, la mostra tindrà aspecte cremós, i de color blanquinós. Si la mostra s'enfosqueix o adquireix color marronós, és indicatiu que hi ha hagut oxidació, i que les mitocondries s'han alterat.

El procés d'homogenització és un dels punts crítics de l'experiment. Una homogenització excessiva provoca oxidació de les mitocondries, i una homogenització escassa no permet que les mitocondries surtin de les cèl·lules.

4. Filtrar la mostra a través de 4 capes de gassa estèril i de Mariacloth®, a fi de retenir tot el midó que sigui possible. Cal espremer la mostra per aconseguir el màxim de filtrat.
5. Centrifugar el filtrat a 3500×g (4500 rpm en rotor A6.9) durant 15 min a 4°C.
6. Centrifugar el sobrenedant del pas anterior, que ha de tenir color grogós, a 18.000×g (10.700 rpm en el rotor GSA) durant 30 min a 4°C.
7. Decantar el sobrenedant. El sediment format conté les mitocondries (de color marró), i restes de midó (de color grogós) a la part superior del sediment. Amb les mateixes restes del sobrenedant i amb una pipeta Pasteur de plàstic, resuspendre únicament el residu corresponent al midó, i descartar-lo.
8. Amb l'ajut d'un pinzell tou i amb molta suavitat, per evitar trencar les mitocondries, resuspendre el total de sediments de mitocondries en aproximadament 8 ml de tampó d'homogenització.
9. Repartir els 8 ml de mitocondries entre quatre gradients discontinus de Percoll (45%-28%-14%). Cal dipositar-los suaument a sobre del gradient, utilitzant una pipeta Pasteur de plàstic.
10. Centrifugar a 70.000×g en un rotor basculant (23.000 rpm en el rotor SW28) durant 45 min a 4°C. Les mitocondries queden retingudes en la interfase de Percoll 28%-Percoll 45%, i la seva aparença és clarament de color blanquinosa, a causa del Percoll present.
11. Recollir les bandes corresponents a les mitocondries amb una pipeta Pasteur de plàstic. Portar-les fins un volum de 500 ml amb tampó de rentat.
12. Centrifugar a 18.000×g (10.700rpm en rotor GSA) durant 15 min a 4°C.
13. Observar el sediment:

- si les mitocondries estan netes de Percoll, hauran caigut al fons del tub de centrifugació formant un sediment força compacte i de color marró. Seguir el protocol, al pas 14.
 - en canvi, si encara hi ha Percoll entre les mitocondries, el sediment tindrà color grisós i no es compactarà al fons del tub. Cal retirar tot el sobrenedant possible, sense perdre mitocondries, afegir el màxim de tampó de rentat i repetir el pas 12.
14. Descartar el sobrenedant, i resuspendre les mitocondries (amb un pinzell) amb 1 o bé 2 ml (depèn de la quantitat de mitocondries obtingudes) de tampó de rentat. Passar la mostra a un tub Eppendorf, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur de plàstic.
 15. Centrifugar 1 min a màxima velocitat en una centrífuga de sobretaula, a 4°C. Les mitocondries cauen al fons del tub, i tenen color marró. (Si el seu color és negrós, és que s'han oxidat durant el procés d'obtenció.)
 16. Resuspendre les mitocondries amb igual volum de tampó de rentat, per agitació suau, i mantenir la mostra en gel fins el moment de procedir a l'assaig d'importació.

SOLUCIONS:

Tampó d'homogenització:

| | |
|-------------------------|--------------------|
| Manitol | 0,4 M |
| EGTA | 1 mM |
| MOPS | 25 mM |
| BSA | 0,1% |
| β -mercaptoetanol | 10 mM |
| | pH 7,8 amb KOH 5 M |

Tampó de rentat 2x:

| | |
|--------------------------|--------------------|
| Manitol | 0,8 M |
| KH_2PO_4 | 20 mM |
| BSA | 0,2% |
| | pH 7,2 amb KOH 5 M |

Autoclavar per esterilitzar. β -mercaptoetanol i BSA s'afegeixen extemporàniament.

Preparació dels gradients de Percoll:

Els gradients utilitzats per purificar mitocondries són gradients discontinus, que estan constituïts per tres fases de diferent densitat de Percoll; Percoll al 45%, al 28% i al 14%. Cada fase del gradient es prepara diluint Percoll 100% amb tampó de rentat 2x i H_2O mQ, fins deixar la solució a la densitat de Percoll desitjada. Un cop es disposa de les tres solucions, cada tub Beckman del rotor SW28 s'omple amb 13 ml Percoll al 14%, 14 ml Percoll al 28% i 8 ml Percoll al 45%. Cal dipositar cada fase suaument, de menor a major densitat, i des del fons del tub, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur acoblada a una xeringa de 20 ml. D'aquesta manera, les interfases no es remouen.

12.2. Assaig d'importació de proteïnes a mitocondries purificades de patata.

Els experiments d'importació de proteïnes a mitocondries de patata purificades s'han dut a terme amb proteïnes sintetitzades *in vitro* amb el sistema de transcripció-traducció de lisat de reticulòcits TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega), utilitzant [³⁵S]Met, tal com s'ha descrit en l'apartat 11.

PROCEDIMENT

Per a cada proteïna que es desitgi estudiar si és importada:

1. En un tub Eppendorf, introduir 107 μl de tampó d'importació, 23 μl de la suspensió de mitocondries i 1 μl de valinomicina 375 $\mu\text{g/ml}$ (preparada en etanol). Mesclar suaument i incubar 5 min a temperatura ambient.
2. Afegir 10 μl del producte de traducció.
Paral·lelament, en un altre tub Eppendorf, introduir 160 μl de tampó d'importació, 35 μl de la suspensió de mitocondries i 15 μl del producte de traducció. Mesclar suaument.
Incubar simultàniament els dos tubs a temperatura ambient durant 30 min.
3. Repartir el contingut dels dos tubs en alíquotes de 70 μl (hi haurà un total de 5 alíquotes), per ser processades de forma diferent.
Afegir :
 - 14 μl de l'estoc de Proteïnasa K a una de les alíquotes tractades amb valinomicina
 - 14 μl de l'estoc de Proteïnasa K a una de les alíquotes no tractades amb valinomicina
 - 5 μl de tritó 10% i 14 μl de l'estoc de Proteïnasa K a una altra de les alíquotes no tractades amb valinomicina. L'addició de tritó lisa les mitocondries, i fa que la mostra es torni clara.
 Incubar les 5 mostres 30 min a temperatura ambient.
4. Afegir 1,5 μl de PMSF 100 mM (preparat en isopropanol) a cada tub. Agitar i incubar 15 min a temperatura ambient.
5. Dipositar suaument les mostres al damunt de 500 μl de solució de sacarosa (en un tub Eppendorf). Centrifugar 10 min a màxima velocitat a 4°C en una microcentrífuga. Les mitocondries intactes atravessen el gradient de sacarosa i es situen al fons del tub.
6. Descartar el sobrenedant, i resuspendre el sediment amb 80 μl de tampó de càrrega 1 \times .
7. Paral·lelament als experiments d'importació, cal dur a terme un control de degradació dels productes de traducció, en les mateixes condicions de l'assaig. Per això, 2,5 μl del producte de traducció en 32,5 μl de tampó d'importació són tractats amb 7 μl de l'estoc de proteïnasa K durant 30 min a temperatura ambient. S'afegeix 1 μl de PMSF 100 mM per aturar la reacció, i 43 μl de tampó de càrrega 2 \times .
8. Les mostres en tampó de càrrega poden ser guardades a -20°C, o bé es pot procedir a efectuar l'electroforesi en gel d' SDS i poliacrilamida (al 10% o bé al 12%), segons el mètode descrit per Laemmli (1970). Mides del gel: pel gel compilador, 5 cm \times 16 cm; pel gel separador, 16 cm \times 16 cm. Carregar la totalitat de les mostres tractades amb proteïnasa K, i 1/20 part de la resta de mostres.
9. Detectar els productes marcats radioactivament mitjançant fluorografia.

SOLUCIONS:

Tampó d'importació:

| | |
|--|--------|
| Manitol | 250 mM |
| HEPES pH 7,5 | 20 mM |
| KCl | 80 mM |
| KH ₂ PO ₄ pH 7,5 | 1 mM |
| ATP | 1 mM |
| Àcid màlic | 1 mM |
| NADH | 2 mM |
| DTT | 1 mM |

Tampó de càrrega 2x:

| | |
|-------------------|---------|
| Tris-HCl pH 6,8 | 0,125 M |
| SDS | 4% |
| Glicerol | 20% |
| β-mercaptoetanol | 10% |
| Blau de bromfenol | 0,04% |

Aquest tampó es prepara extemporàniament, a partir d'estocs estèrils de tots els components, excepte NADH, que es prepara just en el moment de l'assaig.

Estoc de proteïnasa K:

Proteïnasa K 100 µg/ml Tris HCl 10 mM pH 8
Preparar extemporàniament.

13. EXPRESSIÓ TRANSITÒRIA EN PROTOPLASTES D'*Arabidopsis thaliana*.

El manteniment de la línia cel.lular T87, l'obtenció de protoplastes, el protocol de transformació i l'assaig d'activitat GUS van ser descrits per Axelos *et al.* (1992), i han estat adaptats al nostre laboratori amb modificacions. Totes les manipulacions de la suspensió cel.lular s'han realitzar en una campana de flux laminar i s'han mantingut sempre condicions de màxima esterilitat.

13.1. Descripció de les construccions utilitzades en els experiments d'expressió transitòria en protoplastes.

El vector utilitzat pels experiments d'expressió transitòria en protoplastes és pBI221. Aquest vector conté el gen *uidA* d'*E. coli*, que codifica l'enzim β-glucuronidasa (*GUS*). En posició 5' del gen *uidA*, aquest vector té un lloc de clonatge múltiple amb diverses dianes de restricció, on té clonat el promotor del gen 35S del virus del mosaic de la coliflor (35SCaMV).

En el nostre laboratori, per mutagènesi dirigida, es va generar el vector pBI221GUSMut (veure apartat 8 de Materials i Mètodes). Aquest vector deriva del pBI221, al qual se li ha mutagenitzat el triplet ATG, codificant per metionina, codó d'inici de traducció de la proteïna GUS, pel triplet ATC, codificant per isoleucina.

Les diferents construccions assajades van ser obtingudes substituint en el vector pBI221 o bé pBI221GUSMut el promotor del gen 35SCaMV per seqüències de la regió 5'-flanquejant dels gens *FPSI*

o bé *FPS2* d'*Arabidopsis thaliana*. En tots els casos, es va preparar una fusió traduccional amb la seqüència que codifica el gen marcador *uidA*. Els plasmidis van ser replicats en la soca d'*E. coli* DH5 α .

CONSTRUCCIONS QUE CONTENEN DELECIONS DEL PROMOTOR DEL GEN *FPS1* d'*Arabidopsis thaliana*

Les construccions van ser preparades en el vector pBI221GUSMut, en el qual el fragment que conté el promotor del gen 35SCaMV va ser digerit *HindIII-SmaI* i substituït per regions 5'-flanquejant del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*.

Generació de les construccions

El fragment *HindIII-HincII* del plasmidi pgNC3MutDis (veure apartat 8 de Materials i Mètodes), que s'extén de la posició -1476 a la posició +73 del gen *FPS1*, i que conté la mutació que canvia el codó ATG distal per ATC, va ser clonat en les posicions *HindIII-SmaI* del vector pBI221GUSMut. El plasmidi resultant va ser anomenat (-1476/+73)*FPSIS-GUS*.

El plasmidi (-1476/+73)*FPS1-GUS* va ser digerit amb *HindIII-ClaI*, els extrems van ser fets roms, i es va tancar el plasmidi sobre si mateix. El plasmidi resultant va ser anomenat (-571/+73)*FPSIS-GUS*.

Els inserts de les següents construccions delecionades van ser generades per amplificació per PCR, utilitzant com a DNA motllo el plasmidi (-571/+73)*FPSIS-GUS*. Com a encebador antisentit, en tots els casos s'ha utilitzat l'oligonucleòtid FPS7bis, que conté la seqüència complementària que s'extén des de la posició +78 a la +56 del gen *FPS1*, i que inclou la diana *HincII* pròpia del gen. La seqüència de l'encebador FPS7bis es mostra a continuació. La diana *HincII* s'indica en cursiva.

5'-AGGTTGACTTGAGATCGGTCTCC-3'

Com a encebadors sentit, l'amplificació s'ha dut a terme amb els oligonucleòtids que s'indiquen en la taula 3. Els productes d'amplificació van ser digerits amb *HindIII-HincII* i clonats en les posicions *HindIII-SmaI* del vector pBI221GUSMut. Els plasmidis resultants van ser seqüenciats per comprovar l'absència d'artefactes deguts a la PCR.

CONSTRUCCIONS QUE CONTENEN DELECIONS DEL PROMOTOR DEL GEN *FPS2* d'*Arabidopsis thaliana*

Les construccions es van preparar en el vector pBI221, en el que es va eliminar el promotor del gen 35SCaMV digerint *SmaI-HindIII* i es va substituir per regions 5'-flanquejant del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*.

Taula 3. Oligonucleòtids sentit de la regió 5' del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*.

| Construcció | Encebador | Seqüència nucleotídica de l'encebador | Posició |
|-----------------------------|-----------|---------------------------------------|-------------|
| (-364/+73) <i>FPS1S-GUS</i> | FPS14 | <u>GGAAGCTT</u> CTGGGAATTGATCACTCTGG | -364 a -342 |
| (-205/+73) <i>FPS1S-GUS</i> | FPS15 | <u>GGAAGCTT</u> CTGTTTCTTTGGCTTGACATG | -205 a -184 |
| (-113/+73) <i>FPS1S-GUS</i> | FPS30 | <u>GGAAGCTT</u> AGGAAGAAACAGGAGGGG | -113 a -96 |
| (-66/+73) <i>FPS1S-GUS</i> | FPS31 | <u>GGAAGCTT</u> GTGTGAGTTGTTGTTGTAGG | -66 a -47 |

Taula 3. Seqüències nucleotídiques i posicions dels encebadors sentit utilitzats per generar les construccions delecionades per l'extrem 5' del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*. Les seqüències subratllades corresponen a nucleòtids no específics del gen *FPS1*. En cursiva, s'indica la diana de restricció *HindIII*, utilitzada pel clonatge dels fragments amplificats per PCR.

Generació de la construcció (-1328/+65)*FPS2-GUS*

Es pretenia aconseguir una fusió traduccional de la proteïna *FPS2* d'*Arabidopsis* amb la proteïna *GUS*. Com que la seqüència de la regió codificant del gen *FPS2* no contenia cap diana adequada pel clonatge, es va decidir introduir per PCR una diana *SmaI* en aquesta regió. Per fer-ho, es va dissenyar l'encebador antisentit SMAFPS2, de forma que continguéss la diana *SmaI* en l'extrem 5', que inclogués la seqüència dels 6 primers aminoàcids (19 nt) de la isoforma *FPS2*, i que mantingués el correcte marc de lectura amb la seqüència de la proteïna *GUS*. La seqüència de l'encebador SMAFPS2 és la següent:

5'-TCCCCCGGGATTGATTTCAGATCCGCCATTG-3'

L'oligonucleòtid és complementari a la seqüència que s'extén des de la posició +45 a la +65 del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. En cursiva, es marca la diana de restricció *SmaI* situada a l'extrem 5' de l'encebador. En negreta es remarca l'anticodó de la metionina d'inici de traducció de la proteïna *FPS2*. Es subratllen els nucleòtids que no pertanyen al gen *FPS2*.

Per la reacció de PCR, s'utilitzaren com a encebadors l'oligonucleòtid sentit FPS (veure taula 4) i l'oligonucleòtid antisentit SMAFPS2. El fragment de DNA amplificat contenia la regió genòmica compresa entre les posicions -1328/+65. Aquest fragment de DNA va ser digerit amb *SmaI-HindIII*, clonat en el vector pBI221 i seqüenciat. El plasmidi (-1328/+65)*FPS2-GUS* va ser utilitzat per generar la resta de construccions que es descriuen a continuació.

Generació de les construccions delecionades

Les construccions en les que s'eliminen progressivament fragments de la regió promotora del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* han estat preparades a partir del plasmidi (-1328/+65)*FPS2-GUS*. Els fragments de la regió 5'-flanquejant del gen han estat generats per amplificació per PCR, utilitzant com a motllo DNA del plasmidi (-1328/+65)*FPS2-GUS*. S'han utilitzat com a encebadors sentit oligonucleòtids del promotor del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, a les que s'ha afegit la diana de restricció *Hind*III i dues bases més per facilitar la posterior digestió enzimàtica (veure taula 4). Com a encebador antisentit (encebador pBI), s'ha utilitzat en tots els casos un oligonucleòtid complementari a la seqüència que envolta el triplet ATG inicial de la proteïna GUS i inclou part del polilinker del vector. La seqüència de l'encebador pBI és la següent:

5'-AACATAAGGGACTGACCACCCG-3'

En negreta es remarca l'anticodó de la metionina inici de traducció. En cursiva, es mostra la resta de la diana *Sma*I.

Els fragments amplificats van ser digerits amb *Sma*I-*Hind*III i clonats en el lloc corresponent del vector pBI221. Els plasmidis resultants van ser seqüenciats.

Taula 4. Oligonucleòtids sentit de la regió 5' del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*.

| Construcció | Encebador | Seqüència nucleotídica de l'encebador | Posició |
|-----------------------------|-----------|---------------------------------------|---------------|
| (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS | <u>CCAAGCTTGGAGCATAAG</u> | -1328 a -1313 |
| (-533/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS11 | <u>CCAAGCTTCGAGTTGTCCTTACCGACGC</u> | -533 a -513 |
| (-260/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS12 | <u>CCAAGCTTCATCGGAACCCTAGTGAGAATC</u> | -260 a -238 |
| (-111/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS13 | <u>CGAAGCTTCTGAGATAAGCAGGCCTTAGAC</u> | -111 a -87 |
| (-61/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS22 | <u>CCAAGCTTGCCCATTTAAAGAACGTCACG</u> | -66 a -41 |
| (-35/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPS23 | <u>CCAAGCTTCGATATAAGCATGATCCGAGG</u> | -35 a -15 |

Taula 4. Seqüències nucleotídiques i posicions dels encebadors sentit utilitzats per generar les construccions delecionades per l'extrem 5' del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. Les seqüències subratllades corresponen a nucleòtids no específics del gen *FPS2*. En cursiva, es mostra la diana de restricció *Hind*III, utilitzada pel clonatge dels fragments amplificats.

13.2. Purificació del DNA dels plasmidis utilitzats per la transfecció de protoplastes.

En tots els experiments d'expressió transitòria en protoplastes, la transfecció s'ha dut a terme utilitzant DNA plasmídic purificat en gradient de clorur de cesi.

PROCEDIMENT:

1. A partir d'una extensió en placa de la soca DH5 α transformada amb el plasmidi desitjat, créixer un pre-cultiu en un tub de 3 ml LB-ampicil.lina 100 μ g/ml durant una nit en agitació a 37°C.
2. El matí següent, inocular amb aquest cultiu 1 litre d'LB-ampicil.lina 100 μ g/ml. Deixar-lo créixer en agitació a 37°C fins que l'absorbància del cultiu llegida a 650 nm sigui 0,6 udo. Llavors, afegir cloramfenicol al cultiu perquè quedi a una concentració final de 200 μ g/ml, i incubar-lo durant tota la nit.
3. Recuperar les cèl.lules centrifugant 15 min a 5.000 rpm en el rotor A6.9 a 4°C.
4. En el mateix tub de centrifugació, resuspendre el sediment provinent d'1 litre de cultiu en 8 ml de TES.
A partir d'ara, mantenir les mostres en gel.
5. Afegir 2,25 ml de lisozim 10 mg/ml preparat extemporàniament en TES. Incubar 5 min en gel.
6. Afegir 3,25 ml EDTA 0,5 M pH 8. Afegir 25 μ l d'RNAsa A 10 mg/ml, i incubar 5 min a temperatura ambient.
7. Tornar a posar les mostres en gel. Afegir 4 ml de solució de tritó freda gota a gota, i agitant fortament. Incubar 10 min, durant els quals cal agitar les mostres continuament.
8. Centrifugar 70 min a 18.000 rpm en el rotor SM-24 a 4°C.
9. Transferir per decantació el sobrenedant a tubs Corex-30. Afegir 1 g de CsCl/ml de sobrenedant. Per aconseguir que el CsCl es dissolgui, escalfar les mostres a 30°C. Recordar que a aquesta concentració, CsCl precipita si la temperatura <15°C.
10. Afegir 0,1 ml de solució de bromur d'etidi 10 mg/ml (preparada en Tris-HCl 10 mM pH 7,5) per cada ml de sobrenedant transferit al pas 9. A partir d'aquest moment cal protegir les mostres de la llum.
11. Centrifugar 20 min a 7.000 rpm en el rotor SS34 a 20°C.
12. Transferir la solució a un tub Falcon 50 amb una pipeta Pasteur.
En aquest punt és aconsellable comprovar que la densitat de les mostres és 1,6 g/ml. Cas que la densitat no fos la desitjada, caldria corregir-la afegint CsCl sòlid o bé afegint TE a la mostra.
13. Repartir la mostra entre dos tubs d'ultracentrífuga Quick-Seal™ de Beckman. Omplir els tubs totalment amb l'ajut d'una xeringa; si no hi hagués prou mostra, acabar d'omplir els tubs amb solució 1 g CsCl/ml TE, que es pot preparar extemporàniament. Assegurant-se que no hi hagi bombolles, sellar els tubs.

14. Centrifugar 16-18 h a 63.000 rpm en el rotor NVT65 a 20°C, amb acceleració màxima i aturant sense frenada.
15. En el tub de centrifugació es podran observar clarament dues bandes: la superior correspon a DNA genòmic; la inferior correspon a DNA plasmídic. Recuperar la banda del DNA plasmídic aspirant suaument amb una xeringa de 5 ml. Per fer-ho, és necessari perforar la part superior del tub amb una agulla de xeringa, per permetre el pas d'aire. Per aspirar el DNA plasmídic, es recomana perforar el tub aproximadament 1 cm per sota de la seva corresponent banda, i col·locar la part bisellada de l'agulla mirant cap a la banda de DNA plasmídic.
16. Introduir el DNA plasmídic aspirat a l'interior d'un tub d'ultracentrifugació. En aquest cas, per omplir els tubs és necessari preparar la solució 1 g CsCl/ml TE. No cal afegir més bromur d'etidi. Segellar els tubs.
17. Realitzar una segona ultracentrifugació (pas 14) d'aquest DNA per eliminar contaminació provinent del DNA genòmic.
18. Recuperar la banda inferior (pas 15) i transferir-la a tubs eppendorf.
19. Per eliminar el bromur d'etidi del DNA, s'extreu la mostra amb igual volum d'alcohol isoamílic tantes vegades com sigui necessari per eliminar el color rosat completament (solen ser necessàries 5 extraccions).
20. Per eliminar el CsCl, es precipita selectivament el DNA plasmídic. Per fer-ho, en Corex-30, al volum de mostra (v) se li afegeixen 3v d'aigua (es tindrà un volum V); s'afegeixen 2V d'etanol absolut, i es deixa precipitar el DNA plasmídic a 4°C durant un mínim de 2 h. Si la temperatura és inferior a 4°C, precipitarà també CsCl.
21. Recuperar el DNA centrifugant 30 min a 10.000 rpm en el rotor SS34 a 4°C.
22. Rentar el sediment amb etanol 70%, i assecat-lo.
23. Resuspendre el sediment de DNA en 1 ml de TE i conservar-lo a -20°C.

La quantitat de DNA plasmídic obtinguda es pot quantificar espectrofotomètricament, llegint l'absorbància a 260/280, tenint en compte que $1 \text{ udo}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$. Es recomana fer una dilució 1:100 del DNA obtingut.

SOLUCIONS

| <u>TES:</u> | | <u>Solució de tritó:</u> | | <u>TE:</u> | |
|---------------|-----------|--------------------------|--------|---------------|-------|
| Sacarosa | 25% (p/v) | Tritó X-100 | 3% | Tris-HCl pH 8 | 10 mM |
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM | Tris-HCl pH 8 | 150 mM | EDTA pH 8 | 1 mM |
| EDTA pH 8 | 100 mM | EDTA pH 8 | 200 mM | | |

13.3. Manteniment de la línia cel.lular T87 d'*Arabidopsis thaliana*.

Les condicions de creixement de la suspensió cel.lular d'*Arabidopsis* T87 han estat un cicle de 16 h de llum/ 8 h de foscor, 24°C i agitació constant de 115 rpm. El manteniment de la línia s'ha realitzat traspasant una al.líquota de 10-20 ml d'un cultiu en fase exponencial d'aproximadament 7 dies a 120 ml de medi de cultiu nou que contingués ANA 2,5 µM (s'afegien 70 µl d'un estoc ANA 5 mM).

Medi de cultiu:

| | |
|--------------------|---------|
| Murashigue i Skoog | 4,4 g/l |
| Sacarosa | 30 g/l |
| MES | 1 g/l |

pH 5,7 amb KOH 0,1 N

Preparació: pesar els components, dissoldre'ls en aigua destil.lada, ajustar el pH a 5,7 amb KOH i autoclavar. Un cop autoclavats, els medis es poden guardar a 4°C.

Estoc ANA 5 mM:

| | |
|------|--------|
| ANA | 9,3 mg |
| DMSO | 10 ml |

Preparació: pesar la quantitat necessària d'hormona, i dissoldre-la en DMSO (Sigma). Esterilitzar per filtració amb filtre de 0,22 µm.

13.4. Obtenció de protoplastes a partir de la suspensió cel.lular de la línia T87.

Cal partir d'un cultiu en suspensió que estigui en fase exponencial de creixement, que sol ser un cultiu de 5-6 dies.

1. Filtrar tot un erlenmeyer de cultiu (aproximadament 140 ml) a través d'una malla de nylon de 55 µm de diàmetre de porus. Les cèl.lules queden retingudes en el filtre perquè no atravessen el porus de la malla.
Per filtrar, cal lligar la malla de nylon al coll d'un embut, i encaixar aquest embut en el coll d'un erlenmeyer de 250 ml.
2. Rentar les cèl.lules dipositades a la malla amb 135 ml de medi JPL al qual s'ha afegit prèviament 15 ml de solució de sacarosa.
3. Rentar les cèl.lules amb 100 ml de medi PROTO. Aquest medi té una concentració de sacarosa 0,45 M, que és òptima per mantenir l'osmolaritat que necessitaran els protoplastes per conservar íntegra la seva membrana plasmàtica.
4. Col.locar l'embut amb les cèl.lules en un nou erlenmeyer de 250 ml. Amb unes tisores, tallar la base de la malla de nylon, i deixar caure les cèl.lules a l'interior de l'erlenmeyer.
5. Resuspendre les cèl.lules amb 15 ml de solució enzimàtica, i incubar en foscor (embolicant l'erlenmeyer amb paper d'alumini) durant 3 h amb agitació suau (55 rpm) a 26-27°C.

6. Filtrar la suspensió a través d'una altra malla de nylon de 55 µm de diàmetre de porus. Amb 10 ml de medi PROTO, recollir les cèl.lules que puguin quedar a l'interior de l'erenmeyer on ha tingut lloc la digestió enzimàtica, i filtrar-los també.

En aquesta ocasió, els protoplastes poden atravesar el porus de la malla, i són recollits a l'erenmeyer que sosté l'embut.

7. Transferir tot el filtrat recollit dins l'erenmeyer a un tub Falcon-50. En un rotor basculant, centrifugar durant 10 min a 80×g i a 4°C, aturant sense fre.

Els protoplastes intactes es situaran a sobre del coixí de sacarosa que forma el medi PROTO; els protoplastes lísats i les restes cel.lulars cauran al fons del tub.

8. Recuperar els protoplastes aspirant suaument amb una pipeta Pasteur de vidre, i passar-los a un nou tub Falcon-50.
9. Afegir 30 ml de medi PROTO, i resuspendre suaument els protoplastes per inversió.
10. Repetir la centrifugació del pas 7, i fer un altre rentat si és necessari.
11. Després de l'últim rentat, recollir els protoplastes en un tub Falcon-50.
12. Observar i quantificar els protoplastes obtinguts col.locant 30 µl de la suspensió en una càmera de Newbauer, en un microscopi.

Generalment, el número de protoplastes obtinguts oscil.la entre 20 i 40 protoplastes/quadre. Tenint en compte que el volum d'un quadre de la càmera de Newbauer és $2,5 \times 10^{-7}$ ml, vol dir que hi ha entre 8 i 16×10^6 protoplastes/ml.

SOLUCIONS

Totes les solucions es preparen amb aigua mQ.

| <u>Estoc A:</u> | | <u>Estoc B:</u> | | <u>Estoc C:</u> | |
|--------------------------------------|----------|---------------------------------------|-----------|--|-----------|
| KNO ₃ | 65,5 g/l | H ₃ BO ₃ | 6,2 g/l | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2,785 g/l |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 4,4 g/l | MnSO ₄ ·4H ₂ O | 33,3 g/l | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 3,725 g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3,7 g/l | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 10,58 g/l | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1,7 g/l | KI | 840 mg/l | | |
| | | NaMoO ₄ ·2H ₂ O | 240 mg/l | | |
| | | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 25 mg/l | | |
| | | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 25 mg/l | | |

Aquests estocs s'autoclaven 20 min a 120°C i es poden guardar a 4°C.

Estoc de vitamines:

| | |
|----------------|----------|
| Tiamina HCl | 400 mg/l |
| Àcid nicotínic | 500 mg/l |
| Piridoxina HCl | 500 mg/l |

Aquesta solució s'esterilitza per filtració amb filtre de 0,22 µm. Es guarda a 4°C protegida de la llum.

Medi JPL: preparació de 135 ml

| | |
|---------|----------|
| Estoc A | 5,06 ml |
| Estoc B | 50,6 µl |
| Estoc C | 337,5 µl |

Medi PROTO: preparació de 250 ml

| | |
|-----------------|--------|
| Estoc A | 7,5 ml |
| Estoc B | 75 µl |
| Estoc C | 500 µl |
| Mioinositol | 25 mg |
| Estoc vitamines | 2,5 ml |
| Sacarosa | 38,5 g |

Cal ajustar pH 5,7 amb KOH 0,01 N dels medis JPL i PROTO. Autoclavar 20 min a 120°C.

Solució de sacarosa:

| | |
|---|---------|
| Sacarosa | 150 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7 | 1mM |

Autoclavar 20 min a 120°C.

Solució enzimàtica:

| | |
|------------|--------|
| Cailasa | 100 mg |
| Pectoliasa | 15 mg |
| Medi PROTO | 15 ml |

Aquesta solució es prepara extemporàniament, just abans de començar a filtrar el cultiu cel·lular. S'esterilitza per filtració, amb filtre de 0,22 µm.

13.5. Transfecció de protoplastes.

PROCEDIMENT:

1. Col·locar en tubs Falcon-15 alíquotes de 200 µl de suspensió de protoplastes (obtinguts segons s'ha descrit a l'apartat 13.4) que continguin aproximadament un total de 2×10^6 protoplastes.
2. Mesclar l'alíquota de protoplastes amb 20 µl que continguin 40 µg de DNA plasmídic (purificat tal com s'ha descrit a l'apartat 13.2) resuspès amb TE.
3. Afegir 200 µl de solució PEG-Ca, agitar suaument el tub i incubar 20 min a temperatura ambient.
4. Afegir 5 ml de solució Ca(NO₃)₂, agitar suaument i incubar 10 min a temperatura ambient.
5. Centrifugar 10 min a 80×g a 4°C en un rotor basculant; els protoplastes cauran al fons del tub.
6. Decantar suaument el sobrenadant.
7. Resuspendre suaument amb agitació el sediment de protoplastes en 1 ml de medi PROTO que contingui ANA 5 µM i kinetina 1 µM.

Els protoplastes així transfectats s'incuben durant aproximadament 40 h en fosc a 22°C, període durant el qual té lloc l'expressió del DNA plasmídic, i s'origina activitat β-glucuronidasa.

SOLUCIONS

Solució Ca(NO₃)₂:

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Ca(NO ₃) ₂ | 0,275 M |
|-----------------------------------|---------|

La solució es prepara amb aigua mQ, i s'ajusta el pH 5,7 amb KOH 0,01 N. S'autoclava 20 min a 120°C.

Solució de PEG-Ca:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| PEG-6000 | 25% (p/v) |
| Ca(NO ₃) ₂ | 0,1 M |
| Manitol | 0,45 M |
| pH 9 amb NaOH 0,1 N | |

Preparació: dissoldre Ca(NO₃)₂ i manitol en una mica d'aigua mQ. Afegir PEG-6000 i ajustar el volum. Ajustar pH 9 afegint NaOH 0,1N gota a gota. Amb el temps (unes hores), el pH disminueix fins valors de 7. Tornar a ajustar pH 9. Conservar la solució a -20°C i ajustar el pH just abans de cada utilització en el moment de la transfecció.

S'esterilitza per filtració a través de 0,45 µm la quantitat de solució que s'utilitzarà per transfectar.

Estoc kinetina 0,5 mM:

| | |
|------------------|---------|
| Kinetina | 3,21 mg |
| Etanol 50% (v/v) | 30 ml |

La solució s'esterilitza per filtració amb filtre de 0,22 µm, i es conserva a -20°C.

13.6. Assaig d'activitat GUS.

L'activitat de l'enzim β-glucuronidasa es determina mitjançant l'assaig fluorimètric descrit per Jefferson (1987). Aquest assaig es basa en la detecció del producte fluorescent metilumbel.liferil (MU) generat a partir del substrate metilumbel.liferil-β-D-glucurònid (MUG) en ser metabolitzat per l'enzim β-glucuronidasa.

PROCEDIMENT

1. Observar els tubs Falcon -15 que han estat incubats durant 40 h a 22°C en foscor; si els protoplastes estan en bon estat, flotaran damunt del coixí de sacarosa del medi PROTO.
2. Afegir 1,5 ml de solució de rentat, barrejar suaument i centrifugar 10 min a 100×g en un rotor basculant.
3. Decantar el sobrenedant, resuspendre el sediment de protoplastes en 1 ml de solució de rentat i transferir-lo a un tub eppendorf.
4. Centrifugar 5 segons a la màxima velocitat d'una microcentrífuga de sobretaula, i eliminar completament el sobrenedant. Si no es vol procedir a efectuar l'assaig d'activitat GUS, la mostra de protoplastes es pot guardar a -80°C.
5. Resuspendre el sediment de protoplastes en 100 µl de tampó d'extracció.
6. Procedir a lisar els protoplastes per xoc tèrmic, col·locant els tubs de forma alternada 1 min en nitrogen líquid i 1 min en un bany a 37°C. Cal repetir el cicle 3 vegades més. Per evitar que el tub eppendorf es trenqui a causa del canvi de temperatura, es recomana que en treure'l del nitrogen líquid s'atempere durant 30 segons a temperatura ambient abans de ser submergit al bany a 37°C.

7. Centrifugar 5 segons a la màxima velocitat d'una microcentrífuga de sobretaula, i recuperar el sobrenedant

8. Aquest extracte s'utilitza per mesurar l'activitat GUS; es pot conservar a -80°C , i també s'utilitzarà per determinar la concentració de proteïna.

L'assaig d'activitat GUS ha estat realitzat a partir de 2 μl d'aquest extracte quan s'assajaven protoplastes transfectats amb DNA corresponent a construccions quimèriques del promotor del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, i 10 μl en el cas del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*.

9. La quantitat d'extracte de protoplastes que es vulgui assajar es porta a un volum de 500 μl amb tampó d'assaig en un tub eppendorf, i s'incuba a 37°C .

10. Als 15 min, 30 min, 45 min i 60 min, es retira una alíquota de 100 μl de la reacció i s'introdueix a un tub eppendorf on hi ha 900 μl de tampó d'aturada.

11. Per determinar la quantitat de producte (MU) format, s'utilitza un minifluorímetre de longituds d'ona fixes (TKO-100, Hoefler); λ d'excitació de 365 nm i λ d'emissió 455nm.

Per efectuar les lectures de forma adequada, cal calibrar l'aparell amb dues dilucions estàndard de MU: calibrar a 50 unitats amb MU 5 nM i calibrar a 500 unitats amb MU 50 nM. Aquestes dues dilucions estàndard es preparen extemporàniament a partir d'un estoc MU 1mM diluït en tampó d'aturada.

12. Per llegir les mostres, es fa una dilució 1:20 de les alíquotes que estan en tampó d'aturada (pas 9); agafar 100 μl de l'alíquota i portar-los a 2 ml amb més tampó d'aturada, en la mateixa cubeta on s'efectuarà la lectura.

SOLUCIONS

Solució de rentat:

KCl 2,5%
CaCl₂ 0,2%
MES 5 mM

Ajustar pH 5,7 amb KOH 0,1 N i autoclavar 20 min a 120°C

Tampó d'aturada:

Na₂CO₃ 0,2 M
No cal ni ajustar pH ni autoclavar

Tampó d'extracció:

Tampó fosfats pH 7 50 mM
EDTA 10 mM
Tritó X-100 0,1%
 β -mercaptoetanol 10 mM

Tampó d'assaig:

Tampó fosfats pH 7 50 mM
EDTA 10 mM
Tritó X-100 0,1%
 β -mercaptoetanol 10 mM
MUG 1 mM

Els tampons d'extracció i d'assaig es preparen extemporàniament.

Estoc MU 1 mM:

MU 9,9 mg
Aigua mQ 50 ml
Guardar a 4°C protegit de la llum.

14. GENERACIÓ I ANÀLISI DE PLANTES TRANSGÈNIQUES D'*Arabidopsis thaliana*.

La generació de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* s'ha dut a terme per infecció amb *Agrobacterium tumefaciens* C₅₈C₁ mitjançant la tècnica d'infiltració al buit, descrita per Bechtold *et al.* (1993) adaptada amb modificacions.

14.1. Descripció de les construccions utilitzades per generar plantes transgèniques.

El vector utilitzat per l'obtenció de plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* ha estat pBI121. Aquest vector conté el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) i el gen *uidA* d'*Escherichia coli*, que codifica l'enzim β -glucuronidasa (*GUS*). En posició 5' del gen *uidA*, igual que en els cas del vector pBI221, aquest vector conté clonat el promotor 35SCaMV enmig de la regió de clonatge. S'ha escollit aquest vector perquè el gen *uidA* codifica per una proteïna que és innòcua per la planta, estable en la planta i que permet un assaig fàcil i sensible (Jefferson *et al.*, 1987). I donat que les plantes no tenen activitat *GUS*, no es produiran interferències en el moment de detectar aquesta activitat. A més, el gen NPTII confereix resistència a antibiòtics aminoglucòsids, com la kanamicina, la qual cosa permetrà una selecció senzilla de les plantes transgèniques.

Les diferents construccions es van obtenir a partir de les construccions preparades en el vector pBI221 utilitzades en els experiments d'expressió transitòria en protoplastes (apartat 13 de Materials i Mètodes). En el vector pBI121, es va eliminar el fragment que conté el gen *GUS* i el promotor 35SCaMV per digestió *HindIII-SacI* i es va substituir pel fragment quimèric que contingués la fusió traduccional de les regions 5' flanquejants dels gens *FPS1* o bé *FPS2* d'*Arabidopsis thaliana*, generat també per digestió *HindIII-SacI*.

Els plasmidis es repliquen en la soca DH5 α d' *Escherichia coli* i posteriorment s'introdueixen en *Agrobacterium tumefaciens*.

14.2. Transformació d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La transformació d'*Agrobacterium tumefaciens* C₅₈C₁ es realitza segons el mètode descrit per An *et al.* (1987).

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

1. A partir d'una colònia de la soca d' *Agrobacterium tumefaciens*, inocular un pre-cultiu de 10 ml de YEP-Rifampicina 100 μ g/ml, i incubar en agitació (180 rpm) a 28°C aproximadament 24 h.

2. Inocular 50 µl del precultiu en 50 ml de YEP-Rifampicina 100 µg/ml, i incubar en agitació a 28°C fins assolir una $DO_{260}=0,5$. Normalment, si el precultiu no està excessivament saturat, el cultiu tarda 18-20 h a arribar a la DO desitjada; per això l'inòcul es sol fer a la tarda-nit, per tenir l'endemà al matí el cultiu prou crescut.
3. Centrifugar 10 min a 2000 rpm a 4°C. A partir d'ara, cal mantenir les cèl.lules en fred durant les manipulacions, i cal resuspendre-les suaument per evitar lisar-les mecànicament.
4. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules en 10 ml de solució NaCl 0,15 M freda.
5. Centrifugar 10 min a 2000 rpm a 4°C.
6. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules en 1 ml de solució CaCl₂ 200 mM freda.
7. Repartir en alíquotes de 200 µl.

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

1. Afegir una alíquota de 200 µl d'*A. tumefaciens* competents a 1 µg (en 10 µl d'aigua) del DNA plasmídic desitjat, i incubar 30 min en gel.
2. Incubar durant 1 min en nitrogen líquid.
3. Atempter les cèl.lules a 37°C durant 5 min.
4. Afegir 2 ml de medi YEP, i incubar 6 h a 28°C en agitació (180 rpm).
5. Recollir les cèl.lules centrifugant 5 min a 2000 rpm.
6. Descartar el sobrenedant, i resuspendre suaument el sediment de cèl.lules en 200 µl de medi YEP.
7. Sembrar la suspensió cel.lular en dues plaques de Petri que continguin medi YEP sòlid amb Rifampicina (100 µg/ml) i Kanamicina (30 µg/ml).
8. Incubar a 28°C durant aproximadament dos dies.

Les transformacions van ser confirmades per dues vies. Es va obtenir DNA plasmídic a partir de les colònies d'*Agrobacterium*, que per una banda s'analitzà amb enzims de restricció i per l'altra, s'utilitzà per retrotransformar la soca DH5α.

Medi YEP:

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| Extracte de llevat | 1 g/l |
| Extracte de bou | 5 g/l |
| Peptona | 5 g/l |
| Sacaraosa | 5 g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 g/l |
| | pH 7,0 amb NaOH |
| Autoclavar 20 min a 120°C. | |

Medi YEP sòlid:

Medi YEP amb agar 15 g/l
pH 7,0 amb NaOH
Autoclavar 20 min a 120°C.

14.3. Mètode d'infiltració al buit.

Aquest mètode de generació de plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques es basa en aconseguir que *Agrobacterium tumefaciens* infecti les cèl·lules germinals de la planta, a fi que aquestes originin posteriorment llavors portadores del transgèn. Per aconseguir-ho, plantes d'*Arabidopsis* són submergides en una suspensió d'*Agrobacterium* transformat amb la construcció desitjada, i sotmeses al buit, a fi de facilitar la infecció del bacteri a través de les ferides originades en els teixits de la planta.

Un aspecte que cal tenir en compte per aconseguir un bon rendiment en la transformació és que la planta sigui prou forta per resistir les lesions provocades per l'aplicació del buit, i que es trobi en un estat de desenvolupament en el que tingui molts botons florals.

CONDICIONS DE CREIXEMENT DE LA PLANTA.

1. Esterilitzar llavor d'*Arabidopsis thaliana*, ecotip Columbia, tal com s'ha descrit a l'apartat 1.1 de Materials i Mètodes.
2. Sembrar les llavors en plaques de medi de germinació. Vernalitzar durant 3 dies per sincronitzar la germinació.
3. Posar a créixer en condicions de llum de dia curt (8 h de llum i 16 h de foscor).
4. Als 10-15 dies, passar les plàntules a testos amb terra i mantenir el dia curt.
Es planten de 7 a 9 plàntules a cada test. Es preparen 6 testos per cada construcció amb la que es desitgi generar plantes transgèniques.
5. Quan comenci a formar-se la tija principal amb el seu brot floral (aproximadament entre 20 i 30 dies), tallar-la per la base. Així s'afavoreix el desenvolupament de la roseta basal i s'estimula la formació de diverses tiges laterals.
6. Cap als 30 dies, passar a créixer les plantes en condicions de dia llarg.
7. Aproximadament als 60 dies de vida la planta està a punt per a ser infiltrada. Cal esperar que es formi el màxim nombre de brots florals, però no es pot deixar envellir gaires dies més la planta, ja que llavors no es recupera tan bé de les ferides causades per l'aplicació del buit.

CONDICIONS DE CREIXEMENT D'*A. tumefaciens*.

1. A partir d'una extensió en medi YEP-Rifampicina 100 µg/ml - Kanamicina 30µg/ml de la soca d'*A. tumefaciens* portadora de la construcció d'interès, inocular un pre-cultiu de 15 ml de medi YEP-Rifampicina 100 µg/ml - Kanamicina 30µg/ml. Incubar a 28°C i amb agitació (160 rpm) durant 24 h.
2. A partir del pre-cultiu, inocular 1 ml en 750 ml (en un erlenmeyer de 2 litres) de medi YEP-Rifampicina 100 µg/ml - Kanamicina 30µg/ml. Cal inocular 750 ml de cultiu per cada test que es desitgi infiltrar.

3. Incubar a 28°C i amb agitació (170 rpm) fins que la seva $DO_{600}=1$. El creixement d'*Agrobacterium* és lent, i sol trigar 15-20 h a assolir la DO desitjada; per això aquest inòcul es sol fer a les 16-18 h, i s'incuba fins l'endemà.
 4. Recollir les cèl.lules del cultiu centrifugant 15 min a 4000 rpm (Sorvall, rotor A6.9) a 4°C.
 5. Descartar el sobrenedant, i resuspendre suaument les cèl.lules amb medi d'infiltració, a fi que quedi una DO aproximada de 2,4. Normalment, la quantitat de cèl.lules provinents de dos cultius de 750 ml es resuspèn en 600-700 ml de medi d'infiltració.
- Cal resuspendre les cèl.lules amb agitació suau i sense l'ajut d'una pipeta per evitar trencar-les mecànicament.

Medi d'infiltració:

| | |
|------------------------|----------|
| Murashige i Skoog | 2,2 g/l |
| Gamborg's B5 | 3,8 g/l |
| Sacarosa | 50 g/l |
| Benzilaminopurina | 0,044 µM |
| Tensoactiu Silwet L-77 | 36 µl/l |
| pH 5,7 amb KOH 0,5 M | |

Estoc benzilaminopurina:

| | |
|-------------------|------|
| benzilaminopurina | 2 mg |
| DMSO | 1 ml |

Es prepara extemporàniament, i no cal autoclavar-lo.

CONDICIONS DEL PROCÉS D'INFILTRACIÓ.

1. Col.locar 700 ml de la suspensió d'*Agrobacterium* en el recipient adequat per la infiltració.
Aquesta quantitat d'*Agrobacterium* en medi d'infiltració serveix per infiltrar dos testos.
El recipient utilitzat és un motllo de cuina de vidre pyrex, de 16 cm de diàmetre i 6 cm de fondària, en el que hi caben aproximadament 700 ml. Aquesta mida de motllo és adequada, ja que els diàmetres del motllo i dels testos usats són pràcticament idèntics.
2. Cargolar suaument les tiges de les plantes, i col.locar el test invertit de tal manera que el test es suporti a sobre del motllo de vidre i que les tiges i les fulles basals es submergeixin en la suspensió d'*Agrobacterium*.
Per assegurar que el contingut del test, en cas de despredre's, no caigui a l'interior del motllo de vidre, es recomana, abans d'invertir el test, creuar dues espàtules per sota de les fulles basals de les plantes, tenint cura de no arrancar-les, per tal que les espàtules suportin el pes un cop estigui el test invertit.
3. Col.locar el motllo de vidre amb el test invertit a l'interior d'un dessecador.
4. Connectar amb tubs de goma el dessecador a una bomba de buit (Telstar), i aplicar el buit.
Per evitar que vapors de la suspensió arribin a la bomba de buit i puguin deteriorar-la, es recomana col.locar entre el dessecador i la bomba una trampa de buit en nitrogen líquid.
5. A causa del bombolleig de l'aire present en la suspensió d'*Agrobacterium*, aquesta vessa ràpidament. Transcorregut 1 min cal aturar el procés per tornar a l'interior del motllo de vidre tota la suspensió que hagi vessat, amb l'ajut d'una xeringa de 50 ml.

6. Seguir aplicant el buit durant 21 min més, interrompent-lo cada 7 min. Interrompre el buit significa deixar entrar aire a l'interior del dessecador.
7. Obrir el dessecador i retirar el test amb precaució. Rentar bé la planta amb aigua per eliminar la solució d'infiltració, que podria facilitar la infecció per altres microorganismes, a causa de l'elevada quantitat de sacarosa que aquesta conté.
8. Els dies següents al procés d'infiltració cal controlar que les plantes no es deshidratin a causa de les lesions, regant-les amb medi mineral.

Les plantes així infiltrades es mantenen en condicions de dia llarg durant aproximadament 1 mes, temps durant el qual les cèl·lules germinals infectades donaran lloc a llavors transgèniques.

14.4. Selecció de plantes transgèniques.

No totes les llavors de les plantes infiltrades al buit són portadores del transgèn. Cal seleccionar les llavors que contenen el transgèn d'entre totes les llavors obtingudes. El vector pBI121 conté en la seva seqüència el gen NPTII, que confereix resistència a l'antibiòtic kanamicina. Aquesta característica permet una identificació senzilla de les llavors transgèniques, ja que seran les úniques amb capacitat per créixer en un medi amb kanamicina.

PROCEDIMENT

1. Esterilizar llavors (apartat 1.1) provinents de plantes infiltrades (generació T₀).
2. Sembrar les llavors en medi de germinació que contingui 50 µg/ml de kanamicina. Vernalitzar durant 3 dies per sincronitzar la germinació.
3. Posar a créixer les llavors sembrades en condicions de dia llarg.
4. Als 7-8 dies, s'observa clarament que les plàntules no portadores del transgèn, malgrat que puguin germinar, no desenvolupen més enllà dels dos cotilèdons, mentre que les plàntules transgèniques es desenvolupen amb normalitat.
5. Cas que en la placa aparegui contaminació per *A. tumefaciens*, ja que aquest és un bacteri força resistent al procés d'esterilització de les llavors, es recomana passar les plàntules resistents a kanamicina a una nova placa de medi de germinació que contingui 50 µg/ml de kanamicina i 500 µg/ml de vancomicina. La vancomicina és un antibiòtic innocu per *Arabidopsis* i letal per *Agrobacterium*.
6. Un cop s'hagi evidenciat la resistència de la planta a la kanamicina, aquesta pot passar a ser crescuda en terra. Aquestes plàntules resistents constitueixen la generació T₁.
7. La progènie resultant de l'autofecundació de plantes de la generació T₁ constitueix la generació T₂, que és la generació utilitzada per dur a terme l'anàlisi d'activitat GUS.

14.5. Comprovació per PCR de la integració del transgèn en el genoma de la planta.

Les plantes resistents a kanamicina són analitzades per PCR per comprovar que han incorporat la regió del transgèn. S'obté DNA genòmic d'aquestes plantes, i s'amplifica per PCR utilitzant com a encebadors sentit oligonucleòtids específics de les seqüències dels gens *FPS1* o bé *FPS2* d'*Arabidopsis*, i com a encebador antisentit un oligonucleòtid específic del gen *uidA*.

PROCEDIMENT

1. Recollir aproximadament 15 mg de teixit de la planta, i introduir-los en un eppendorf.
No és necessari utilitzar una planta crescuda en condicions estèrils. Sol utilitzar-se com a teixit fulles joves d'una planta crescuda en terra.
2. Afegir 10 µl NaOH 0,5 M/mg de teixit.
3. Moldre el teixit amb un pistil de plàstic.
4. Diluir 20 µl del teixit mòlt amb 980 µl de tampó Tris-HCl 100 mM pH 8.

Per dur a terme l'amplificació per PCR, s'ha utilitzat el kit Ready-To-Go® PCR-BEADS de Pharmacia.

5. En el tub de PCR, afegir 16 µl d'aigua, 5 µl de la dilució de DNA de la planta, i 2 µl tant d'encebador d'anada com d'encebador de tornada d'un stock 10 µM cada un (equival a 20 pmols de cada encebador).
6. Assegurar-se de dissoldre bé els components del kit agitant enèrgicament, fer un pols de centrifuga per baixar la mostra al fons del tub, i cobrir-la amb 50 µl d'oli mineral.
7. Escalfar les mostres 5 min a 95 °C.
8. Realitzar una primera etapa d'elongació de 5 min a 72°C.
9. Realitzar 35 cicles de: 1 min de desnaturalització a 90°C, 1 min d'hibridació a 56°C i 2 min 30 seg d'elongació a 72°C.
10. Acabar l'amplificació amb una extensió final de 5 min a 72°C.
11. Analitzar els productes d'amplificació en un gel d'agarosa al 2%.

ENCEBADORS UTILITZATS I FRAGMENT'S GENERATS EN LA PCR.

pBIGUS2: encebador antisentit del gen *uidA*, complementari a la seqüència de DNA compresa entre les posicions +51 a +70, respecte la posició +1 que ocupa la base A del codó inicial ATG de la proteïna GUS. La seva seqüència és la següent:

5'-CCAGACTGAATGCCACAGG-3'

Els diferents encebadors sentit de les regions promotores dels gens *FPS1* i *FPS2* i les mides dels fragments generats en l'amplificació per PCR es mostren en la taula 5.

Taula 5. Encebadors sentit utilitzats per comprovar la integració dels transgens.

| Construcció | Encebador | Seqüència nucleotídica de l'encebador | Posició | Mida fragment |
|--------------------------------|-----------|--|---------------|---------------|
| (-1476/+73) <i>FPS1-GUS</i> | FPS5' | AAGCTTATAGTAGTTAATGTTGGG | -1476 a -1453 | 1632 pb |
| (-1328/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPSA | GTTCTCTTCGTCATAAAG | -1131 a -1113 | 1286 pb |
| (-533/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPSB | <u>CCAAGCTTC</u> GAGTTGTCCTTACCGACGC | -533 a -513 | 695 pb |
| (-260/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPSC | CTAGTGAGAATCTCCCCTACCAAATC | -250 a -225 | 405 pb |
| (-111/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPSD | <u>CGAAGCTTCT</u> GAGATAAGCAGGCCTTAGAC | -111 a -87 | 271 pb |
| (-61/+65) <i>FPS2-GUS</i> | FPSE | GCCCATTTAAAGAACGTCACG | -61 a -41 | 216 pb |

Taula 5. Seqüències dels encebadors sentit utilitzats en la PCR per comprovar la integració dels transgens al genoma de les plantes, i mida dels fragments generats en l'amplificació. Els nucleòtids dels encebadors que no corresponen a les seqüències genòmiques es mostren subratllats. En cursiva, s'indiquen les dianes de restricció.

14.6. Anàlisi de les plantes transgèniques.

L'anàlisi de les plantes transgèniques s'ha dut a terme mitjançant la localització histoquímica de l'activitat β -glucuronidasa, d'acord amb el mètode de Jefferson (1987). L'activitat GUS es posa de manifest quan actua sobre el substracte X-Gluc (5-brom-4-clor-3-indolil β -D-glucuronid), ja que el producte de reacció, 5-brom-4-clor-3-indol, dona lloc en oxidar-se a un compost cromogènic blau, 5-brom-4-cloríndig.

Per dur a terme l'anàlisi de les plantes transgèniques es van utilitzar plantes de la generació T₂. Les llavors de les plantes transgèniques de la generació T₁ van ser esterilitzades (apartat 1.1) i sembrades

en medi de germinació-kanamicina 50 µg/ml. Les plàntules assajades de diferents dies de vida van ser retirades de la placa de Petri en el moment de l'assaig. Quan la planta tenia aproximadament 20 dies de vida, era posada a créixer en terra. Els assajos d'òrgans de planta adulta s'han realitzat sempre a partir de plantes crecudes en terra, ja que el desenvolupament en condicions estèrils dificultava una floració adequada.

PROCEDIMENT

1. Preparar el tampó d'assaig GUS.
2. Rentar les mostres en tampó fosfats 50 mM pH 7.
3. Introduir les mostres en un tub del tamany adequat, i cobrir-les amb tampó d'assaig GUS.
4. Infiltrar les mostres mitjançant un buit suau (dessecador connectat a una bomba de buit d'aigua) durant 5-10 min.
5. Incubar a 37°C durant 8-24 hores.
6. Per facilitar la visualització del color blau, es recomana eliminar el color verd de la planta tractant les mostres amb etanol al 70%, fent tants rentats com sigui necessari. Les mostres es poden conservar durant mesos en etanol al 70%.

Tampó d'assaig GUS:

| | |
|-------------------|---------|
| Fosfat sòdic pH 7 | 100 mM |
| EDTA pH 8 | 10 mM |
| Tritó X-100 | 0,1% |
| β-mercaptoetanol | 0,5 mM |
| X-Gluc | 1 mg/ml |

Aquest tampó es prepara extemporàniament. Cal tenir en compte que X-Gluc s'ha de dissoldre prèviament en DMF (1 mg/10 µl) abans de ser afegit al tampó d'assaig.

FOTOGRAFIES

Les fotografies s'han obtingut amb una lupa binocular Olympus SZ-40. Quan la coloració blava de la mostra era intensa, s'ha utilitzat una pel·lícula per diapositives Kodak Ektachrome 64T, i s'ha utilitzat com a única il·luminació dues bombetes de tungstè de 100 wats. Quan la coloració de les mostres era feble, s'ha utilitzat una pel·lícula fotogràfica Kodak Ektachrome Gold 100 ASA, i s'ha il·luminat utilitzant un transil·luminador situat a sota la mostra, per contrastar més els teixits on no hi ha expressió GUS.

Per dur a terme les fotografies, les mostres han estat preparades sempre en medi líquid (etanol al 70%), per evitar que s'assequessin i deterioressin, muntades en un portaobjectes i cobertes amb un cobreobjectes.

RESULTATS

1. CLONATGE DELS GENS *FPS1* I *FPS2* D'*Arabidopsis thaliana*.

En el moment d'iniciar aquest treball, només havia estat descrit el clonatge d'un cDNA codificant per l'enzim farnesildifosfat sintasa (FPS) de plantes. Aquest cDNA, corresponent a la FPS d'*Arabidopsis thaliana*, havia estat clonat mitjançant complementació funcional d'una soca mutant de llevat deficient en activitat farnesildifosfat sintasa (Delourme *et al.*, 1994), utilitzant un banc d'expressió en llevat de cDNA d'*Arabidopsis* (Minet *et al.*, 1992).

Gràcies a la col.laboració establerta amb el Dr. Francis Karst de la Universitat de Poitiers (França), es va poder disposar del cDNA de la FPS d'*Arabidopsis*. A partir d'aquest cDNA es va preparar una sonda homòloga amb la qual poder iniciar el treball que es presenta a continuació, que està dedicat a la caracterització molecular de la farnesildifosfat sintasa d'*Arabidopsis thaliana*.

1.1. Determinació de la complexitat genòmica de la FPS d'*Arabidopsis thaliana*.

Per tal de determinar el número de gens que codifiquen FPS a *Arabidopsis*, es van dur a terme experiments de Southern blot, tant en condicions d'alta com de baixa

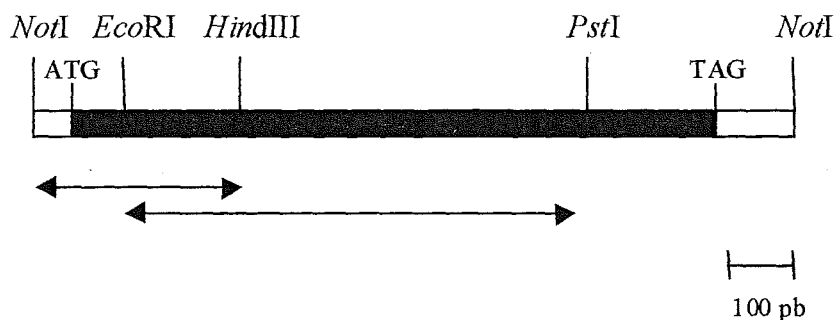


Figura 11. Mapa de restricció del cDNA de la FPS d'*Arabidopsis thaliana*. La regió codificant es representa amb una caixa negra. Les regions 5' i 3' transcrites no traduïdes es representen amb caixes blanques. Les dianes de restricció *NotI* provenen del vector utilitzat per construir el banc d'expressió de cDNA d'*Arabidopsis*. Els fragments utilitzats com a sonda s'indiquen amb línies de doble fletxa.

astringència, amb DNA genòmic d'*Arabidopsis* digerit amb diferents enzims de restricció, utilitzant com a sonda el fragment de 340 pb *NotI-HindIII* del plasmidi pDD71, que conté el cDNA de la FPS d'*Arabidopsis* (fig. 11). En condicions d'alta astringència (fig. 12.A), la sonda hibrida amb un únic fragment de DNA en els carrils corresponents a les digestions amb *BamHI*, *XbaI* i *EcoRV*, i amb dos fragments en el carril corresponent a la digestió amb *EcoRI*. Tenint en compte que la sonda utilitzada conté una diana de restricció *EcoRI*, aquest patró simple de bandes indica que la sonda reconeix específicament els fragments corresponents al gen que codifica la FPS clonada prèviament (Delourme *et al.*, 1994). Quan l'experiment es repeteix en condicions de baixa astringència, s'observa l'aparició d'un mínim de dues bandes addicionals en cada carril (fig. 12.C). Per tant, en aquestes condicions la sonda utilitzada reconeix fragments genòmics corresponents a un mínim de dos gens que codifiquen FPS.

1.2. Clonatge dels gens *FPS1* i *FP2* d'*Arabidopsis thaliana*.

Amb la finalitat de clonar gens d'*Arabidopsis* que codifiquen FPS, es va fer el crivellatge d'aproximadament 20.000 fags d'un banc genòmic d'*Arabidopsis thaliana*, en condicions de baixa astringència, utilitzant com a sonda el fragment de 730 pb

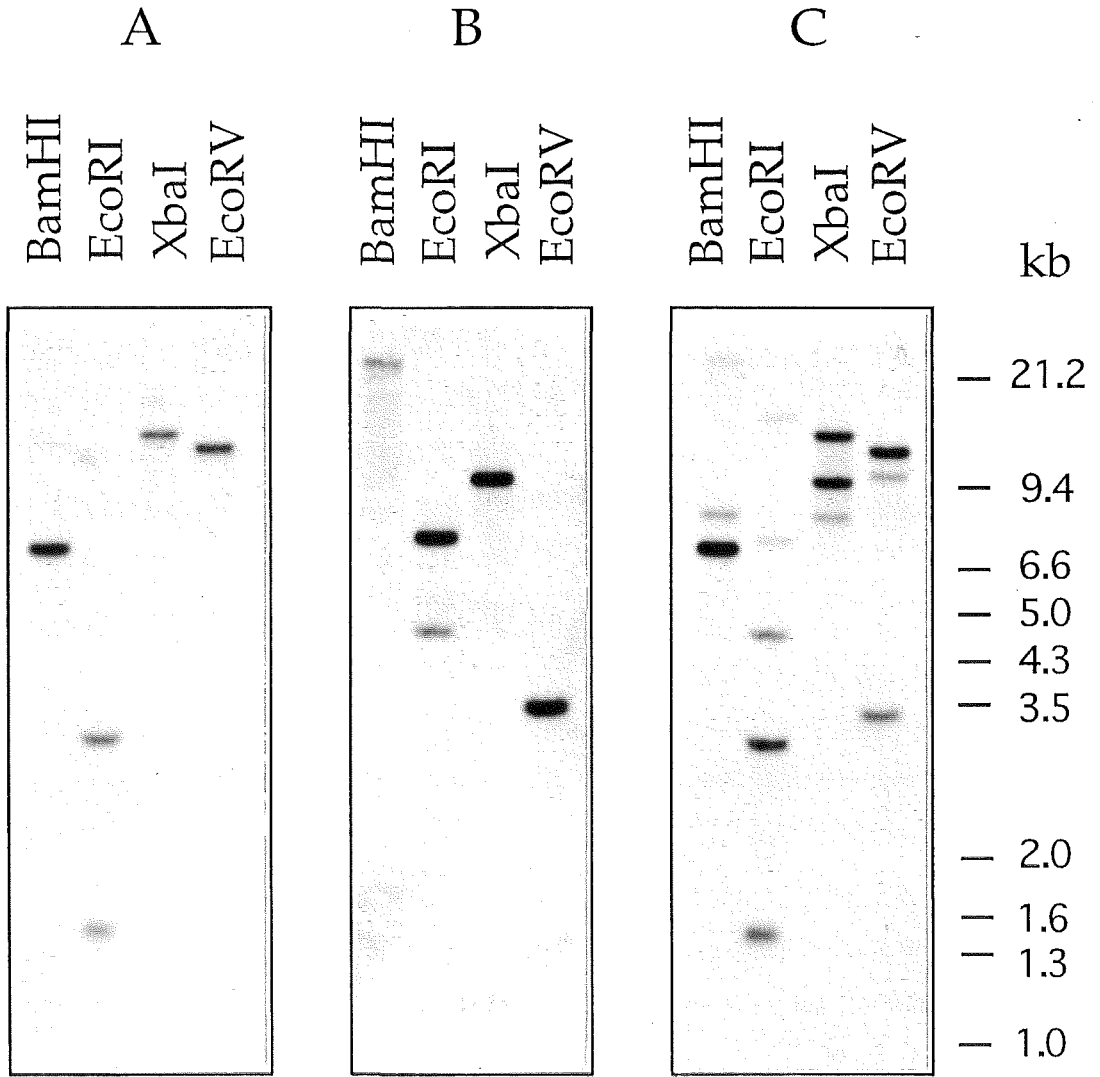


Figura 12. Anàlisi mitjançant experiments de Southern blot de la complexitat genòmica de la FPS d'*Arabidopsis*. DNA genòmic d'*Arabidopsis* (8µg) va ser digerit amb els enzims de restricció indicats a la part superior de la figura, sotmès a electroforesi i transferit a membranes de nitrocel.lulosa. Els filtres van ser hibridats amb el fragment de 340 pb *NotI-HindIII* del cDNA de la FPS d'*Arabidopsis* (Delourme *et al.*, 1994) en condicions d'alta (panell A) o baixa (panell C) astringència, o bé amb el fragment de 800 pb *XhoI-HindIII* del gen *FPS2*, en condicions d'alta astringència (panell B). Els números de la dreta indiquen la posició dels marcadors de mida de DNA.

EcoRI-PstI del cDNA de la FPS d'*Arabidopsis* (fig. 11). El resultat, després de tres passos de purificació, va ser l'aïllament de vuit clons genòmics que hibridaven amb la sonda. Per tal de comprovar si els clons aïllats contenien regions genòmiques diferents, es va obtenir DNA i es va digerir amb diferents enzims de restricció. L'anàlisi dels patrons de restricció (resultat no mostrat) va permetre classificar els clons genòmics en dos grups diferents. Un dels grups estava integrat pels clons λ gNC4, λ gNC12, λ gNC17 i λ gNC24, i l'altre, pels clons λ gNC1, λ gNC2, λ gNC10 i λ gNC14.

Per tal d'averiguar quins fragments de DNA detectats en els experiments de Southern genòmic estaven continguts en cada grup de clons i, a la vegada, definir els fragments més apropiats per ser subclonats i caracteritzats, el DNA de les digestions anteriors va ser analitzat per Southern blot en condicions d'alta o de baixa astringència, utilitzant la mateixa sonda emprada en els experiments de Southern blot genòmic (fragment de 340 pb *NotI-HindIII* del plasmidi pDD71). En la figura 13 es mostren els resultats obtinguts quan l'experiment es va dur a terme amb DNA dels clons genòmics digerit amb *EcoRI*. En condicions d'alta astringència, la sonda només hibrida amb fragments provinents dels clons del primer grup (λ gNC4, λ gNC12, λ gNC17 i λ gNC24). En concret, s'observen dues bandes per cada clon; una d'elles, que correspon a un fragment d'una mida aproximada de 1.300 pb, es detecta en els quatre clons, mentre que l'altra, corresponent a un fragment d'aproximadament 3.000 pb, només s'observa en els clons λ gNC4, λ gNC12 i λ gNC24, ja que en el clon λ gNC17 aquest fragment està truncat i té una mida de 1.600 pb. Els fragments de 1.300 i 3.000 pb coincideixen amb els fragments *EcoRI* detectats en el Southern genòmic realitzat en condicions d'alta astringència (fig. 12.A). Per tant, es va concloure que els quatre clons contenien la regió genòmica corresponent al cDNA de la FPS aïllat per Delourme *et al.* (1994). Quan l'experiment es va repetir en condicions de baixa astringència, a més dels fragments derivats dels clons del primer grup, la sonda també reconeix fragments de DNA dels clons pertanyents al segon grup, λ gNC1, λ gNC2, λ gNC10 i λ gNC14. En concret, en les digestions dels clons λ gNC1, λ gNC2, λ gNC10 i λ gNC14 amb *EcoRI* (fig. 13), es detecta una banda d'aproximadament 5.000 pb, que coincideix amb una de les bandes detectades en l'experiment de Southern blot genòmic fet en condicions de baixa

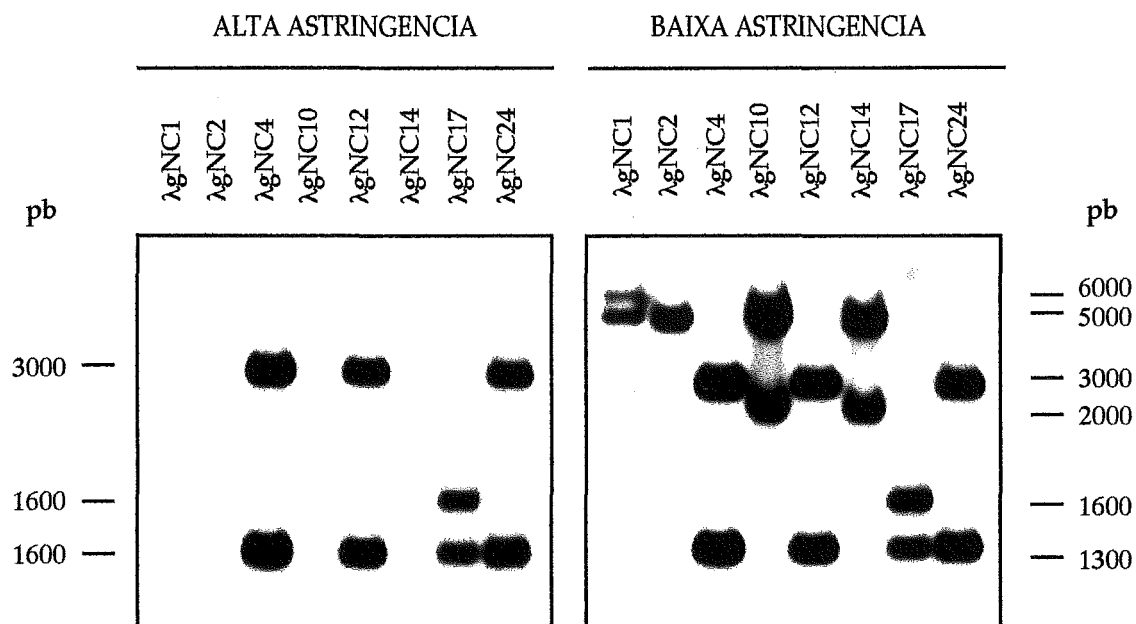


Figura 13. Anàlisi dels clons genòmics mitjançant Southern blot. DNA dels vuit clons genòmics indicats a la part superior de la figura va ser digerit amb *EcoRI*, sotmès a electroforesi i transferit a membranes de nitrocel.lulosa. Els filtres van ser hibridats en condicions d'alta o de baixa astringència amb la sonda de 340 pb *NotI-HindIII* del cDNA de la FPS d'*Arabidopsis* (Delourme *et al.*, 1994). Les mides dels fragments de DNA detectats per la sonda s'indiquen a esquerra i dreta dels panells.

astringència (fig. 12.C), i una segona banda que només es detecta en tres dels quatre clons. Aquesta banda, que correspon a un fragment de 6.000 pb en el cas del clon λgNC1, i de 2800 pb en el cas dels clons λgNC10 i λgNC14, no té equivalència amb cap de les bandes detectades en el Southern genòmic (fig. 12.C), la qual cosa suggereix que correspon a fragments *EcoRI* truncats. Aquests resultats indiquen que els clons del segon grup contenen la regió genòmica corresponent a un segon gen FPS d'*Arabidopsis*.

A fi de determinar quin dels dos fragments detectats en cada família de clons s'extenia cap a 3' de la diana *EcoRI* continguda en la sonda utilitzada, es van realitzar altres dos experiments de Southern blot en condicions d'alta i de baixa astringència (resultats no mostrats) amb DNA dels clons digerits amb *EcoRI*, però aquesta vegada utilitzant com a sonda el fragment de 730 pb *EcoRI-PstI* del cDNA FPS1 (fig. 11). Per

completar l'anàlisi, també es van analitzar per Southern blot digestions amb *Hind*III del DNA dels mateixos clons, utilitzant les dues sondes mencionades anteriorment. Aquests experiments van permetre identificar fragments *Hind*III solapants amb els fragments *Eco*RI que, a més, tenien una mida adequada per ser subclonats.

Es van seleccionar els clons λ gNC10 i λ gNC24 com a representants de cada un dels dos grups i de cada clon es van subclonar en el vector pBluescript dos fragments de DNA genòmic que hibridaven amb la sonda de cDNA 340 pb *Not*I-*Hind*III. Per λ gNC10, es subclonaren en pBluescript el fragment *Eco*RI de 5.000 pb i un fragment *Hind*III de 1.700 pb, obtenint-se els plasmidis anomenats pgNC102 i pgNC101, respectivament (fig. 14). Del clon λ gNC24, es subclonaren en pBluescript el fragment *Eco*RI de 3.000 pb i un fragment *Hind*III de 2.000 pb, obtenint-se els plasmidis pgNC242 i pgNC241, respectivament (fig. 14).

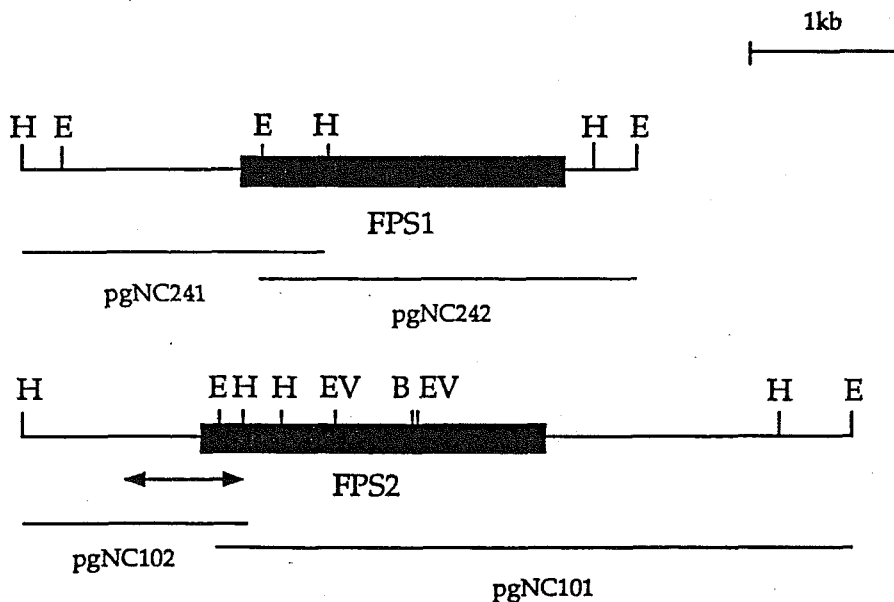


Figura 14. Representació esquemàtica i mapa de restricció de les regions genòmiques que contenen els gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*. Les unitats transcripcionals dels gens *FPS1* i *FPS2* es representen amb caixes negres. Els fragments genòmics clonats en el plasmidi pBluescript s'indiquen amb una línia. La sonda de 800 pb *Xho*I-*Hind*III del gen *FPS2* utilitzada en el Southern blot genòmic mostrat al panell B de la figura 12 es representa amb una línia de doble fletxa. Les dianes de restricció mostrades són les següents: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; ÈV, *Eco*RV; H, *Hind*III.

Es varen seqüenciar els fragments clonats dels plasmidis pgNC241 i pgNC242. L'anàlisi de la seqüència va confirmar que els fragments es solapaven parcialment i que la regió genòmica contenia la seqüència completa del cDNA de la FPS clonat per complementació funcional de la soca mutant de llevat deficient en activitat FPS (Delourme *et al.*, 1994). Per tant, a partir d'aquest moment, el gen contingut en aquesta regió de DNA va ser anomenat gen *FPS1*, i el corresponent cDNA, cDNA *FPS1*. Els fragments clonats dels plasmidis pgNC101 i pgNC102 també van ser seqüenciats. Es va veure que també eren fragments parcialment solapants i que la seva seqüència era diferent, encara que molt semblant, a la seqüència del gen *FPS1*. En conseqüència, el gen contingut en els plasmidis pgNC101 i pgNC102 va ser anomenat gen *FPS2*. Les seqüències dels gens *FPS1* i *FPS2* han estat dipositades en el banc de dades *GenBank™/EMBL Data Bank*, amb el números d'accés L46367 i L46350, respectivament. Recentment, el projecte de seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis* ha permès localitzar el gen *FPS1* en el cromosoma 5 i el gen *FPS2* en el cromosoma 4.

El següent objectiu en l'anàlisi de la complexitat genòmica de la FPS d'*Arabidopsis thaliana* era comprovar si totes les bandes detectades en el Southern genòmic realitzat en condicions de baixa astringència (fig. 12.C) corresponien a fragments derivats dels gens *FPS1* i *FPS2*. Amb tal finalitat, es va dur a terme un altre Southern blot genòmic en condicions d'alta astringència, utilitzant com a sonda el fragment de 800 pb *XhoI-HindIII* del gen *FPS2* (fig. 14). En aquestes condicions, la sonda detecta una única banda en els carrils corresponents a les digestions amb *BamHI*, *XbaI* i *EcoRV*, i dues bandes en el carril corresponent a la digestió amb *EcoRI* (fig. 12.B). Tenint en compte que la sonda utilitzada conté una diana de restricció *EcoRI*, el patró de bandes que s'obté indica que els fragments detectats corresponen únicament al gen *FPS2*. Tot i que aquestes bandes coincideixen amb algunes de les bandes detectades prèviament en condicions de baixa astringència per la sonda del cDNA *FPS1* (fig. 12.C), la superposició dels patrons de bandes obtinguts en condicions d'alta astringència amb les sondes dels gens *FPS1* i *FPS2* (fig. 12.A i B, respectivament) no reproduïx totalment el patró de bandes obtingut amb la sonda del cDNA *FPS1* en condicions de baixa astringència (fig. 12. C), en el que encara s'observa una banda addicional feble en

cada carril. Aquesta observació indica que en el genoma d'*Arabidopsis* existeix una tercera seqüència genòmica relacionada amb els gens *FPS1* i *FPS2*.

Així doncs, tot aquest conjunt de resultats indica que *Arabidopsis thaliana* conté una petita família gènica composta per dos gens que codifiquen FPS, els gens *FPS1* i *FPS2*, i una tercera seqüència genòmica, que podria correspondre o bé a una tercera isoforma de FPS o bé a una preniltransferasa molt relacionada.

1.3. Anàlisi estructural dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis thaliana*.

L'aliniament de la seqüència del gen *FPS1* amb la seqüència del cDNA FPS1 ha permès determinar l'estructura d'aquest gen, que consta de 12 exons separats per 11 introns (fig. 15). La comparació de les dues seqüències també ha posat de manifest diversos canvis d'una base. Dos d'aquests canvis fan que els aminoàcids Ser-177 (TCC) i Thr-283 (ACC) de la proteïna predita a partir del cDNA FPS1 (Delourme *et al.*, 1994) es converteixin en Ala (GCC) i Pro (CCC), respectivament, en la proteïna codificada pel gen *FPS1*. Aquests canvis poden ser deguts a polimorfismes associats als diferents ecotips d'*Arabidopsis* utilitzats, *Landsberg* en el cas del cDNA FPS1 i *Columbia* en el cas del gen *FPS1*.

L'estructura del gen *FPS2* va ser deduïda inicialment per comparació de la seva seqüència amb la del gen *FPS1*, i posteriorment confirmada per aliniament amb la seqüència del seu corresponent cDNA (veure apartat 3 de Resultats). Com es mostra en la figura 15, el gen *FPS2* consta d'11 exons separats per 10 introns.

La comparació de l'estructura dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* posa de manifest que ambdós gens tenen una organització molt similar, encara que no idèntica. La diferència més evident es troba en l'exó 4 del gen *FPS2*, que correspon als exons 4 i 5 dels gen *FPS1*. Els exons restants tenen la mateixa mida, excepte el primer i l'últim de cada gen, on la diferència ve determinada per la mida de les regions 5' i 3' transcrites no

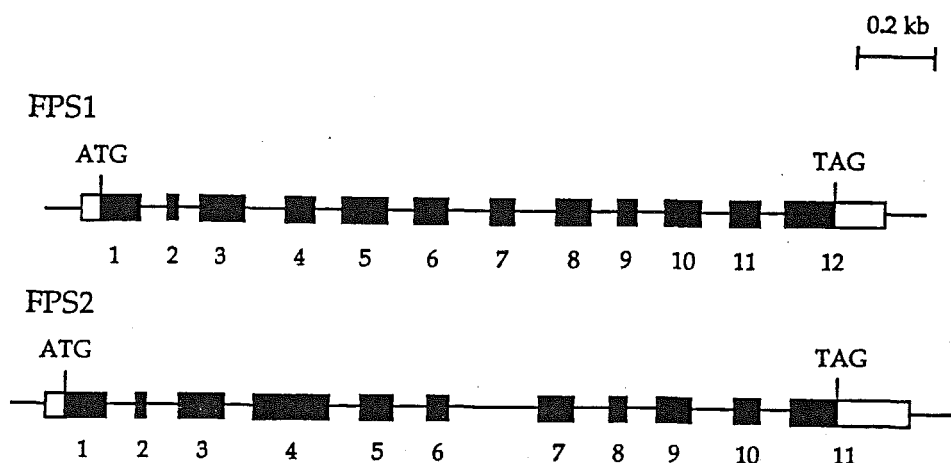


Figura 15. Estructura dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*. Els exons es representen amb caixes, i estan numerats des de l'extrem 5' dels gens. Les regions codificants estan representades amb caixes negres. Les línies entre les caixes representen els introns.

traduïdes (veure més endavant), i pel fet que el primer exó del gen *FPS2* codifica un aminoàcid menys que l'exó equivalent del gen *FPS1* (taula 6). En tots dos gens els introns estan localitzats en les mateixes posicions relatives de les seqüències codificants, lògicament amb l'excepció de l'intró que separa els exons 4 i 5 del gen *FPS1*, que no té equivalent en el gen *FPS2* (fig. 15). Per altra banda, tots els introns comencen i acaben amb els dinucleòtids GT i AG, respectivament.

A més de la conservació estructural dels gens *FPS1* i *FPS2*, l'aliniament de les seves seqüències revela que ambdós gens presenten un elevat grau d'identitat, no només en la regió codificant, on hi ha una identitat global del 87%, sinó també en les regions intròniques, on els valors d'identitat entre els diferents introns oscil·len entre el 57% i el 79% (taula 6). L'elevada conservació de l'estructura i de la seqüència dels gens *FPS1* i *FPS2*, fins i tot en les regions no codificants, suggereix que ambdós gens s'han originat per una duplicació recent d'un gen ancestral comú de FPS.

RESULTATS

| EXÓ | <i>FPS1</i> | 1* | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12* |
|-----------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|----|-----|
| | <i>FPS2</i> | 1* | 2 | 3 | 4 | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11* |
| <i>FPS1</i> mida (pb) | | 114 | 25 | 116 | 87 | 117 | 89 | 52 | 96 | 45 | 90 | 72 | 129 |
| <i>FPS2</i> mida (pb) | | 111 | 25 | 116 | 204 | | 89 | 52 | 96 | 45 | 90 | 72 | 129 |
| identitat nucleòtids (%) | | 85 | 92 | 84 | 88 | | 88 | 88 | 86 | 93 | 90 | 89 | 84 |
| identitat aminoàcids (%) | | 79 | 100 | 87 | 93 | | 87 | 88 | 94 | 100 | 100 | 87 | 86 |

(*) Les regions 5' i 3' transcrites no traduïdes no han estat considerades en aquest estudi comparatiu, ja que tal i com es veurà més endavant (apartat 4 de Resultats), d'una banda l'expressió del gen *FPS1* genera simultàniament dos mRNAs que codifiquen dues isoformes FPS que difereixen en el seu extrem aminoterminal, i d'altra banda, en la regió 3' del gen *FPS1* existeixen diferents llocs de poliadenilació.

| INTRÓ | <i>FPS1</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-----------------------------|-------------|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | <i>FPS2</i> | 1 | 2 | 3 | - | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <i>FPS1</i> mida (pb) | | 73 | 93 | 106 | 63 | 82 | 106 | 120 | 76 | 83 | 78 | 86 |
| <i>FPS2</i> mida (pb) | | 85 | 79 | 70 | - | 81 | 95 | 234 | 99 | 90 | 116 | 146 |
| identitat nucleòtids (%) | | 67 | 57 | 71 | - | 58 | 58 | 78 | 70 | 59 | 73 | 79 |

Taula 6. Comparació de les mides i percentatge d'identitat a nivell de nucleòtids i d'aminoàcids entre els exons i els introns equivalents dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*.

2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS *FPS1* I *FPS2* PER NORTHERN BLOT.

Tal i com s'ha demostrat en l'apartat anterior, *Arabidopsis thaliana* conté, com a mínim, dos gens que codifiquen FPS, els gens *FPS1* i *FPS2*. Estava demostrat que el gen *FPS1* és funcional, ja que el seu corresponent cDNA havia estat clonat mitjançant complementació funcional d'una soca mutant de llevat deficient en activitat FPS amb un banc d'expressió de cDNA d'*Arabidopsis* (Delourme *et al.*, 1994). En canvi, encara no es disposava de cap evidència que el gen *FPS2* fos funcional, és a dir, que s'expressés, i que la proteïna codificada tingués activitat FPS.

Per tal de comprovar si el gen *FPS2* s'expressava i, a la vegada, obtenir una primera aproximació del patró d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2*, es van realitzar experiments de Northern blot amb RNA total de diferents òrgans d'*Arabidopsis* (arrels, tiges, fulles i flors) i de plàntules crescudes durant deu dies en condicions de llum o de foscor. Donat l'elevat grau d'identitat que presenten els dos gens en les regions codificants, per aconseguir detectar de forma específica cada missatger, va ser necessari utilitzar sondes derivades de la regió 3' transcrita no traduïda dels gens *FPS1* i *FPS2* (fig. 16.B).

Els resultats dels experiments de Northern blot (fig 16.A) indiquen, en primer lloc, que els dos gens s'expressen en tots els teixits analitzats, ja que en totes les mostres cada sonda detecta un missatger d'aproximadament 1,3 kb, de mida suficient per codificar les isoformes FPS1 (Delourme *et al.*, 1994) i FPS2 (deduïda per comparació de les seqüències dels gens *FPS1* i *FPS2*). En segon lloc, els resultats de l'anàlisi de Northern blot mostren que els dos gens presenten un patró d'expressió diferent. Mentre que l'mRNA del gen *FPS1* s'acumula principalment en arrels i flors, l'mRNA del gen *FPS2* s'acumula majoritàriament en flors. A més, en tots els casos, el nivell d'expressió del gen *FPS2* és inferior al del gen *FPS1*, ja que per obtenir les imatges presentades ha estat necessari exposar els filtres durant 9 dies en el cas del gen *FPS1*, i durant 21 dies en el cas del gen *FPS2*. Finalment, no s'observa cap efecte de la llum sobre l'expressió

dels gens *FPS1* i *FPS2*, ja que els nivells dels mRNAs *FPS1* i *FPS2* en plàntules d'*Arabidopsis* crescudes en condicions de llum o de foscor pràcticament no varien.

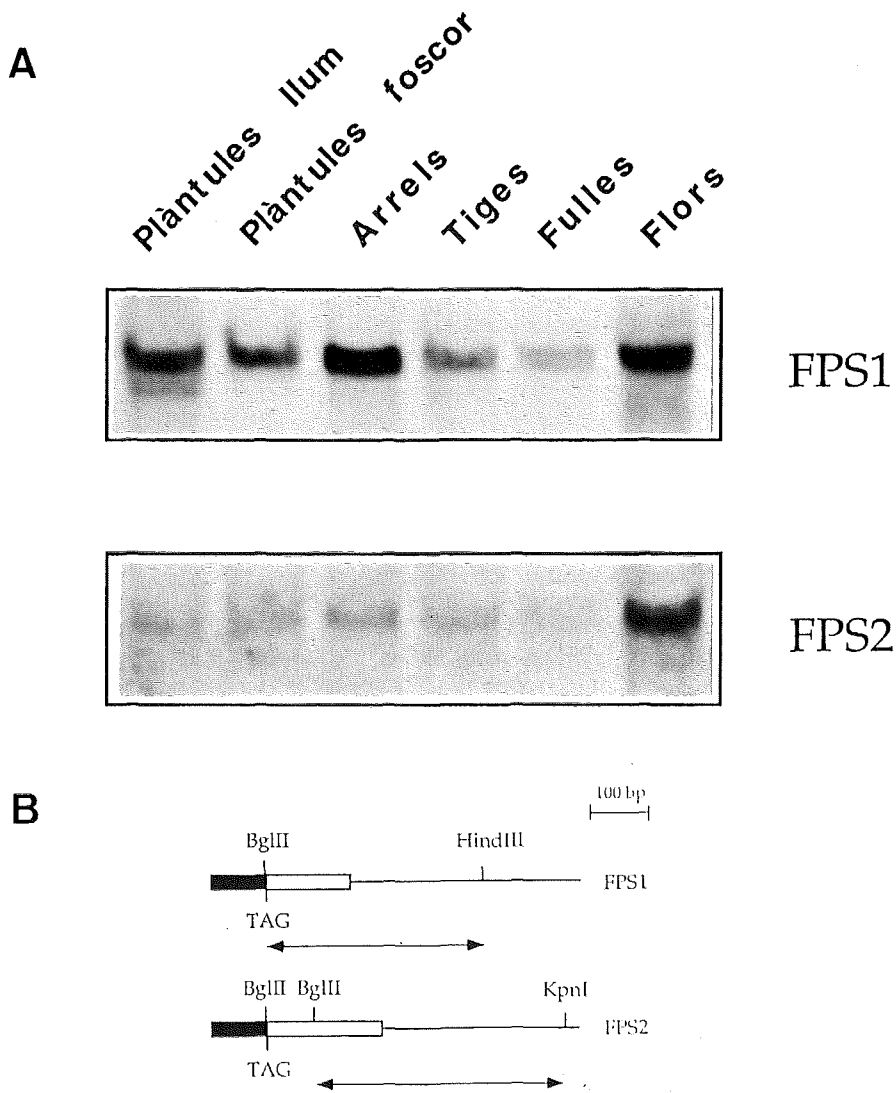


Figura 16. Anàlisi del patró d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* mitjançant Northern blot. A) RNA total de diferents teixits d'*Arabidopsis* (30 µg/carril) va ser sotmès a electroforesi en gels a l'1% d'agarosa amb formaldehíd, i transferit a membranes de nitrocel.lulosa. Els filtres van ser hibridats amb les sondes específiques pels gens *FPS1* i *FPS2* mostrades a l'apartat B de la figura. El temps d'exposició va ser de 9 dies en el cas del filtre hibridat amb la sonda *FPS1* i 21 dies en el cas del filtre hibridat amb la sonda *FPS2*. **B)** Esquema de la regió 3' dels gens *FPS1* i *FPS2*. L'últim exó de cada gen està representat amb una caixa. Les regions 3' transcrites no traduïdes estan representades amb caixes blanques. Les línies corresponen a les regions flanquejants de l'extrem 3' dels gens. Les sondes específiques pel gen *FPS1* (fragment de 370 pb *BglII-HindII*) i pel gen *FPS2* (fragment de 450 pb *BglII-KpnI*) estan representades amb línies de doble flexa.

3. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN cDNA D'*Arabidopsis thaliana* QUE CODIFICA L'ISOENZIM FPS2.

Els resultats obtinguts en els experiments de Northern blot mostren que el gen *FPS2* d'*Arabidopsis* s'expressa i dona lloc a un RNA missatger que té una mida suficient per codificar un isoenzim FPS. Malgrat això, per tal d'obtenir evidències de la funcionalitat del gen *FPS2*, era necessari confirmar que el missatger generat codifica una forma activa de l'enzim. Amb tal finalitat, es va procedir a clonar un cDNA d'*Arabidopsis* amb capacitat per codificar l'isoenzim FPS2 sencer. Disposar d'aquest cDNA permetria, per una banda, confirmar l'organització proposada pel gen *FPS2* (apartat 1.3 de Resultats) i en conseqüència, l'estructura primària de l'isoenzim FPS2, i per altra banda, permetria dur a terme estudis funcionals per demostrar l'activitat farnesildifosfat sintasa de l'isoenzim FPS2.

3.1. Clonatge d'un cDNA que codifica l'isoenzim FPS2 d'*Arabidopsis*.

Per obtenir un cDNA corresponent al gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, es va utilitzar una estratègia de clonatge basada en la tècnica de *RACE* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (Frohman *et al.*, 1988). Aquesta estratègia resulta particularment útil quan es tracta de clonar cDNAs corresponents a gens que tenen un nivell baix d'expressió. En el cas concret del cDNA FPS2, el material de partida va ser la fracció poli(A)⁺ obtinguda a partir d'RNA total de flors d'*Arabidopsis*, ja que és en aquest teixit on s'acumula majoritàriament l'mRNA del gen *FPS2*. La fracció poli(A)⁺ es va utilitzar com a motlle per a la síntesi d'un banc de cDNA de cadena senzilla, a partir del qual es va procedir a amplificar el cDNA FPS2 per PCR (per més detalls, veure apartat 6.2 de Materials i Mètodes).

Mitjançant aquest mètode, es va amplificar un fragment de DNA d'aproximadament 1,3 kb, que va ser clonat i seqüenciat. El cDNA amplificat (fig. 17)

RESULTATS

| | | | |
|------|-----|--|------|
| | | AATCAGGTCCACATTTGGCTTTGCACACCTTCCTTGATCCTA | -4 |
| FPS2 | 1 | TCAATGGCGGATCTGAAATCAACCTTCCTCGACGTTACTCTGTTCTCAAGTCTGATCTG | 57 |
| FPS1 | 1 | M A D L K S T F L D V Y S V L K S D L | |
| | | M E T N | |
| | | CTTCAAGATCCTTCCTTTGAATTCACCCACGAATCTCGTCAATGGCTTGAACGGATGCTT | 117 |
| | 20 | L Q D P S F E F T H E S R Q W L E R M L | |
| | 21 | . H N L . V D . Δ . . | |
| | | GACTACAATGTACGGGAGGGAAGCTAAATCGTGGTCTCTCTGTGTTGATAGCTACAAG | 177 |
| | 40 | D Y N V R G G K L N R G L S V V D S Y K | |
| | 41 | G G K R F . | |
| | | G G K R | |
| | | Δ I | |
| | 60 | CTGTTGAAGCAAGTCAAGACTTGACGGAGAAGAGACTTCCCTCATGTGCTCTTGGT | 237 |
| | 61 | L L K Q G Q D L T E K E T F L S C A L G | |
| | | N Q . V | |
| | | TGGTGCATGAAATGGCTTCAAGCTTATTTCCCTTGTGCTTGATGACATCATGGACAACCTCT | 297 |
| | 80 | W C I E W L Q A Y F E V L D D I M D N S | |
| | 81 | E L D D D | |
| | | E L D D D | |
| | | Δ II | |
| | 100 | GTCACACGCCGTGGCCAGCTTGTGGTTAGAAAGCCAAAGTGGTATGATTGCCATT | 357 |
| | 101 | V T R R G Q P C W F R K P K V G M I A I | |
| | | V . Q V | |
| | | R R G Δ A | |
| | 120 | AACGATGGGATCTACTTCGCAATCATATCCACAGGATCTCAAAAAGCACTTCAGGGAA | 417 |
| | 121 | N D G I L L R N H I H R I L K K H F R E | |
| | | D D | |
| | | D L | |
| | | III | |
| | 140 | ATGCCCTACTATGTTGACCTCGTTGATTTGTTAACGAGGTAGAGTTTCAAACAGCTTGC | 477 |
| | 141 | M P Y Y V D L V D L F N E V E F Q T A C | |
| | | K Δ L | |
| | | GGCCAGATGATTGATTTGATCACCACCTTTGATGGAGAAAAGATTTGTCTAAGTACTCC | 537 |
| | 160 | G Q M I D L I T T F D G E K D L S K Y S | |
| | 161 | E A | |
| | | G Q D L | |
| | | IV | |
| | 180 | TTGCAAAATCCATCGGCGTATTGTTGAGTACAAAACAGCTTATTACTCATTTTATCTTCTC | 597 |
| | 181 | L Q I H R R I V E Y K T A Y Y S F Y L P | |
| | | . S Q H Δ Δ | |
| | | Δ K T A | |
| | | V | |
| | 200 | GTTGCTTCGCGATTGCTCATGGCGGAGAAAATTTGGAAAACCATACTGATGTGAAGACT | 657 |
| | 201 | V A C A L L M A G E N L E N H T D V K T | |
| | | I N | |
| | | GTTCTTGTGACACGGGAATTTACTTCAAGTACAGGATGATTTATCTGGACTGTTTTGCT | 717 |
| | 220 | V L V D M G I Y F Q V Q D D Y L D C F A | |
| | 221 | G F Q D D D | |
| | | G F Q D D D | |
| | | VI | |
| | 240 | GATCCTGAGACACTTGGCAAGATAGGGACAGACATAGAAGATTTCAAATGCTCCTGGTGTG | 777 |
| | 241 | D P E T L G K I G T D I E D F K C S W L | |
| | | G D K . S | |
| | | G K D K S | |
| | | Δ | |
| | 260 | GTAGTTAAGGCATTGGAACGCTGCAGTGAAGAACAATAAGATATACGAGAAGTAT | 837 |
| | 261 | V V K A L E R C S E E Q T K I L Y E N Y | |
| | | Δ | |
| | | GGTAAAGCCGAACCATCAAACGTTGCTAAGGTGAAAGCTCTCTACAAGAGCTTGTATCTC | 897 |
| | 280 | G K A E P S N V A K V K A L Y K E L D L | |
| | 281 | . . P D D | |
| | | Δ | |
| | 300 | GAGGGAGCGTTTCAATGGAATATGAGAAGGAAAGCTATGAGAAGCTGACAAAGTGTATCGAA | 957 |
| | 301 | E G A F M E Y E K E S Y E K L T K L I E | |
| | | . Δ . V S K G A | |
| | | GCTCACCAGAGTAAAGCAATTCAGCAGTGTCTAAAATCTTCTTGGCTAAGATCTACAAG | 1017 |
| | 320 | A H Q S K A I Q A V L K S F L A K I Y K | |
| | 321 | G | |
| | | AGGCAGAAGTAGAGACATACTCGGGCCTCTCCGTTTTATTCTTCTGACATTTATGATAT | 1077 |
| | 340 | R Q K * | |
| | 341 | * | |
| | | VII | |
| | | TGGTGCATGACTTCTTTTGCCTTAGATCTTAIGTCCCTCCGAAAATAGAATTTGAGAT | 1137 |
| | | TCCTGTCATGCTTATAGTATAGAGACTTAGAAAATGCTATGTTTCTTTAATTTCTG | 1197 |
| | | ATAAAAATGTGCAATCAGTGT(A) ₃₉ | 1259 |

conté una seqüència de 1.300 nucleòtids, dels quals 1.261 són idèntics a la seqüència dels exons predits del gen *FPS2*. Els 39 nucleòtids restants corresponen a la cua poli(A)⁺. La seqüència del cDNA clonat conté un marc de lectura obert de 1.029 nucleòtids, que codifica una proteïna de 342 residus aminoacídics, amb una massa molecular teòrica de 39.825 Da. El cDNA també conté una regió 5' transcrita no traduïda de 41 pb i una regió 3' transcrita no traduïda de 191 pb, on es troba un motiu consens de poliadenilació (AATAAA) situat a 18 pb cap a 5' de l'inici de la cua poli(A)⁺. S'assumeix que el triplet ATG més pròxim a l'extrem 5' s'utilitza com a codó d'inici de traducció, d'acord amb la regla que el primer AUG serveix d'inici de traducció en aproximadament el 95% dels mRNAs eucariotes (Kozac, 1984). Aquesta assumpció està recolzada pel fet que les seqüències de nucleòtids que flanquegen el triplet proposat com a inici de traducció (ATCAATGGC) coincideixen amb el consens descrit en plantes com a inici de traducció (ACAATGGC) (Lütcke *et al.*, 1987), amb l'excepció de la T situada en posició -3 respecte el codó ATG. Aquest punt es va confirmar mitjançant la transcripció-traducció *in vitro* del cDNA *FPS2* en extractes de germen de blat (TNT™ Coupled Wheat Germ Extract Systems, Promega). El resultat (fig. 18) va ser la síntesi d'un únic polipèptid que migra amb una massa molecular aparent de 41 kDa en un gel d'acrilamida-SDS. La massa molecular aparent d'aquesta proteïna està d'acord amb la massa molecular teòrica (39.825 Da) predita per l'isoenzim *FPS2*.

Figura 17. Seqüència nucleotídica del cDNA *FPS2* d'*Arabidopsis*, i aliniament de les seqüències aminoacídiques dels isoenzims *FPS1* i *FPS2*. La numeració dels nucleòtids (a la dreta), s'ha fet assignant la posició +1 a la primera base del codó ATG. La seqüència de l'extrem 5' del cDNA *FPS2* determinada mitjançant la tècnica de *RACE* s'indica en cursiva. El triangle negre sobre la seqüència indica el lloc alternatiu d'inici de transcripció del gen *FPS2*. El senyal de poliadenilació es mostra subratllat amb una doble línia. Els codons d'aturada es marquen amb un asterisc. Les posicions dels residus aminoacídics estan indicades a l'esquerra. Els residus idèntics s'indiquen amb punts. Les set regions (I a VII) conservades en les *E*-preniltransferases (Quondam *et al.*, 1997) estan ombrejades, i els residus aminoacídics presents en totes les preniltransferases s'indiquen a sota. Les posicions dels introns s'indiquen amb triangles.

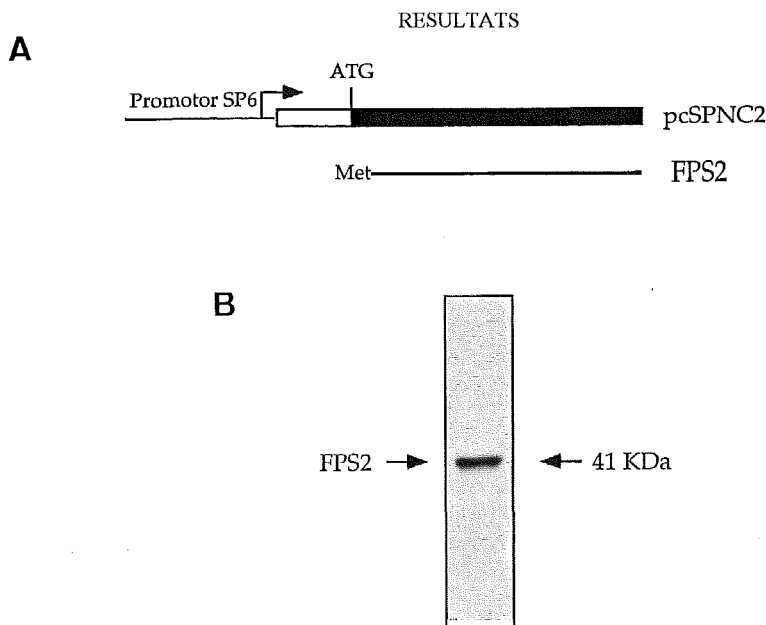


Figura 18. Transcripció i traducció *in vitro* del cDNA FPS2. (A) Representació esquemàtica de la construcció que conté el cDNA FPS2 utilitzada en l'experiment de transcripció-traducció *in vitro*. La regió 5' del cDNA es representa amb una caixa, blanca a la regió transcrita no traduïda, i negra a la regió codificant. La fletxa indica l'inici de transcripció del promotor de la RNA polimerasa SP6. (B) Anàlisi del producte de transcripció-traducció *in vitro* del cDNA FPS2 utilitzant la RNA polimerasa SP6 i un extracte de germen de blat (TNT™ Coupled Wheat Germ Extract Systems, Promega), amb [³⁵S]-metionina com a precursor radioactiu. Les fletxes indiquen la posició i la massa molecular aparent de la proteïna FPS2 sintetitzada *in vitro*.

3.2. Determinació de l'inici de transcripció del gen *FPS2*.

L'inici de transcripció del gen *FPS2* va ser determinat mitjançant una variant de la tècnica de *RACE* (Frohman *et al.*, 1988). L'estratègia emprada es descriu amb detall a l'apartat 6.3 de Materials i Mètodes. Com a resultat de l'etapa final d'amplificació per PCR, es van obtenir dos fragments de DNA d'aproximadament 400 pb. El DNA amplificat va ser digerit amb *EcoRI*, purificat en un gel d'agarosa i clonat en el plasmidi pUC19. Per identificar els clons que contenien fragments corresponents a l'extrem 5' del cDNA FPS2, les colònies bacterianes van ser transferides a membranes de nitrocel.lulosa, i hibridades amb la sonda de 800 pb *XhoI-EcoRI* del gen *FPS2* (fig. 14). Es va obtenir el DNA plasmídic de setze de les colònies identificades per la sonda, i es van seqüenciar els fragments clonats. L'anàlisi de les seqüències va posar de manifest que la meitat dels clons contenia un fragment de 101 pb i l'altra meitat contenia un

fragment de 127 pb. Tot i que en els dos casos les seqüències clonades coincidien amb la seqüència de la regió corresponent del gen *FPS2*, els fragments diferien en el seu extrem 5'. L'extrem 5' del fragment més llarg s'extenia 5 nt més enllà de l'extrem 5' del cDNA clonat, mentre que l'extrem 5' del fragment més curt estava localitzat 21 nt cap a 3' de l'extrem 5' del cDNA clonat (veure fig. 17). Aquests resultats indiquen que l'expressió del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* dona lloc simultàniament a dues poblacions de missatgers que es produeixen en igual proporció, i que es diferencien en la mida de la seva regió 5' transcrita no traduïda, que pot ser de 21 o de 46 nt. S'ha assignat la posició +1 del gen *FPS2* a l'inici de transcripció de l'mRNA més llarg, referit com TS1; l'inici de transcripció de l'mRNA més curt serà referit com TS2, posició +27. D'acord amb aquests resultats, en la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* s'han identificat dues possibles seqüències TATA (TATAAA i TTAAA) situades a una distància adequada dels inicis de transcripció per ser funcionals (fig. 38).

3.3. Anàlisi comparativa dels isoenzims FPS1 i FPS2.

Els isoenzims FPS1 i FPS2 d'*Arabidopsis* estan compostats per 343 i 342 residus aminoacídics, respectivament. Aquesta és la mida que tenen la majoria de les FPS de plantes caracteritzades fins al moment, que oscil·la entre 341 i 343 aminoàcids. L'única excepció la constitueixen les dues FPS clonades de plantes monocotiledònies, *Zea mays* i *Oryza sativa*, que són lleugerament més llargues en el seu extrem aminoterminal, i que tenen 350 i 353 aminoàcids, respectivament. Pel que fa referència a les mides de les FPS d'altres organismes, en el cas de les FPS de mamífers i llevats la mida oscil·la al voltant de 350 aminoàcids, mentre que en el cas de les FPS bacterianes, la seva mida és menor, i oscil·la al voltant de 300 aminoàcids.

L'aliniament de les seqüències aminoacídiques de les dues FPS d'*Arabidopsis* (fig. 17) evidencia que les dues proteïnes estan altament conservades, ja que presenten un 90,6% d'identitat i un 94,5% de similitud. Els dos enzims contenen els set dominis conservats en les prenilttransferases (Quondam *et al.*, 1997), indicats I-VII en la figura 17, dels quals els dominis II i VI contenen els motius rics en aspartat. Quan l'aliniament es fa amb la resta de FPS de plantes, s'observa una gran conservació entre els enzims

d'*Arabidopsis* i la resta de FPS, ja que la identitat oscil·la entre un màxim del 80% amb els dos isoenzims de *Lupinus albus*, i un mínim del 72% amb les FPS de *Zea mays* i *Oryza sativa*. Aquest aliniament (veure Annex I) posa de manifest que l'elevada conservació de la seqüència no està restringida als set dominis conservats en totes les *E*-preniltransferases (Quondam *et al.*, 1997), sinó que s'extén sobre la totalitat de l'estructura primària. Quan les seqüències de les proteïnes FPS1 i FPS2 d'*Arabidopsis* es comparen amb les seqüències de les FPS d'altres d'organismes, el grau d'identitat disminueix. Així doncs, la identitat les proteïnes FPS1 i FPS2 d'*Arabidopsis* amb les proteïnes de mamífers i de llevats oscil·la al voltant del 50% (46% d'identitat amb la FPS humana, 47% amb la FPS de rata, 51% amb la FPS de *S. cerevisiae*, o 53% amb la FPS de *N. crassa*) i es concentra en les regions que constitueixen els set dominis conservats. Les proteïnes FPS1 i FPS2 presenten major divergència amb les FPS de bacteris, amb qui mantenen una identitat inferior al 40% (35% amb *E. coli* o 33% amb *B. stearothermophilus*), que pràcticament es veu limitada als dominis conservats. L'aliniament múltiple de seqüències de les FPS clonades dels diferents organismes (Annex II) posa de manifest que, tot i que l'homologia entre totes elles és baixa, es mantenen els set dominis característics de les *E*-preniltransferases.

3.4. Confirmació de l'activitat farnesildifosfat sintasa de l'isoenzim FPS2.

La presència en la FPS2 d'*Arabidopsis* dels set dominis conservats en totes les *E*-preniltransferases i, a la vegada, l'elevada identitat existent amb l'enzim FPS1 de la mateixa planta, suggerien que l'isoenzim FPS2 era una farnesildifosfat sintasa funcional. No obstant, i per tal de confirmar-ho, es va analitzar la capacitat de l'isoenzim FPS2 per complementar una soca mutant de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) deficient en activitat FPS. La soca de llevat CC25 és portadora de la mutació puntual *erg20-2* en el gen que codifica la FPS (gen *ERG20*) (Blanchard, L. i Karst, F., 1993). Aquesta mutació és una transició (A¹³⁸⁹→G), que provoca el canvi d'un residu aminoacídic (Lys¹⁹⁷→Glu) en la seqüència de la FPS. Com a conseqüència, la FPS mutada té afectada la capacitat de catalitzar la condensació de GPP amb IPP per produir

FPP, de tal manera que el producte de reacció majoritari és GPP enlloc d’FPP. A més, aquesta mutació és termosensible, de tal manera que a una temperatura no permissiva (36°C) la soca CC25 esdevé auxotròfica per l’ergosterol (fenotip *erg⁻*) (Chambon *et al.*, 1990), que és l’esterol majoritari dels llevats, i només pot créixer en medis suplerts amb ergosterol. En canvi, a una temperatura permissiva (28°C), la soca CC25 deixa de ser auxotròfica per l’ergosterol, ja que la quantitat de FPP que produeix és suficient per fer front a les necessitats d’esterols.

Per dur a terme l’anàlisi de complementació funcional, es va transformar la soca CC25 amb el plasmidi pNCFPS2, que conté el cDNA FPS2 d’*Arabidopsis* sota el control del promotor del gen de la fosfoglicerat quinasa de llevat, i es va analitzar la seva capacitat per créixer a 36°C en absència o presència d’ergosterol en el medi. Tal com s’ha indicat anteriorment i s’observa en la figura 19, la soca CC25 només creix a 36°C en presència d’ergosterol. En canvi, la soca CC25 transformada amb el plasmidi pNCFPS2 creix a 36°C en un medi sense ergosterol. Aquest fet indica que el plasmidi pNCFPS2 complementa la mutació *erg20-2* de la soca CC25 i per tant, confirma que el cDNA FPS2 d’*Arabidopsis* codifica una forma funcional de l’enzim FPS.

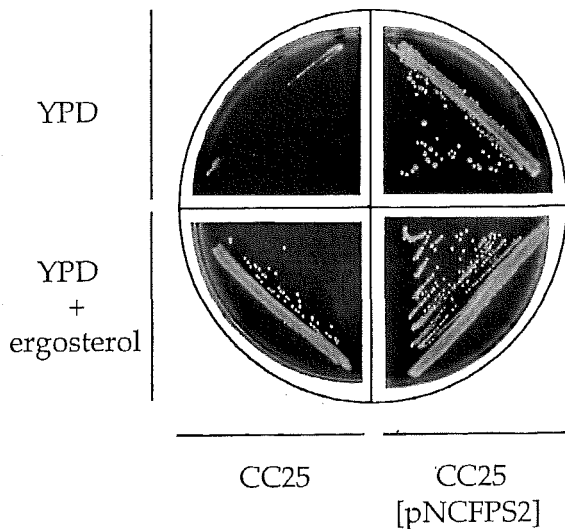


Figura 19. Complementació funcional de la soca mutant de llevat CC25 amb el plasmidi pNCFPS2. La soca CC25 i la soca CC25[pNCFPS2] van ser sembrades en plaques de medi YPD o de medi YPD suplert amb 80 µg/ml d’ergosterol, i incubades a 36°C durant tres dies.

Per demostrar la restauració d'activitat FPS en la soca CC25[pNCFPS2], es van realitzar assajos *in vitro* d'activitat FPS en extractes proteics d'aquesta soca en presència de [^{14}C]IPP i DMAPP com a substrats de l'enzim. Com a control, es va dur a terme el mateix experiment en extractes de la soca CC25 sense transformar. En els dos casos es van analitzar els productes de la reacció (fig. 20) i només es va detectar radioactivitat deguda a la formació de GPP i FPP. En els extractes de la soca CC25 el producte de reacció majoritari detectat va ser el GPP (75% GPP i 25% FPP), mentre que en el cas dels extractes de la soca CC25[pNCFPS2] el producte de reacció majoritari va ser el FPP (95% FPP i 5% GPP).

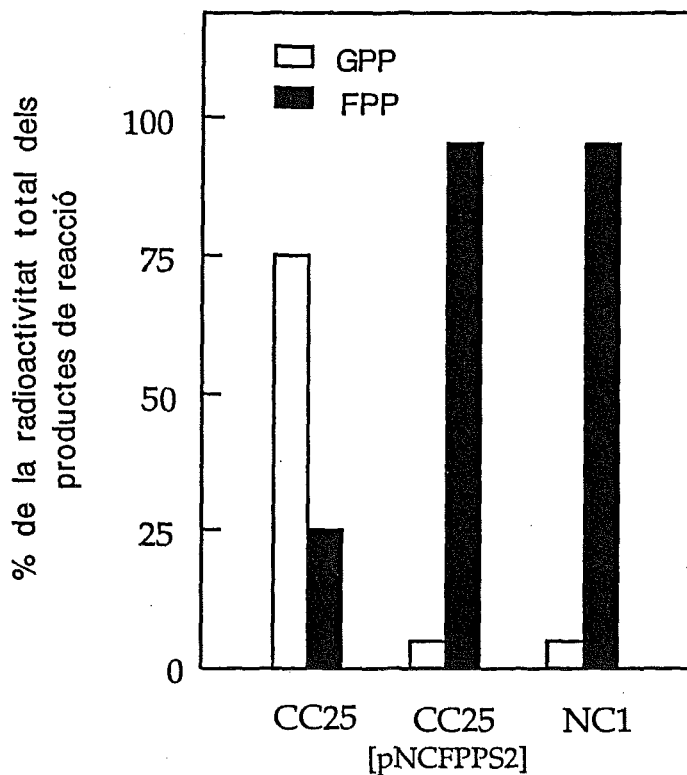


Figura 20. Identificació dels productes de reacció dels assajos *in vitro* d'activitat FPS en extractes proteics de les soques CC25, CC25[pNCFPS2] i NC1. Els extractes proteics de cada soca van ser incubats en presència de [^{14}C]IPP i DMAPP. Els productes de reacció obtinguts van ser defosforilats enzimàticament i analitzats per cromatografia en capa fina (TLC). Només es va detectar radioactivitat incorporada a geraniol i farnesol. La quantitat de GPP i FPP produïda s'expressa com a percentatge respecte la suma de comptes de les fraccions de geraniol i farnesol, a la que es va assignar el valor 100. Els resultats presentats corresponen a la mitjana de tres experiments.

Tot i que aquests resultats indicaven que l'isoenzim FPS2 d'*Arabidopsis* tenia activitat FPS, el fet que la mutació *erg20-2* només afecti la capacitat de l'enzim per catalitzar la condensació de GPP amb IPP per produir FPP, no permetia afirmar amb absoluta seguretat que l'isoenzim FPS2 fos capaç de catalitzar les dues condensacions seqüencials requerides per sintetitzar FPP a partir d'IPP i DMAPP. Per resoldre aquesta qüestió, va ser necessari analitzar la capacitat del plasmidi pNCFPS2 per complementar una interrupció del gen *ERG20*. Cal tenir present que una soca de llevat haploide portadora d'una interrupció en el gen *ERG20* és completament inviable, independentment de la temperatura de creixement i de la composició del medi de cultiu, fins i tot en presència d'ergosterol (Blanchard, L. i Karst, F., 1993), ja que té una mancança absoluta d'activitat FPS. La soca diploide LB311 (*erg20::URA3/ERG20, ura3/ura3, trp1/trp1*) és heterozigota per l'al·lel interromput de la FPS; és a dir, conté una còpia intacta del gen *ERG20* i una còpia del gen *ERG20* interrompuda amb el gen marcador *URA3*. Quan la soca LB311 esporula, genera únicament dues de les quatre espores possibles, que són les que segreguen amb l'al·lel *ERG20* (fenotip Ura⁻ Trp⁻), ja que les espores portadores de l'al·lel mutat *erg20::URA3* (fenotip Ura⁺ Trp⁻) són completament inviàbles.

Es va transformar la soca LB311 amb el plasmidi pNCFPS2 (que conté el gen marcador *TRP1*) i es va provocar la seva esporulació. Es va induir la germinació de les espores, i es va seleccionar la soca haploide NC1, amb fenotip Ura⁺ Trp⁺, indicatiu de la presència de l'al·lel *erg20::URA3* i del plasmidi pNCFPS2. La soca NC1 té capacitat de créixer en un medi mínim sense cap tipus de suplement. Aquest resultat demostra inequívocament que el cDNA FPS2 complementa la interrupció del gen *ERG20* i que, per tant, l'isoenzim FPS2 té capacitat per sintetitzar FPP a partir d'IPP i DMAPP. Tal i com era previsible, quan es va dur a terme un assaig *in vitro* d'activitat FPS en extractes proteics de la soca NC1 en presència de [¹⁴C]IPP i DMAPP com a substrats, el producte de reacció majoritari va ser FPP (95% FPP i 5% GPP) (fig. 20). Així doncs, el conjunt de resultats dels experiments de complementació funcional de les soques mutants de llevat CC25 i LB311 demostra que el cDNA FPS2 d'*Arabidopsis* codifica un isoenzim funcional de FPS, ja que és capaç de catalitzar les dues condensacions seqüencials d'IPP amb DMAPP i GPP per produir FPP.

4. IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UN ISOENZIM MITOCONDRIAL DE LA FPS D'*Arabidopsis thaliana*.

L'anàlisi de la seqüència de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* va posar de manifest la presència d'un codó ATG situat en fase i 123 pb cap a 5' del codó ATG utilitzat com a inici de traducció de la isoforma FPS1 (Delourme *et al.*, 1994) (fig. 21). Suposant que existís un mRNA que contingués aquest triplet AUG distal, la seva utilització com a inici de traducció generaria una isoforma FPS que contindria una extensió aminoterminal de 41 aminoàcids respecte la isoforma FPS1. A més, i tal com es descriu més endavant, aquesta seqüència NH₂-terminal presenta les característiques pròpies d'un pèptid de trànsit a mitocondries, la qual cosa suggeriria l'existència d'una forma mitocondrial de l'enzim FPS en *Arabidopsis thaliana*.

4.1. Detecció i clonatge d'un nou mRNA derivat del gen *FPS1*.

L'existència d'un mRNA derivat del gen *FPS1* que conté el triplet AUG distal va ser demostrada inicialment mitjançant el clonatge d'un fragment de 501 pb de l'extrem 5' del seu corresponent cDNA, utilitzant una estratègia de *RACE* (Frohman *et al.*, 1988) (Apartat 6.1 de Materials i Mètodes). Una vegada confirmada l'existència d'aquest nou mRNA producte del gen *FPS1*, es va procedir a aïllar el corresponent cDNA, seguint la mateixa estratègia de *RACE* utilitzada per aïllar el cDNA FPS2, però en aquest cas utilitzant un encebador dissenyat a partir de la seqüència situada a 5' del triplet ATG distal del gen *FPS1*. Com a material de partida es va utilitzar la fracció poli(A)⁺ obtinguda a partir d'RNA total de flors d'*Arabidopsis*. D'aquesta manera es va amplificar un cDNA d'aproximadament 1,4 kb, que va ser clonat i seqüenciat. El cDNA amplificat conté una seqüència de 1.396 pb, sense comptar els 30 pb de la cua de poli(A)⁺, que inclou la seqüència completa del cDNA FPS1 prèviament caracteritzat, i s'extén 99 i 98 nucleòtids més enllà dels seus extrems 5' i 3', respectivament. Aquestes extensions addicionals per 5' i 3' coincideixen amb la seqüència del gen *FPS1*. El marc

RESULTATS

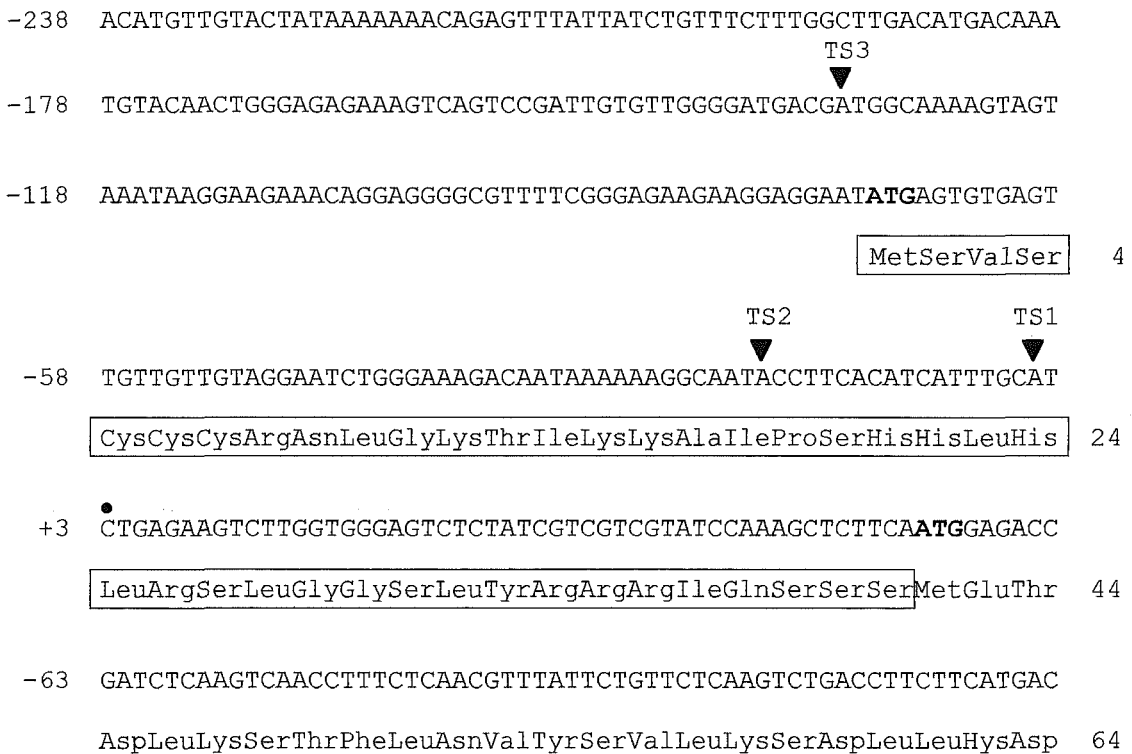


Figura 21. Seqüència de nucleòtids de la regió 5' del gen *FPS1*, i seqüència deduïda d'aminoàcids de l'extrem NH₂-terminal de la proteïna FPS1L. Els inicis de transcripció de l'mRNA FPS1S (TS1 i TS2) i FPS1L (TS3) estan indicats amb un cap de fletxa. Els nucleòtids estan numerats a l'esquerra, i s'ha assignat la posició +1 a l'inici de transcripció més intern (TS1) del gen *FPS1*. L'extrem 5' del cDNA FPS1 (Delourme *et al.*, 1994) s'indica amb un punt. Els codons ATG estan marcats amb negreta. La seqüència deduïda d'aminoàcids, numerada a la dreta, es mostra a sota la seqüència nucleotídica. La seqüència aminoacídica corresponent a l'extensió NH₂-terminal de la isoforma FPS1L es presenta dins una caixa.

obert de lectura que s'inicia al triplet ATG distal codifica una proteïna de 384 residus aminoacídics, amb una massa molecular teòrica de 44.254 Da que, com s'ha indicat anteriorment, es diferencia de la isoforma FPS1 en el fet de tenir una extensió aminoterminal de 41 aminoàcids. El cDNA també conté una regió 5' transcrita no traduïda de 27 pb, i una regió 3' transcrita no traduïda de 214 pb. La cua de poli(A)⁺ està situada 89 pb cap a 3' del lloc de poliadenilació del cDNA FPS1 (Delourme *et al.*, 1994), fet que indica que en el gen *FPS1* existeixen diferents llocs de poliadenilació.

4.2. Determinació dels inicis de transcripció del gen *FPS1*.

L'existència de dues seqüències de cDNA corresponents al gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, la descrita en aquest treball i la descrita anteriorment per Delourme *et al.* (1994), suggeria que l'expressió del gen *FPS1* dona lloc a dos mRNAs diferents. Tot i això, no es podia descartar la possibilitat que l'expressió del gen *FPS1* generés únicament l'mRNA més llarg i, per tant, que el cDNA *FPS1* descrit inicialment correspongués a una forma del cDNA *FPS1* més llarg truncada per l'extrem 5'.

Per tal de confirmar l'existència de dos RNAs missatgers diferents generats a partir de l'expressió del gen *FPS1* i, a la vegada, determinar els seus extrems 5', es van dur a terme experiments de protecció enfront la digestió amb RNAsa, utilitzant la ribosonda que s'indica a la figura 22 i la fracció poli(A)⁺ obtinguda a partir d'RNA total de flors d'*Arabidopsis*. Tal i com es pot observar en la figura, s'obtenen dues poblacions diferenciades de fragments protegits. Dins el grup de fragments més petits, la mida estimada de les bandes més intenses indica l'existència de dos mRNAs majoritaris (bandes protegides de 137 i 154 nucleòtids) que tenen els seus extrems 5' localitzats entre els dos triplets AUG; concretament, a 53 i 70 nucleòtids cap a 5' del triplet AUG més intern. Aquests dos inicis de transcripció s'han definit com TS1 i TS2, respectivament (fig. 21). En el cas de la població de fragments de mida més gran, s'observa una banda majoritària de 269 nucleòtids, que correspon a un mRNA que té el seu extrem 5' situat a 62 nucleòtids cap a 5' del triplet AUG distal. Aquest lloc d'inici de transcripció s'ha definit com TS3 (fig. 21). Cal indicar que l'heterogeneïtat observada entre els extrems 5' dels missatgers derivats del gen *FPS1* està d'acord amb l'absència de seqüències consens TATA situades a la distància apropiada dels corresponents llocs d'inici de transcripció.

El conjunt d'aquest resultat demostra que l'expressió del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* genera simultàniament dues poblacions d'mRNAs diferents en el seu extrem 5'. Una d'elles, anomenada des d'ara mRNA *FPS1S*, conté només el triplet AUG intern i, en conseqüència, té capacitat per codificar la isoforma *FPS1* prèviament

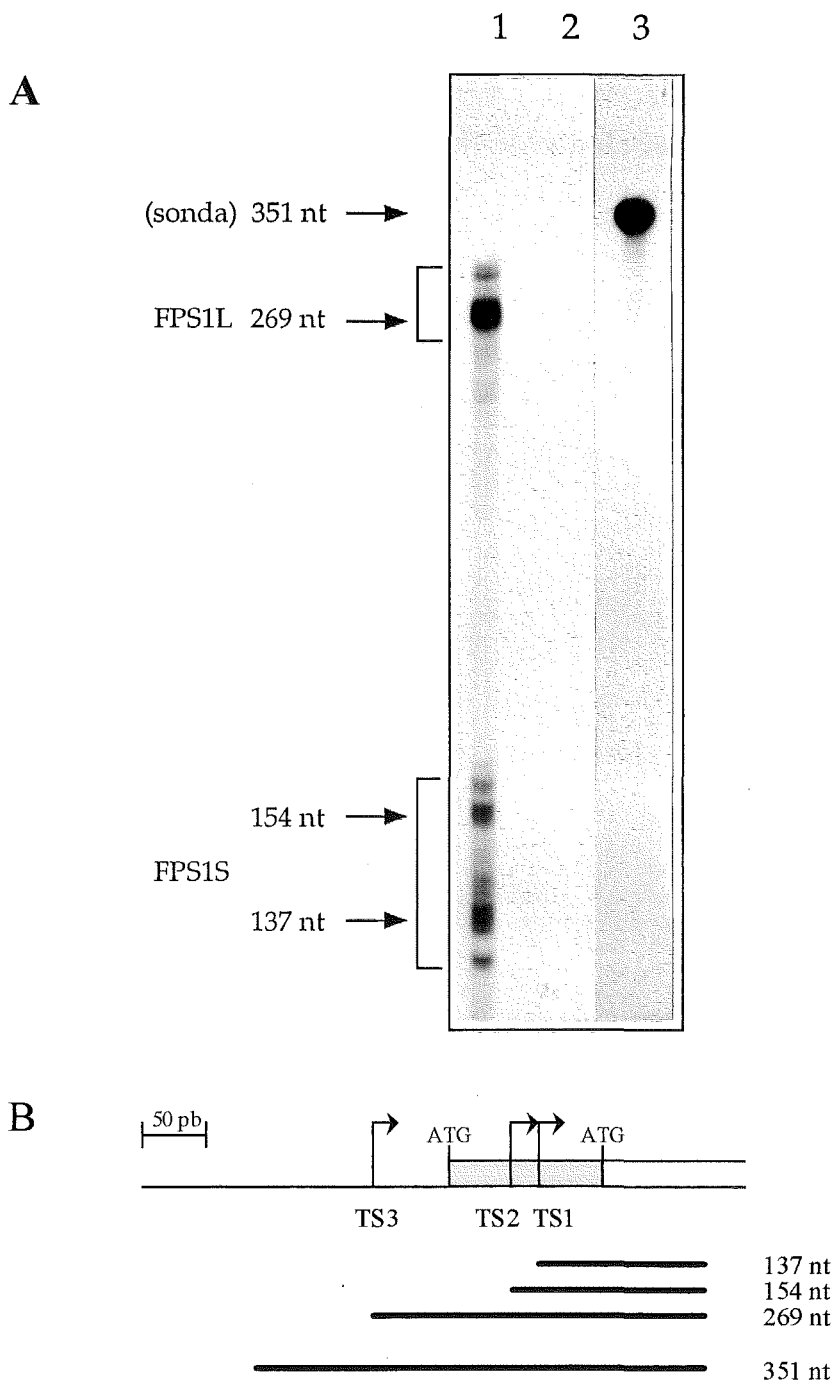


Figura 22. Determinació dels inicis de transcripció del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* mitjançant protecció enfront la digestió amb RNAsa. A) Autoradiografia de la ribosonda marcada i dels fragments protegits. Carril 1, experiment realitzat amb la fracció poli(A)⁺ obtinguda d'RNA de flors d'*Arabidopsis*. Carril 2, experiment control amb tRNA de llevat. Carril 3, ribosonda sense digerir. La mida de la ribosonda sense digerir i dels fragments protegits està indicada a l'esquerra de la figura (nt). **B)** Representació esquemàtica de la regió 5' del gen *FPS1*, de la ribosonda utilitzada i dels fragments d'aquesta protegits pels mRNAs. Els inicis de transcripció (TS1, TS2 i TS3) s'indiquen amb fletxes. La ribosonda (351 nt) i els fragments protegits majoritaris (269, 154 i 137 nt) es representen amb línies a la part inferior de la figura. La seqüència del gen *FPS1* compresa entre els dos triplets ATG s'indica amb una caixa puntejada.

caracteritzada (Delourme *et al.*, 1994), isoforma que s'anomenarà des d'ara FPS1S. L'altra població, anomenada mRNA FPS1L, inclou els dos triplets AUG i, per tant, té capacitat per codificar la isoforma que conté l'extensió NH₂-terminal de 41 aminoàcids, isoforma que s'anomenarà a partir d'ara FPS1L.

4.3. Anàlisi per Northern blot de l'expressió dels mRNAs derivats del gen *FPS1*.

Amb anterioritat al descobriment que l'expressió del gen *FPS1* d'*Arabidopsis thaliana* pot donar lloc a dos mRNAs diferents, el patró d'expressió del gen *FPS1* havia estat analitzat per Northern blot (apartat 2 de Resultats). No obstant, un cop demostrada l'existència dels mRNAs FPS1L i FPS1S, es volia determinar el patró d'expressió corresponent a cada un dels missatgers. Amb la finalitat d'analitzar el patró d'expressió de l'mRNA FPS1L, es van dur a terme experiments de Northern blot amb RNA total de diferents òrgans d'*Arabidopsis* (arrels, tiges, fulles i flors) i de plàntules crescudes durant deu dies en condicions de llum o de foscor. La sonda utilitzada va ser un fragment de DNA de 289 pb que s'extén entre les posicions -309 a -20 del gen *FPS1* (fig. 21 i 23.B) i que reconeix específicament el missatger FPS1L. Pel que fa referència al missatger FPS1S, i davant la impossibilitat d'obtenir una sonda específica per aquest missatger, ja que la totalitat de la seva seqüència està continguda en el missatger FPS1L, el seu patró d'expressió s'ha deduït per comparació del resultat obtingut amb la sonda específica per l'mRNA FPS1L amb l'obtingut en l'experiment de Northern blot utilitzant la sonda de 370 pb *Bgl*II-*Kpn*I, derivada de la regió 3' del gen *FPS1*, que reconeix simultàniament els missatgers FPS1L i FPS1S (Fig. 23.B).

L'anàlisi dels dos patrons d'expressió indica que els mRNA FPS1S i FPS1L es detecten en tots els teixits analitzats, encara que presenten un patró d'expressió diferent. Mentre que l'mRNA FPS1S s'acumula preferentment en flors i arrels, l'mRNA FPS1L es detecta majoritàriament en flors. No s'observen canvis significatius en el nivell d'expressió dels dos missatgers en plàntules crescudes en condicions de llum o de foscor.

El fet que els dos missatgers produïts pel gen *FPS1* tinguin patrons d'expressió diferents indica que es troben sota el control de promotors diferents.

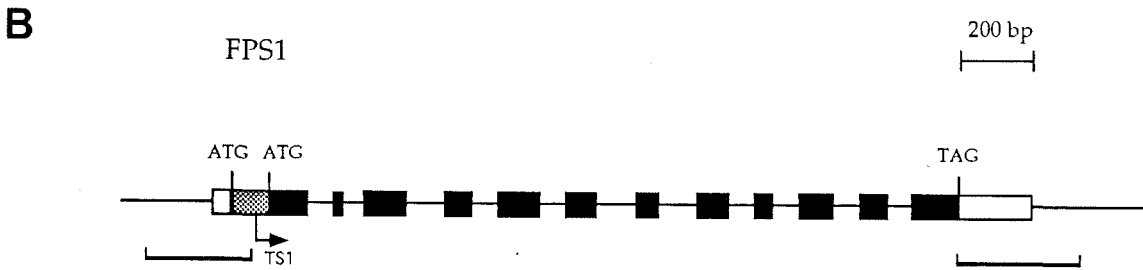
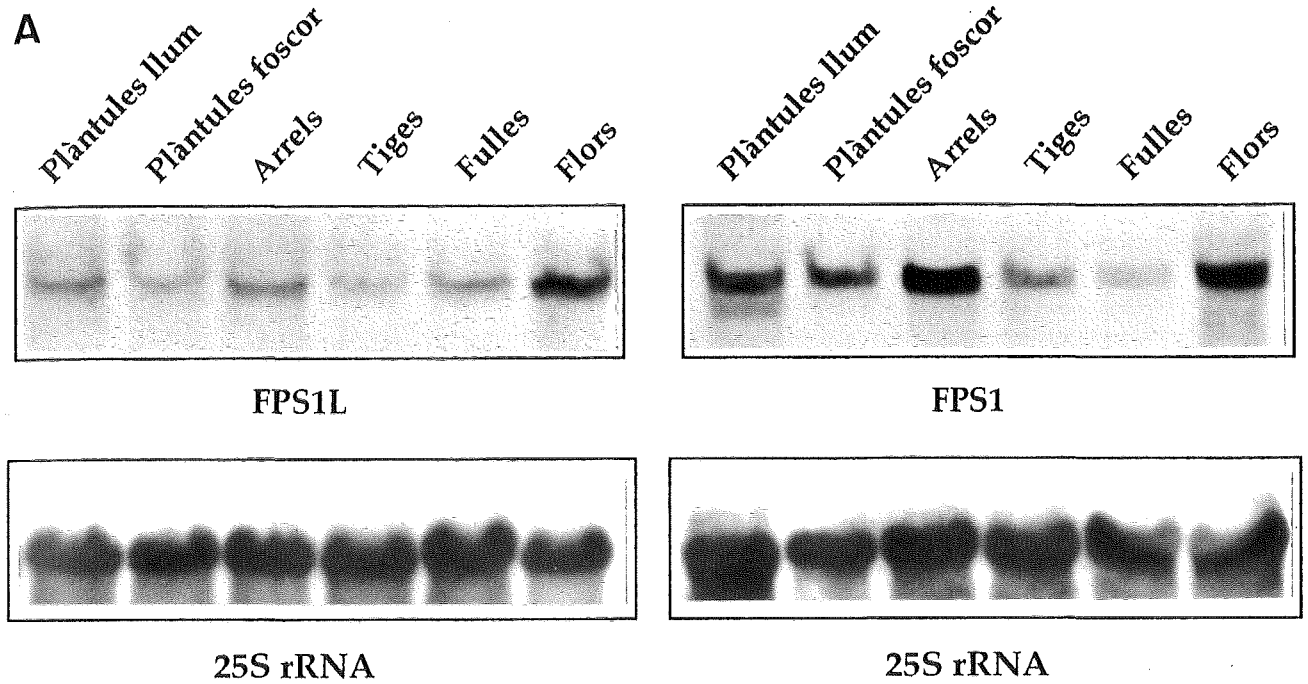


Figura 23. Anàlisi per Northern blot del patró d'expressió dels mRNAs derivats del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*. A) RNA total de diferents teixits (30 µg/carril) va ser sotmès a electroforesi en gels d'agarosa a l'1% amb formaldehid, i transferit a membranes de nitrocel·lulosa. Els filtres van ser hibridats amb la sonda específica per l'mRNA FPS1L o bé amb la sonda específica pel gen *FPS1*, que reconeix simultàniament els mRNAs FPS1S i FPS1L. El temps d'exposició va ser de 9 dies en els dos casos. Per confirmar que en cada carril s'havien transferit quantitats equivalents d'RNA, els filtres van ser rehibridats amb el fragment de 900 pb *Bam*HI-*Eco*RI del gen de l'RNA ribosomàlic citoplasmàtic 25S de blat (Gerlach i Bedbrook, 1979). **B)** Representació esquemàtica de les sondes derivades del gen *FPS1* utilitzades en els experiments de Northern blot.

4.4. Anàlisi funcional *in vitro* del codó AUG distal de l'mRNA FPS1L.

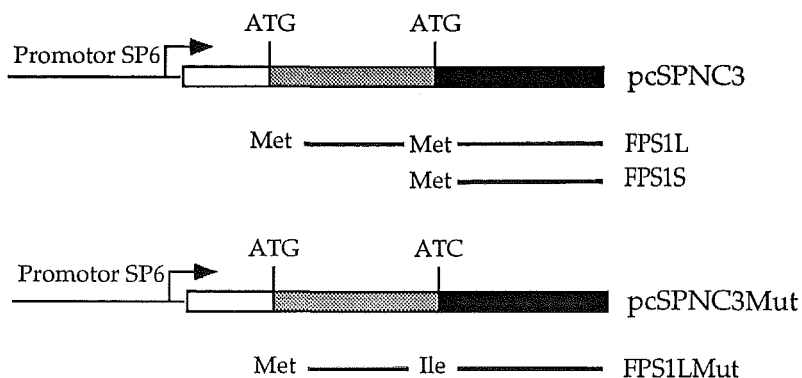
Les seqüències de nucleòtids que flanquejen el triplet ATG distal del cDNA FPS1L (GAATATGAG) són clarament diferents a les seqüències consens descrites en plantes com a entorn més favorable del codó d'inici de traducció (AACCAATGGC) (Lütcke *et al.*, 1987). Amb la finalitat d'analitzar si malgrat això el triplet ATG distal podia ser utilitzat eficientment com a codó d'inici de traducció, es van realitzar experiments de transcripció-traducció *in vitro* del cDNA FPS1L (plasmidi pcSPNC3) en extractes de germen de blat lliures de cèl.lules (TNT™ Coupled Wheat Germ Extract Systems, Promega) en presència de [³⁵S]-metionina. Els productes obtinguts es van fraccionar en un gel de poliacrilamida-SDS i es van analitzar per fluorografia. Com es pot observar en la figura 24, la traducció de l'mRNA FPS1L dona lloc a dues proteïnes amb masses moleculars aproximades de 44 i 40 kDa, que estan d'acord amb les masses moleculars teòriques de les proteïnes traduïdes a partir del primer (44.254 Da) i del segon (39.689 Da) codó AUG de l'mRNA FPS1L, respectivament. Quan es van repetir els experiments de transcripció-traducció *in vitro*, però aquesta vegada utilitzant el plasmidi pcSPNC3Mut (fig. 24), que conté una versió mutada del cDNA FPS1L en el qual el codó ATG intern s'ha convertit en un codó ATC (codificant isoleucina) mitjançant mutagènesi dirigida, només es sintetitza el proteïna de 44 kDa. Aquest resultat confirma que la proteïna de 40 kDa correspon a la isoforma FPS1S.

En definitiva, aquests resultats demostren que en l'extracte de germen de blat, el codó AUG més pròxim a l'extrem 5' de l'mRNA FPS1L és funcional i s'utilitza preferentment com a inici de traducció, tot i que el segon triplet AUG també és utilitzat, donant lloc a una quantitat significativa de la isoforma FPS1S.

4.5. Anàlisi teòrica de la seqüència aminoterminal de la isoforma FPS1L.

L'anàlisi de la seqüència aminoacídica i la predicció d'estructura secundària de l'extensió NH₂-terminal de 41 aminoàcids de la isoforma FPS1L van posar de manifest

A



B

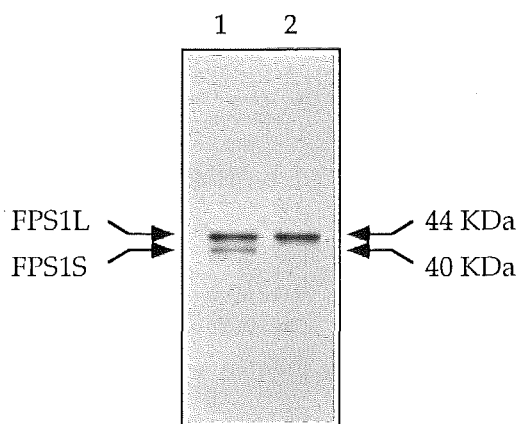


Figura 24. Anàlisi funcional *in vitro* del codó AUG distal de l'mRNA FPS1L. A) Representació esquemàtica dels plasmidis pcSPNC3 i pcSPNC3Mut, que contenen els cDNAs FPS1L i FPS1LMut, respectivament, utilitzats en els experiments de transcripció-traducció *in vitro*. La regió 5' dels cDNAs es representa amb una caixa, blanca a la regió 5' transcrita no traduïda, i negra a la regió codificant. Les fletxes indiquen l'inici de transcripció del promotor de l'SP6 RNA polimerasa. Les línies de sota cada construcció representen la regió NH₂-terminal de les proteïnes resultants de la transcripció-traducció *in vitro* dels plasmidis pcSPNC3 i pcSPNC3Mut. B) Anàlisi dels productes de transcripció-traducció *in vitro* dels plasmidis pcSPNC3 (carril 1) i pcSPNC3Mut (carril 2), en extractes de germen de blat lliures de cèl.lules (TNT™ Coupled Wheat Germ Extract Systems, Promega) utilitzant [³⁵S]-metionina. Les fletxes indiquen la posició de les proteïnes FPS1L i FPS1S i les corresponents masses moleculars estimades.

que té les característiques pròpies d'un pèptid de trànsit a mitocondries (von Heijne *et al.*, 1989; von Heijne, 1992; Sjöling i Glaser, 1998). Tal com es pot apreciar en la figura 25.A, en l'extensió NH₂-terminal hi ha una proporció elevada de residus aminoacídics

tall proposat. Està descrit que els residus d'arginina situats en les posicions -2 i -10 són importants per definir amb precisió el punt de processament (von Heijne *et al.*, 1989), tot i que en plantes el residu d'arginina en la posició -10 no està conservat (revisat a Sjöling i Glaser, 1998). Finalment, la predicció de l'estructura secundària (Rost i Sander, 1993) de l'extensió NH₂-terminal indica que els residus aminoacídics 8-17 poden adoptar la conformació d'una α -hèlix amfifílica, on els residus amb càrrega positiva queden situats a un costat de l'hèlix, i els residus hidrofòbics i apolars, a l'altra (fig 25.B). Un dels requisits dels pèptids de trànsit a mitocondria és tenir un domini que pugui adoptar conformació en α -hèlix amfifílica en el seu extrem aminoterminal (revisat a Sjöling i Glaser, 1998).

4.6. Anàlisi funcional *in vivo* de l'extensió aminoterminal de la isoforma FPS1L.

Està descrit en la bibliografia que els pèptids de trànsit a mitocondries de plantes i llevats es poden intercanviar mantenint la seva funcionalitat (Bowler *et al.*, 1989; Schmitz *et al.*, 1989; Chaumont *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Mireau *et al.*, 1996). En una primera aproximació per estudiar la funcionalitat de l'extensió NH₂-terminal de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* com a pèptid de trànsit a mitocondries, es va analitzar la seva capacitat per dirigir *in vivo* una proteïna marcador a mitocondries de llevat.

Per realitzar aquest experiment, es disposava de la soca mutant de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) WSR, cedida pel doctor Ian Small, de l'Institut National de la Recherche Agronomique, de Versailles (França). Aquesta soca és portadora d'una interrupció en el gen *COXIV*, que codifica la subunitat IV de la citocrom c oxidasa mitocondrial (CoxIV). Aquesta mutació fa que la cadena de transport electrònic mitocondrial no sigui funcional i, per tant, que la soca WSR no pugui dur a terme metabolisme oxidatiu. En conseqüència, per poder créixer, la soca WSR necessita un medi que contingui substrats fermentables com a font d'energia i, en canvi, no pot créixer en un medi on la font d'energia sigui un substrat no fermentable, com per

exemple el glicerol. A més de la soca WSR, es disposava dels plasmidis d'expressió pYCOX i pY Δ COX (fig. 26.A). El plasmidi pYCOX conté la regió codificant completa del gen *COXIV* de *Saccharomyces cerevisiae* sota el control del promotor de l'alcohol deshidrogenasa. Per tant, aquest plasmidi expressa el precursor mitocondrial, incloent el seu propi pèptid de trànsit, de la subunitat CoxIV. El plasmidi pY Δ COX conté una versió delecionada del gen *COXIV* (Δ COXIV) que dona lloc a una subunitat CoxIV truncada, ja que no conté el pèptid de trànsit a mitocòndries, però funcional.

L'objectiu de l'experiment era analitzar si la seqüència aminoterminal de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* podia dirigir la subunitat IV de la citocrom c oxidasa a les mitocòndries de llevat i, en conseqüència, si podia complementar la mutació de la soca WSR, restaurant la capacitat per créixer en un medi amb glicerol com a única font d'energia. Amb tal finalitat, es va preparar el plasmidi pFPS1Ltp-Y Δ COX, que conté el fragment del cDNA FPS1L codificant pels 41 aminoàcids de l'extrem NH₂-terminal de la isoforma FPS1L, fusionat a la seqüència Δ COXIV (fig. 26.A). Aquest plasmidi expressa una proteïna quimèrica en la que el pèptid de trànsit a mitocòndries de la subunitat CoxIV de llevat s'ha substituït per l'extensió NH₂-terminal de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis*.

La soca WSR va ser transformada amb els plasmidis pFPS1Ltp-Y Δ COX, pYCOX (control positiu de complementació) i pY Δ COX (control negatiu de complementació). Per analitzar la complementació de la deficiència respiratòria de la soca WSR, la soca WSR i les soques transformades WSR[pFPS1Ltp-Y Δ COX], WSR[pYCOX] i WSR[pY Δ COX] van ser sembrades en medi N3, que conté glicerol com a única font d'energia. Com s'aprecia en la figura 26, les soques WSR i WSR[pY Δ COX] no creixen en el medi N3, mentre que les soques WSR[pYCOX] i WSR[pFPS1Ltp-Y Δ COX] creixen normalment en aquest medi. Aquest resultat indica que el plasmidi pFPS1Ltp-Y Δ COX complementa la mutació de la soca WSR, ja que li retorna la capacitat per créixer en un medi amb glicerol com a única font d'energia. Així doncs, es demostra que l'extensió NH₂-terminal de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* és capaç de substituir el pèptid de trànsit de la subunitat IV de la citocrom c oxidasa de

llevat i, per tant, que en aquest sistema *in vivo* és funcional com a pèptid de trànsit a mitocondries.

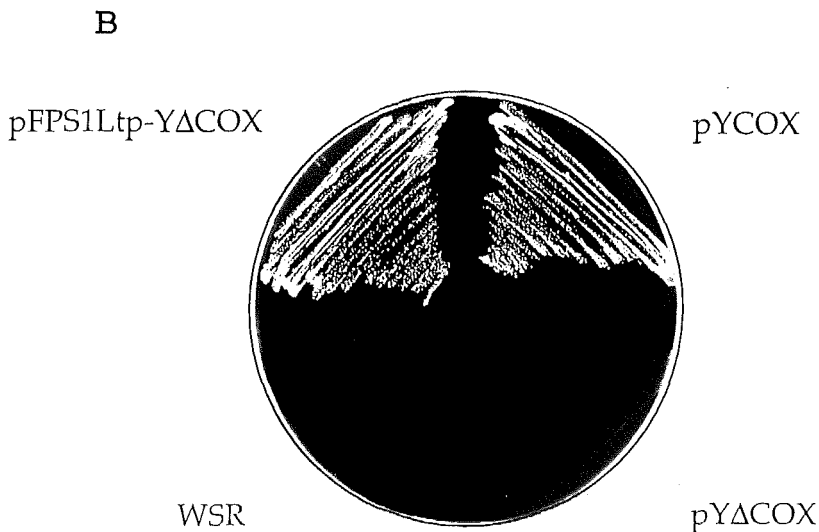
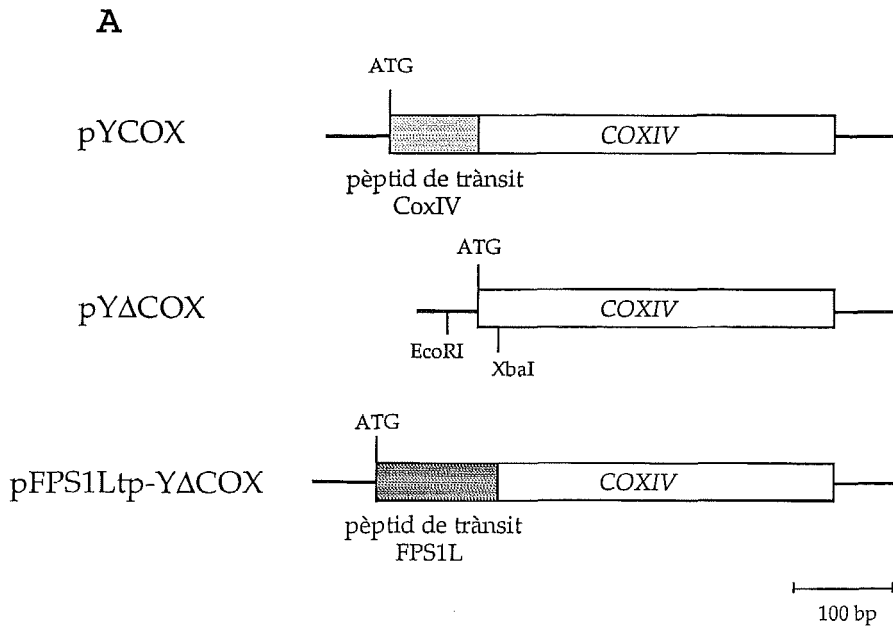


Figura 26. Complementació funcional de la soca mutant de llevat WSR amb el plasmidi pFPS1Ltp-YΔCOX. A) Representació esquemàtica dels plasmidis utilitzats en aquest estudi. El plasmidi pYCOX conté una còpia del gen *COXIV* de *S. cerevisiae*, que inclou la regió que codifica el pèptid de trànsit. El plasmidi pYΔCOX conté la seqüència Δ*COXIV*, que correspon a la seqüència de *COXIV* delecionada en la regió que codifica el pèptid de trànsit. El plasmidi pFPS1Ltp-YΔCOX conté la regió del cDNA FPS1L que codifica els 41 aminoàcids de l'extrem NH₂-terminal de la proteïna FPS1L fusionada a la seqüència Δ*COXIV*. **B)** Anàlisi de complementació funcional de la soca WSR amb els plasmidis descrits a l'apartat A. Les soques WSR, WSR [pYΔCOX], WSR[pYCOX] i WSR[pFPS1Ltp-YΔCOX] van ser sembrades en medi N3, que conté glicerol com a única font d'energia, i incubades a 28°C durant dos dies.

4.7. Importació *in vitro* de la isoforma FPS1L a mitocòndries de planta.

Per confirmar la funcionalitat de l'extensió aminoterminal de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* com a pèptid de trànsit a mitocòndries, es va estudiar la importació *in vitro* de la isoforma FPS1L d'*Arabidopsis* a mitocòndries de planta purificades.

Per procedir a la purificació de mitocòndries de planta habitualment s'utilitzen tubercles de patata com a material de partida, ja que són molt rics en mitocòndries i, a diferència dels teixits verds, presenten l'avantatge de no contenir cloroplastes que puguin contaminar la fracció mitocondrial. Com a etapa prèvia abans d'analitzar la importació de la proteïna FPS1L d'*Arabidopsis* a mitocòndries de patata purificades, es va procedir a posar a punt el sistema experimental utilitzant la proteïna ribosomal S10 de mitocòndries (RPS10) d'*Arabidopsis thaliana*. Estava demostrat (Wischmann, i Schuster, 1995) que el precursor de la proteïna ribosomal S10 de mitocòndries, de 28 kDa, s'importa eficientment *in vitro* a mitocòndries de patata, i que durant el procés d'importació es processa a una forma madura de 21 kDa, per eliminació del pèptid de trànsit de 7 kDa.

Tal i com s'ha descrit en l'apartat 4.4 de Resultats, la transcripció i traducció *in vitro* en extractes de germen de blat del cDNA FPS1L dona lloc majoritàriament a la proteïna FPS1L, tot i que també es produeix una quantitat significativa de la proteïna FPS1S. Quan el mateix experiment es repeteix utilitzant un lisat de reticulòcits de conill (TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega), les dues proteïnes es produeixen en la mateixa quantitat. Per aquesta raó, i pel fet de tractar-se d'una proteïna vegetal, es va considerar més adequat utilitzar com a precursor en els experiments d'importació la proteïna FPS1L sintetitzada *in vitro* en extractes de germen de blat. No obstant, tenint en compte que en molts experiments similars d'importació *in vitro* de proteïnes de plantes a mitocòndries purificades s'han utilitzant proteïnes sintetitzades en lisats de reticulòcits, els experiments d'importació de la proteïna RPS10 es van fer sintetitzant el precursor tant en extractes de germen de blat com en lisats de reticulòcits, per comprovar si el sistema emprat per sintetitzar *in vitro* la proteïna precursora podia influir en el resultat de l'experiment. Tal i com es pot observar en la figura 27, quan el

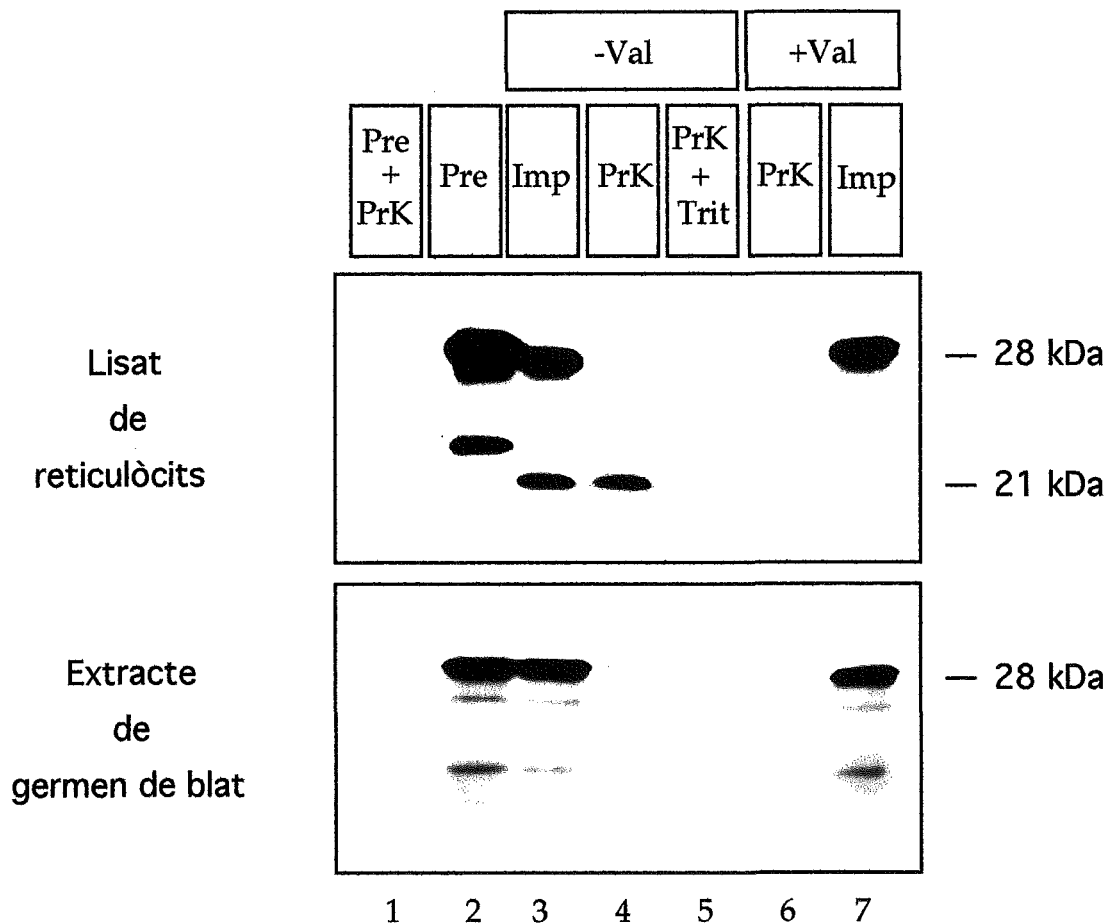


Figura 27. Anàlisi de la influència del sistema de transcripció-traducció *in vitro* de la proteïna precursora RPS10 en el procés d'importació a mitocondries purificades de patata. Els polipèptids resultants de la transcripció-traducció *in vitro* en presència de [³⁵S]-metionina del cDNA que codifica la proteïna precursora RPS10 van ser sotmesos a diferents tractaments, fraccionats en gels de SDS-poliacrilamida (12%) i analitzats per fluorografia. Les masses moleculars estimades s'indiquen a la dreta. En el carril 2 de cada panell, es mostren els productes (Pre) de traducció amb cada sistema de transcripció-traducció *in vitro*. S'observa l'aparició d'una proteïna majoritària de 28 kDa, que correspon al precursor RPS10. Els productes de traducció són completament digerits per tractament amb proteïnasa K (carril 1). Per la reacció d'importació, els productes de traducció van ser incubats amb mitocondries purificades de patata. Un terç de la mostra no es va sotmetre a cap tractament (Imp, carril 3). De la resta de la mostra, es van fer dues alíquotes, que van ser posteriorment tractades amb proteïnasa K (carril 4) o bé amb Tritó X-100 i proteïnasa K (carril 5). Es van incubar els productes de traducció amb mitocondries prèviament incubades amb valinomicina, que neutralitza el potencial de membrana. La meitat de la reacció no es va sotmetre a cap tractament (carril 7), i l'altra meitat es va tractar amb proteïnasa K (carril 6). La banda de 21 kDa detectada en els carrils 3 i 4 de l'experiment d'importació del precursor sintetitzat emprant un lisat de reticulòcits de conill correspon a la forma madura RPS10 un cop importada a mitocondries.