

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

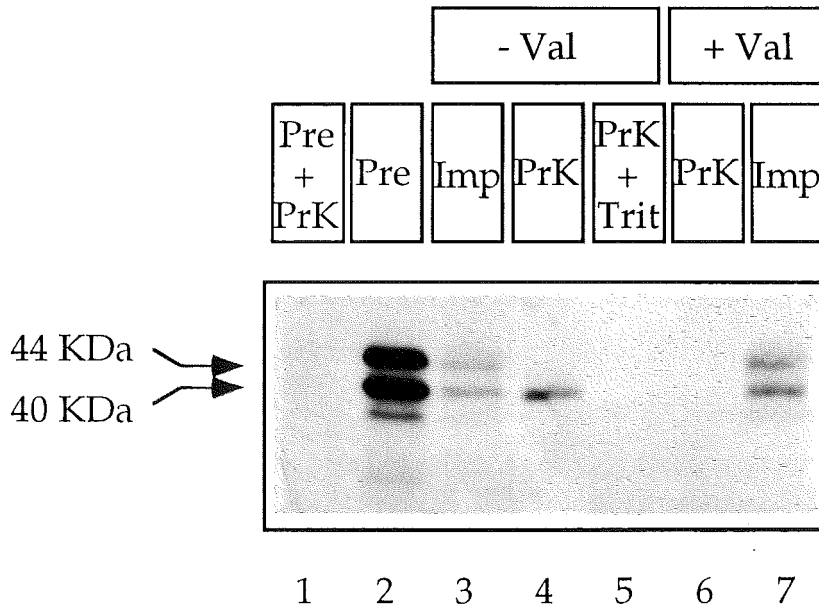
**BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES:  
CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA FARNESILDIFOSFAT  
SINTASA D'*Arabidopsis thaliana*.**

Núria Cunillera i Segarra  
Barcelona, 1999

precursor de 28 kDa (carril 2) sintetitzat en un lisat de reticulòcits de conill s'incuba amb presència de mitocondries purificades de patata (carril 3), apareix un polipèptid d'aproximadament 21 kDa, que és resistent a la digestió amb proteïnasa K (carril 4), i que correspon a la forma madura de la proteïna, que es troba dins les mitocondries. La proteïna importada és completament degradada per acció de la proteïnasa K quan les mitocondries es solubilitzen amb Tritó X-100 (carril 5). Quan la incubació amb mitocondries es realitza en presència de l'antibiòtic ionòfor valinomicina, que neutralitza el potencial de membrana, el procés d'importació no té lloc, i no es detecta la proteïna de 21 kDa (carrils 6 i 7). En canvi, quan s'analitzen els resultats dels experiments d'importació obtinguts amb el precursor de la proteïna RPS10 sintetitzat en extractes de germen de blat, s'observa que no hi ha importació a mitocondries, ja que en els carrils 3 i 4 no es detecta cap polipèptid de 21 kDa corresponent a la forma processada. Així doncs, aquest conjunt de resultats va demostrar que les preparacions de mitocondries i les condicions experimentals eren correctes per estudiar la importació de la proteïna FPS1L a mitocondries, però que els extractes de germen de blat, malgrat ser un sistema vegetal, no eren un bon sistema per sintetitzar el precursor que es pretenia importar a mitocondries. Per aquesta raó, els experiments d'importació a mitocondries de la isoforma FPS1L es van dur a terme sintetitzant el precursor *in vitro* en lisats de reticulòcits de conill.

Així doncs, la proteïna FPS1L d'*Arabidopsis* va ser sintetitzada *in vitro* en un lisat de reticulòcits de conill per transcripció i traducció del cDNA FPS1L. Tal i com s'ha indicat anteriorment, la mescla de traducció conté quantitats similars de les isoformes FPS1L (44 kDa) i FPS1S (40 kDa) (fig. 28, carril 2). Aquestes proteïnes són completament digerides quan s'incuben amb proteïnasa K (carril 1). Quan la mescla de traducció s'incuba amb mitocondries de patata i posteriorment es tracta amb proteïnasa K, es detecta un polipèptid protegit a l'interior de les mitocondries d'aproximadament 40 kDa (carril 4). En canvi, aquest polipèptid no es detecta quan les mitocondries es solubilitzen per tractament amb Tritó X-100 previ a la digestió amb proteïnasa K (carril 5). Quan l'experiment es realitza en presència de valinomicina, que impedeix que tingui lloc el procés d'importació perquè neutralitza el potencial de membrana, no es detecta el

polipèptid de 40 kDa protegit de la digestió amb proteïnasa K (carril 6). Aquests resultats demostren que la proteïna FPS1L de 44 kDa d'*Arabidopsis* és transportada a mitocòndries de patata, i que durant la importació és processada a una forma madura de 40 kDa per eliminació d'un pèptid de trànsit d'aproximadament 4 kDa.



**Figura 28. Importació de la proteïna FPS1L d'*Arabidopsis* a mitocòndries purificades de patata.** Els polipèptids resultants de la transcripció-traducció *in vitro* en presència de [<sup>35</sup>S]-metionina del cDNA FPS1L van ser sotmesos a diferents tractaments, fraccionats en gels de SDS-poliacrilamida (10%) i analitzats per fluorografia. Les masses moleculars estimades s'indiquen a l'esquerra. En el carril 2, es mostren els productes obtinguts (precursor, Pre) FPS1L (44 kDa) i FPS1S (40 kDa) de la transcripció-traducció *in vitro* del cDNA FPS1L. Aquests productes de traducció van ser completament digerits per tractament amb proteïnasa K (carril 1). Per la reacció d'importació, els productes de traducció sintetitzats *in vitro* van ser incubats amb mitocòndries purificades de patata, i posteriorment la reacció va ser repartida en tres alíquotes. Una alíquota no va ser sotmesa a cap tractament (Imp, carril 3). De la resta de la mostra, es van fer dues alíquotes, que van ser tractades amb proteïnasa K (carril 4) o bé amb Tritó X-100 i proteïnasa K (carril 5). Els productes de traducció també van ser incubats amb mitocòndries que havien estat prèviament incubades amb valinomicina, antibiòtic ionòfor que neutralitza el potencial de membrana. La meitat de la reacció no va ser sotmesa a cap tractament (Imp, carril 7), i l'altra meitat va ser tractada amb proteïnasa K (PrK, carril 6).

En definitiva, els resultats dels experiments de complementació funcional de la soca mutant de llevat WSR amb el plasmidi pFPS1Ltp-YΔCOX i dels experiments d'importació de la proteïna FPS1L a mitocondries de patata indiquen que la proteïna FPS1L d'*Arabidopsis* és precursora d'una isoforma de FPS de localització mitocondrial. En conseqüència, es pot concloure que el gen *FPS1* d'*Arabidopsis* és un gen bifuncional, ja que codifica una isoforma FPS de localització citosòlica i una isoforma FPS de localització mitocondrial.

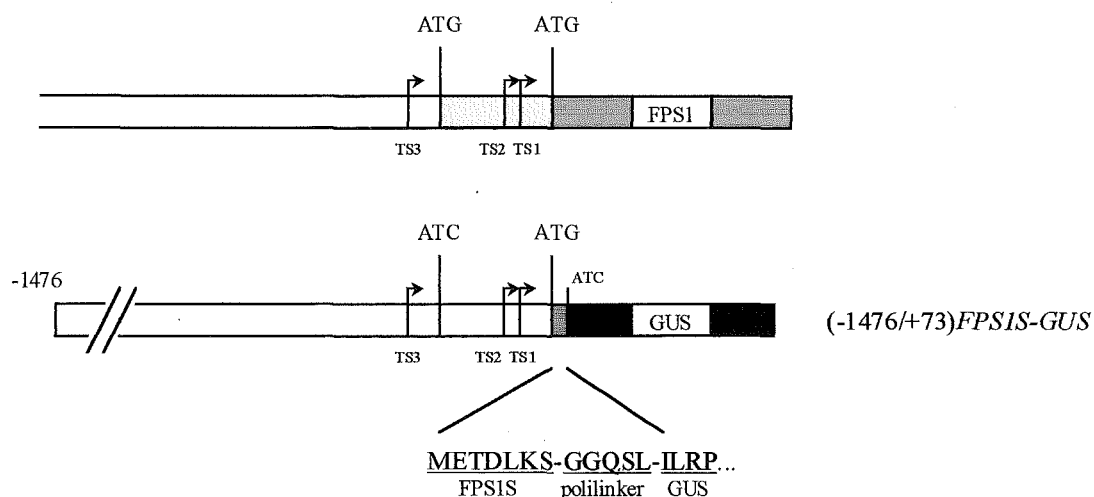
## **5. ANÀLISI DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DELS GENS *FPS1* I *FPS2* EN PLANTES TRANSGÈNIQUES D'*Arabidopsis thaliana*.**

Els resultats presentats fins aquest punt de la memòria indiquen que *Arabidopsis thaliana* conté com a mínim dos gens FPS (*FPS1* i *FPS2*) que codifiquen tres isoenzims FPS (FPS1L, FPS1S i FPS2), i que els mRNAs codificants per aquests enzims presenten patrons d'expressió diferents. En aquest apartat, es presenta l'estudi del patró d'expressió espacial i temporal dels gens *FPS1* i *FPS2*, determinat mitjançant la generació i anàlisi d'*Arabidopsis* transgèniques, transformades amb construccions que contenen regions 5'-flanquejants dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* fusionades amb el gen marcador *uidA* d'*Escherichia coli*, que codifica l'enzim β-glucuronidasa (GUS).

### **5.1. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73)*FPS1S-GUS* en plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*.**

Per tal d'estudiar el patró d'expressió del gen *FPS1*, es van generar i analitzar plantes transgèniques d'*Arabidopsis* portadores de la construcció (-1476/+73)*FPS1S-GUS* (fig. 29). Aquesta construcció conté la seqüència del gen *FPS1* compresa entre les posicions -1476/+73 fusionada de forma traduccional amb la seqüència del gen *uidA*. Tal i com s'ha descrit en anteriors apartats, l'expressió del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* genera simultàniament els mRNAs FPS1L i FPS1S. La traducció de l'mRNA FPS1S

genera únicament la isoforma FPS1S, però la traducció de l'mRNA FPS1L pot donar lloc simultàniament a les isoformes FPS1L i FPS1S, com demostren els experiments de transcripció-traducció *in vitro* (fig. 24). Per evitar la síntesi de la proteïna quimèrica formada per la fusió dels 41 aminoàcids de l'extrem aminoterminal de la isoforma FPS1L amb l'enzim GUS, el codó ATG d'inici de traducció de la isoforma FPS1L va ser convertit en un codó ATC. El codó ATG d'inici de traducció de la l'enzim GUS també va ser convertit en un codó ATC. D'aquesta manera, la construcció (-1476/+73)FPSIS-GUS permet detectar únicament l'activitat GUS de la proteïna quimèrica generada per traducció a partir del segon ATG de l'mRNA FPS1L i del primer ATG de l'mRNA FPS1S. Per aquest motiu, es considera que el patró d'expressió d'activitat GUS que s'observa en analitzar les plantes transformades amb la construcció (-1476/+73)FPSIS-GUS correspon al patró d'expressió de la isoforma FPS1S. D'altra banda, la finalitat de la fusió traduccional era mantenir intacta la regió 5' transcrita no traduïda i la seqüència de l'entorn de l'inici de traducció, en previsió que poguessin influir en l'expressió. En conseqüència, la proteïna resultant de l'expressió de la construcció (-1476/+73)FPSIS-GUS conté els 7 primers aminoàcids de la regió codificant de la isoforma FPS1S, seguits de 5 aminoàcids codificats pel polilinker del vector d'expressió (pBI121), fusionats a l'enzim GUS.



**Figura 29.** Representació esquemàtica del gen quimèric (-1476/+73)FPSIS-GUS utilitzat per generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*. A la part superior, es representa la regió 5'-flanquejant del gen FPS1 d'*Arabidopsis*. A la part inferior, es representa el gen quimèric (-1476/+73)FPSIS-GUS. A sota de la construcció, es mostra la seqüència aminoacídica de l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal de la proteïna quimèrica resultant.

La construcció (-1476/+73)*FPSIS-GUS* va ser introduïda en *Agrobacterium tumefaciens* C<sub>58</sub>C<sub>1</sub> i, mitjançant el mètode d'infiltració al buit, es van generar *Arabidopsis* transgèniques portadores de l'esmentat gen quimèric. Es van seleccionar 10 transformants independents de la generació T<sub>1</sub>, en els quals es va comprovar la integració del transgèn per PCR. Amb tal finalitat, es van dur a terme amplificacions per PCR de DNA genòmic de les plantes, utilitzant l'oligonucleòtid sentit FPS5', corresponent a la seqüència compresa entre les posicions -1476 a -1453 de la regió 5' del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, i l'oligonucleòtid antisentit pBIGUS2, complementari a la seqüència compresa entre les posicions +51 a +70 de la regió codificant del gen *uidA* (la posició +1 s'ha assignat a la primera base del codó ATG d'inici de traducció del gen *uidA*). Es va amplificar un fragment de DNA de 1632 pb que va ser seqüenciat pels seus extrems per comprovar que corresponia al transgèn (-1476/+73)*FPSIS-GUS*.

El patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS* va ser determinat mitjançant detecció histoquímica de l'activitat GUS en plantes transgèniques de la generació T<sub>2</sub>. L'anàlisi es va dur a terme en diferents estadis del desenvolupament i en diferents òrgans de les plantes. Tot i que es van observar diferències quantitatives d'activitat GUS entre les 10 línies de plantes transgèniques estudiades, el patró d'expressió va ser el mateix en totes elles. Els resultats que es mostren a continuació corresponen a l'anàlisi de la línia transgènica 17.1.

### **5.1.1. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS* durant la fase vegetativa del desenvolupament de la planta.**

Tal i com es pot observar en les imatges de la figura 30, es detecta una expressió intensa i generalitzada de l'activitat GUS en tots els òrgans de la planta durant tota la fase vegetativa del desenvolupament, des de la germinació (fig. 30.A) fins que la roseta de fulles basals està formada (fig. 30.H). Ja en els primers estadis de desenvolupament s'observa tinció en la radícula, l'hipocòtil i els cotilèdons (fig. 30.A, B i C), tot i que l'activitat GUS en els cotilèdons i en l'arrel és més intensa que en l'hipocòtil, tal i com es posa de manifest quan les mostres s'incuben durant menys temps (4 h enlloc de 10) en el tampó d'assaig GUS (fig 30.D). En el moment de l'aparició de les fulles, es pot

apreciar expressió de l'activitat GUS en les estípules que les flanquegen (fig. 30.F). Les fulles presenten activitat GUS durant tot el seu desenvolupament, i es detecta en el pecíol, el limbe i, amb una mica més d'intensitat, en els feixos vasculars (fig. 30.E. i H). Incubacions més curtes (4 h enlloc de 10) en el tampó d'assaig GUS mostren que l'activitat GUS en les fulles és menys intensa que en els cotilèdons i en l'arrel (fig. 30.F). Pel que fa referència a l'expressió en arrels, es detecta tinció GUS intensa, i en general uniforme (fig. 30.H), durant tota la fase vegetativa. Finalment, no s'observen diferències significatives en el patró d'expressió de l'activitat GUS en plàntules crescudes en condicions de llum (fig. 30.E) o de foscor (fig. 30.G).

### **5.1.2. Patró d'expressió del gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS* durant la fase reproductiva del desenvolupament de la planta.**

Igual que durant la fase vegetativa del desenvolupament de la planta, durant la fase reproductiva es detecta expressió generalitzada de l'activitat GUS en tots els òrgans de la planta, tot i que l'expressió més intensa es detecta en flors i fruits. En el panell A de la figura 31 es mostra una inflorescència en la que es pot apreciar clarament que l'activitat GUS s'expressa de manera generalitzada i molt intensa en tots els estadis florals i en els fruits, i més feblement en les tiges. En el panell B es presenta el detall d'una inflorescència secundària, que posa de manifest que l'expressió en flors té lloc des d'etapes molt inicials, i que l'expressió en fulles caulinars i en tiges és més baixa. D'altra banda, tot i que no es mostren les imatges, durant la fase reproductiva les plantes mantenen el mateix patró d'expressió d'activitat GUS en arrels i fulles de la roseta basal descrit en l'apartat anterior.

En observar amb detall una flor adulta (fig. 31.C), es pot apreciar que la tinció GUS és molt intensa en tots els òrgans florals. Els sèpals i els pètals presenten activitat GUS, que és més marcada en els feixos vasculars. Tant en l'aparell reproductor masculí com el femení es detecta una intensa activitat GUS. Els estams presenten tinció GUS en els filaments, en les anteres i en el pol.len. De fet, amb temps d'incubació més curts de les mostres en el tampó d'assaig GUS, s'observa que el primer lloc on es manifesta l'activitat GUS és en les anteres i en els grans de pol.len. El pistil presenta tinció GUS

en l'estigma, en l'ovari i, de forma més marcada, en l'estil. Després de la fecundació de l'ovari, el fruit manté l'expressió GUS durant tot el procés de maduració. En la figura 31.D es presenta un detall de la part superior d'una síliqua, en el que es pot apreciar expressió GUS en l'estigma, en l'estil, en els dos carpels, en el septe que separa els carpels i en els funicles que sostenen les llavors. La síliqua madura presenta també tinció GUS (fig. 31.E). Les llavors presenten activitat GUS en el teixit intern, encara que no es pot apreciar en les imatges dels fruits, ja que la coberta de la llavor impedeix l'accés del substrat. Aquesta activitat ha estat detectada assajant llavors seccionades manualment (imatges no mostrades).

En definitiva, l'anàlisi de les plantes transgèniques portadores de gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS* indica que la isoforma FPS1S d'*Arabidopsis* s'expressa de manera generalitzada a tots els òrgans de la planta i durant tot el desenvolupament, la qual cosa suggereix que l'enzim FPS1S és d'expressió constitutiva, i que probablement està implicat en la síntesi d'isoprenoides que desenvolupen funcions generals de caràcter bàsic en la planta, com poden ser, per exemple, els fitoesterols.

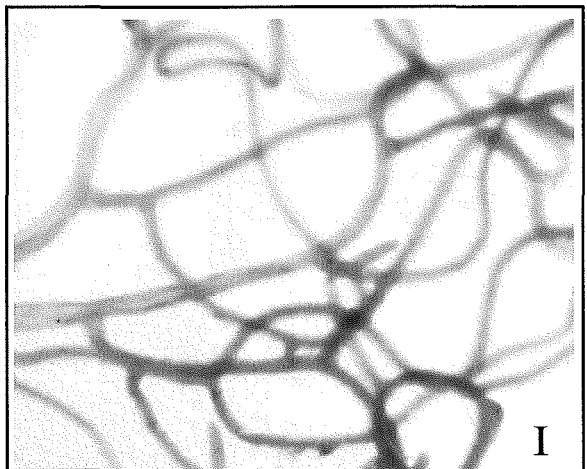
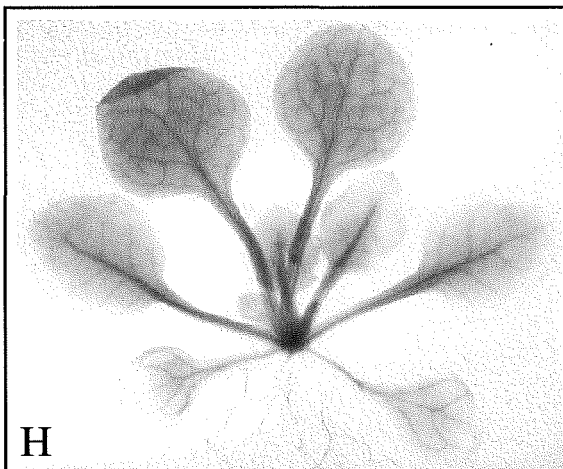
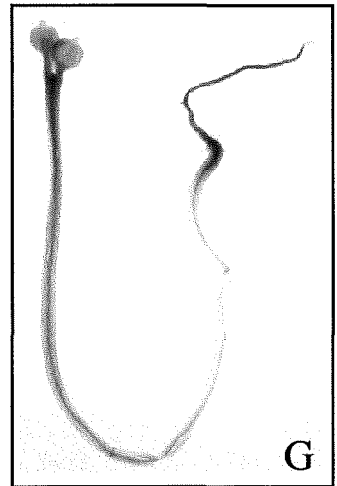
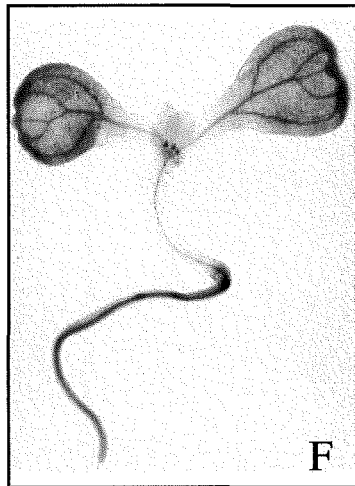
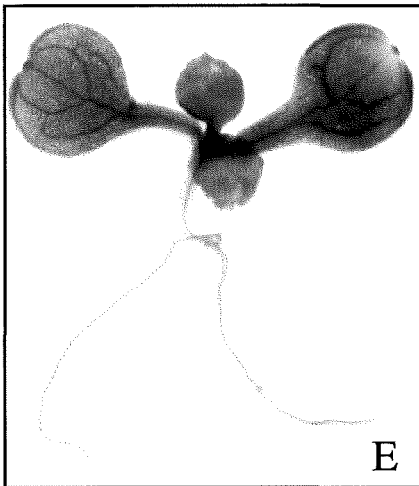
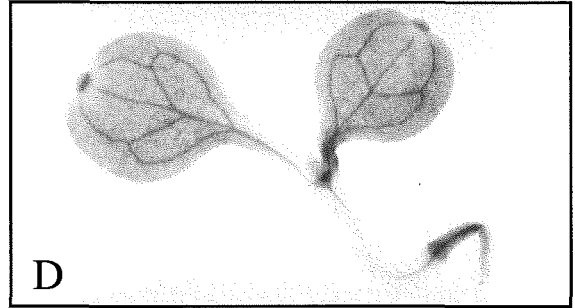
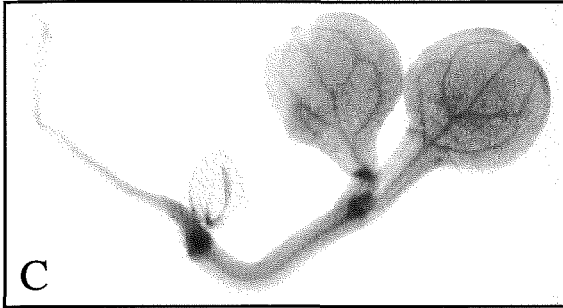
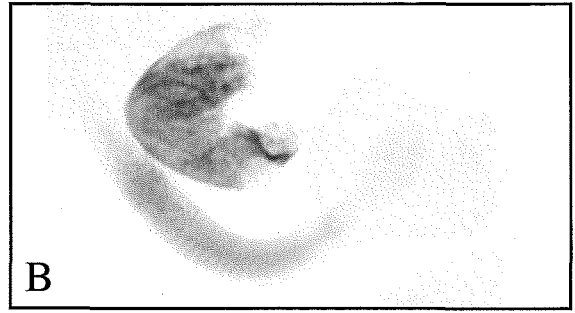
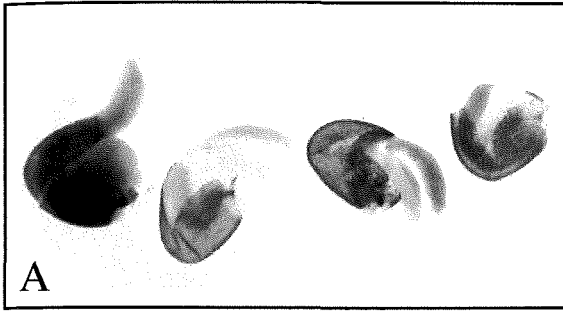
---

**Figura 30. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase vegetativa del desenvolupament en plantes d'*Arabidopsis* transformades amb el gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS*.** Les plantes van ser crescudes amb un cicle de 16 h llum:8 h fosc, excepte en el cas de la mostra del panell G, que va ser crescuda en fosc contínu. Les mostres van ser incubades durant 10 h en el tampó d'assaig GUS, excepte les mostres presentades en els panells D i F, que van ser incubades només 4 h en el mateix tampó. **A)** Llavors germinant (20 h). **B)** Plàntula de 36 h. **C)** Plàntula de 3 dies. **D)** Plàntula de 3 dies incubada durant 4 h en tampó d'assaig GUS. **E)** Plàntula de 4 dies. **F)** Plàntula de 4 dies incubada durant 4 h en tampó d'assaig GUS. **G)** Plàntula de 4 dies crescuda en condicions de fosc contínu. **H)** Planta de 15 dies. **I)** Detall de l'arrel d'una planta de 15 dies.

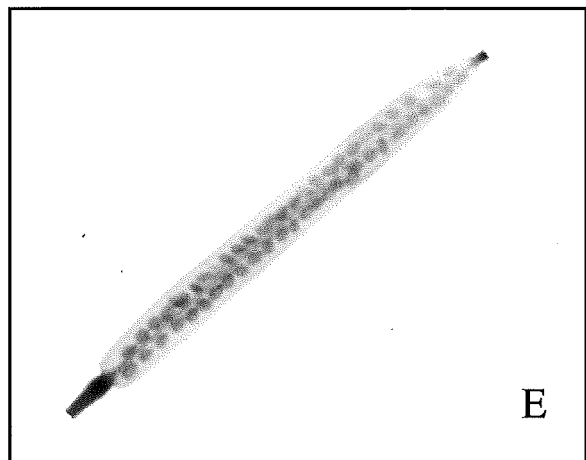
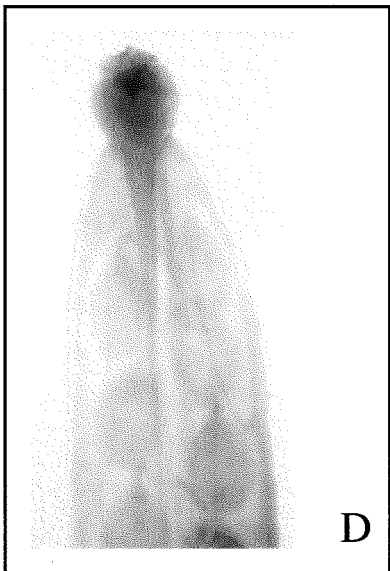
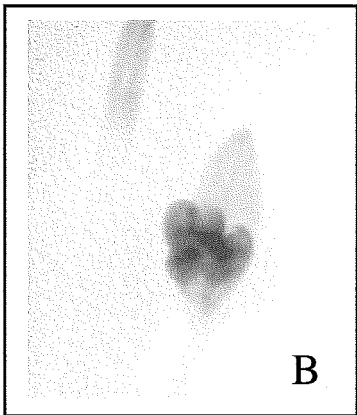
**Figura 31. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase reproductiva del desenvolupament en plantes d'*Arabidopsis* transformades amb el gen quimèric (-1476/+73)*FPSIS-GUS*.** Les mostres van ser incubades a 37°C durant 10 h en el tampó d'assaig GUS. **A)** Inflorescència, amb diferents estadis florals i un fruit. **B)** Inflorescència secundària amb estadis florals inicials i fulla caulinar. **C)** Detall d'una flor. **D)** Detall de la part superior d'un fruit. **E)** Síliqua madura.



RESULTATS

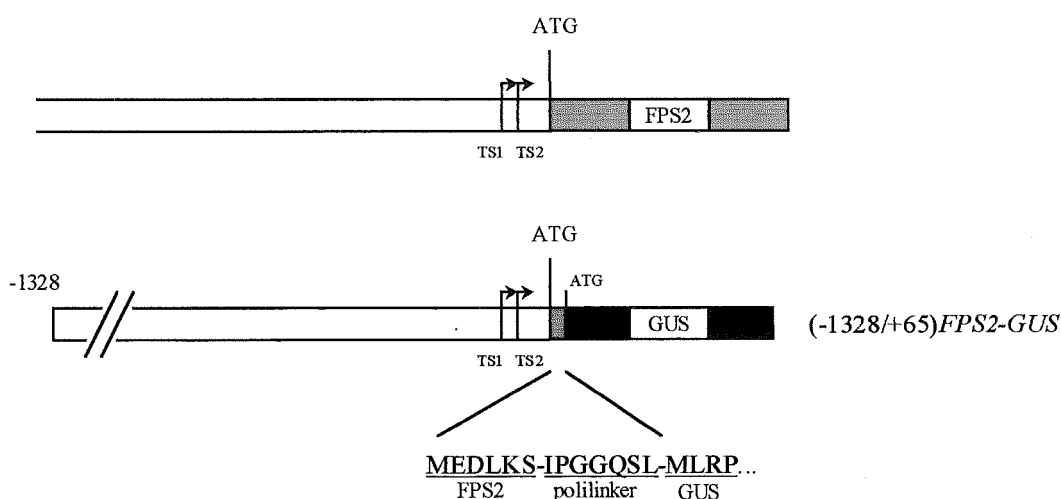


RESULTATS



## 5.2. Patró d'expressió del gen quimèric $(-1328/+65)FPS2-GUS$ en plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*.

El patró d'expressió del gen *FPS2* va ser determinat mitjançant l'anàlisi d'*Arabidopsis* transgèniques portadores del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  (fig. 32). Aquesta construcció conté la seqüència del gen *FPS2* compresa entre les posicions  $-1328/+65$  fusionada de forma traduccional amb la seqüència del gen *uidA*. Tal i com ja s'ha comentat en el cas de la construcció  $(-1476/+73)FPSIS-GUS$ , es va mantenir intacta la regió 5' transcrita no traduïda i la seqüència de l'entorn de l'inici de traducció, en previsió que poguessin influir en l'expressió del gen. En conseqüència, la proteïna resultant de l'expressió de la construcció  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  conté els 6 primers aminoàcids de la regió codificant de l'enzim *FPS2*, seguits de 7 aminoàcids codificats pel polilinker del vector d'expressió (pBI121), fusionats a l'extrem aminoterminal de la proteïna *GUS* (fig. 32).



**Figura 32.** Representació esquemàtica del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  utilitzat per generar plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*. A la part superior de la figura, es representa la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. A la part inferior, es representa el gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ . A sota de la construcció, es mostra la seqüència aminoacídica de l'extrem  $NH_2$ -terminal de la proteïna quimèrica resultant.

Com en el cas anterior, es van generar *Arabidopsis* transgèniques portadores del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  i es van seleccionar 10 transformants independents de la generació T<sub>1</sub>, en els quals es va comprovar la integració del transgèn mitjançant amplificació per PCR. Per dur a terme les amplificacions, es van utilitzar com encebadors l'oligonucleòtid antisentit pBIGUS2 i l'oligonucleòtid sentit FPSA, corresponent a la seqüència compresa entre les posicions -1131 i -1113 de la regió 5' del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*. Es va amplificar un fragment de DNA de 1286 pb, que va ser seqüenciat pels seus extrems per comprovar que corresponia a l'amplificació de la construcció  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ .

El patró d'expressió del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  va ser determinat mitjançant detecció histoquímica de l'activitat GUS en plantes transgèniques de la generació T<sub>2</sub>. L'anàlisi es va dur a terme en diferents estadis de desenvolupament i en diferents òrgans de les plantes. Tot i que es van observar diferències quantitatives d'activitat GUS entre les 10 línies de plantes estudiades, el patró d'expressió va ser el mateix en totes elles. Els resultats que es mostren a continuació corresponen a l'anàlisi de la línia transgènica 4.1.

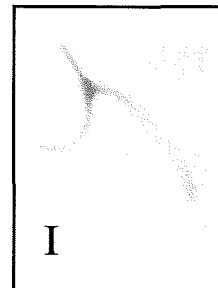
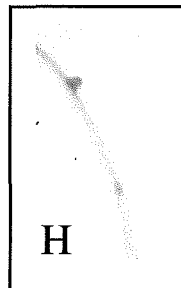
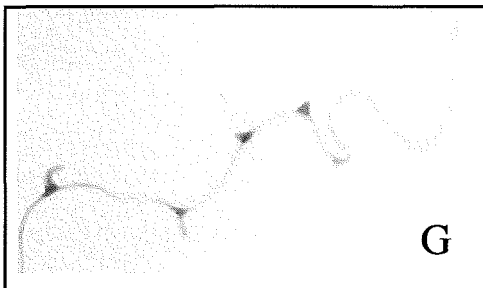
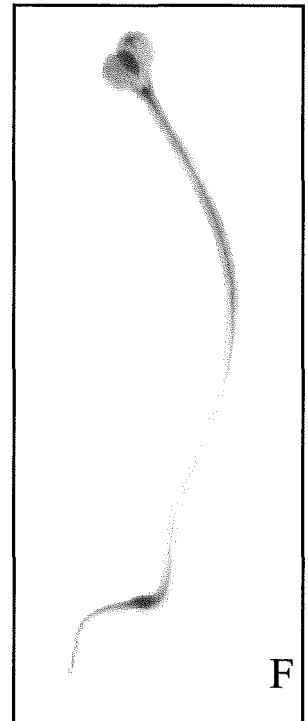
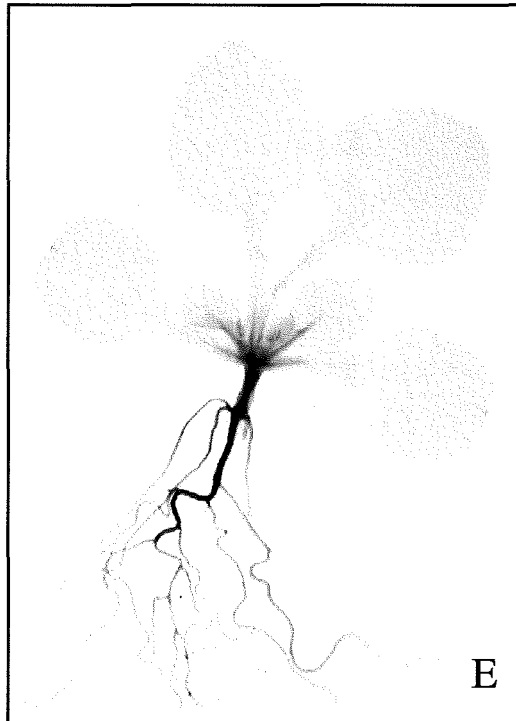
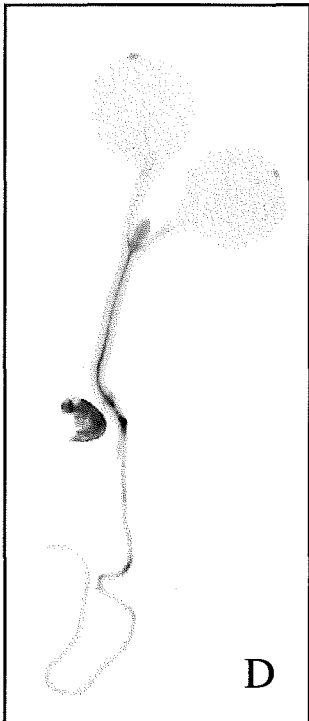
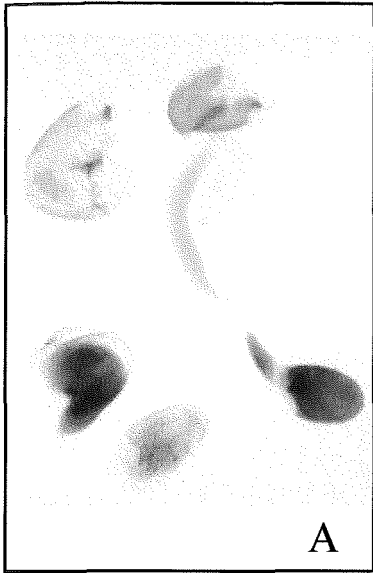
### 5.2.1. Patró d'expressió del gen quimèric $(-1328/+65)FPS2-GUS$ durant la fase vegetativa del desenvolupament de la planta.

El gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  s'expressa de forma generalitzada en tota la plàntula des de la germinació i fins aproximadament els dos dies de vida (fig. 33.

---

**Figura 33. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase vegetativa del desenvolupament en plantes d'*Arabidopsis* transformades amb el gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ .** Les plàntules van ser crescudes amb un cicle de 16 h llum: 8 h fosc, excepte el cas on s'indica que les plàntules van créixer en condicions de fosc continu (panell F). Les mostres van ser incubades a 37°C durant 24 h en el tampó d'assaig GUS. **A)** Llavors germinant i plàntula de 24 h. **B)** Plàntula de 2 dies. **C)** Plàntula de 3 dies. **D)** Plàntula de 4 dies. **E)** Planta de 15 dies. **F)** Plàntula de 3 dies crescuda en condicions de fosc continu. **G)** Detall de l'arrel principal d'una planta de 10 dies. **H i I)** Detall de l'aparició i elongació d'arrels secundàries.

RESULTATS



A i B). A partir d'aquest moment, l'activitat GUS dels cotilèdons comença a desaparèixer progressivament a mesura que la plàntula es desenvolupa (fig. 33.C), de manera que quan apareixen les primeres fulles únicament queda un remanent d'activitat a la base del pecíol (fig. 33.D). No s'ha observat activitat GUS en les fulles de la roseta basal de la planta, excepte en les fases inicials del seu desenvolupament (fig. 33.D i E). L'hipocòtil presenta expressió de l'activitat GUS en tots els estadis analitzats (fig. 33.C-E), fins i tot en la planta adulta (imatge no mostrada). L'anàlisi del patró d'expressió de l'activitat GUS en plàntules crescudes en condicions de foscor contínua (fig. 33.F) indica que no hi ha diferències significatives respecte el patró d'expressió observat en plàntules crescudes en condicions de llum (fig. 33.C).

Pel que fa referència a l'expressió del gen quimèric en arrels, es detecta activitat GUS des del moment de l'aparició de la radícula i durant tot el seu desenvolupament (fig. 33.A-I). En l'arrel principal, aquesta activitat GUS disminueix de forma gradual des de la zona de transició hipocòtil-arrel fins al meristem apical, on pràcticament no s'observa activitat GUS (fig. 33.E i G). No obstant, s'observa una expressió intensa de l'activitat GUS a les zones on emergeixen les arrels secundàries. Aquesta expressió s'inicia abans que l'arrel secundària aparegui com a tal (fig. 33.H), i es manté en la base d'aquesta mentre es desenvolupa (fig. 33.I). Com en el cas de l'arrel principal, l'expressió de l'activitat GUS en l'arrel secundària disminueix progressivament fins a ser pràcticament inapreciable en la zona apical (fig. 33.E i I). Aquest patró d'expressió en arrels es manté durant tot el desenvolupament de la planta.

### **5.2.2. Patró d'expressió del gen quimèric (-1328/+65)*FPS2-GUS* durant la fase reproductiva del desenvolupament de la planta.**

L'anàlisi de les plantes transgèniques durant la fase reproductiva del desenvolupament posa de manifest que el gen quimèric (-1328/+65)*FPS2-GUS* s'expressa principalment en les inflorescències (figures 34.A i 35.G i H), i que l'expressió de l'activitat GUS en els diversos òrgans de la flor és diferent segons l'estadi floral. Ja des dels estadis més inicials del desenvolupament floral, l'activitat GUS més intensa té lloc en les anteres i els grans de pol.len. De fet, quan les mostres

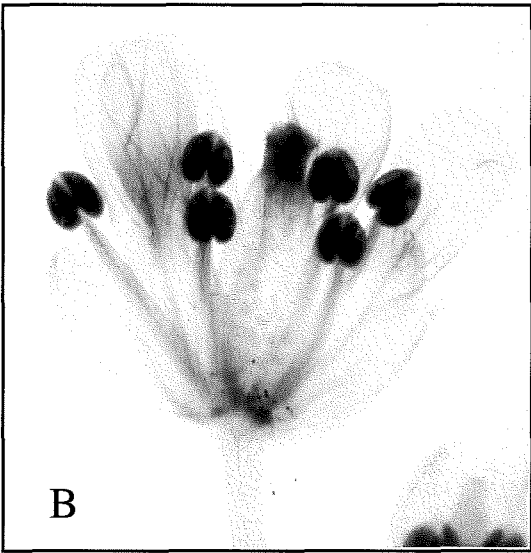
s'incuben durant menys temps (de 4 h enlloc de 24 h) en el tampó d'assaig GUS, únicament es tenyeixen les anteres i els grans de pol.len. Anteres i pol.len presenten activitat GUS intensa durant tot el desenvolupament floral. L'activitat GUS a sèpals, pètals i filaments dels estams es comença a detectar aproximadament en el moment de la pol.linització (fig. 34.B), i es manté fins l'abscisió d'aquests òrgans (fig. 34.D i E). Pel que fa referència a l'aparell reproductor femení, l'activitat GUS també s'inicia aproximadament en el moment de la pol.linització en l'estigma i l'estil (fig. 34.A). En l'ovari, l'activitat GUS es detecta únicament després de la pol.linització, i concretament només en el teixit de transmissió, en els funicles i en els primordis seminals (fig. 34.C-E). L'activitat GUS que es detecta en el teixit de transmissió i en els funicles pot ser deguda a l'expressió d'activitat GUS que té lloc en els tubs pol.línics, que passen a través d'aquests teixits per arribar a fecundar els òvuls.

---

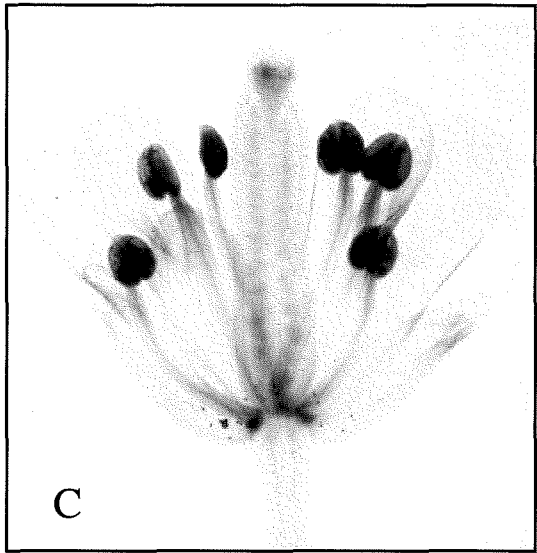
**Figura 34. Localització histoquímica de l'activitat GUS en diferents estadis florals de plantes d'*Arabidopsis* transformades amb el gen quimèric (-1328/+65)*FPS2-GUS*.** Les mostres van ser incubades a 37°C durant 24 h en el tampó d'assaig GUS. **A)** Inflorescència amb diferents estadis florals. **B)** Flor en l'estadi de pol.linització. **C)** Flor amb ovari sobrepassant les anteres després de la pol.linització. Inici de la formació dels tubs pol.línics a l'interior de l'ovari. **D)** Abscisió de sèpals i de pètals de la flor. Inici de la fecundació dels òvuls. **E)** Final de l'abscisió de sèpals i pètals. Ovari amb els primordis seminals.



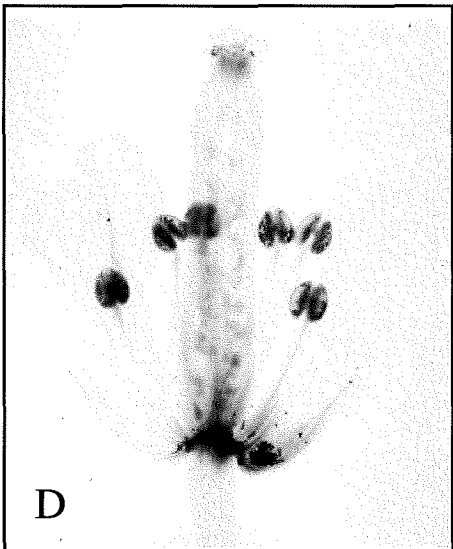
A



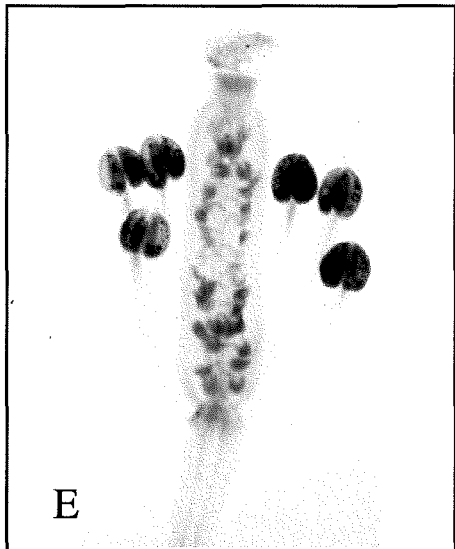
B



C



D



E



L'expressió de l'activitat GUS durant la fructificació es mostra a la figura 35 (imatges A-F). En cap moment s'ha detectat activitat GUS en els carpels. Els primordis seminals fecundats presenten activitat GUS durant els estadis inicials de la formació de la llavor (fig. 35.A). No s'ha pogut determinar si durant la maduració de la llavor hi ha expressió d'activitat GUS, ja que la coberta de la llavor impedeix l'accés del substrat (fig. 35.B-F). En canvi, s'ha detectat activitat GUS a l'interior de la llavor madura, que s'ha posat de manifest incubant en tampó d'assaig GUS llavors seccionades manualment (imatges no mostrades). D'altra banda, a mesura que el fruit madura, s'observa que l'expressió en l'estil disminueix mentre que es manté en l'estigma. En la síliqua madura, únicament es detecta activitat GUS en les papil·les estigmàtiques (fig. 35.E i F).

També s'ha detectat expressió intensa del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  en la zona d'abscisió dels òrgans florals. Aquesta expressió s'inicia a la base dels estams laterals aproximadament durant la pol·linització (fig. 34.B) i es manté durant tot el procés de maduració de l'ovari, fins i tot quan la síliqua és madura (fig. 34.B-E i 35.A-E).

Finalment, s'ha detectat activitat GUS en les axil·les formades per la tija, tant amb els peduncles de flors i de fruits com amb les tiges secundàries. Com es pot apreciar en les imatges 35.G i H, hi ha una gradació d'intensitat d'activitat GUS en les axil·les, que és més intensa en les axil·les formades amb les tiges secundàries, seguida de les formades amb els peduncles dels fruits, per acabar amb les axil·les formades amb els peduncles de les flors, que és més feble com més jove és la flor. En el mateix panell H també es pot observar que no hi ha expressió GUS ni en les tiges ni en les fulles caulinars.

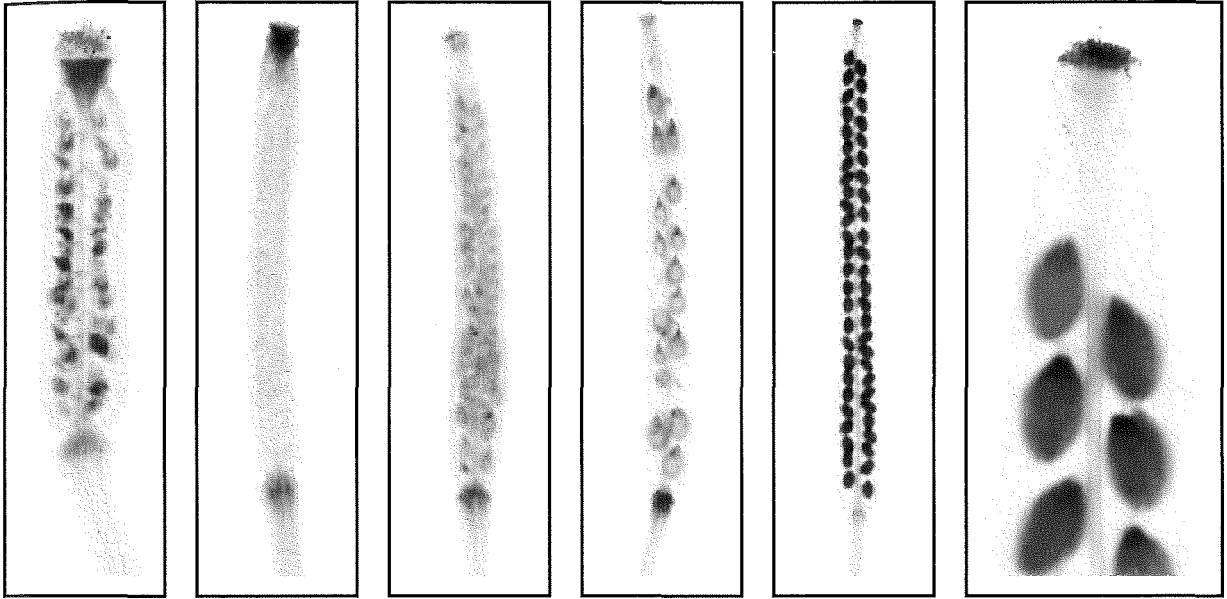
Els experiments de Northern blot havien indicat prèviament que l'mRNA del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* s'expressa fonamentalment en flors, tot i que també en la resta d'òrgans, encara que de manera més feble. Per tant, el patró d'expressió espacial i temporal del gen *FPS2* determinat amb l'anàlisi de les plantes transgèniques portadores del gen quimèric  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  està d'acord amb els resultats del Northern

blot. A la vegada, però, l'anàlisi d'aquestes plantes transgèniques ha posat de manifest nous aspectes del patró d'expressió del gen *FPS2*, ja que ha permès definir les regions de la planta i els estadis concrets on té lloc aquesta expressió. En particular, és destacable l'elevada expressió del gen *FPS2* en anteres i grans de pol.len. En definitiva, el fet que el gen *FPS2* presenti un patró d'expressió restringit a regions i estadis de desenvolupament de la planta molt concrets suggereix que l'enzim FPS2 probablement està implicat en la síntesi d'isoprenoides que desenvolupen funcions especialitzades en la planta.

---

**Figura 35. Localització histoquímica de l'activitat GUS durant la fase reproductiva del desenvolupament en plantes d'*Arabidopsis* transformades amb el gen quimèric (-1328/+65)*FPS2-GUS*. Diferents estadis de la fructificació. Les mostres van ser incubades a 37°C durant 24 h en el tampó d'assaig GUS. A) Ovari fecundat. B, C i D) Diferents estadis de desenvolupament del fruit. E) Síliqua madura. F) Detall de la part superior d'una síliqua madura. G) Inflorescència. H) Detall d'una tija secundària amb fulla caulinar.**

RESULTATS



A

B

C

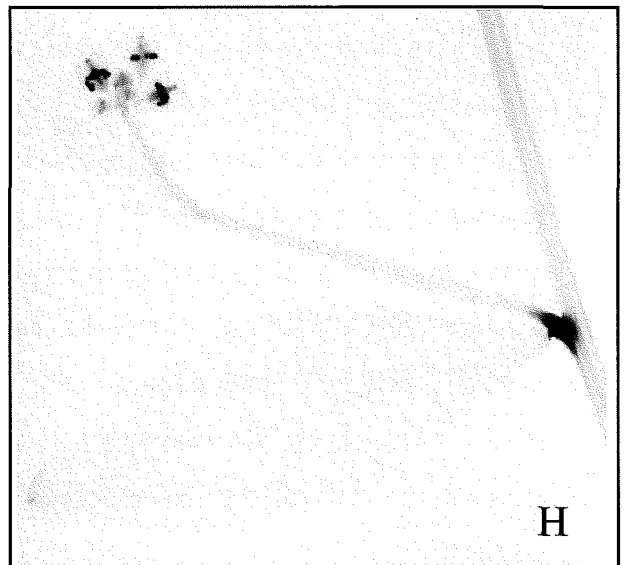
D

E

F



G



H

## **6. ANÀLISI DE LES REGIONS 5'-FLANQUEJANTS DELS GENS *FPS1* I *FPS2* D'*Arabidopsis thaliana*.**

En l'anterior apartat de la memòria s'ha posat de manifest que la regió -1476/+73 del gen *FPS1* i la regió -1238/+65 del gen *FPS2* tenen capacitat per dirigir l'expressió del gen *uidA* d'*E. coli* en *Arabidopsis*. Amb la finalitat d'identificar regions implicades en el control de l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2*, es va procedir a realitzar experiments d'expressió transitòria en protoplastes i d'expressió estable en plantes transgèniques de construccions que contenen versions progressivament delecionades per l'extrem 5' de les regions 5'-flanquejants dels gens *FPS1* i *FPS2* fusionades de forma traducciona a la seqüència del gen marcador *uidA*.

### **6.1. Estudis d'expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1*.**

Per identificar regions implicades en el control de l'expressió del gen *FPS1*, es van dur a terme estudis d'expressió transitòria en protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* de construccions que contenen fragments progressivament delecionats per 5' de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* (fig. 36) fusionades de forma traducciona al gen marcador *uidA*, en el vector pBI221. En totes les construccions analitzades, la fusió realitzada és idèntica a la fusió detallada a l'apartat 5.1 de Resultats (fig. 29) del gen quimèric (-1476/+73)*FPS1S-GUS*. En conseqüència, les construccions permeten detectar únicament l'activitat GUS de la proteïna quimèrica generada per traducció a partir de l'ATG utilitzat com inici de traducció de la isoforma *FPS1S*. Per aquesta raó, quan en aquest apartat es parla de promotor o regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* es fa referència a la regió que dirigeix l'expressió de la isoforma *FPS1S*.

L'esquema de les construccions utilitzades i els resultats dels experiments d'expressió transitòria en protoplastes es mostren a la figura 37. La construcció referència a la qual es va assignar activitat 100 conté la seqüència genòmica que s'extén entre les posicions -1476/+73 del gen *FPS1*, que és la mateixa regió utilitzada per

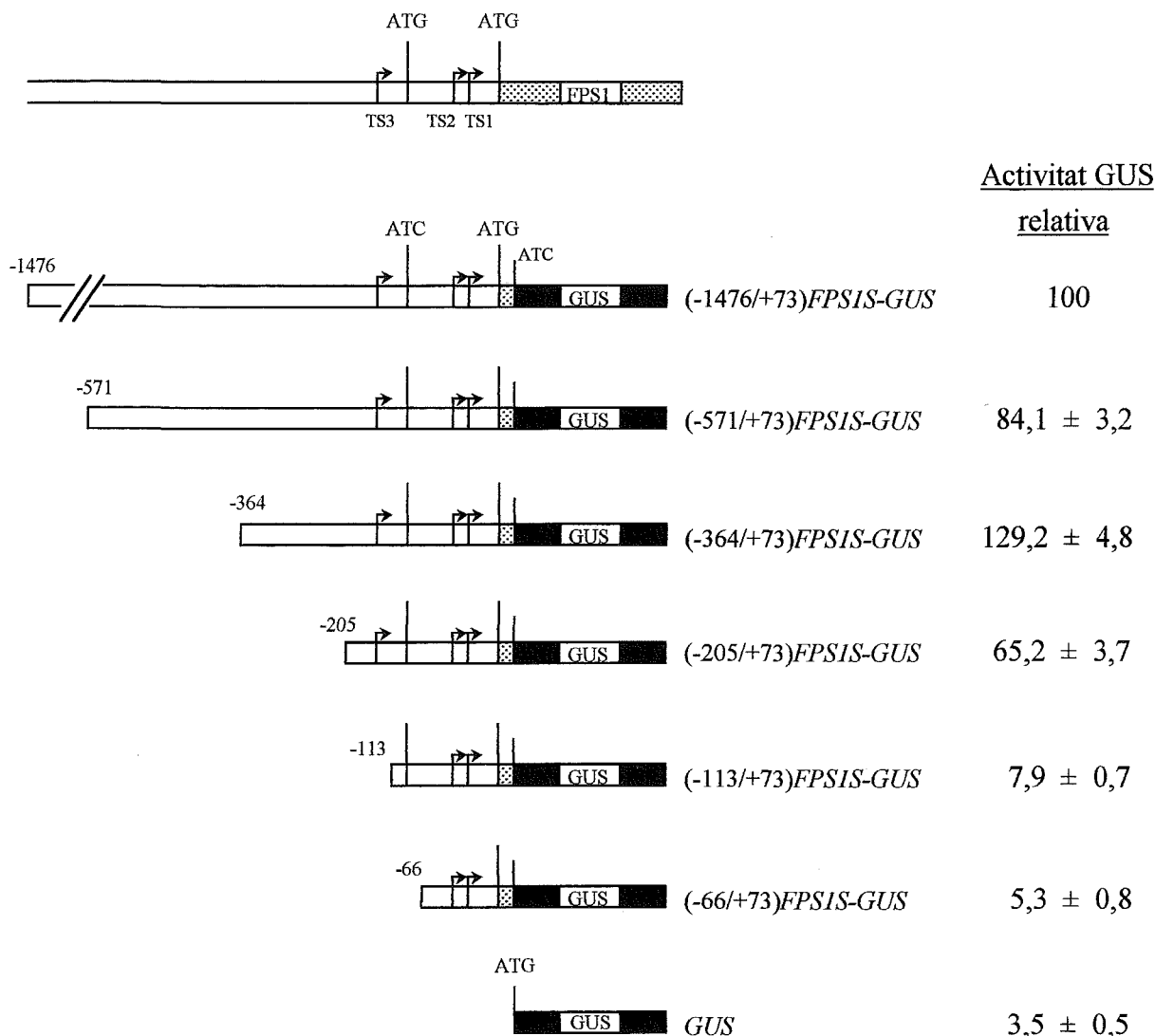
RESULTATS

```

-1476          AAGCTTATAGTAGTTAATGTTGGGGTCTAGTCCAAC
-1440  TACAACCTGCCACCTGTCACAGGAAGTCATGAAGAAATATACAACATTAGAACCTAGA
-1380  GCAAAAGAGAATAAGAAAAACGCAAGATTGGAGAAGGAATCAAAGTCTTATGGCCCATTA
-1320  CACTTTTATCATGTTCAAAGAGAGAGTTTGATTTCATTGTGCCTTCTTTTCACCATCTT
-1260  CCTGCATGGAAGCAAATACTGCTTCAGATAGACAGAGGAATTCAAATTATACAATTTTGG
-1200  TTGGTTTAAAAACACAGGAGCAGTAAGTATCAAACATCTTGTACAATGATATGAGTCCTC
-1140  AGAGTGACCAAAACATGACCTGATCAAACATATAACAAAAGGAAGACTACTTACAGGAC
-1080  CACCAAGACCTGTAAAACCGGCAATCTGCAGCTCCTCAAGAACCCTCTCCACCAATCA
-1020  CATAAACCTACAAAAGCAAACACGAAAGGAAAAAAAGTGAGAAAAAGATGACGATAGAG
-960   AGACATAAGCCAATGTGTCAGTCGAAGTAGAACCTTCTTGTCTTAGGAAAGTTATTGAC
-900   TTTGAGATACATAGCTGCCGCAAATGACGAAGAGAAGATCTCATCCTTCCAAAGTAATCA
-840   CTTTTTTTTGTTTTAGTTTTAATGGTAATCACAAAGTAATACGAAGAAGGAGAAGTCAAAG
-780   TTTACCTGAGTAATAGAAGTGACACCCAAAGATCGGAACTTTTCAGCGTATTGCCTCCTC
-720   GATTTTACGGAATTGTTGGTCACAAAGACAACATTTTTACCCTGAAAATCGCAAAAGATC
-660   AGAGAGAGAGAGACTGAAAAGGAATAGAGAGTGGGGAAAAGGGAAAGCACCTTAGAACGG
-600   ATAAGGTCGAGAGTTTGGGAGACGCCATCGATGAGCGTTTCACCCTTCCATATAACACCT
-540   GAATCGAATCATCATCCATCATCAGAGTAGTAACTAAAGAGGATAACAATCGAATGGAAG
-480   AAAGTAGAATCTACCATCGCAGTCGAAGAGGAACGTATCGACAGAGTCAAAGAGAGATTT
-420   GAAGTTACTGGAGGAGAGAAGCTGAGGCGCCATTGGAGGAGTGTCTTCTTCTTCTTCTC
-360   TGGGAATTGATCACTCTGGTAAAGCACAATTGGCACGTCCAAAACGACACCGTTCCATCG
-300   AAAGAGGCCACATTGTGATTGGTGAGCCCAATTAGGAAGGCCTATTTAACTAATGTTGAA
-240   GCACATGTTGTACTATAAAAAACAGAGTTTATTATCTGTTTCTTTGGCTTGACATGACA
-180   AATGTACAACCTGGGAGAGAAAGTCAGTCCGATTGTGTTGGGGATGACGATGGCAAAAGTA
-120   GTAAATAAGGAAGAAACAGGAGGGGCGTTTTTCGGGAGAAGAAGGAGGAATATGAGTGTGA
-60   GTTGTGTTGTAGGAATCTGGGAAAGACAATAAAAAAGGCAATACCTTCACATCATTTCG
+1     ▼ATCTGAGAAGTCTTGGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCGTATCCAAAGCTCTTCAATGGAGA
+61   CCGATCTCAAGTC

```

**Figura 36.** Seqüència nucleotídica de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* d'*Arabidopsis thaliana*. Els inicis de transcripció del gen *FPS1* s'indiquen amb triangles negres invertits. La posició +1 s'ha assignat a l'inici de transcripció TS1. Els codons ATG inici de traducció s'indiquen en negreta. Els extrems 5' de les construccions progressivament deleccionades analitzades en els experiments d'expressió transitòria s'indiquen amb fletxes.



**Figura 37.** Anàlisi mitjançant expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments delecionats per l'extrem 5' de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* d'*Arabidopsis* fusionades al gen marcador *uidA*. Les construccions analitzades es representen de forma esquemàtica. Les fletxes indiquen els inicis de transcripció del gen *FPS1* (TS1, TS2 i TS3). Els codons ATG utilitzats com a inici de traducció de la isoforma FPS1L i de l'enzim GUS han estat substituïts per codons ATC. La posició +1 s'ha assignat a l'inici de transcripció més intern (TS1). A la dreta, es presenten els resultats dels experiments d'expressió transitòria. Els valors d'activitat GUS estan expressats respecte la construcció  $(-1476/+73)FPSIS-GUS$ , a qui s'ha assignat valor 100 d'activitat GUS, i que ha estat utilitzada en tots els experiments de transfecció. Els valors d'activitat GUS han estat obtinguts com a mitjana  $\pm$ SD d'un mínim de tres experiments diferents. Com a control negatiu s'ha utilitzat un vector derivat del pBI221 al qual s'ha eliminat la seqüència del promotor 35SCaMV.

determinar el patró d'expressió de la isoforma FPS1S en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* (apartat 5.1). Aquesta construcció s'ha utilitzat en tots els assajos de transfecció. Com a control negatiu, s'ha utilitzat un vector derivat del pBI221 que no conté el promotor del virus del mosaic de la coliflor (35SCaMV).

Com es pot observar en la figura, quan la regió 5'-flanquejant del gen *FPSI* es delecciona fins la posició -571, es produeix una lleugera devallada de l'activitat, que disminueix fins valors del 84% de l'activitat de la construcció (-1476/+73)*FPSIS-GUS*. En canvi, l'eliminació de la regió compresa entre les posicions -571 i -364 provoca un increment d'activitat GUS del 30% respecte l'activitat de la construcció de referència. Quan la regió 5'-flanquejant es delecciona fins la posició -205, l'activitat GUS torna a disminuir fins aproximadament un 65% de l'activitat de la construcció de referència. No obstant, cal destacar que la construcció (-205/+73)*FPSIS-GUS* té només la meitat de l'activitat de la construcció immediatament més llarga (-364/+73)*FPSIS-GUS*. Eliminar la regió 5'-flanquejant compresa entre les posicions -205 i -113 produeix una dràstica disminució de l'activitat del promotor, ja que l'activitat GUS cau fins valors inferiors al 10% de l'activitat de la construcció (-1476/+73)*FPSIS-GUS*. L'activitat disminueix encara més en assajar la construcció (-66/+73)*FPSIS-GUS*, que presenta valors d'activitat GUS pràcticament iguals als del control negatiu.

En conjunt, aquests resultats indiquen que, en aquest sistema, diverses regions de la regió 5'-flanquejant del gen *FPSI* són necessàries per modular l'activitat transcripcional. La regió del gen *FPSI* compresa entre les posicions -571 a -364 conté elements que influencien l'activitat del promotor, i en particular, entre les posicions -571 a -364 es localitza algun possible element regulador negatiu de l'expressió. No obstant, els elements més importants implicats en l'expressió quantitativa del promotor en aquest sistema estan compresos en un fragment de 437 pb de la regió 5'-flanquejant del gen, situat entre les posicions -364 i +73. Més concretament, la regió compresa entre les posicions -205 i -113 conté elements *cis* crítics per l'activitat de la regió 5'-flanquejant del gen *FPSI*. Aquests resultats no descarten que en la regió -113/+73 també es localitzin elements necessaris per l'expressió del gen *FPSI*.

## 6.2. Estudis d'expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2*.

Amb la finalitat d'identificar regions implicades en el control de l'expressió del gen *FPS2*, es van dur a terme estudis d'expressió transitòria en protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* (fig. 38) fusionades de forma traduccional al gen marcador *uidA* en el vector pBI221. En totes les construccions analitzades, la fusió realitzada és idèntica a la fusió de la construcció  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  detallada a l'apartat 5.2 Resultats (fig. 32). L'esquema de les construccions utilitzades i els resultats obtinguts de l'anàlisi de l'expressió transitòria es mostren a la figura 39. La construcció referència a la qual es va assignar activitat 100 conté la seqüència genòmica que s'extén entre les posicions  $-1328$  i  $+65$  del gen *FPS2*, que és la mateixa regió emprada per determinar el patró d'expressió del gen *FPS2* en plantes transgèniques d'*Arabidopsis*. Aquesta construcció ha estat utilitzada en tots els experiments de transfecció. Com a control negatiu, s'ha utilitzat un vector derivat del pBI221 que no conté el promotor 35SCaMV.

Tal com es pot apreciar en la figura 39, l'eliminació de la regió d'1,2 kb compresa entre les posicions  $-1328$  i  $-111$  del gen *FPS2* no afecta l'activitat del promotor, ja que quan s'analitzen les construccions  $(-533/+65)FPS2-GUS$ ,  $(-260/+65)FPS2-GUS$  i  $(-111/+65)FPS2-GUS$  s'observa que presenten la mateixa activitat GUS que la construcció de referència  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ . En canvi, l'activitat GUS pràcticament es perd quan s'assaja la construcció  $(-61/+65)FPS2-GUS$ , en la qual s'han deletat 50 pb de la regió 5'-flanquejant respecte la construcció  $(-111/+65)FPS2-GUS$ . L'activitat disminueix encara més en assajar la construcció  $(-35/+65)FPS2-GUS$ , que presenta valors d'activitat GUS pràcticament iguals als del control negatiu.



RESULTATS

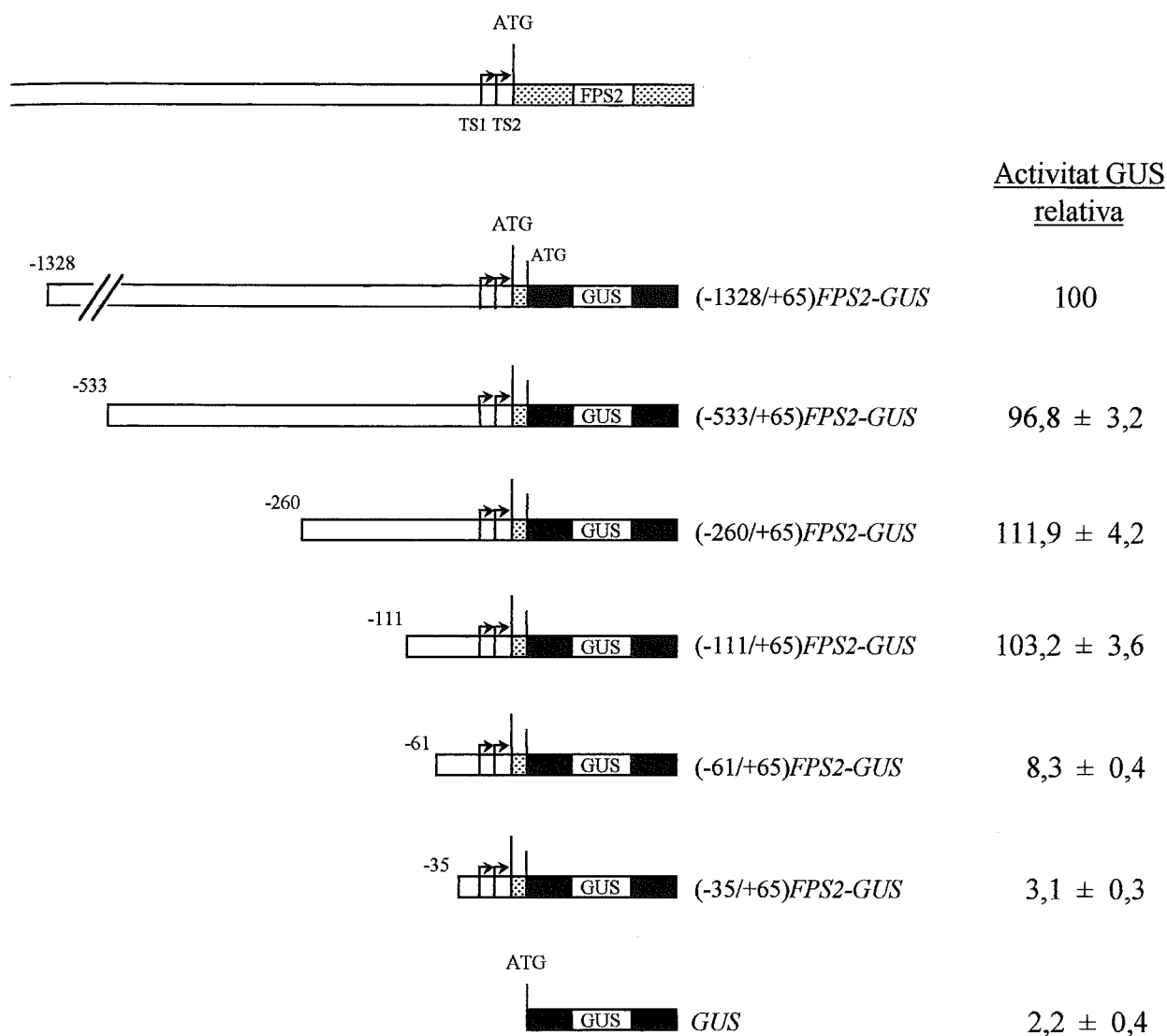
```

-1328                                     ▶ AAGCTTGG
-1300   AGCATAAGAAGACCACACAAGTGGGCAACAATACACGTAGGGGTCAGGTTTACGAGATC
-1260   GGGAGCTTCCCGGAGAGTCGCGGATTTGAAGTATCCGTCTTGTCCAATGATGTAAGCTGT
-1200   CGGGTAGCGGCGGTTTCGGTTTTCTACTCTTGGGTTAAACAAGTCTGAATTAAAAAATAC
-1140   AGCGACTTTGTCTCTTTCGTCAATAAAGAAGCTCCAGCTTCATCATCGAACTGACAACC
-1080   AGTGGGTGGTTCATATCCACTGACAAAAACATGCTCCAGGACACCGCAGTGGGATCGAT
-1020   CTTAGTGGTTACCCAAATCTCCCATGTTTTCAAACCGCTGATATAACACCGCAAGCTGATC
-960    ATCTCTAACACAAGATATAGCCACAGTTTCCAAAACATCAGAGTGAAATGGCAGAGGAAG
-900    ACGCGGTCCAAACCTCTCTGTATGAAAATCAAACAGAGTAAAAACTTTTCAATCTCATC
-840    TACTATTCTTCTTCTTCTCTCCCTCCACAATTATCTTCTCTTGAGCAAGAAAATAAGTGTTT
-780    CCATTCAAAGACACGCTCTGTTGATGAAACGGTATATGGCAGTCGGGACTGACATCAAGA
-720    ACCCTCCATGAATCAGAGCTAAAGTGGTAGATTTGGTAACCAAAAAGGTGCCCTGTATCA
-660    TAGTTCATCAAGATTTTGTAGTTGTGGTTATTGTCATATCCGAGAGCGTACCATTGAGT
-600    TTGTTAAACCTTTTTTCTTGGTTTGATAAACCTTGTGTTGCCCTAAATAAGGATTCACAC
-540    TAGAAGCTCGAGTTGTCCCTTACCGACGCATAACAACAACCATCGCATTGAAGGACTTTA
-480    GATACCTCGATTTGCCAAGTTTAGCAATTTCCCTTTATACATGGCTCAACAAAGTCATGT
-420    CCGTTGTTTCGGATTCCTTGGAGATCAAACCTCATTGAACAAACCCTAGAATCCATCATC
-360    GTGAATCCCATAAACTGCTTCCCTGCTGCTTTAAAGAAAATCCCTTCTTTGGATAAAGCG
-300    TTCCACATTTTGCAAGTACACCGTACTGAAATCAAAGATGTCATCGGAACCCCTAGTGAGA
-240    ATCTCCCCTACCAAATCTGGTGAAAGATCAGACATTGTCGTCATCCTTTGAAACTCTGCA
-180    ATACAAAATTAGGGGTTTAGAGTTGTTTAAAAATGTTTCCCCATTTACGTACATTTTA
-120    TATACTGTACTTCTGAGATAAGCAGGCCTTAGACGGCTCAATTAATGGGCCACAAAAAG
-60    CCCATTTAAAGAACGTCACGTGACGCGATATAAGCATGATCCGAGGAACACACTTAAAC
+1    ▼ AATCAGGTTCCACATTTGGCTTTGCACACCTTCCTTGATCCTATCAATGGCGGATCTGAA
+61    ATCAA

```

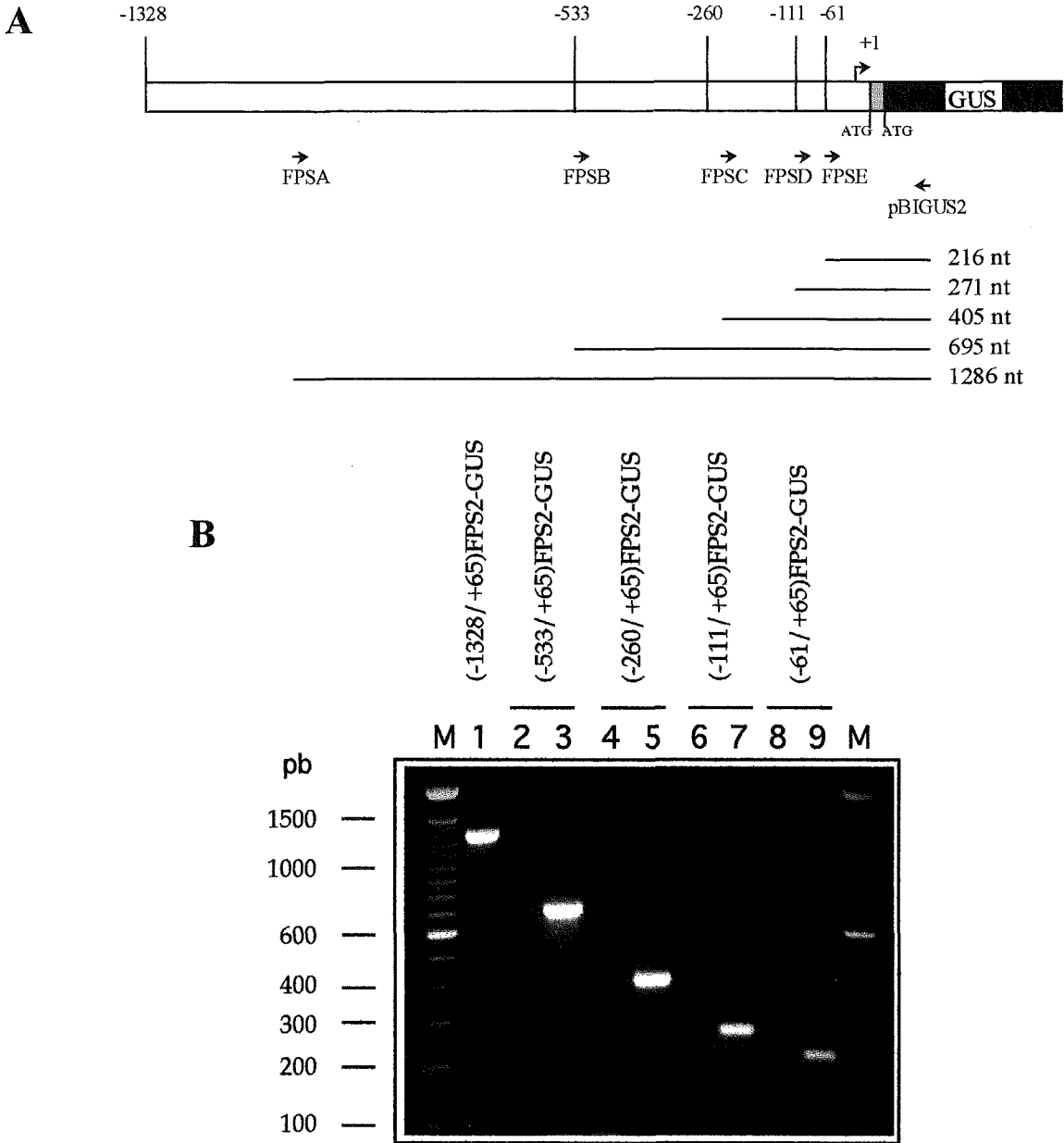
**Figura 38.** Seqüència nucleotídica de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* d'*Arabidopsis thaliana*. Els inicis de transcripció s'indiquen amb triangles negres invertits. La posició +1 s'ha assignat a l'inici de transcripció TS1. Les seqüències TATA s'indiquen amb subratllat. El codó ATG inici de traducció s'indica amb negreta. Els extrems 5' de les construccions progressivament delecionades analitzades en els experiments d'expressió transitòria s'indiquen amb fletxes.

RESULTATS



**Figura 39.** Anàlisi mitjançant expressió transitòria en protoplastes de construccions que contenen fragments deletionats per l'extrem 5' de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* fusionats al gen marcador *uidA*. Les construccions analitzades es representen de forma esquemàtica. Les fletxes indiquen els inicis de transcripció del gen *FPS2* (TS1 i TS2). La posició +1 s'ha assignat a l'inici de transcripció TS1. A la dreta, es presenten els resultats dels experiments d'expressió transitòria. Els valors d'activitat GUS estan referits a la construcció (-1328/+65)FPS2-GUS, a qui s'ha assignat valor 100 d'activitat GUS, i que ha estat utilitzada en tots els experiments de transfecció. Els valors d'activitat GUS han estat obtinguts com a mitjana ±SD d'un mínim de tres experiments diferents. Com a control negatiu, s'ha utilitzat un derivat del vector pBI221 al qual s'ha eliminat la seqüència del promotor 35SCaMV.

RESULTATS



**Figura 40. Comprovació per PCR de la integració dels diferents transgens en les plantes transformades amb construccions que contenen fragments de la regió 5' del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*.** **A)** Representació esquemàtica dels encebadors utilitzats en les amplificacions per PCR, i fragments resultants de l'amplificació. A la part superior, es representa la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2* fusionada de forma traducciona a la seqüència del gen *uidA*. Els encebadors es representen amb caps de fletxa. Els fragments amplificats es representen amb línies, a la dreta de les quals s'indica la mida amb nucleòtids (nt). **B)** Electroforesi on es mostren els productes resultants de l'amplificació per PCR de DNA genòmic de les diferents plantes transgèniques (indicades a la part superior). En tots els casos, l'encebador antisentit utilitzat ha estat pBIGUS2. L'encebador sentit utilitzat és FPSA en els carrils 1 i 2; FPSB en els carrils 3 i 4; FPSC en els carrils 5 i 6; FPSD en els carrils 7 i 8; FPSE en el carril 9. Carrils M: marcador molecular de DNA, que és 100 pb ladder® (GIBCO-BRL).

amb la construcció  $(-61/+65)FPS2-GUS$ , en les que es va comprovar per PCR la integració del transgèn corresponent. Amb tal finalitat, DNA genòmic de les plantes va ser utilitzat com a motllo per dues amplificacions (veure fig. 40.A). L'encebador antisentit utilitzat en els dos casos era l'oligonucleòtid pBIGUS2, complementari a la seqüència compresa entre les posicions +51 a +70 del gen *uidA*. En l'amplificació corresponent al control positiu d'integració del transgèn, l'encebador sentit corresponia a la seqüència de l'extrem 5' de la construcció quimèrica estudiada. En l'altra amplificació, corresponent al control negatiu, l'encebador sentit corresponia a la seqüència de l'extrem 5' de la construcció immediatament més llarga. En la figura 40, es mostra el resultat de les amplificacions de PCR realitzades amb DNA genòmic d'una planta representativa de cada grup de plantes transgèniques portadores del mateix gen quimèric.

Es va determinar el patró d'expressió dels diferents gens quimèrics mitjançant detecció de l'activitat GUS per tinció histoquímica en les diferents línies de plantes transgèniques de la generació  $T_2$ . L'anàlisi es va dur a terme en diferents estadis del desenvolupament i en diferents òrgans de les plantes. En paral·lel, es van analitzar plantes transformades amb la construcció de referència  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ . L'anàlisi histològica de l'activitat GUS en les plantes transgèniques va posar de manifest que les línies de plantes portadores dels gens quimèrics  $(-533/+65)FPS2-GUS$ ,  $(-260/+65)FPS2-GUS$  i  $(-111/+65)FPS2-GUS$  presentaven el mateix patró espacial i temporal d'expressió d'activitat GUS que les plantes portadores de la construcció  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ . No es mostren imatges perquè són idèntiques a les imatges mostrades a les figures 33, 34 i 35. En canvi, cap de les plantes portadores del transgèn  $(-61/+65)FPS2-GUS$  va mostrar activitat GUS en cap teixit ni en cap estadi analitzat.

Per tant, aquests resultats, conjuntament amb els resultats de l'expressió transitòria en protoplastes, posen de manifest que la totalitat dels elements implicats en el control de l'expressió quantitativa i qualitativa del gen *FPS2* es troba compresa en la regió de 176 pb situada entre les posicions -111/+65 del gen. A més, el fet que la construcció  $(-61/+65)FPS2-GUS$  no presenti activitat GUS ni en protoplastes ni en plantes transgèniques indica que la regió de 50 pb compresa entre les posicions -111 i

-61 conté elements fonamentals per dirigir l'expressió del gen *FPS2*, tot i que no és possible establir si es tracta d'elements implicats únicament en l'expressió quantitativa o bé si també inclou elements que participen en el control de l'expressió qualitativa. No es descarta que la regió -61/+65 contingui també elements necessaris per l'expressió del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*.

**DISCUSSION**

## 1. *Arabidopsis thaliana* CONTÉ UNA PETITA FAMÍLIA MULTIGÈNICA QUE CODIFICA FPS.

La caracterització molecular de l'enzim farnesildifosfat sintasa en *Arabidopsis thaliana* va ser iniciada determinant la complexitat genòmica d'*Arabidopsis* per FPS. Mitjançant experiments de Southern blot genòmic, s'ha demostrat que *Arabidopsis* conté una petita família multigènica composta com a mínim per dos gens, els gens *FPS1* i *FPS2*. Aquests dos gens han estat clonats i caracteritzats. Els dos gens presenten una organització molt similar pel que fa referència a la mida dels exons i a la posició dels introns, i mostren una elevada similitud en la seva seqüència nucleotídica, no només en les regions codificants, sinó també en les seqüències intròniques. Aquest conjunt d'observacions indica que els dos gens probablement s'han originat a partir d'una duplicació recent d'un gen ancestral comú.

Fins l'actualitat, els gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* són les úniques seqüències genòmiques de farnesildifosfat sintasa de plantes clonades i caracteritzades. Per aquesta raó no és possible comparar l'organització dels gens d'*Arabidopsis* amb cap altre gen FPS de plantes. No obstant, sí estan clonades diverses seqüències genòmiques que codifiquen FPS en fongs. En el cas dels gens FPS de *Neurospora crassa* i *Gibberella fujikuroi*, la regió codificant es troba interrompuda per un intró situat en la mateixa posició en ambdós gens (Homann *et al.*, 1996), i que coincideix amb la posició del

Així doncs, aquests experiments d'expressió transitòria indiquen que la totalitat dels elements necessaris per dirigir l'expressió quantitativa del gen *FPS2* en protoplastes de *Arabidopsis* estan compresos en només 176 pb de la regió 5'-flanquejant del gen, entre les posicions -111 i +65. Concretament, la regió de 50 pb situada entre les posicions -111 i -61 conté elements crítics implicats en l'expressió quantitativa del gen *FPS2*, sense descartar que en la resta del fragment hi hagi també elements necessaris pel control de l'expressió. La regió del gen *FPS2* que s'extén cap a 5' de la posició -111 no conté cap element que modifiqui l'expressió del gen en aquest sistema.

### **6.3. Estudis d'expressió estable en *Arabidopsis* de construccions que contenen fragments de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2*.**

Encara que els experiments d'expressió transitòria en protoplastes constitueixen un sistema de treball valuós per detectar regions involucrades en el control de l'expressió gènica, aquests estudis presenten limitacions, perquè no poden proporcionar informació relativa als elements implicats en el control del patró d'expressió espacial i temporal d'un gen. Aquesta informació només es pot obtenir amb experiments d'expressió estable en plantes transgèniques. En aquest sentit, amb la finalitat d'identificar les regions que confereixen el patró d'expressió del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*, es van dur a terme estudis d'expressió estable en *Arabidopsis* transgèniques de les construccions prèviament assajades en els experiments d'expressió transitòria en protoplastes.

Així doncs, es van generar *Arabidopsis* transgèniques portadores dels gens quimèrics (-533/+65)*FPS2-GUS*, (-260/+65)*FPS2-GUS*, (-111/+65)*FPS2-GUS* i (-61/+65)*FPS2-GUS* i es van seleccionar transformants independents de la generació T<sub>1</sub> per a cada transgèn. En concret, es van seleccionar 8 línies de plantes transformades amb la construcció (-533/+65)*FPS2-GUS*, 4 línies amb la construcció (-260/+65)*FPS2-GUS*, 12 línies amb la construcció (-111/+65)*FPS2-GUS* i 10 línies



primer intró dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*. També està clonada la seqüència genòmica que codifica la FPS de rata (Spear *et al.*, 1992). El gen està organitzat en vuit exons separats per set introns. Un dels introns està situat en la regió 5' transcrita no traduïda; dels altres sis introns, la posició de cinc d'ells coincideix amb la posició de cinc dels introns dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*.

Els experiments de Southern blot genòmic han posat de manifest l'existència en *Arabidopsis* d'una tercera seqüència genòmica relacionada amb FPS. Tot i que no hi ha evidències directes de què aquesta seqüència correspongui a un gen de FPS, tenint en compte que la prenilttransferasa més relacionada amb la FPS és la GGPS i que *Arabidopsis* conté, com a mínim, sis gens que codifiquen GGPS (Bartley i Scolnick, 1995; Zhu *et al.*, 1997), el fet de detectar una única seqüència addicional en el Southern blot suggereix que aquesta seqüència gènica correspon a un tercer gen FPS.

La multiplicitat gènica de FPS no és exclusiva d'*Arabidopsis*, sinó que és una característica que també s'observa en altres espècies de plantes. S'han clonat dues seqüències de cDNA que codifiquen FPS en *Lupinus albus* (Attucci *et al.*, 1995a; Attucci *et al.*, 1995b) i tres en *Parthenium argentatum* (Pan *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998, número d'accés *GenBank*<sup>TM</sup>/*EMBL* AF005201). També s'ha descrit l'existència d'almenys dos gens FPS en *Zea mays* (Li i Larkins, 1996). En *Oryza sativa*, tot i que inicialment els experiments de Southern blot genòmic semblaven indicar que contenia una única còpia del gen FPS (Sanmiya *et al.*, 1997), estudis posteriors han posat de manifest l'existència d'un segon cDNA codificant FPS (Sanmiya *et al.*, 1999).

En plantes, la multiplicitat gènica tampoc és exclusiva de l'enzim FPS, ja que diferents enzims de la via de síntesi d'isoprenoides estan codificats per famílies multigèniques. Així, per exemple, l'enzim HMGR es troba codificat per un número de gens que varia entre els dos descrits en *Arabidopsis* (Caelles *et al.*, 1989; Enjuto *et al.*, 1994) fins el mínim d'onze descrits en *Solanum tuberosum* (Stermer *et al.*, 1994; Bhattacharyya *et al.*, 1995). També l'esqualè sintasa està codificada per una petita família gènica composta per dos gens tant en *Arabidopsis* (Kribii *et al.*, 1997) com en *Nicotiana tabacum* (Devarenne *et al.*, 1998). En *Arabidopsis*, l'enzim GGPS està

codificat per un mínim de sis gens (Bartley i Scolnick, 1995; Zhu *et al.*, 1997), i la IPP isomerasa, per dos (Campbell *et al.*, 1997). També està descrit que la vetispiradiè sintasa, una sesquiterpè ciclasa que es troba en *Hyosциamus muticus*, està codificada per una família gènica composta de sis a vuit membres (Back i Chappell, 1995).

Estava prèviament demostrat que el gen *FPS1* d'*Arabidopsis* és un gen funcional. En aquest sentit, cal recordar que el corresponent cDNA havia estat clonat mitjançant complementació funcional d'un mutant de llevat deficient en activitat FPS (Delourme *et al.*, 1994). Pel que fa referència al gen *FPS2*, mitjançant experiments de Northern blot (que es discutiran més endavant) es va posar de manifest que el gen s'expressa en tots els teixits analitzats, i que el seu mRNA s'acumula majoritàriament en flors. Aplicant una estratègia d'RT-PCR, es va clonar el cDNA *FPS2*, i es va comprovar que l'isoenzim *FPS2* presenta un 90,6 % d'identitat amb l'isoenzim *FPS1*. L'elevada identitat existent entre els dos isoenzims suggeria que *FPS2* representava també una forma activa de l'enzim. Tot i això, la funcionalitat de l'isoenzim *FPS2* va ser demostrada complementant la soca mutant de llevat CC25 amb el plasmidi pNCFPS2, que conté el cDNA *FPS2* sota el control del promotor de la fosfoglicerat quinasa de llevat. La soca CC25 és portadora de la mutació puntual *erg20-2* en el gen FPS, que impedeix que l'enzim condensi IPP amb l'intermediari GPP per produir FPP. Per tant, la soca CC25 acumula GPP, que és defosforilat per fosfatases endògenes i excretat al medi en forma de geraniol (Blanchard i Karst, 1993). Com a conseqüència de la mutació, a 36°C la soca CC25 és auxotròfica per l'ergosterol, l'esterol majoritari en llevats. Ara bé, a causa de la naturalesa de la mutació *erg20-2*, era teòricament possible que l'enzim *FPS2* d'*Arabidopsis* pogués catalitzar la síntesi de FPP a partir d'IPP i GPP, però no la condensació prèvia d'IPP amb DMAPP per formar GPP. De fet, està descrit que la FPS, en presència d'IPP, pot acceptar tant DMAPP com GPP com a substrats al·lílics per la síntesi de FPP (Huguene y Camara, 1990). Per descartar la possibilitat que l'enzim *FPS2* només fos capaç de catalitzar la síntesi de FPP a partir d'IPP i GPP, es va generar la soca de llevat haploide NC1, que conté una còpia interrompuda del gen FPS (mutació *erg20*) i el plasmidi pNCFPS2. La interrupció del gen FPS és letal pel llevat, fins i tot en presència d'ergosterol exogen (Blanchard i Karst, 1993). El fet que la soca NC1 fos viable va demostrar que l'isoenzim *FPS2*

d'*Arabidopsis* és capaç de catalitzar les dues condensacions seqüencials d'IPP amb DMAPP i GPP per produir FPP. La presència d'activitat FPS va ser posteriorment confirmada mitjançant assajos d'activitat *in vitro* en extractes proteics de les soques CC25[pNCFPS2] i NC1. En definitiva, doncs, la complementació funcional de mutants de llevat deficients en activitat FPS posa de manifest que els gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* codifiquen dues FPS funcionals.

## **2. EL GEN *FPS1* ÉS UN GEN BIFUNCIONAL QUE CODIFICA UNA ISOFORMA CITOSÒLICA I UNA ISOFORMA MITOCONDRIAL DE FPS.**

### **2.1. El gen *FPS1* genera dos mRNAs que es troben sota el control de promotors alternatius.**

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 nucleòtids cap a 5' del codó ATG inici de traducció de l'enzim FPS1 descrit per Delourme *et al.* (1994). Donat el cas que existís un mRNA que contingué 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. L'existència d'un missatger que contenia aquest codó AUG distal va ser inicialment demostrada mitjançant el clonatge del seu corresponent cDNA. Així doncs, l'existència de dues seqüències de cDNA corresponents al gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, la descrita anteriorment per Delourme *et al.* (1994) i la descrita en aquest treball, suggeria que l'expressió del gen *FPS1* donava lloc a dos mRNAs diferents en el seu extrem 5'. Ara bé, 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 correspongués simplement a una forma truncada per l'extrem 5' de l'mRNA FPS1 més llarg. El resultat dels experiments de protecció enfront l'RNasa va demostrar que l'expressió del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*

genera simultàniament dues poblacions de missatgers, els mRNAs FPS1L i FPS1S, que es diferencien en la presència o absència de la seqüència 5' que codifica l'extensió aminoterminal addicional. L'mRNA FPS1L conté els dos triplets AUG i, per tant, té capacitat per codificar la isoforma FPS1L. L'mRNA FPS1S no conté el triplet AUG distal i, en conseqüència, només té capacitat per codificar la isoforma FPS1S. A més, els dos missatgers mostren heterogenicitat en els seus extrems 5', fet que es correlaciona amb l'absència de seqüències TATA consens localitzades a la distància apropiada dels inicis de transcripció.

Com a primera aproximació per determinar la possible expressió diferencial dels mRNA FPS1L i FPS1S es van realitzar experiments de Northern blot. Es va obtenir una sonda específica per l'mRNA FPS1L, generada a partir de l'extensió 5' addicional. En canvi, donat que la totalitat de la seqüència de l'mRNA FPS1S està continguda en la seqüència de l'mRNA FPS1L, no va ser possible preparar una sonda que reconegués específicament l'mRNA FPS1S. Per tant, el patró d'expressió de l'mRNA FPS1S va haver de ser deduït per comparació del resultat del Northern blot realitzat amb la sonda específica per l'mRNA FPS1L amb el del realitzat utilitzant una sonda derivada de la regió 3' del gen *FPSI*, que reconeix simultàniament els mRNAs FPS1L i FPS1S. L'anàlisi dels patrons d'expressió va indicar que els dos missatgers es troben en tots els teixits analitzats, encara que el seu patró d'expressió és diferent: mentre que l'mRNA FPS1L s'acumula principalment en flors, l'mRNA FPS1S s'acumula principalment en arrels i flors. L'expressió diferencial dels mRNAs FPS1L i FPS1S indica que els dos mRNAs derivats del gen *FPSI* es troben sota el control de promotors alternatius.

## **2.2. La isoforma FPS1L és precursora d'una FPS mitocondrial.**

Tal i com s'ha indicat anteriorment, l'mRNA FPS1L pot codificar una nova isoforma de l'enzim FPS (FPS1L) amb una seqüència aminoterminal addicional de 41 aminoàcids respecte la isoforma FPS1S. La funcionalitat del triplet AUG distal com a inici de traducció ha estat demostrada *in vitro* mitjançant experiments de transcripció-

traducció del corresponent cDNA utilitzant un sistema de lisat de germen de blat i *in vivo*, en protoplastes de la línia cel.lular T87 d'*Arabidopsis* (resultats no presentats).

L'extensió aminoterminal de 41 aminoàcids de la isoforma FPS1L no té equivalent en cap de les FPS d'altres organismes caracteritzades fins el moment. En plantes, tot i que fins l'actualitat el citosol-RE és l'únic compartiment cel.lular on s'ha detectat FPS (Gray, 1987; Kleinig, 1989; Huguency i Camara, 1990), s'accepta que hi ha síntesi d'isoprenoides a partir d'IPP en citosol-RE, mitocòndries i cloroplastes (Kreuz i Kleinig, 1984; Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984; Kleinig, 1989). Aquestes observacions van plantejar la possibilitat que l'extensió aminoterminal de la isoforma FPS1L pogués actuar com a pèptid de trànsit per dirigir la proteïna a un compartiment subcel.lular diferent del citosol-RE, com per exemple, els cloroplastes o les mitocòndries. En aquest sentit, l'acumulació de dades de seqüències de pèptids de trànsit a orgànuls ha posat de manifest que, si bé aquests pèptids de trànsit mostren entre ells un baix nivell de conservació en termes d'estructura primària, presenten característiques comunes pel que fa referència a composició d'aminoàcids, posició de determinats aminoàcids i estructura secundària (von Heijne *et al.*, 1989; von Heijne, 1992; Sjöling i Glaser, 1998). L'extensió aminoterminal de l'enzim FPS1L compleix tots els requeriments per ser un pèptid de trànsit a mitocòndries. En primer lloc, no conté cap residu aminoacídic àcid i està enriquida amb residus carregats positivament, hidroxilats i hidrofòbics. En segon lloc, la seqüència RIQS (posicions 36 a 39 de la seqüència de la proteïna FPS1L), que coincideix amb el motiu consens de processament de pèptids de trànsit a mitocòndries RX/XS (on X representa qualsevol aminoàcid i / representa el punt de processament) (von Heijne, 1992), es troba justament dos residus cap a l'extrem aminoterminal de la metionina inicial de la isoforma FPS1S. A més, aquest motiu es troba precedit de dos residus d'arginina situats en les posicions -2 i -12 de l'hipotètic punt de processament (RI/QS). Tot i que està proposat que els residus d'arginina situats en les posicions -2 i -10 respecte el punt de tall són importants per definir el lloc de processament dels pèptids de trànsit (von Heijne *et al.*, 1989), en el cas dels pèptids de trànsit a mitocòndries de les plantes, el residu d'arginina situat en la posició -10 no sol estar conservat (Sjöling i Glaser, 1998). En tercer lloc, està descrit que els pèptids de trànsit a mitocòndries de plantes estan constituïts per dos dominis

amb una estructura secundària clarament diferenciada (Sjöling i Glaser, 1998): l'extrem aminoterminal, que constitueix el que s'anomena domini d'importació, i adopta una conformació d' $\alpha$ -hèlix amfipàtica carregada positivament; i l'extrem carboxiterminal, que constitueix el domini de processament, i pot adoptar una conformació o bé d' $\alpha$ -hèlix, o bé d' $\alpha$ -hèlix seguida d'una regió sense estructura definida. La predicció d'estructura secundària de l'extensió FPS1L indica que els 10 residus aminoacídics situats entre les posicions 8 i 17 poden adoptar una conformació d' $\alpha$ -hèlix amfipàtica carregada positivament, mentre que els residus propers a l'hipotètic punt de processament poden formar un petit llaç (posicions 28 a 33 de la proteïna FPS1L) seguit d'una regió sense estructura definida (34 a 38 de la proteïna FPS1L). En conjunt, totes aquestes observacions van suggerir que l'extensió aminoterminal de la isoforma FPS1L era un pèptid de trànsit a mitocondries.

Com a primera aproximació per analitzar si l'extensió aminoterminal de la isoforma FPS1L podia actuar com a pèptid de trànsit a mitocondries, es va estudiar la seva capacitat per dirigir *in vivo* una proteïna marcador a mitocondries de llevat. Aquesta aproximació experimental estava basada en observacions prèvies que demostraven que els pèptids de trànsit a mitocondries de plantes i de llevats es podien 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). Amb aquesta finalitat, es va analitzar la capacitat de la proteïna quimèrica resultant de fusionar l'extrem aminoterminal de 41 aminoàcids de la isoforma FPS1L a la subunitat IV de la citocrom c oxidasa mitocondrial de llevat sense el seu propi pèptid de trànsit a mitocondries (plasmidi pFPS1Ltp- $\Delta$ COXIV) per complementar la soca mutant de llevat WSR. Aquesta soca és portadora d'una interrupció en el gen *COXIV*, que codifica la subunitat IV de la citocrom c oxidasa mitocondrial. En conseqüència, en la soca WSR el procés de transport electrònic està bloquejat. Per tant, aquesta soca només pot créixer en un medi que contingui com a font d'energia substrats fermentables com la glucosa. En canvi, la soca WRS és incapaç de créixer en un medi que contingui com a única font d'energia substrats no fermentables com el glicerol. El fet que el plasmidi pFPS1Ltp- $\Delta$ COXIV restaurés la capacitat de la soca WSR per créixer en un medi amb glicerol com a font d'energia va indicar que la subunitat CoxIV de llevat era correctament

l'IPP utilitzat a les mitocondries per la síntesi d'ubiquinona es produeix a través de la via del mevalonat i que, per tant, prové del citosol-RE (Disch *et al.*, 1998a). A més, les preniltransferases implicades en la síntesi de les cadenes laterals de la ubiquinona (de moment només caracteritzades en bacteris) no són capaces de catalitzar la condensació d'IPP amb DMAPP, sinó que requereixen FPP o GPP com a substrat al·lílic per condensar la resta d'unitats d'IPP (Ogura i Koyama, 1998). En definitiva, la identificació d'una isoforma mitocondrial de FPS a *Arabidopsis thaliana* reforça la hipòtesi que les mitocondries, com a mínim les de plantes, poden utilitzar l'IPP com a precursor per a la síntesi de FPP que, a la seva vegada, pot ser utilitzat per la síntesi de derivats isoprenoides, com les proteïnes farnesilades, les cadenes laterals de la ubiquinona o del grup hem a.

D'altra banda, el fet que la isoforma FPS1L s'importi a mitocondries no exclou la possibilitat que també pugui ser importada a altres orgànuls. En plantes, s'han descrit diversos exemples de pèptids de trànsit que poden dirigir la proteïna simultàniament a mitocondries i a cloroplastes (Creissen *et al.*, 1995; Chow *et al.*, 1997; Menand *et al.*, 1998; Akashi *et al.*, 1998). En conseqüència, la presència de FPS en cloroplastes no es pot excloure, i més si es té en compte que el FPP és necessari en cloroplastes per la farnesilació de proteïnes (Parmryd *et al.*, 1997). En aquest sentit, molt recentment s'ha demostrat la presència de FPS en cloroplastes de fulles d'arròs, de blat i de tabac (Sanmiya *et al.*, 1999). Concretament en el cas de la FPS d'arròs, l'enzim FPS1 presenta una extensió aminoterminal de només cinc aminoàcids (MAAAV) respecte les altres FPS de plantes dicotiledònies. Aquesta extensió aminoterminal és idèntica a la de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa de pèsol, un enzim de localització cloroplastídica (Sanmiya *et al.*, 1997).

### 3. ELS GENS *FPS1* I *FPS2* PRESENTEN PATRONS D'EXPRESSIÓ DIFERENTS.

#### 3.1. Anàlisi dels patrons d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* per Northern blot.

Els patrons d'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis* han estat analitzats de forma preliminar mitjançant experiments de Northern blot. D'aquesta manera, s'ha pogut comprovar que l'mRNA del gen *FPS2* s'acumula majoritàriament en flors, mentre que en la resta d'òrgans analitzats es detecta una expressió molt feble. D'altra banda, tal i com s'ha discutit anteriorment, l'expressió del gen *FPS1* genera simultàniament els mRNA *FPS1L* i *FPS1S*. Tot i les limitacions derivades de no disposar d'una sonda específica per l'mRNA *FPS1S*, l'anàlisi per Northern blot mostra que els mRNAs derivats del gen *FPS1* s'expressen en tots els òrgans analitzats, però tenen patrons d'expressió diferents. Així, mentre l'mRNA *FPS1L* s'acumula preferentment en flors, l'mRNA *FPS1S* s'acumula principalment en flors i arrels. En definitiva, l'anàlisi per Northern blot indica que els patrons d'expressió dels mRNAs *FPS1L* i *FPS1S* són diferents entre si i, a més, són diferents del patró d'expressió de l'mRNA *FPS2*.

Actualment, es disposa d'informació molt limitada referent al patró d'expressió de les FPS d'altres plantes. Així per exemple, se sap que la FPS de *Capsicum annuum* s'expressa de forma constitutiva en el fruit durant el desenvolupament i la maduració, i que la seva expressió augmenta quan el fruit és tractat amb cel.lulasa, que indueix la síntesi de fitoalexines sesquiterpèniques (Huguency *et al.*, 1996). D'altra banda, s'ha estudiat l'expressió de la FPS en plantes productores de làtex com *Hevea brasiliensis* i *Parthenium argentatum*. En *Hevea Brasiliensis*, la FPS s'expressa en els laticífers i en l'epidermis de la planta, fet que suggereix que la FPS està involucrada en la síntesi del FPP requerit per la producció del cautxú i d'altres isoprenoides (Adiwilaga i Kush, 1996). En *Parthenium argentatum*, dues FPS estan associades a partícules de làtex (Pan *et al.*, 1996). En el cas de *Lupinus albus*, els isoenzims *FPS1* i *FPS2* s'expressen en



arrels, ja que els corresponents cDNAs han estat clonades a partir d'un banc de cDNA preparat a partir d'RNA d'arrels de plàntules de 10 dies (Attucci *et al.*, 1995). També es coneix que, en *Zea mays*, un dels dos gens FPS s'expressa de forma específica en l'endosperm (Li i Larkins, 1996). A més, els autors han observat que l'acumulació de l'mRNA en l'endosperm augmenta significativament en els mutants *o2* i *fl2* de *Zea mays*, mutants en els que el contingut de zeïnes en l'endosperm està disminuït. El gen *O2* codifica el factor de transcripció activador opaque-2, que regula l'expressió de zeïnes de 22 kDa (Schmitd *et al.*, 1990), mentre que el gen *fl2* codifica una zeïna mutada de la subfamília de zeïnes de 22 kDa (Coleman *et al.*, 1995). D'altra banda, se sap que el gen *FPS1* d'arròs s'expressa principalment en fulles i que la llum, concretament la llum blava, augmenta la seva expressió (Sanmiya *et al.*, 1997). En canvi, pel que fa referència a l'efecte de la llum sobre l'expressió dels gens *FPS1* i *FPS2* d'*Arabidopsis*, els experiments de Northern blot han posat de manifest que l'expressió quantitativa dels gens no sembla estar influenciada per la presència o absència de llum en les condicions de creixement.

Per definir amb més detall els patrons d'expressió espacial i temporal dels gens *FPS1* i *FPS2*, s'han generat *Arabidopsis* transgèniques portadores de les construccions  $(-1476/+73)FPS1S-GUS$  i  $(-1328/+65)FPS2-GUS$ , que contenen les regions 5'-flanquejants dels gens fusionades de forma traduccional al gen marcador *uidA*. Tal i com s'ha descrit en el corresponent apartat de Resultats, en la construcció  $(-1476/+73)FPS1S-GUS$  s'ha mutagenitzat l'ATG inici de traducció de la isoforma FPS1L i l'ATG inici de traducció de l'enzim GUS. En conseqüència, en les plantes transgèniques portadores d'aquesta construcció es pot detectar l'activitat GUS deguda a la proteïna quimèrica generada per traducció a partir de l'ATG inici de la isoforma FPS1S. Per aquesta raó, es considera que el patró d'expressió del transgèn  $(-1476/+73)FPS1S-GUS$  correspon al patró d'expressió espacial i temporal de la isoforma FPS1S. Per tant, en aquestes plantes transgèniques s'ha determinat el patró d'expressió dels isoenzims FPS1S i FPS2, els dos isoenzims de localització suposadament citosòlica.

### 3.2. La isoforma FPS1S presenta un patró d'expressió de tipus "housekeeping".

L'anàlisi de les plantes transgèniques d'*Arabidopsis* portadores de la construcció (-1476/+73)*FPSIS-GUS* ha mostrat que la regió compresa entre les posicions -1476 i +73 del gen *FPSI* dirigeix l'expressió del gen *uidA* en tots els teixits de la planta i en tots els estadis de desenvolupament, tant durant la fase vegetativa com durant la fase reproductiva, encara que de forma més intensa en flors i arrels. Aquest patró d'expressió suggereix que l'enzim FPS1S correspon a una forma "housekeeping" de FPS, que probablement participa en la síntesi d'isoprenoides que duen a terme funcions generals de caràcter bàsic pel desenvolupament normal de la planta, com és el cas, per exemple, dels esterols requerits per la síntesi de les membranes. No obstant, donada la gran diversitat de grups específics d'isoprenoides que deriven del FPP, no es pot descartar que la isoforma FPS1S també estigui involucrada en la síntesi d'altres grups d'isoprenoides.

Amb anterioritat, havien estat descrits els patrons d'expressió dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*Arabidopsis* en plantes transgèniques. Mentre que el gen *HMG2* d'*Arabidopsis* presenta un patró d'expressió restringit a teixits meristemàtics i florals (Enjuto *et al.*, 1995), el gen *HMG1* presenta un patró d'expressió generalitzat (Lumbreras, 1995; Learned i Connolly, 1997). Cal tenir present que l'expressió del gen *HMG1* genera dos mRNAs que donen lloc a les isoformes HMGR1L i HMGR1S (Lumbreras *et al.*, 1996), i que les construccions utilitzades en aquests estudis permeten determinar el patró d'expressió corresponent a les dues isoformes simultàniament. No obstant, tenint en compte que la isoforma HMGR1L es sintetitza en proporció minoritària, probablement el patró d'expressió descrit correspon al patró d'expressió de la isoforma HMGR1S. Segons Lumbreras (1995), el gen *HMG1* d'*Arabidopsis* s'expressa en tots els teixits, encara que de forma més intensa en teixits meristemàtics. En canvi, segons Learned i Connolly (1997), el gen *HMG1* no presenta expressió en teixits meristemàtics, i en l'arrel s'expressa preferentment en la zona d'elongació. No es pot descartar que les diferències observades entre els dos estudis del patró d'expressió del gen *HMG1* d'*Arabidopsis* puguin ser degudes al fet que el patró va ser determinat en plantes

transgèniques diferents, tabac en el cas de Lumbreras (1995) i *Arabidopsis* en el cas de Learned i Connolly (1997). En relació amb l'expressió de la isoforma FPS1S, es pot observar que, en conjunt, existeix un paral·lelisme evident entre els patrons d'expressió de la isoforma FPS1S i del gen *HMG1* (isoforma HMGR1S) d'*Arabidopsis*. Aquest paral·lelisme suggereix que els dos enzims poden participar en la síntesi dels mateixos tipus d'isoprenoides.

D'altra banda, pel que fa referència a l'efecte de la llum sobre l'expressió del gen *FPS1* d'*Arabidopsis*, l'anàlisi de les plantes transgèniques ha confirmat que l'expressió del gen no es veu modificada per la presència o absència de llum. De forma idèntica, l'expressió del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* tampoc està influenciada per la llum. En canvi, experiments de Northern blot han indicat que l'expressió dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*Arabidopsis* és més elevada en plàntules crescudes en condicions de foscor que en condicions de llum (Enjuto *et al.*, 1994; Learned, 1996), i l'estudi de l'expressió del gen *HMG1* en plantes transgèniques ha posat de manifest que la llum modula el patró d'expressió espacial del gen *HMG1* (Learned i Connolly, 1997).

### **3.3. El gen *FPS2* presenta un patró d'expressió especialitzat.**

L'anàlisi de les plantes transgèniques d'*Arabidopsis* portadores de la construcció (-1328/+65)*FPS2-GUS* ha posat de manifest que el gen *FPS2* d'*Arabidopsis* presenta un patró d'expressió especialitzat, ja que l'activitat GUS es troba localitzada només en determinades regions de la planta i en estadis concrets de desenvolupament. El patró d'activitat GUS està en concordància amb el patró d'expressió del gen *FPS2* determinat mitjançant Northern blot, ja que es detecta una intensa activitat GUS en les flors, concretament en pol·len i anteres, mentre que en la resta de teixits es detecta una feble expressió de l'activitat GUS.

De la mateixa manera que el patró d'expressió de l'enzim FPS1S és equiparable al patró d'expressió del gen *HMG1* d'*Arabidopsis*, l'existència del gen *FPS2* suggeriria

inicialment que el seu patró d'expressió podria ser equivalent al patró d'expressió del gen *HMG2* d'*Arabidopsis*. L'anàlisi de les plantes transgèniques, però, ha posat de manifest que tot i que els dos gens tenen patrons d'expressió especialitzats, aquests són clarament diferents. Així, mentre que el gen *HMG2* s'expressa de forma específica en teixits meristemàtics i florals (Enjuto *et al.*, 1995), el gen *FPS2* s'expressa preferentment en flors, però no s'expressa de forma particularment intensa en teixits meristemàtics. No obstant, cal tenir present que l'anàlisi dels patrons d'expressió s'ha dut a terme en plantes transgèniques diferents: tabac en el cas del gen *HMG2*, i *Arabidopsis* en el cas del gen *FPS2*.

El fet que el gen *FPS2* presenti un patró d'expressió especialitzat, restringit a regions específiques i estadis concrets de desenvolupament de la planta, es pot interpretar com un indicador que, en determinats llocs i moments, la planta té requeriments particulars pel que fa referència a la síntesi d'isoprenoides. En aquest sentit, és probable que es requereixi la síntesi de grups específics d'isoprenoides que desenvolupen funcions especialitzades i que no es sintetitzen a partir del FPP produït per l'isoenzim FPS1S. Tampoc es pot descartar que existeixi una elevada demanda d'isoprenoides que duen a terme funcions generals de caràcter bàsic que no pot ser coberta únicament amb el FPP sintetitzat per l'isoenzim FPS1S.

Pel que fa referència a la demanda d'isoprenoides en flors, aquesta sembla ser particularment elevada, ja que múltiples gens de la via de síntesi d'isoprenoides presenten una intensa expressió en els òrgans florals. Aquest és el cas de diversos gens HMG, com és el gen *HMG1* de *Camptotheca acuminata* (Burnett *et al.*, 1993), els gens *HMG1* i *HMG2* d'*Arabidopsis* (Lumbreras, 1995; Enjuto *et al.*, 1995), el gen *HMG2* de tomàquet (Weissenborn *et al.*, 1995), i els gens *HMG1*, *HMG2* i *HMG3* de patata (Bhattacharyya *et al.*, 1995; Korth *et al.*, 1997). També els gens *SQS1* (Kribii *et al.*, 1997; del Arco i Boronat, 1999), mevalonat quinasa (*MVK*, Lluch *et al.*, 1999) i *FPS1* (isoforma FPS1S) d'*Arabidopsis* s'expressen de forma marcada en les flors. En les flors, tal i com s'ha indicat anteriorment, les antereres i els grans de pol.len són els llocs on el gen *FPS2* s'expressa de forma més intensa. De fet, molts dels gens citats s'expressen de forma intensa en pol.len, com és el cas dels gens *HMG1* de *Camptotheca*

*acuminata* (Burnett *et al.*, 1993), *HMG1* i *HMG2* d'*Arabidopsis* (Lumbreras, 1995; Enjuto *et al.*, 1995), *HMG2* de tomàquet (Weissenborn *et al.*, 1995), *HMG1* de patata (Bhattacharyya *et al.*, 1995), i *MVK* (Lluch *et al.*, 1999), *SQS1* (del Arco i Boronat, 1999) i *FPS1* (isoforma FPS1S) d'*Arabidopsis*. Aquesta intensa expressió en pol.len de diversos enzims de la via metabòlica suggereix que el gra de pol.len requereix una síntesi molt activa de compostos isoprenoides. Entre aquests compostos, probablement s'hi trobin els esterols, que són necessaris pel ràpid creixement del tub pol.línic, i també altres isoprenoides que realitzin funcions més especialitzades. En aquest sentit, el gra de pol.len de les plantes crucíferes (o brassicàcies) presenta un elevat contingut de brassinoesteroides, que són hormones vegetals d'estructura esteroídica. Els brassinoesteroides estan implicats en una gran varietat de funcions (revisat a Yokota, 1997), una de les quals és promoure el creixement del tub pol.línic.

També està descrit que la coberta del gra de pol.len és rica en esters triterpènics i en esters d'esterols (revisat a Piffanelli *et al.*, 1998). Ara bé, la majoria d'aquests compostos isoprenoides de la coberta són sintetitzats en les cèl.lules de la tapeta de l'antera (Piffanelli *et al.*, 1998). Per tant, la síntesi d'esters triterpènics i d'esters d'esterols de la coberta estaria més d'acord amb l'expressió dels gens de la via de síntesi d'isoprenoides en les antereres que en el mateix gra de pol.len. Finalment, és possible que la demanda d'isoprenoides en pol.len estigui relacionada amb la síntesi de proteïnes prenilades. En mamífers i llevats, les GTPases, que per ser actives han de ser prenilades, controlen processos cel.lulars com la reorganització del citoesquelet d'actina, l'establiment de la polaritat cel.lular, el moviment cel.lular i l'exocitosi i l'endocitosi. Aquests processos són essencials per la germinació i el creixement del tub pol.línic (Mascarenhas, 1993; Lin i Yang, 1997; Taylor i Hepler, 1997). De fet, en pol.len d'*Arabidopsis* i de pèsol s'ha identificat la proteïna Rop1, que pertany a la subfamília de GTPases tipus Rho de plantes i que es geranilgeranila (Lin *et al.*, 1996). En pèsol, Rop1 es troba associada a la membrana cel.lular del córtex apical del tub pol.línic (Lin *et al.*, 1996), i controla el seu creixement (Lin i Yang, 1997). En *Arabidopsis*, Rop1 s'expressa de forma específica en pol.len i tub pol.línic (Li *et al.*, 1998). De la mateixa manera que s'ha caracteritzat la proteïna Rop1, no es pot descartar

que altres proteïnes, tant geranilgeranilades com farnesilades, estiguin involucrades en el control del creixement del tub pol.línic.

En relació a l'expressió del gen *FPS2* en l'estigma de la flor, amb anterioritat havia estat descrita l'expressió en l'estigma del gen *HMG1* de *Camptotheca acuminata* (Burnett *et al.*, 1993) i dels gens *HMG1* i *HMG2* d'*Arabidopsis* (Lumbreras, 1995; Enjuto *et al.*, 1995) en plantes trangèniques de tabac. Es va proposar que l'exsudat de l'estigma, que està involucrat en la hidratació i germinació del gra de pol.len, podria contenir compostos isoprenoides (Enjuto *et al.*, 1995). Recentment, però, s'ha demostrat que els components relacionats amb aquesta funció de l'exsudat són bàsicament triglicèrids d'àcids grassos insaturats (Wolters-Arts *et al.*, 1998). A més, *Arabidopsis*, a diferència de tabac, és un gènere de planta amb estigma sec i que, per tant, no secreta exsudat. Així doncs, no sembla que l'expressió en l'estigma d'aquests gens es pugui relacionar amb la síntesi dels components de l'exsudat. En canvi, està descrit que tant en la coberta del gra de pol.len com en les papil.les estigmàtiques hi ha nombroses glicoproteïnes involucrades en el procés de reconeixement pol.len-papil.la (Taylor i Hepler, 1997). Per tant, és possible que l'expressió dels gens de la via de síntesi d'isoprenoides en aquests òrgans estigui relacionada amb la síntesi de dolicol, requerit per la glicosilació de proteïnes.

El gen *FPS2* també presenta expressió en la zona d'abscisió de flors/fruits. Aquesta expressió s'inicia després de l'antesi, i es manté fins l'abscisió del fruit. Aquest fet suggereix que en la zona d'abscisió es pugui sintetitzar algun compost isoprenoide relacionat amb el procés d'abscisió dels òrgans florals. L'àcid abscísic (ABA, C<sub>15</sub>) és una hormona que està relacionada amb l'abscisió. Fins fa poc temps, es creia que la biosíntesi d'ABA en plantes tenia lloc únicament de forma indirecta, a partir del precursor carotenòidic (C<sub>40</sub>) zeaxantina (revisat a Merlot i Giraudat, 1997; Koornneef *et al.*, 1998). Ara bé, el fet que mutants nuls en l'enzim zeaxantina oxidasa (enzim que catalitza l'epoxidació de zeaxantina a violaxantina en la via de síntesi de l'ABA) presentin nivells d'ABA que oscil.len entre 23-48% del nivell normal d'ABA (Marin *et al.*, 1996) plantejava la possibilitat que existís una via secundària de síntesi d'ABA, que podria tenir lloc directament a partir de FPP, semblant a la via de síntesi d'ABA descrita

en fongs (Zeevaart i Creelman, 1988). Recentment, s'ha descrit que en alvocat existeixen dues vies de síntesi d'ABA (Cowan, 1999). Una d'elles té lloc a través de la via del metileritritolfosfat i, per tant, està d'acord amb la biosíntesi d'ABA a partir de carotenoides. L'altra via passa per l'intermediari mevalonat. Donat que la via de síntesi del mevalonat té lloc en el citosol-RE, aquest resultat recolza la hipòtesi que l'ABA es pugui sintetitzar a partir de FPP.

S'ha detectat expressió del gen *FPS2* en els primordis seminals en els primers estadis de l'embriogènesi. No s'ha pogut determinar si durant la maduració dels primordis seminals i la dessecació de la llavor hi ha o no expressió del gen, ja que la coberta de la llavor impedeix l'accés del substrat i, per tant, la detecció de l'activitat GUS. Sí s'ha detectat activitat GUS a l'interior de la llavor dessecada. Cal destacar que el gen *HMG2* d'*Arabidopsis* presenta expressió en l'endosperm mentre aquest es divideix (Enjuto *et al.*, 1995), i que el gen *HMG1* de *Camptotheca acuminata* s'expressa en les llavors dessecades (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997). També s'ha descrit que un dels dos gens *FPS* de *Zea mays* s'expressa en l'endosperm (Li i Larkins, 1996). L'expressió dels gens que codifiquen enzims de la biosíntesi d'isoprenoides en els estadis inicials de l'embriogènesi suggereix que hi ha demanda d'esterols, per exemple, requerits en la divisió cel·lular. Tampoc no es pot descartar la possibilitat de l'existència d'una reserva d'isoprenoides en la llavor (Enjuto *et al.*, 1995). Aquesta hipòtesi està recolzada pel fet que, en presència de concentracions elevades de mevinolina, un potent inhibidor específic de l'HMGR, les llavors d'*Arabidopsis* germinen i les plàntules es desenvolupen amb aparent normalitat fins passats dos o tres dies, moment a partir del qual les plàntules aturen el seu desenvolupament (Boronat i Bach, resultats no publicats). Aquest comportament també s'observa quan les llavors es fan germinar en presència d'un inhibidor específic de la FPS (R172117, ZENECA Agrochemicals, Regne Unit). D'altra banda, l'expressió dels gens de la via de síntesi d'isoprenoides en la llavor també es pot relacionar amb la síntesi d'àcid abscísic, que controla el desenvolupament de la llavor i la seva germinació (revisat a Zeevaart i Creelman, 1988; Giraudat *et al.*, 1994; Bewley, 1997), o amb la síntesi de brassinoesteroides, dels quals les llavors en són riques, i s'ha demostrat la seva

presència en *Arabidopsis* (Schmidt *et al.*, 1997), encara que no es coneix quina és la funció específica que desenvolupen.

Pel que fa referència a l'expressió del gen *FPS2* en arrels, tot i que té lloc de forma generalitzada, és més intensa en els punts on s'iniciaran les arrels secundàries i a la base d'aquestes un cop formades. L'expressió en els punts on s'inicien les arrels secundàries sembla que correspongui a una expressió en el meristem lateral que ha de donar lloc a l'arrel secundària. Però a mesura que l'arrel es desenvolupa, es pot apreciar que l'expressió del gen *FPS2* no té lloc a la regió apical de l'arrel secundària, sinó que es manté a la base d'aquesta. Així doncs, l'expressió del gen *FPS2*, encara que podria estar relacionada amb el procés de diferenciació cel.lular que genera el meristem de l'arrel secundària, no està directament associada a la divisió i elongació cel.lulars. L'expressió del gen *FPS2* a la base de l'arrel secundària podria estar relacionada amb la lesió que provoca la pròpia emergència de l'arrel. Està descrit que el gen *HMG2* de tomàquet s'expressa també a la base de les arrels secundàries (Weissenborn *et al.*, 1995). Aquesta expressió està d'acord amb el fet que l'expressió del gen *HMG2* de tomàquet s'indueix per ferida i per atac d'agents patògens (Weissenborn *et al.*, 1995; Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999). No obstant, en el cas del gen *FPS2* d'*Arabidopsis* no s'ha observat inducció de l'expressió del gen per ferida. Per tant, no sembla que l'expressió del gen *FPS2* en la base de les arrels secundàries estigui relacionada amb les lesions provocades per la sortida de l'arrel secundària.

Tal i com s'ha discutit en el cas concret de l'expressió del gen *FPS2* en pol·len, l'expressió del gen *FPS2* en altres regions de la planta podria estar també relacionada amb la producció del FPP requerit per la farnesilació. La farnesilació de proteïnes en plantes, igual que en mamífers i llevat, està involucrada en el control de cicle cel.lular (Morohead *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1996), i també desenvolupa un paper important en la regulació de la latència i la germinació de la llavor, ja que la farnesilació intervé en la cascada de transducció del senyal de l'ABA en les llavors en *Arabidopsis*, i actua desensibilitzant la resposta d'aquestes a l'ABA (Cutler *et al.*, 1996). Recentment s'ha descrit el patró d'expressió del gen que codifica la subunitat  $\beta$  de la proteïna-farnesiltransferasa (FTasa) de pèsol en plantes transgèniques de tabac (Zhou *et al.*,



1997), i s'ha observat que el gen s'expressa en teixits meristemàtics, en l'embrió madur de la llavor i durant la germinació, patró que està d'acord amb les funcions atribuïdes a la farnesilació. També s'ha observat que el gen s'expressa en els punts d'unió de dos òrgans, com són les axil·les formades amb la tija, la juntura de les arrels secundàries amb l'arrel principal i a la zona de transició entre l'hipocòtil i l'arrel. Els autors han relacionat l'expressió del gen de la subunitat  $\beta$  de la FTasa en aquests punts amb el control del transport de nutrients, funció en la qual participaria la farnesilació. El patró d'expressió del gen *FPS2* en la llavor, durant la germinació i en les axil·les de la tija, en la zona de transició hipocòtil-arrel i a la base de les arrels secundàries, és similar al patró d'expressió de la subunitat  $\beta$  de la FTasa. Aquesta observació suggereix una correlació entre el procés de farnesilació i la síntesi de FPP.

És evident que l'anàlisi del patró d'expressió d'activitat GUS dels transgens  $(-1476/+73)FPS1S-GUS$  i  $(-1328/+65)FPS2-GUS$  no permet establir la contribució específica dels isoenzims FPS1S i FPS2 al conjunt de la síntesi d'isoprenoides. Ara bé, aquesta anàlisi evidencia que el patró d'expressió del gen *FPS2*, i per extensió de l'isoenzim FPS2, és especialitzat i que el patró d'expressió del gen *FPS1*, en concret l'isoenzim FPS1S, és constitutiu. Tal i com s'ha comentat anteriorment, la major part dels enzims de la via de biosíntesi d'isoprenoides caracteritzats fins l'actualitat estan codificats per famílies multigèniques. A més, els diferents gens de cada família presenten patrons d'expressió diferencials i una resposta diferent enfront de diversos estímuls. En aquest sentit, en el cas de l'enzim HMGR, diferents isoenzims han estat associats amb la producció de grups específics d'isoprenoides (Yang *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994; Weissenborn *et al.*, 1995; Rodríguez-Concepción i Gruissem, 1999). D'altra banda, també s'ha observat que l'activitat de diferents isoenzims de la via de síntesi d'isoprenoides es modula de forma coordinada (Vögeli i Chappell, 1988; Threlfall i Whitehead, 1988; Zook i Kuc, 1991; Fulton *et al.*, 1994). Aquestes i d'altres observacions ha conduït a l'actual hipòtesi d'organització de la via de biosíntesi d'isoprenoides en metabolons o canals metabòlics (Chappell, 1995a i b). Aquesta hipòtesi proposa l'existència en el reticle endoplasmàtic d'agrupacions d'isoenzims dedicades a produir grups específics d'isoprenoides. L'existència de metabolons permetria regular de forma independent cada agrupació enzimàtica i

canalitzar els intermediaris cap a la formació de famílies específiques d'isoprenoides, evitant la competició de diferents enzims pel mateix substrat.

En el cas concret d'*Arabidopsis thaliana*, els enzims HMGR i SQS estan codificats per famílies compostes per dos gens (Enjuto *et al.*, 1994; Kribii *et al.*, 1997). Els mRNAs dels gens *HMG1* i *SQS1*, igual que en el cas del gen *FPS1*, s'acumulen en tots els òrgans. A més, l'anàlisi del patró d'expressió dels gens *HMG1* (Lumbreras, 1995; Learned i Connolly, 1997) i *SQS1* (del Arco i Boronat, 1999) i de l'enzim FPS1S en plantes transgèniques posa de manifest que la seva expressió és de tipus "housekeeping". En canvi, el gen *HMG2* s'expressa únicament en teixits meristemàtics i florals (Enjuto *et al.*, 1995). El gen *FPS2* s'expressa en tots els òrgans, encara que principalment en inflorescències, i no s'expressa de forma particular en teixits meristemàtics. D'altra banda, l'expressió del gen *SQS2* no ha pogut ser detectada per Northern blot, tot i que el seu mRNA ha estat detectat aplicant una estratègia d'RT-PCR. Aquest fet indica que l'expressió del gen *SQS2* és molt baixa, o que només té lloc en teixits i/o estadis molt concrets de desenvolupament (Kribii *et al.*, 1997). Així doncs, en *Arabidopsis*, sembla que quan existeixen famílies multigèniques codificants pels enzims de la via de biosíntesi d'isoprenoides, en línies generals, un dels gens s'expressa de forma constitutiva, i l'altre, de forma especialitzada. Aquesta característica recolza l'actual teoria dels metabolons i suggereix que els diferents isoenzims de cada família estan involucrats en la síntesi de compostos isoprenoides específics. Mentre que els isoenzims que s'expressen de forma constitutiva estarien relacionats amb la síntesi d'isoprenoides que desenvolupen funcions generals de caràcter bàsic en la cèl.lula, els isoenzims que s'expressen de forma especialitzada estarien relacionats amb la síntesi d'isoprenoides que desenvolupen funcions especialitzades. Per tant, els isoenzims FPS1S i FPS2 formarien part de metabolons diferents i que estarien involucrats en la producció de tipus específics d'isoprenoides. En definitiva, mentre que l'isoenzim FPS1S probablement està implicat en la síntesi del FPP requerit per la producció dels isoprenoides necessaris pel funcionament basal de la majoria de cèl.lules de la planta (com per exemple els fitoesterols), l'isoenzim FPS2 probablement està implicat en la síntesi del FPP necessari per la producció d'isoprenoides requerits per dur a terme funcions més especialitzades en estadis concrets de desenvolupament i/o en determinats

tipus cel·lulars de la planta (com per exemple els brassinoesteroides o les proteïnes prenilades). Tot i això, donada la gran diversitat d'isoprenoides que deriven del FPP, és possible que el destí del FPP sintetitzat pels isoenzims FPS1S i FPS2 pugui veure's modificat en funció de l'òrgan i/o de l'estadi de desenvolupament i que, en alguns casos, pugui coincidir. En conseqüència, encara que no sembla gaire probable, no es pot descartar que, en determinades circumstàncies, l'isoenzim FPS2 sigui un reforç per l'isoenzim FPS1S i/o que l'isoenzim FPS1S pugui sintetitzar també isoprenoides que desenvolupin funcions especialitzades.

#### **4. ANÀLISI DE LES REGIONS 5'-FLANQUEJANTS DELS GENS *FPS1* I *FPS2*.**

Amb la finalitat d'identificar les regions dels promotors dels gens *FPS1* i *FPS2* implicades en el control de la seva expressió, s'han dut a terme estudis d'expressió transitòria en protoplastes i d'expressió estable en *Arabidopsis* transgèniques de contruccions que contenen fragments progressivament delecionats per l'extrem 5' de la regió 5'-flanquejant dels gens *FPS1* i *FPS2* fusionats de forma traduccional al gen marcador *uidA*. Pel que fa referència a l'anàlisi de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1*, s'han analitzat construccions que donen lloc únicament a la proteïna quimèrica resultant de la traducció a partir de l'ATG inici de traducció de la isoforma FPS1S. Per aquesta raó, tal i com s'ha indicat en el corresponent apartat de resultats, quan es parla de promotor o regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* es fa referència a la regió 5'-flanquejant que dirigeix l'expressió de la isoforma FPS1S.

#### 4.1. Anàlisi de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1*.

Els experiments d'expressió transitòria en protoplastes han posat de manifest que les seqüències implicades en el control de l'expressió de la isoforma FPS1S en aquest sistema es troben distribuïdes en una àmplia regió, que s'extén entre les posicions -571 i +73 de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1*. En particular, entre les posicions -571 i -364 existeix un possible element regulador negatiu, ja que quan aquesta regió es deleciona l'activitat del promotor augmenta. No obstant, els elements *cis* més importants implicats en l'expressió quantitativa del gen *FPS1* en protoplastes es troben en la regió compresa entre les posicions -364 i +73 del gen. Més concretament, entre les posicions -205 i -113 es localitza algun(s) element(s) clau per l'activitat del promotor, tot i que no es pot descartar que entre les posicions -113 i +73 hi hagi també elements necessaris per l'expressió del gen *FPS1*.

S'ha realitzat una recerca de possibles elements *cis* localitzats en la regió 5'-flanquejant del gen *FPS1* en bancs de dades de seqüències *cis* identificades en gens de plantes. Tot i que s'ha observat la presència d'una sèrie de seqüències reguladores consens, no sembla probable que aquestes seqüències estiguin implicades en el control de l'expressió del gen *FPS1*, ja que no es pot associar la deleció de cap d'elles amb la modificació de l'activitat del promotor. A més, aquestes seqüències han estat identificades com elements de control implicats en l'expressió de gens que no estan relacionats amb la biosíntesi d'isoprenoides, o com elements mitjancers de la resposta a estímuls que no afecten l'expressió del gen *FPS1* (com la llum). Aquestes observacions suggereixen que altres elements *cis* encara no identificats estan implicats en el control de l'expressió del gen *FPS1*.

Segons l'actual hipòtesi d'organització de la via de biosíntesi d'isoprenoides en metabolons (Chappell, 1995a i b), els gens que codifiquen enzims que han de formar part d'un mateix metaboló podrien tenir seqüències control comunes en els seus promotors, per tal de coordinar la seva expressió. Tot i que els enzims FPS1S i HMGR1 d'*Arabidopsis* presenten un patró d'expressió de tipus "housekeeping", l'aliniament de les regions 5'-flanquejant dels gens *FPS1* i *HMG1* no ha posat de manifest la presència

d'elements conservats que puguin estar implicats en una expressió coordinada. Fins l'actualitat, l'únic element *cis* identificat important per l'expressió quantitativa del gen *HMG1* d'*Arabidopsis* és l'anomenat element CT, (T/C)TCCTCT(T/C), que està localitzat en la regió líder del gen (Lumbreras, 1995). La majoria de gens HMG de plantes clonats contenen aquesta seqüència consens en la regió 5' transcrita no traduïda (Enjuto *et al.*, 1995; Lumbreras, 1995; Daraselia *et al.*, 1996). Aquest element CT, o algun element similar, no és present en la regió líder del gen *FPS1*, ni tampoc en la del gen *FPS2*.

#### 4.2. Anàlisi de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2*.

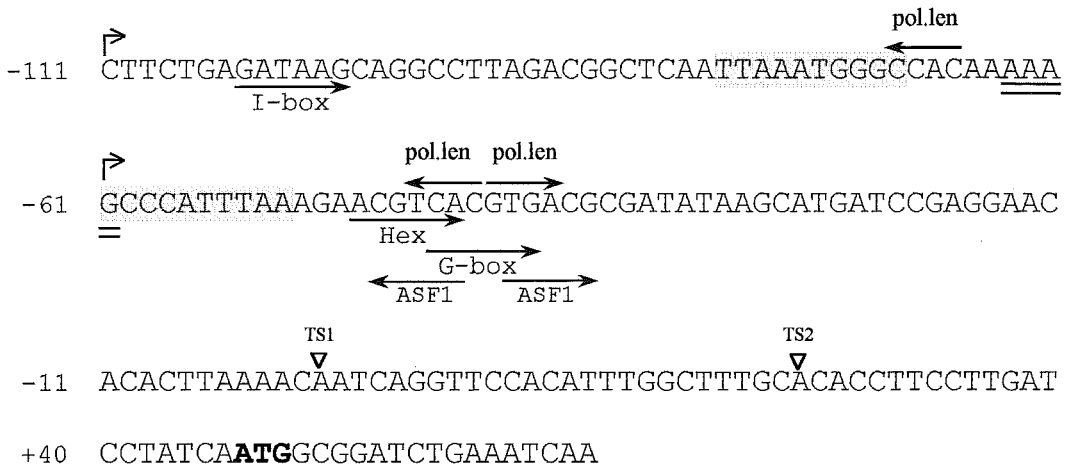
Els resultats dels experiments d'expressió transitòria en protoplastes i d'expressió estable en plantes transgèniques han posat de manifest que els elements que participen en el control de l'expressió quantitativa i qualitativa del gen *FPS2* es troben localitzats en una petita regió de 176 pb situada entre les posicions -111 i +65 de la regió 5'-flanquejant del gen. A més, el fet que la construcció (-61/+65)*FPS2-GUS* no presenti activitat GUS ni en protoplastes ni en plantes transgèniques indica que la regió de 50 pb compresa entre les posicions -111 i -61 conté elements fonamentals per dirigir l'expressió del gen *FPS2*, tot i que encara no és possible determinar si es tracta d'elements implicats únicament en l'expressió quantitativa o bé si també inclou elements que participen en el control del patró d'expressió qualitatiu. Tampoc es pot descartar que entre les posicions -61 i +65 hi hagi elements necessaris per l'expressió del gen *FPS2*.

En realitzar una búsqueda de possibles elements *cis* continguts en la regió -111/+65 del gen *FPS2* en bancs de dades de seqüències *cis* identificades en gens de plantes, es detecta l'existència de diversos motius consens, entre els quals hi ha un element I-box (GATAAG), un element G-box (CACGTG), dos elements ASF-1 (TGACG), i un element Hex (ACGTCA). Com es pot apreciar en la figura 41, els elements G-box, ASF1 i Hex es superposen en una petita regió de 13 pb.

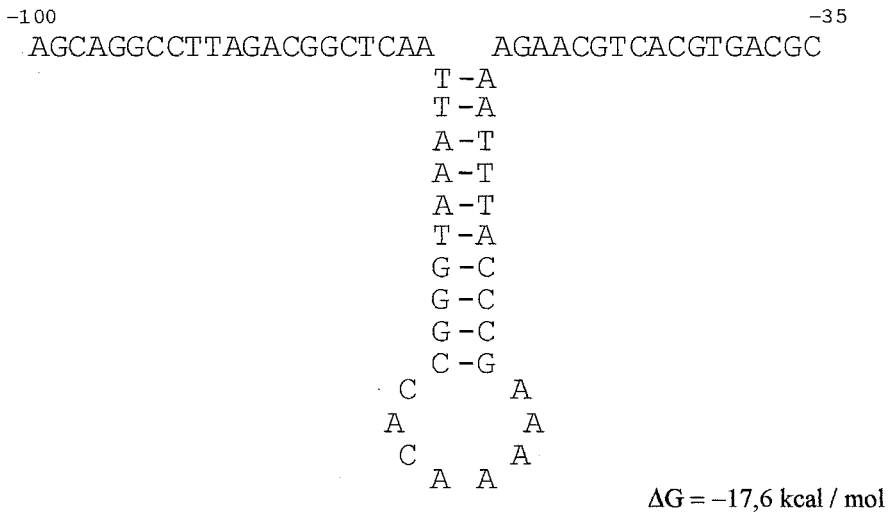
El motiu I-box està relacionat amb el control de l'expressió gènica per llum (Giuliano *et al.*, 1990) i el motiu Hex es troba en el promotor dels gens de les histones de blat (Mikami *et al.*, 1987 i Mikami *et al.*, 1989). Donat que els experiments de Northern blot i l'anàlisi de les plantes transgèniques han indicat que el gen *FPS2* no presenta diferències d'expressió en resposta a la llum i no s'expressa de forma intensa en teixits meristemàtics, *a priori* no sembla que aquests motius estiguin implicats en el control de l'expressió del gen *FPS2*.

L'element G-Box (CACGTG) està involucrat en el control de l'expressió de diversos gens en resposta a estímuls com són la llum o l'anaerobiosi, i a hormones com l'etilè, l'àcid abscísic i el metil jasmonat (revisat a Menkens *et al.*, 1995). Els factors de transcripció que reconeixen el motiu G-box (GBFs) pertanyen al grup de proteïnes dimèriques anomenades factors bZIP, les quals s'uneixen a seqüències consens ACGT (Foster *et al.*, 1994). L'especificitat de la unió al DNA de les proteïnes bZIP depèn de les seqüències que envolten el palíndrom ACGT (Foster *et al.*, 1994). Està descrit que l'especificitat de funció de cada G-box ve donada o bé pel propi context on es troba, o bé perquè els GBFs interaccionen amb un altre factor proteic que confereix l'especificitat (Menkens *et al.*, 1995). Per tant, en el cas que la G-box situada en les posicions -44/-39 del gen *FPS2* estés involucrada en la regulació de l'expressió del gen, tenint en compte que la construcció (-61/+65)*FPS2-GUS* conté l'element G-box i no té activitat transcripcional, probablement caldria que el GBF interaccionés simultàniament amb un altre factor que li donés funcionalitat com activador transcripcional. A més, aquest hipotètic segon factor hauria de reconèixer un element *cis* situat entre les posicions -111/-61 del gen *FPS2*. En aquest sentit, està descrit que els factors bZIP poden interaccionar amb factors Dof, que constitueixen una nova classe de factors de transcripció que contenen un domini d'unió a DNA amb un únic dit de zinc (Yanisaga, 1996; Singh, 1998). En *Arabidopsis*, s'han identificat diversos factors Dof que interaccionen amb factors bZIP (Zhang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Yanisaga, 1996). Aquests factors Dof reconeixen els motius AAGG o AAAG, que estan situats aproximadament a 20 pb cap a 5' de l'element d'unió del factor bZIP. Precisament el promotor del gen *FPS2* conté la seqüència AAAG (posicions -64/-61) situada a la distància adequada de la G-box perquè els hipotètics factors bZIP i Dof pugin

**A**



**B**



**Figura 41. Anàlisi de la seqüència compresa entre les posicions -111 i +65 de la regió 5'-flanquejant del gen *FPS2*. A) Seqüència nucleotídica compresa entre les posicions -111 i +65 del gen *FPS2*. La numeració dels nucleòtids s'indica a l'esquerra. Els extrems 5' de les construccions (-111/+65)*FPS2-GUS* i (-61/+65)*FPS2-GUS* s'indiquen amb caps de fletxa. Els inicis de transcripció s'indiquen amb triangles invertits. El triplet ATG inici de traducció s'indica amb negreta. Els diversos motius consens i la seva orientació s'indiquen amb fletxes. La seqüència AAAG s'indica amb doble subratllat. La repetició invertida que pot formar un "hairpin" s'indica amb ombrejat. B) Possible estructura en forma de "hairpin" que pot adoptar la regió -79/-52.**

interaccionar. També està descrit que alguns d'aquests factors Dof interaccionen amb factors bZIP que reconeixen el motiu ASF1 (TGACG) (Chen *et al.*, 1996). El promotor del gen *FPS2* conté dos elements ASF1 parcialment superposats amb la seqüència de la G-box. La presència en el promotor del gen *FPS2* de seqüències consens per la unió de factors Dof i bZIP situades a la distància adequada perquè els factors interaccionin suggereix que aquests elements poden participar en el control de l'expressió del gen *FPS2*.

D'altra banda, en relació amb la intensa expressió en pol.len del gen *FPS2*, l'anàlisi de les regions promotores de diversos gens d'expressió específica en pol.len ha permès identificar els motius GTGG o GTGA com elements involucrats en el control de l'expressió dels gens en pol.len (Twell *et al.*, 1991; Carpenter *et al.*, 1992; Hamilton *et al.*, 1992). El promotor del gen *FPS2* presenta el motiu GTGA en les posicions -41/-38, l'invers del motiu GTGA (TCAC) en les posicions -45/-42, i l'invers del motiu GTGG (CCAC) en les posicions -71/-68 (fig. 41). Posteriorment, s'ha descrit un altre motiu (AAATGA) que constitueix un nou element *cis* implicat en el control de l'expressió en pol.len (Weterings *et al.*, 1995). L'existència de diversos elements *cis* relacionats amb el control de la transcripció en pol.len no és sorprenent, si es té en compte la gran diversitat de gens d'expressió específica en pol.len que existeixen i les diferents funcions que desenvolupen (Mascarenhas, 1975; Weterings *et al.*, 1995). Així doncs, no es pot descartar que altres elements encara no identificats estiguin relacionats amb el control de l'expressió del gen *FPS2* en pol.len.

Finalment, l'anàlisi estructural de la regió -111/+63 del gen *FPS2* indica que el fragment de DNA comprès entre les posicions -79 i -52 conté una repetició invertida i que, per tant, pot formar un "hairpin" (fig. 41). Part d'aquesta repetició invertida ha estat deletada en la construcció (-61/+65)*FPS2-GUS*, que no presenta activitat transcripcional. Així doncs, és possible que aquesta regió participi en la regulació de l'expressió del gen *FPS2*, bé perquè la mateixa conformació adoptada pugui influenciar la transcripció del gen, bé perquè la seqüència pugui ser reconeguda per algun factor proteic específic involucrat en el control de l'expressió del gen.



Evidentment, la funcionalitat d'aquests elements en el control de l'expressió del gen *FPS2* encara no ha estat demostrada. Tot i això, els estudis duts a terme han permès acotar una regió molt concreta del promotor que conté tots els elements necessaris per controlar l'expressió quantitativa i qualitativa del gen *FPS2* i són, per tant, el punt de partida per la realització de nous experiments encaminats a determinar si els elements detectats o uns altres encara per identificar estan implicats en el control de l'expressió del gen *FPS2* d'*Arabidopsis*.