



# **Metabolismo lipídico en *Arabidopsis thaliana*: Caracterización de mutantes *arv* y de las isoenzimas farnesildifosfato sintasa citosólicas**

Ana Verónica Beatriz Keim

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CSIC-IRTA-UAB-UB)

Departament de Genètica Molecular

Metabolismo lipídico en *Arabidopsis thaliana*:

Caracterización de mutantes *arv* y de las isoenzimas farnesildifosfato

sintasa citosólicas

Ana Verónica Beatriz Keim

2012





UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CSIC-IRTA-UAB-UB)

Departament de Genètica Molecular

Programa de Doctorado de Biotecnología - Bienio 2005-2007

Metabolismo lipídico en *Arabidopsis thaliana*:

Caracterización de mutantes *arv* y de las isoenzimas farnesildifosfato

sintasa citosólicas

Memoria presentada por Ana Verónica Beatriz Keim para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Directores:

Autora:

Dr. Albert Ferrer Prats

Dra. Montserrat Arró Plans

Ana Verónica Beatriz Keim

Ana Verónica Beatriz Keim

2012





## ABREVIATURAS



<b>35S CaMV</b>	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
<b>AACT</b>	Enzima acetoacetil CoA tiolasa
<b>ACAT</b>	Acyl-coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase
<b>ADE2</b>	Gen involucrado en la síntesis del aminoácido adenina
<b>AE</b>	Actividad específica
<b>AHD</b>	<b>ARV Homology Domain</b>
<b>Alg5</b>	Proteína de RE de levadura
<b>ARE</b>	<b>ACAT-Related Enzymes</b>
<b>ARV</b>	<b>ARE Required for Viability</b>
<b>atm</b>	Atmósferas
<b>BECL</b>	Base Esfingoide de Cadena Larga
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>c.s.p.</b>	Cantidad suficiente para
<b>cDNA</b>	DNA codificante
<b>CDP-ME</b>	4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol
<b>CDP-MEP</b>	CDP-ME- fosfato
<b>Cer</b>	Ceramidas
<b>Ci</b>	Curies
<b>CMK</b>	Enzima CDP-ME kinasa
<b>Col 0</b>	Columbia 0
<b>Col 3 qrt1</b>	Columbia 3 qrt1/qrt1
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CS</b>	Enzima ceramida sintasa
<b>CsVMPro</b>	Promotor del virus del mosaico de la nervadura de <i>Cassava</i>
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetriltrimetilamonio
<b>CTP</b>	Citidina-trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DHS</b>	Dihidroesfingosina
<b>DIM</b>	Detergent Insoluble Membranes
<b>DMAPP</b>	Dimetilalil difosfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>Ds</b>	Elemento de inserción
<b>DSF</b>	Differential Scanning Fluorimetry
<b>DsRed</b>	Proteína fluorescente roja de discosoma
<b>dsRNA</b>	Double strand RNA
<b>DTT</b>	Ditiotritol
<b>DXP</b>	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato

<b>DXR</b>	Enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
<b>DXS</b>	Enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
<b>E64</b>	Inhibidor de proteasa
<b>EcR</b>	Receptor de ecdisona
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EtNP</b>	Fosforil etanolamina
<b>FPP</b>	Farnesildifosfato
<b>FPS</b>	Enzima farnesildifosfato sintasa
<b>FT</b>	Factor de transcripción
<b>G3P</b>	Gliceraldehído-3-fosfato
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GC</b>	Glicosil ceramidas
<b>GCasa</b>	Enzima glicosilceramidas
<b>GC-MS</b>	Gas chromatography–mass spectrometry
<b>GCS</b>	Enzima glicosilceramida sintasa
<b>GFP</b>	Proteína Fluorescente Verde
<b>GFPS</b>	Enzima Geranilfarnesil difosfato sintasa
<b>GGPP</b>	Geranilgeranil difosfato
<b>GGPPS</b>	Enzima geranilgeranil difosfato sintasa
<b>GIPC</b>	Glucosilinositol fosforilceramida
<b>GIPC</b>	Glucosil inositol fosforilceramidas
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglucosamina
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GPP</b>	Geranildifosfato
<b>GPS</b>	Enzima geranildifosfato sintasa
<b>GST</b>	Glutación -S-transferasa
<b>GUS</b>	$\beta$ -Glucuronidasa
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HDR</b>	Enzima HMBPP reductasa
<b>HDS</b>	Enzima HMBPP sintasa
<b>HIS3</b>	Gen involucrado en la síntesis del aminoácido histidina
<b>HMBPP</b>	4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
<b>HMGR</b>	Enzima HMG-CoA reductasa
<b>HMGS</b>	Enzima HMG-CoA sintasa
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>hRNA</b>	RNA hairpin
<b>IDI</b>	Enzima isopentenil difosfato isomerasa
<b>IPC</b>	Inositol fosforilceramida
<b>IPP</b>	Isopentenil difosfato
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside

<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KSR</b>	Enzima cetoesfingosina reductasa
<b>LCBK</b>	Long Chain Base quinasa
<b>LCBPP</b>	Lon Chain Base fosfatasa
<b>Ler</b>	Landsberg erecta
<b>LEU2</b>	Gen que codifica para el aminoácido leucina
<b>lexA-VP16</b>	Factor de transcripción artificial
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>MCT</b>	Enzima MEP-citidil-transferasa
<b>MDS</b>	Enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa
<b>ME-cPP</b>	2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato
<b>MEP</b>	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
<b>Met</b>	Metoxifenocida
<b>MIPC</b>	Manosil-IPC
<b>MPK</b>	Enzima Mevalonato kinasa
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MS</b>	Medio Murashige & Skoog
<b>MVA</b>	Mevalonato
<b>MDC</b>	Enzima mevalonato-5-difosfato descarboxilasa
<b>MDK</b>	Mevalonato-5-fosfato-kinasa
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (reducido)
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>nmol</b>	Nanomoles
<b>NosTer</b>	Terminador de la nopalina sintasa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer de fosfato sódico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI</b>	Fosfatidil inositol
<b>PMK</b>	Fosfomevalonato kinasa
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride
<b>PSA</b>	Persulfato amónico
<b>psi</b>	Pound per square inch, presión de 1 libra por pulgada <sup>2</sup>
<b>PSPP</b>	Pre-escualeno bifosfato
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RFP</b>	Proteína Fluorescente Roja
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	RNA inducible

---

<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	PCR de retrotranscripción
<b>SAT</b>	Enzima esfingosina acil transferasa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SMT</b>	Enzima esterol metiltransferasa
<b>SPS</b>	Enzima solanesildifosfato sintasa
<b>SPT</b>	Enzima serina palmitoil transferasa
<b>SQE</b>	Enzima escualeno epoxidasa
<b>SQS</b>	Enzima escualeno sintasa
<b>SREBP</b>	Sterol Regulatory Element Binding Protein
<b>sRNA</b>	RNA small
<b>TAE</b>	Tris-Acético-EDTA
<b>T-DNA</b>	DNA de transferencia
<b>TE</b>	Buffer Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>T<sub>m</sub></b>	Melting temperature
<b>TM</b>	Tunicamicina
<b>Tris-CIH</b>	Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>URA3</b>	Gen involucrado en la síntesis del aminoácido uracilo
<b>Wt</b>	Wild type
<b>x g</b>	Unidades de fuerza centrífuga relativa
<b>X-Gluc</b>	5-bromo-4-cloro-3-indonil β-glucurónido

# ÍNDICE



## INTRODUCCIÓN

<b>1. Isoprenoides</b> .....	11
1.1 Biosíntesis de isoprenoides .....	12
1.1.1 <i>Síntesis de IPP</i> .....	13
1.1.1.1 <i>Vía del Mevalonato</i> .....	13
1.1.1.2 <i>Vía del Metileritritol fosfato (MEP)</i> .....	14
1.1.2 <i>Compartimentalización subcelular de las vías de síntesis de isoprenoides</i> .....	16
1.2 Etapas posteriores a la síntesis de IPP.....	17
1.2.1 <i>Enzimas preniltransferasas</i> .....	18
1.2.2 <i>Reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos</i> .....	19
1.3 Esteroles .....	20
1.4 Regulación de la vía del MVA.....	22
1.4.1 <i>HMGR: Principal punto de regulación de la vía del MVA</i> .....	22
<b>2. Farnesildifosfato sintasa</b> .....	24
2.1 FPS en plantas.....	26
2.2 Expresión temporal y espacial de los genes <i>FPS1</i> y <i>FPS2</i> .....	28
2.3 Localización subcelular de las enzimas FPS.....	28
2.4 Función de las FPS en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas .....	29
2.5 Mutantes de Arabidopsis con pérdida de función de los genes <i>FPS1</i> y <i>FPS2</i> .....	32
<b>3. Esfingolípidos</b> .....	34
3.1 Estructura de los esfingolípidos .....	34
3.2 Biosíntesis de esfingolípidos en plantas .....	37
3.3 Funciones de los esfingolípidos.....	39
<b>4. Interacción entre esteroides y esfingolípidos</b> .....	40
4.1 Concepto de “ <i>lipid rafts</i> ” .....	40
4.2 Regulación coordinada de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos .....	41
<b>5. Las proteínas Arv</b> .....	43
5.1 Arv en levaduras y mamíferos .....	43
5.2 Arv en plantas .....	47
<b>OBJETIVOS</b> .....	53

**RESULTADOS I: Caracterización de los mutantes *arv* de *Arabidopsis thaliana***

<b>1. Determinación de la topología de la proteína AtArv1 de <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	57
<b>2. Obtención y caracterización del doble mutante <i>arv1-1:arv2</i></b> .....	60
2.1 Determinación de la posición de la inserción en los mutantes <i>arv1-1</i> y <i>arv2</i> .....	61
2.2 Obtención del doble mutante <i>arv1-1:arv2</i> .....	62
2.2.1 Análisis fenotípico de las líneas <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21.....	64
2.2.2 Análisis de los niveles de mRNA del gen <i>AtARV1</i> en las líneas <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21 mediante PCR cuantitativa.....	64
2.2.3 Análisis bioquímico de los doble mutantes <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21.....	65
2.2.3.1 Análisis de la actividad <i>HMGR</i> en las líneas <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21 .....	66
2.2.3.2 Análisis de esfingolípidos en las líneas <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21 .....	68
2.2.3.3 Análisis del perfil de esteroides en las líneas doble mutante <i>arv1-1:arv2</i> 5.9 y <i>arv1-1:arv2</i> 25.21 .....	68
<b>3. Identificación y caracterización de nuevas líneas mutante con pérdida de función del gen <i>AtARV1</i></b> .....	69
3.1 Identificación y análisis de nuevas líneas mutante con pérdida de función del gen <i>AtARV1</i> ..	70
3.2 Determinación de los niveles de mRNA del gen <i>AtARV1</i> en la línea mutante <i>arv1-2</i> .....	71
3.3 Estudio de la funcionalidad de la proteína <i>AtArv1</i> <sub>214</sub> en la cepa de levadura YNJ1756 .....	72
3.3.1 Análisis del nivel de expresión de la proteína <i>AtArv1</i> <sub>214</sub> en la cepa de levadura YNJ1756 mediante <i>Western blot</i> .....	74
3.4 Obtención del doble mutante <i>arv1-2:arv2</i> .....	75
3.4.1 Estudio de la expresión del mRNA quimérico <i>AtARV1</i> <sub>214</sub> /T-DNA del mutante <i>arv1-2</i> .....	76
3.5 Estudio de la funcionalidad de la proteína híbrida <i>AtArv1</i> <sub>214</sub> /T-DNA en la cepa de levadura YNJ1756 .....	77
3.5.1 Análisis del nivel de expresión de la proteína <i>AtArv1</i> <sub>214</sub> /T-DNA-HA por <i>Western blot</i> .....	78
<b>4. Silenciamiento inducible de la expresión residual del alelo mutante <i>arv1-1</i> en el doble mutante <i>arv1-1:arv2</i> 25.21 mediante siRNA</b> .....	80
4.1 Estudio de los efectos causados por el silenciamiento del gen <i>AtARV1</i> en las diferentes líneas homocigotas con sistema de silenciamiento inducible.....	81
4.1.1 Análisis del fenotipo en plántulas de las líneas silenciadas <i>Red-arv2</i> y <i>Red-25.21</i> .....	81
4.1.2 Efecto del silenciamiento del gen <i>AtARV1</i> sobre las raíces de plántulas de las líneas <i>Red-arv2</i> 5 y <i>Red-25.1</i> 1 .....	84
4.2 Determinación de los niveles de mRNA <i>AtARV1</i> en las líneas <i>Red-25.21</i> 1 mediante PCR cuantitativa .....	85
4.3 Análisis de los niveles de expresión de <i>AtARV1</i> en respuesta al estrés de RE en la línea <i>Red-25.21</i> 1 .....	86
4.4 Caracterización bioquímica del mutante <i>Red-25.21</i> 1 .....	88

4.4.1 Análisis de los niveles de esteroides de la línea Red-25.21 1.....	88
4.4.2 Análisis de los niveles de esfingolípidos de la línea Red-25.21 1 .....	89
<b>DISCUSIÓN I</b> .....	93
<b>CONCLUSIONES I</b> .....	105
<b>RESULTADOS II: Caracterización de las isoenzimas farnesil difosfato sintasa 1S (FPS1S) Y 2 (FPS2) de <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	
<b>1. Caracterización bioquímica de las isoenzimas FPS1S y FPS2 purificadas</b> .....	109
1.1 Expresión de las isoenzimas FPS1S y FPS2 de <i>A. thaliana</i> en <i>E. coli</i> .....	109
1.2 Purificación de las isoenzimas FPS1S y FPS2 .....	110
1.3 Estudio del efecto del Mg <sup>2+</sup> sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2.....	111
1.4 Determinación del pH óptimo de las isoenzimas FPS1S y FPS2.....	112
1.5 Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2 .....	113
1.6 Determinación de las constantes cinéticas de las isoenzimas FPS1S y FPS2 para los sustratos IPP, DMAPP y GPP.....	113
1.7 Estudio de la inhibición por FPP de las isoenzimas FPS1S y FPS2 .....	115
1.8 Análisis de la estabilidad térmica de las isoenzimas FPS1S y FPS2 .....	115
<b>2. Localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2 en células epidérmicas de cebolla</b> .....	117
<b>3. Estudio del patrón de expresión espacial y temporal de los genes <i>FPS1S::GUS</i> y <i>FPS2::GUS</i> en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	119
<b>4. Complementación del mutante nulo <i>fps2-1</i> de <i>A. thaliana</i> con los genes quiméricos <i>FPS1Sp::FPS2</i> y <i>FPS2p::FPS1S</i></b> .....	120
4.1 Reversión del fenotipo del mutante <i>fps2-1</i> mediante expresión de la proteína FPS1S, bajo el control del promotor <i>FPS2</i> .....	120
4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de mRNA y proteína FPS de las líneas <i>FPS2p::FPS1S-mutdis</i> y <i>FPS2p::FPS1S</i> .....	122
4.1.2 Determinación de la actividad FPS de las líneas <i>FPS2p::FPS1S-mutdis</i> y <i>FPS2p::FPS1S</i> .....	123
4.1.3 Determinación de los niveles de esteroides en semillas de las líneas <i>FPS2p::FPS1S-mutdis</i> y <i>FPS2p::FPS1S</i> .....	124
4.1.4 Estudio de los niveles de actividad HMGR y la respuesta a mevastatina en semillas de las líneas <i>FPS2p::FPS1S-mutdis</i> y <i>FPS2p::FPS1S</i> .....	125
4.2 Reversión del fenotipo del mutante <i>fps2-1</i> mediante complementación con la proteína FPS2, expresada bajo el control del promotor <i>FPS1</i> .....	128

4.2.1 Análisis de los niveles de expresión de mRNA y proteína FPS de las líneas <i>FPS1mutdisp::FPS2</i> y <i>FPS1p::FPS2</i> .....	129
4.2.2 Determinación de la actividad FPS en las líneas <i>FPS1mutdisp::FPS2</i> y <i>FPS1p::FPS2</i> ...	130
4.2.3 Determinación de los niveles de sitosterol en las líneas <i>FPS1mutdisp::FPS2</i> y <i>FPS1p::FPS2</i> .....	131
4.2.4 Estudio de la actividad HMGR y el efecto de la mevastatina en semillas de las líneas <i>FPS1mutdisp::FPS2</i> y <i>pFPS1S::FPS2</i> .....	132
<b>DISCUSIÓN II</b> .....	137
<b>CONCLUSIONES II</b> .....	151
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. Material vegetal</b> .....	155
1.1 Cultivos estériles <i>in vitro</i> .....	156
1.1.1 Esterilización de semillas.....	156
1.1.2 Siembra de semillas .....	156
1.1.3 Condiciones de crecimiento.....	157
1.2 Cultivo de plantas en tierra .....	158
1.3 Cultivo líquido .....	158
<b>2. Material bacteriológico</b> .....	159
2.1 Cepas bacterianas .....	159
2.2 Cepas de levadura .....	159
2.3 Medios de cultivo .....	160
<b>3. Vectores plasmídicos</b> .....	161
3.1 Vectores para subclonaje .....	161
3.2 Vector para la expresión de proteínas en <i>E. coli</i> .....	161
3.3 Vectores para la expresión de proteínas en levadura.....	162
3.3.1 Plásmido <i>pJ1133</i> usado en el ensayo de complementación funcional en levaduras <i>YNJ1756</i> .....	162
3.3.2 Vectores usados en la determinación de la topología de <i>AtArv1</i> .....	163
3.4 Vectores para la expresión estable de proteínas en plantas de Arabidopsis.....	165
3.4.1 Vector de expresión inducible de RNA de interferencia del gen <i>AtARV1</i> .....	165
3.4.2 Vectores de expresión de los genes quiméricos usados para la reversión de los fenotipos del mutante <i>fps2-1</i> .....	166

3.5 Vectores utilizados en la localización subcelular de las enzimas FPS .....	166
<b>4. Determinación de la topología de AtArv1 .....</b>	<b>167</b>
4.1 Obtención de los plásmidos utilizados para determinar la topología de AtArv1 .....	167
4.2 Determinación de la topología de AtArv1 mediante el sistema <i>Split Ubiquitine Membrane Yeast Two Hybrid</i> en levadura.....	168
<b>5. Complementación funcional de la cepa de levadura <i>S. cerevisiae</i> YNJ1756 .....</b>	<b>169</b>
5.1 Obtención de los plásmidos pJRAtArv1 <sub>214</sub> -HA y AtArv1 <sub>214</sub> /T-DNA-HA para el ensayo de complementación funcional en levadura .....	169
5.2 Transformación de la cepa de levadura YNJ1756.....	170
5.3 Ensayo de complementación funcional.....	171
<b>6. Construcciones utilizadas para la generación de plantas transgénicas .....</b>	<b>172</b>
6.1 Construcción del plásmido pRedArv1 para el silenciamiento inducible del gen <i>AtARV1</i> .....	172
6.2 Construcciones <i>FPS::GUS</i> utilizadas en el análisis de la expresión de los genes <i>FPS1</i> y <i>FPS2</i> .....	173
6.3 Construcción de la construcción <i>FPS2p::FPS1S-mutdis</i> para la reversión del fenotipo del mutante <i>fps2-1</i> .....	174
<b>7. Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>176</b>
7.1 Condiciones y preparación de plantas para la agroinfiltración .....	176
7.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	177
7.2.1 Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	177
7.2.2 Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 .....	178
7.2.3 Genotipado de la cepa de <i>Agrobacterium transformada</i> .....	178
7.3 Condiciones de crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> transformada .....	179
7.4 Infiltración de plantas con <i>A. tumefaciens</i> GV3101 transformada.....	179
7.5 Selección de plantas transgénicas.....	180
7.6 Selección de líneas homocigotas para el transgén .....	181
<b>8. Generación de plantas doble mutantes de <i>arv1-1:arv2</i> y <i>arv1-2:arv2</i> por polinización cruzada.....</b>	<b>181</b>
<b>9. Obtención de los plásmidos pGEXFPS1 y pGEXFPS2 utilizados en la expresión en <i>E. coli</i> de las isoenzimas FPS1S y FPS2.....</b>	<b>183</b>
<b>10. Localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2 fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP).....</b>	<b>184</b>

10.1 Construcciones de los genes recombinantes <i>FPS1S::GFP</i> , <i>GFP::FPS1S</i> , <i>FPS2::GFP</i> y <i>GFP::FPS2</i> .....	184
10.2 Expresión transitoria mediante microbombardeo de los genes quiméricos <i>GFP::FPS1S</i> , <i>FPS1S::GFP</i> , <i>GFP::FPS2</i> y <i>FPS2::GFP</i> en células epidérmicas de cebolla .....	186
10.2.1 Preparación de las micropartículas de tungsteno .....	186
10.2.2 Adsorción del DNA a la superficie de las micropartículas de tungsteno .....	186
10.2.3 Microbombardeo sobre los cortes de cebolla .....	187
10.3 Observación al microscopio confocal de las células de cebolla transfectadas .....	189
<b>11. Análisis de la expresión de los genes quiméricos <i>FPS1::GUS</i> y <i>FPS2::GUS</i> en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>190</b>
<b>12. Técnicas con DNA.....</b>	<b>192</b>
12.1 Extracción de DNA genómico de tejidos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	192
12.1.1 Extracción de DNA mediante kit comercial.....	192
12.1.2 Extracción de DNA por el método del CTAB .....	192
12.2 Cuantificación de las muestras de DNA.....	194
12.3 Genotipado de los mutantes <i>arv1</i> y <i>arv2</i> .....	194
<b>13. Técnicas con RNA.....</b>	<b>195</b>
13.1 Extracción de RNA de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	195
13.1.1 Extracción de RNA por el reactivo de TRIzol® .....	195
13.1.2 Extracción de RNA mediante un kit comercial.....	196
13.2 Cuantificación de las muestras de RNA.....	196
13.3 Tratamiento para eliminar la posible presencia remanente de DNA .....	197
13.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA total mediante reacción de retrotranscripción.....	197
13.5 Amplificación del cDNA mediante PCR .....	198
13.6 Amplificación del cDNA mediante PCR en tiempo real.....	200
<b>14. Técnicas con proteínas.....</b>	<b>202</b>
14.1. Purificación de las enzimas <i>FPS1S</i> y <i>FPS2</i> fusionadas a la glutatión-S-transferasa expresadas en <i>E. coli</i> .....	202
14.2 Preparación de extractos proteicos de <i>A. thaliana</i> .....	205
14.2.1 Obtención de extractos proteicos a partir de semillas de <i>Arabidopsis</i> para determinar la actividad y los niveles de proteína <i>HMGR</i> .....	205
14.2.2 Obtención de extractos proteicos a partir de semillas de <i>Arabidopsis</i> para determinar la actividad y los niveles de proteína <i>FPS</i> .....	205
14.3 Preparación de extractos proteicos de <i>S. cerevisiae</i> .....	207
14.4 Determinación de la concentración de proteína .....	207
14.4.1 Método de Bradford.....	207
14.4.2 Método de Lowry.....	208

<b>15. Western blot</b> .....	209
15.1 Electroforesis de poliacrilamida-SDS (PAGE).....	210
15.2 Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa .....	211
15.3 Inmunodetección quimioluminiscente .....	212
15.4 Tinción de las proteínas de la membrana de nitrocelulosa .....	213
<b>16. Ensayos de actividad enzimática</b> .....	216
16.1 Determinación de la actividad HMGR .....	216
16.1.1 <i>Reacción enzimática</i> .....	216
16.1.2 <i>Cromatografía en capa fina</i> .....	218
16.1.3 <i>Cuantificación de la mevanolactona marcada con [<sup>14</sup>C]</i> .....	219
16.1.4 <i>Cálculo de la actividad específica</i> .....	219
16.2 Determinación de la actividad FPS .....	219
16.2.1 <i>Reacción enzimática</i> .....	220
16.2.2 <i>Cálculo de la actividad específica</i> .....	221
16.3 Aproximación al cálculo de $K_m$ .....	221
16.4 Determinación del pH óptimo de las enzimas purificadas FPS1S y FPS2 .....	223
<b>17. Análisis de productos metabólicos</b> .....	223
17.1 Extracción y análisis de esteroides .....	223
17.2 Análisis del perfil de esfingolípidos .....	226
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	231
<b>PUBLICACIONES</b> .....	257



# INTRODUCCIÓN



## 1. Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenos, constituyen una de las familias de compuestos naturales más numerosas y diversas a nivel estructural y funcional. Hasta el momento se estima que sólo en el reino vegetal se sintetizan al menos 30.000 compuestos de esta naturaleza (Page *et al.*, 2004). A nivel estructural, hay isoprenoides constituidos por una simple cadena lineal hasta formas más complejas como estructuras cíclicas, anillos, cadenas policarbonadas o multicíclicas. Esta amplia variedad, conlleva que estos compuestos también cumplan funciones muy diferentes en los seres vivos (Tabla 1). Los isoprenoides participan en procesos básicos para el crecimiento y el desarrollo normal de la planta (Croteau *et al.*, 2000), asimismo, también actúan como mediadores en las interacciones de las plantas con su entorno y contribuyen a la reproducción de las mismas. Entre ellos encontramos los fitoesteroles, que forman parte de las membranas celulares, regulando su fluidez; dolicoles, que participan en la glicosilación de proteínas; carotenoides y clorofilas, que participan del proceso de fotosíntesis; brasinoesteroides, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, los cuales constituyen hormonas reguladoras del crecimiento y desarrollo, y por último, ubiquinonas y plastoquinonas, involucradas en el transporte de electrones. Los isoprenoides también participan en la protección frente al estrés oxidativo y térmico, en la defensa directa frente a insectos (Gershenzon y Dudareva, 2007), a herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001; Heiling *et al.*, 2010) o patógenos (Hasegawa *et al.*, 2010), además en las interacciones con otros organismos (insectos o animales que dispersan semillas) o bien como aleloquímicos que participan en la competencia entre diferentes especies de plantas (Weir *et al.*, 2004; Tharayil, 2009). Asimismo, un gran número de isoprenoides poseen un valor comercial elevado, debido a su interés en diferentes áreas industriales. Entre ellos podemos destacar aquellos utilizados como aromatizantes (limoneno o alcanfor), saborizantes (mentol), pigmentos (carotenoides) y polímeros de uso industrial (caucho), entre otros. También son utilizados como agroquímicos (piretrina y azadiractina) o bien como precursores potenciales en la producción de biocombustibles (Bohlmann, 2011). Algunos isoprenoides poseen una elevada relevancia a nivel farmacológico y son utilizados en tratamientos contra el cáncer, como en el caso del paclitaxel o taxol (Rowinsky, 1994), la artemisina como tratamiento contra la malaria (Douglas *et al.*, 2010) o constituyen en sí mismos compuestos nutracéuticos (como los fitoesteroles; Gupta *et al.*, 2011). Incluso, algunos se encuentran en fase de prueba como posibles tratamientos en enfermedades como el HIV (Sabde *et al.*, 2011).

<b>ISOPRENOIDE (Nº de carbonos)</b>	<b>EJEMPLOS</b>	<b>FUNCIONES</b>
HEMITERPENOS (C <sub>5</sub> )	· Isopentenil-tRNA · Citoquininas (cadena lateral) · Isopreno	· Involucrado en la traducción proteica · Fitohormonas · Mecanismo de protección y molécula base en la síntesis de terpenos
MONOTERPENOS (C <sub>10</sub> )	· Mentol, alcanfor, geraniol, pineno, limoneno	· Aromas, fragancias, interacción planta-insecto, actividad antimicrobiana
SESQUITERPENOS (C <sub>15</sub> )	· Fitoalexinas sesquiterpénicas · Grupo farnesilo · Cadena lateral del grupo hemo A	· Antimicrobianas y repelente de insectos · Prenilación de proteínas · Estructura de citocromos
DITERPENOS (C <sub>20</sub> )	· Fitoalexinas · Grupo geranilgeranilo · Giberelinas · Fitol · Cadena lateral del tocoferol y filoquinonas · Taxol	· Actividad antimicrobiana · Prenilación de proteínas · Fitohormonas · Grupo lateral de la clorofila · Transporte de electrones · Defensa contra patógenos
TRITERPENOS (C <sub>30</sub> )	· Esteroles · Brasinoesteroides · Saponinas triterpénicas	· Estructura y función de las membranas · Reguladores del desarrollo · Defensa ante patógenos
TETRATERPENOS (C <sub>40</sub> )	· Carotenoides · Ácido abscísico	· Pigmento fotosintético · Fitohormona
POLITERPENOS (C <sub>&gt;40</sub> )	· Dolicol · Plastoquinona, ubiquinona · Caucho	· Glicosilación de proteínas · Transporte de electrones

**Tabla 1. Clasificación y funciones de los isoprenoides según el número de carbonos que forman parte de su estructura.**

### 1.1 Biosíntesis de isoprenoides

A pesar de la pluralidad de funciones y estructuras, todos los isoprenoides derivan de la misma molécula precursora de cinco carbonos (C<sub>5</sub>) denominada isopentenildifosfato (IPP o unidad isopreno) y su isómero dimetilalildifosfato (DMAPP). Los diferentes isoprenoides se

sintetizan a través de sucesivas reacciones de adición de estas unidades isopreno, principio formulado en 1914 por Wallach, "*Isoprene rule*", la cual fue posteriormente redefinida por Ruzicka en 1953, como "*Biogenetic isoprene rule*". El proceso de síntesis de los isoprenoides, puede dividirse en tres etapas. La primera de ellas consiste en la biosíntesis de la molécula precursora común IPP (y su isómero DMAPP). La segunda contempla la producción de los prenildifosfatos lineales, como el geranildifosfato (GPP), farnesildifosfato (FPP) y geranylgeranildifosfato (GGPP) a partir de los cuales la vía metabólica principal se ramifica para dar lugar a los diferentes isoprenoides finales que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Tabla 1). La tercera etapa comprende todas aquellas reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos que se producen sobre los productos anteriores, como metilaciones o desmetilaciones, ciclaciones, isomerizaciones, hidroxilaciones, oxidaciones y reducciones necesarias para la obtención de los productos finales (Chappell, 1995<sup>1</sup>).

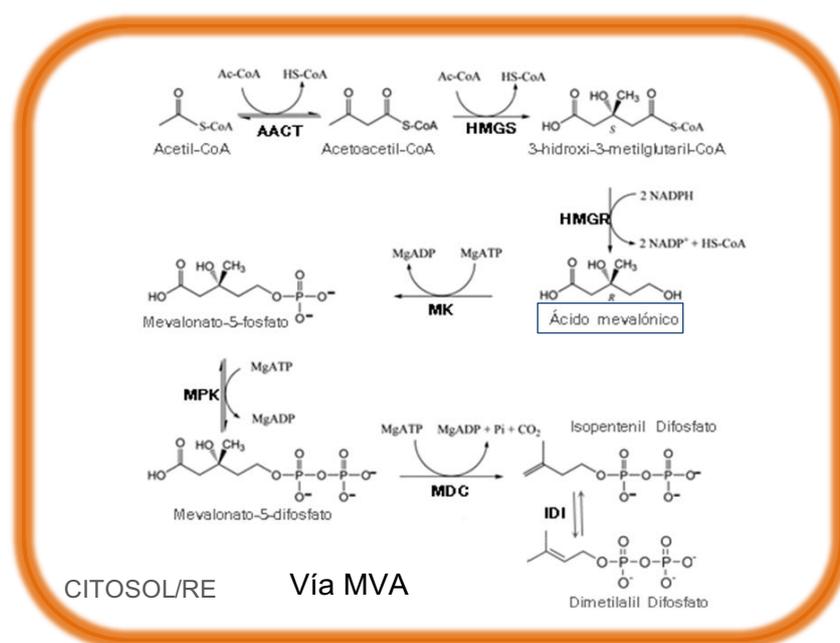
### 1.1.1 Síntesis de IPP

En plantas superiores, el IPP puede obtenerse mediante dos vías metabólicas: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del metileritritolfostato (MEP). La vía del mevalonato fue la primera en ser descubierta (en los años cincuenta) y es la mejor estudiada, por lo cual también suele llamarse vía clásica. Por otro lado, más recientemente, se descubrió la existencia de otra vía distinta de la clásica, la cual fue denominada vía del metileritritolfostato (MEP) o vía de Rohmer, en referencia a su descubridor (Rohmer, 1993), también llamada vía alternativa, aunque prevalece el nombre químico del primer compuesto específico de la misma.

#### 1.1.1.1 Vía del Mevalonato

La vía clásica o del MVA (Figura 1) comienza con una reacción de condensación donde intervienen dos moléculas de acetil-CoA para dar lugar a una molécula de acetoacetil-CoA. Este paso está catalizado por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa (AACT). Posteriormente ocurre otra condensación entre acetoacetil-CoA y una nueva molécula de acetil-CoA para obtener 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA, donde interviene la enzima HMG-CoA sintasa (HMGS). Seguidamente, el HMG-CoA es reducido por la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR), originando mevalonato (primer intermediario específico de esta vía). La enzima mevalonato kinasa (MK) es la responsable de fosforilar la molécula de mevalonato

en el carbono de la posición 5, obteniéndose así, mevalonato-5-fosfato. Este es nuevamente fosforilado por la enzima mevalonato-5-fosfato-kinasa (MPK), que convierte la molécula anterior en mevalonato-5-difosfato. A continuación, este compuesto es descarboxilado por acción de la enzima mevalonato-5-difosfato descarboxilasa (MDC), dando lugar al IPP (Miziorko, 2010). Una vez sintetizado el IPP, por sí mismo no es lo suficientemente reactivo para llevar a cabo las reacciones de condensación para formar isoprenoides de longitud mayor, por lo tanto, una parte de este debe ser previamente convertido en su isómero DMAPP mediante una reacción reversible catalizada por la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI; Mccarvey y Croteau, 1995).

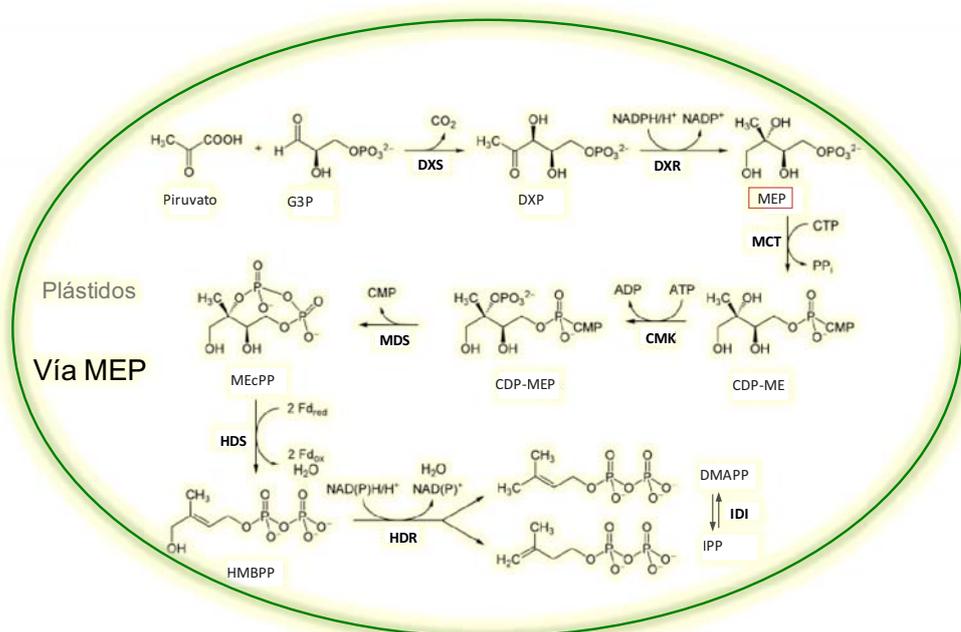


**Figura 1. Esquema de la vía del MVA para la síntesis de IPP.** Ac-CoA: Acetil-Coenzima A. **AACT**: acetoacetil-CoA tiolasa. **HMGS**: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa. **HMGR**: HMG-CoA reductasa. **MK**: mevalonato kinasa. **MPK**: mevalonato-5-fosfato kinasa. **MDC**: mevalonato-5-difosfato descarboxilasa. **IDI**: isopentenil difosfato isomerasa. (Imagen adaptada de Miziorko, 2010)

#### 1.1.1.2 Vía del Metileritritol fosfato (MEP)

La reacción inicial de la vía del MEP (Figura 2) consiste en la condensación de una molécula de piruvato con el grupo aldehído de una molécula de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para producir 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). Esta reacción está catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Seguidamente, se produce un reordenamiento intramolecular y una reducción del DXP que da lugar a 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, compuesto que da nombre a la vía), en este paso interviene la enzima DXP

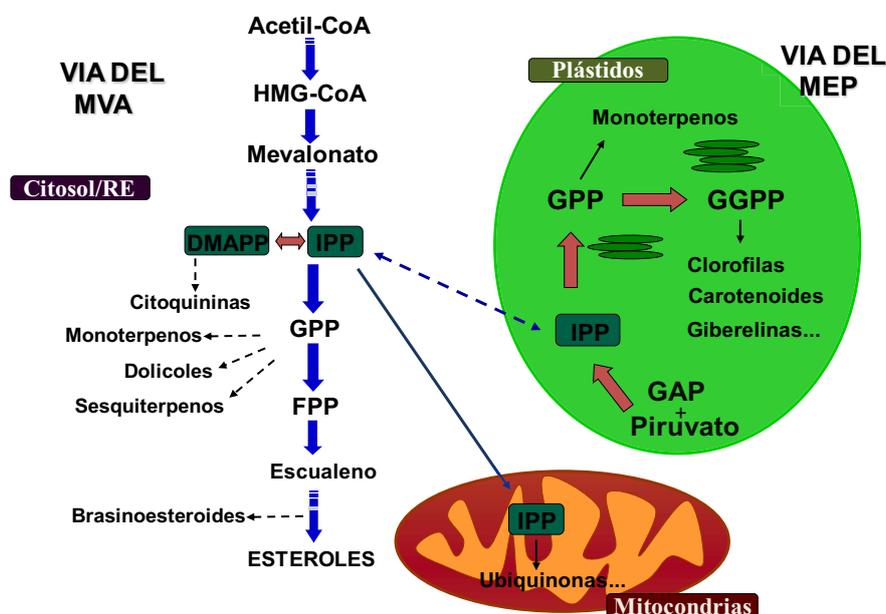
reductoisomerasa (DXR). Posteriormente, MEP participa en 3 procesos enzimáticos: en el primero, es conjugado con citidina-trifosfato (CTP), paso catalizado por la enzima MEP-citidil-transferasa (MCT) para obtener 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). Este es fosforilado por la acción de la 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol kinasa (CMK), que da lugar al compuesto 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol-2 fosfato (CDP-MEP), el cual, es convertido a 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-CPP) a través de la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS). Finalmente el producto anterior es reducido por acción de la enzima 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato sintasa (HDS) a 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato (HMBPP). A partir de HMBPP se sintetizan los productos principales: IPP y DMAPP, en proporción 5:1 (Rohdich *et al.*, 2004) mediante la acción de la enzima HMBPP reductasa (HDR; Phillips *et al.*, 2008). Cabe destacar que este paso marca una diferencia con la vía del MVA, debido a que esta última no es capaz de sintetizar simultáneamente IPP y DMAPP, como ocurre en la vía del MEP. No obstante, se ha observado la presencia de una enzima IPP/DMAPP isomerasa (IDI) en plástidos, por lo cual es posible que el IPP también sea convertido en DMAPP y viceversa mediante la acción de esta enzima. Sin embargo, en un estudio con mutantes con pérdida de función de la enzima IDI1, no se hubo cambios en los niveles de carotenoides, lo que indica que la enzima IDI en cloroplastos no es esencial para el funcionamiento de la vía (Phillips *et al.*, 2008).



**Figura 2. Esquema de la vía del MEP.** G3P: gliceraldehído 3 fosfato. **DXS**: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. DXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato. **DXR**: DXP reductoisomerasa. MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. **MCT**: MEP-citidil-transferasa. CDP-ME: 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol. **CMK**: CDP-ME kinasa. CDP-MEP: CDP-ME-fosfato. **MDS**: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa. ME-cPP: 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato. **HDS**: HMBPP sintasa. HMBPP: 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato. **HDR**: HMBPP reductasa. IPP: isopentenildifosfato. DMAPP: dimetilalildifosfato. **IDI**: IPP/DMAPP isomerasa. (Imagen adaptada de Bouvier *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Compartimentalización subcelular de las vías de síntesis de isoprenoides

En plantas se pueden diferenciar tres compartimentos subcelulares donde se producen isoprenoides: el citosol/RE, los plástidos y las mitocondrias. En el citosol/RE se encuentra la vía del MVA y allí se produce el IPP que da lugar a compuestos como citoquininas, dolicol, sesquiterpenos, fitoesteroles, poliprenoles o brasinoesteroides; asimismo, parte del IPP sintetizado aquí se destina a mitocondrias, donde se utiliza en la síntesis de isoprenoides involucrados en la cadena respiratoria como las ubiquinonas o el grupo hemo A de los citocromos. Recientemente, se ha sugerido la posibilidad de que las enzimas involucradas en la vía MVA se localicen parcial o completamente en peroxisomas (Sapir-Mir *et al.*, 2008). Paralelamente, en los cloroplastos, se halla la vía del MEP que origina IPP para la producción de monoterpenos, clorofilas, tocoferoles, plastoquinonas, carotenoides y hormonas como el ácido abscísico o las giberelinas (Figura 3).



**Figura 3. Modelo de la compartimentalización subcelular de la síntesis de isoprenoides en plantas.** La vía del MVA se encuentra en el citosol/RE y genera IPP a partir de acetil-CoA para la síntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales. La vía MEP tiene lugar en los plástidos y produce IPP y DMAPP a partir de G3P y piruvato para la síntesis de los isoprenoides plásticos.

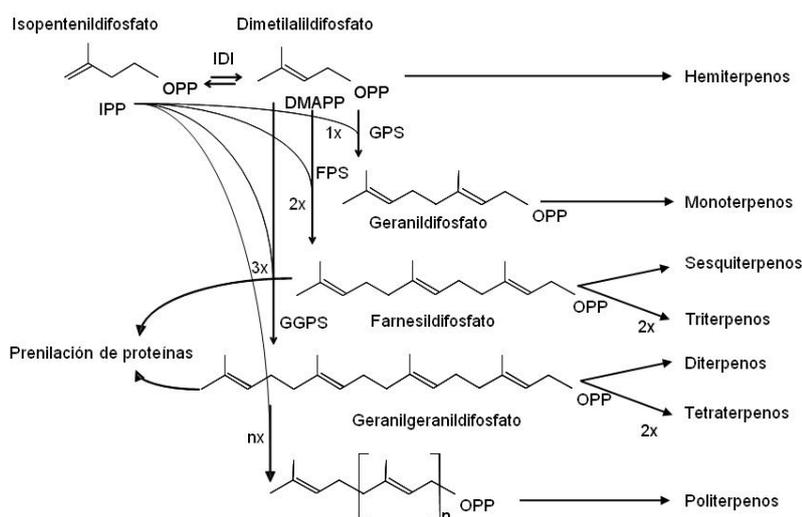
El hecho que las vías del MVA y la del MEP se encuentren en compartimentos separados, no implica que operen de forma absolutamente independiente, sino que parece haber un intercambio de intermediarios limitado entre ambas, a través de la regulación coordinada de la biosíntesis de IPP y DMAPP (Laule *et al.*, 2003; Wille *et al.*, 2004; Dudareva *et al.*, 2005; Rodríguez-Concepción, 2006). Hasta el momento no ha sido posible establecer el o los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el transporte de los compuestos entre ambas vías, aunque se ha planteado en diferentes especies vegetales la

posible existencia de transportadores de prenil difosfatos (Bick y Lange, 2003; Flügge y Gao, 2005; Rodríguez-Concepción, 2010), sin embargo, la regulación del intercambio entre las vías MEP/MVA parece ser mucho más compleja y dependiente de otros factores aún no dilucidados.

## 1.2 Etapas posteriores a la síntesis de IPP

Una vez sintetizados el IPP y su isómero el DMAPP, se utilizan como sustratos en reacciones de condensación secuenciales (tipo cabeza-cola) entre una molécula de DMAPP y 1, 2 o 3 moléculas de IPP para producir GPP ( $C_{10}$ ), FPP ( $C_{15}$ ) o GGPP ( $C_{20}$ ), respectivamente (Wang y Ohnuma, 2000; Vandermoten *et al.*, 2009).

Estos prenildifosfatos constituyen el punto de partida para la síntesis de un gran número de isoprenoides finales. Por ejemplo, el GPP es el precursor de los monoterpenos; a partir de FPP, se sintetizan sesquiterpenos, esteroides brasinoesteroides, triterpenoides, poliprenoles, la cadenas laterales de la ubiquinona y proteínas farnesiladas; y el GGPP es el punto de partida en la síntesis de diterpenos, giberelinas, carotenoides, ácido abscísico, cadenas laterales de la clorofila, filoquinonas, plastoquinonas, tocoferoles y proteínas geranilgeraniladas (Tholl y Lee, 2011). Por último, los politerpenos ( $C_{>40}$ ) se obtienen a partir de la adición secuencial de unidades IPP sobre el FPP y los sustratos alílicos subsiguientes (Figura 4).

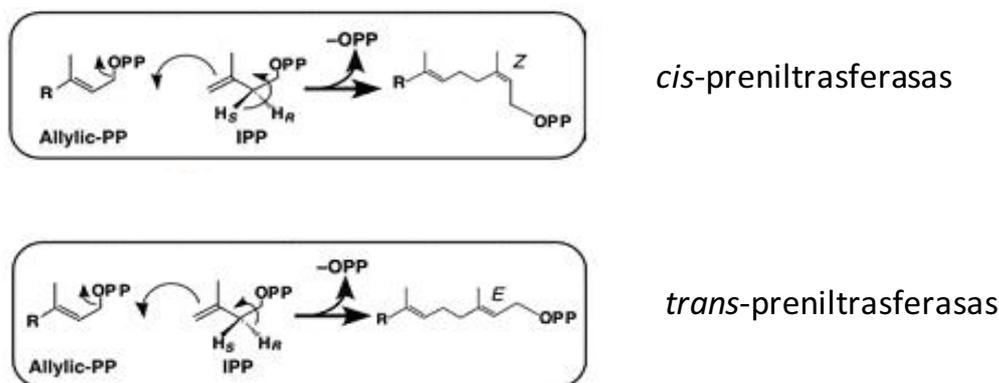


**Figura 4. Esquema representativo de la síntesis de prenil difosfatos y sus productos finales.** Reacciones de condensación entre IPP y DMAPP que originan los intermediarios GPP, FPP y GGPP, a partir de los cuales se forman los diferentes grupos de compuestos isoprenoides. **IDI:** IPP/DMAPP isomerasa, **GPS:** geranildifosfato sintasa, **FPS:** farnesildifosfato sintasa, **GGPS:** geranilgeranildifosfato sintasa. (Imagen adaptada de McGarvey y Croteau, 1995).

### 1.2.1 Enzimas preniltransferasas

Las preniltransferasas, también llamadas prenildifosfato sintasas, son las enzimas responsables de catalizar las reacciones de condensación entre el IPP y los diferentes sustratos alílicos. Esta reacción, se inicia con la eliminación del grupo difosfato de la posición C<sub>1</sub> del sustrato alílico, formando un carbocatión alílico, proceso activado por la presencia de un catión divalente como el Mg<sup>2+</sup>. El carbocatión resultante es atacado en el entorno del C<sub>4</sub> por una molécula de IPP formando un nuevo enlace carbono-carbono y un doble enlace. El resultado es una condensación 1'-4 entre el C<sub>1</sub> del sustrato alílico y el C<sub>4</sub> del IPP (Poulter y Rilling, 1976). Las preniltransferasas repiten esta condensación entre el IPP y el sustrato alílico hasta producir un prenildifosfato de longitud y estereoquímica específica (Chappell, 1995<sup>2</sup>).

En lo que respecta a la clasificación de estas enzimas, las preniltransferasas se dividen en dos grupos, las *cis* o (*Z*)-preniltransferasas y las *trans* o (*E*)-preniltransferasas, en función de la estereoquímica de la reacción de condensación entre el IPP y el sustrato alílico (Ogura y Koyama, 1998; Koyama, 1999). En ambos casos, el mecanismo de la reacción es el mismo, ya que implican elongaciones electrofílicas, sin embargo, la diferencia radica en la estereoquímica de los productos formados (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas *cis*- y *trans*-preniltransferasas.** (Imagen adaptada de Takahashi y Koyama., 2006).

La mayoría de las preniltransferasas descritas pertenecen a la familia de las *E*-preniltransferasas. Estas a su vez, se clasifican en función de la composición de las subunidades y la longitud del producto sintetizado (Koyama, 1999). El primer grupo, denominado tipo I o de cadena corta, comprende las *E*-preniltransferasas responsables de

la síntesis de prenildifosfatos de hasta 25 átomos de carbono. Son enzimas que actúan como homodímeros y precisan de cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$  o el  $Mn^{2+}$ . Se incluyen dentro de este grupo las enzimas geranildifosfato sintasa (GPS), farnesildifosfato sintasa (FPS), y geranilgeranildifosfato sintasa (GGPS), las cuales se encuentran en todos los organismos vivos, ya que sus productos de reacción, GPP, FPP, y GGPP, se encuentran en la parte troncal de la vía de síntesis de isoprenoides. Por otro lado, se encuentran las *E*-preniltransferasas de tipo II o de cadena mediana que catalizan la síntesis de cadenas prenílicas de  $C_{30}$  y  $C_{35}$  a partir de FPP o GGPP e incluyen enzimas bacterianas como la hexaprenildifosfato sintasa (HexPS) y la heptaprenildifosfato sintasa (HepPS), cuyos productos de reacción son utilizados posteriormente en la síntesis de quinonas (Szkopińska, 2000). Estas enzimas, actúan en forma de heterodímeros y en presencia de cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$ . Por último, se halla el grupo de las *E*-preniltransferasas de tipo III o de cadena larga, responsables de la síntesis de cadenas prenílicas de 40, 45 y 50 átomos de carbono, a partir de FPP o GGPP. Actúan como homodímeros y necesitan de la presencia de un factor proteico para mantener un recambio catalítico eficiente, así como también de cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$ . A este grupo pertenecen enzimas como la octaprenildifosfato sintasa (OPS) y la solanesildifosfato sintasa (SPS; Ohnuma *et al.*, 1991).

Respecto a las *Z*-preniltransferasas, se subclasifican en dos grupos; las de tipo IV o de cadena larga y las de tipo V o de cadena corta. La mayor parte pertenecen al primer grupo (tipo IV) y se trata de enzimas que sintetizan *E-Z*-prenildifosfatos de cadena larga mediante la condensación sucesiva de IPP en posición *cis* sobre el sustrato alílico *E*-FPP. Son activas en forma de homodímeros y requieren cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$ , así como también de la presencia de un componente lipídico o detergente para mantener la eficiencia en el recambio catalítico. Un ejemplo lo constituye la enzima *Z,Z*-FPS de tricomas de *Solanum habrochaites* (Sallaud *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos

En la mayoría de los casos, los productos de reacción de las preniltransferasas son posteriormente convertidos en  $C_5$  hemiterpenos (excepto en *Arabidopsis*),  $C_{10}$  monoterpenos,  $C_{15}$  sesquiterpenos o  $C_{20}$  diterpenos por enzimas denominadas terpeno sintasas (Degenhardt *et al.*, 2009).

Los productos obtenidos pueden ser modificados mediante reacciones secundarias como hidroxilaciones, peroxidaciones, metilaciones, acilaciones, glicosilaciones, entre otras,

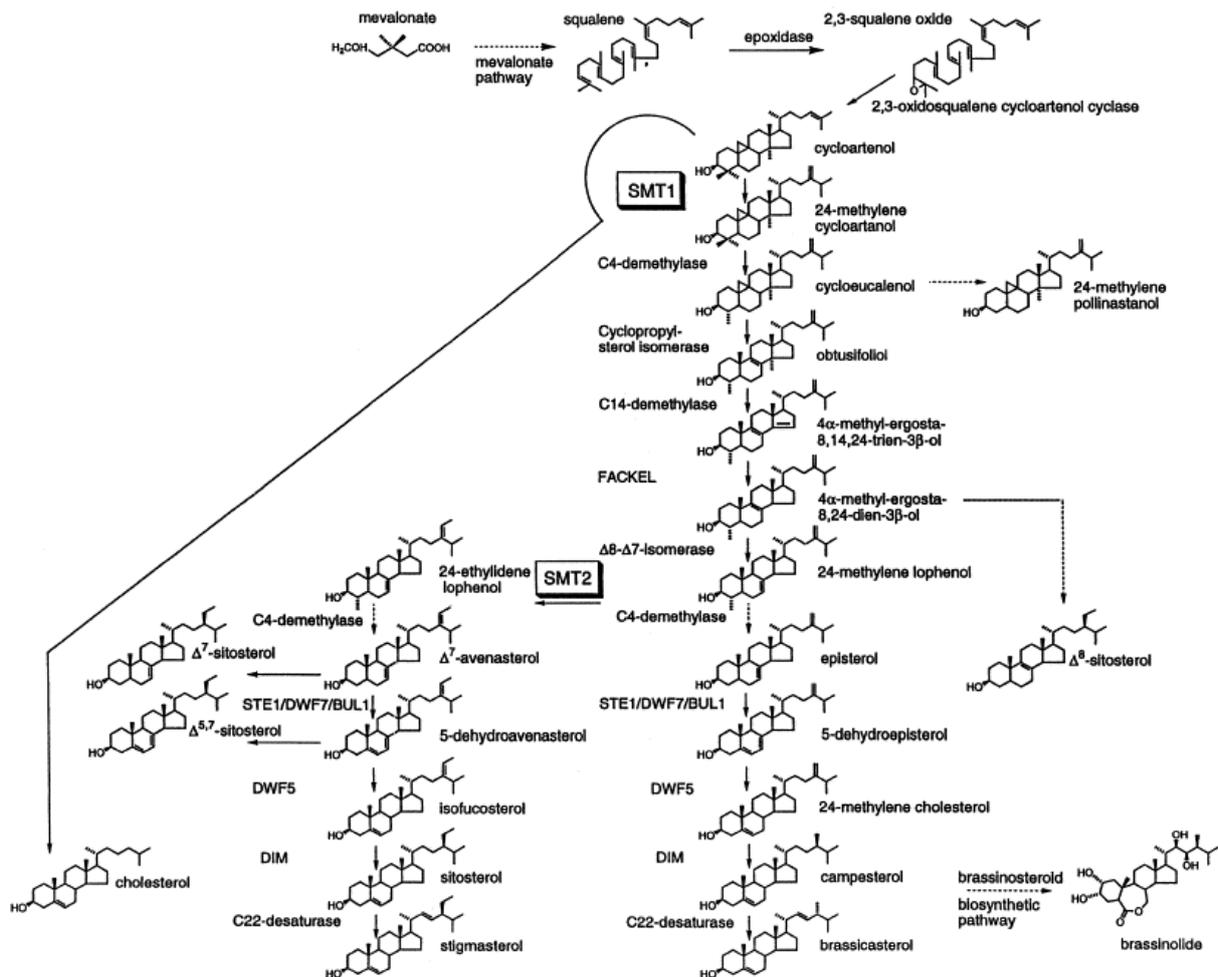
que originan compuestos terpénicos más complejos. Un ejemplo de este nivel de complejidad, lo constituye el caso de la síntesis de los esteroides, tratado a continuación.

### 1.3 Esteroides

Los esteroides son considerados metabolitos primarios de naturaleza isoprenoide. Su estructura base es un anillo perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno y son sintetizados por todos los organismos eucariotas, pero con diferencias en el proceso de biosíntesis y las estructuras finales, según la especie. Mientras que en mamíferos y levaduras se sintetiza un único tipo de esteroide mayoritario, colesterol y ergosterol, respectivamente; en plantas, se sintetiza una mezcla compleja, donde predominan sitosterol, campesterol y estigmasterol (también poseen colesterol, pero sólo representa un porcentaje muy bajo comparado con el total de fitoesteroides sintetizados).

Los esteroides poseen múltiples funciones. Una de las principales y mejor estudiada es como constituyente de las membranas, donde interactúan con cadenas laterales de fosfolípidos y proteínas, regulando la fluidez y permeabilidad de la misma (Demel y De Kruffy, 1976; Bloch, 1983). Asimismo, son partícipes en algunos casos de la regulación de procesos metabólicos asociados a membrana, como se describirá más adelante, donde interactúan con otros compuestos como los esfingolípidos (*lipid rafts*). También son precursores de hormonas vegetales, ya que el campesterol se utiliza como precursor para la síntesis de brasinoesteroides, conocidos por su función como reguladores del crecimiento (Schaller, 2003). Por otro lado, algunos estudios sugieren que los esteroides podrían estar involucrados en diferentes procesos como por ejemplo en la regulación de la división y elongación celular, en el establecimiento de la polaridad celular, la acumulación de celulosa, la regulación del desarrollo del embrión, así como también podrían estar relacionados con la biosíntesis del etileno (Boutté y Grebe, 2009). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos procesos todavía no han podido elucidarse por completo.

La vía de síntesis de esteroides, comienza específicamente con el escualeno, el cual se oxida convirtiéndose en 2,3-óxido escualeno que se cicla, formándose cicloartenol y continúa la vía de síntesis que consta de unas 30 reacciones enzimáticas asociadas a membrana (Piironen *et al.*, 2000) que dan lugar a los diferentes intermediarios que culminarán con la síntesis de los esteroides finales (Figura 6).



**Figura 6. Esquema representativo de la biosíntesis de esteroides en plantas.** (Imagen obtenida de Schaller, 2003)

Los esteroides son los isoprenoides que mayor requerimiento presenta la célula, por lo tanto su síntesis debe estar correctamente regulada y coordinada. Al comienzo de la vía, se encuentra la enzima SQS, que es considerada un punto importante de control (Busquets *et al.*, 2008). Posteriormente, se han identificado otros puntos de control de la vía que son las etapas catalizadas por las enzimas esteroil metiltransferasa, SMT1 y SMT2. La primera, es la responsable de catalizar la metilación del cicloartenol para formar 24-metilcicloartenol, mientras que SMT2 controla los niveles relativos de campesterol/sitosterol, catalizando la metilación del 24-metilenlofenol para obtener 24-etiliden-lofenol. La actividad de estas enzimas regulan las proporciones de colesterol, campesterol y sitosterol en la célula (Schaller, 2003). Si bien los esteroides libres constituyen la mayor parte del total de estos compuestos encontrados en las células, también es posible hallarlos bajo la forma de esteril-ésteres (donde el hidroxilo en C<sub>3</sub> es sustituido por un ácido graso) que se almacenan en forma de gotas lipídicas. La esterificación constituye una forma de regulación de los niveles

de esteroides libres ya que si se acumulan en exceso pueden llegar a ser tóxicos (Schaller, 2003).

#### 1.4 Regulación de la vía del MVA

Considerando la enorme diversidad a nivel de estructura, número y función que presentan los isoprenoides en plantas superiores, es evidente que se requiere un alto grado de regulación y coordinación entre las vías de producción, a diferentes niveles; desde la planta entera, a cada órgano, tejido, célula y orgánulo, hasta llegar al nivel molecular. Asimismo la regulación no sólo abarca un aspecto de localización física sino también temporal, dependiendo del estadio de desarrollo o de la necesidad de respuesta ante una situación de estrés.

##### 1.4.1 HMGR: Principal punto de regulación de la vía del MVA

La enzima HMGR, como se mencionó anteriormente (apartado 1.1.1.1), es la responsable de la formación del mevalonato a partir de HMG-CoA en la vía del MVA. En plantas, se ha descrito que la enzima HMGR está codificada por familias multigénicas que dan lugar a diferentes isoformas (Antolín, tesis doctoral, 2005). La HMGR está localizada en la membrana del RE, y a nivel estructural, posee una región N-terminal citosólica (muy divergida entre diferentes especies), dos secuencias transmembrana altamente conservadas, una región conectora divergente y un dominio catalítico orientado hacia el citosol, muy conservado evolutivamente (Figura 7; Campos y Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996). *Arabidopsis* presenta una pequeña familia multigénica compuesta por dos genes, *HMG1* y *HMG2*, los cuales expresan tres isoformas, HMGR1L, HMGR1S (que difieren entre sí en una extensión N-terminal de 50 aa presente en HMGR1L) y HMGR2.

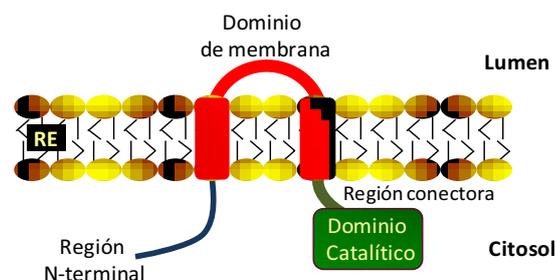


Figura 7. Esquema de la topología de la enzima HMGR.

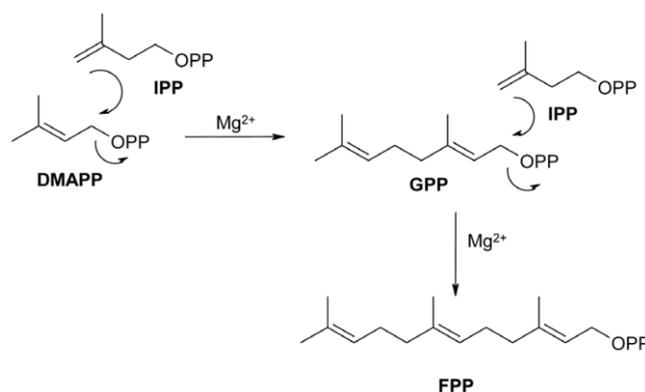
En plantas, al igual que en mamíferos y levaduras, la HMGR constituye el principal punto de control de la vía del MVA y de la síntesis de esteroides. Se ha demostrado que la actividad de la HMGR responde a una gran variedad de estímulos. Entre ellos se encuentran factores externos como la luz (Wong *et al.*, 1982; Ji *et al.*, 1992; Learned y Connolly, 1997), tratamientos con herbicidas (Grumbach *et al.*, 1979; Bach *et al.*, 1986), heridas (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1991; Kondo *et al.*, 2003) y exposición a metales pesados (Genshick *et al.*, 1992). No obstante, la enzima está regulada también por compuestos intracelulares como el trans-farnesol (Hemmerlin y Bach, 2000), fitohormonas (Mansouri *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2009; Rupasinghe *et al.*, 2001; Russel y Davidson, 1982), esfingolípidos (Nieto *et al.*, 2009) y fitoesteroides (detallado a continuación). Estos metabolitos afectan la actividad HMGR modulando su expresión a nivel transcripcional y post-transcripcional (Stermer *et al.*, 1994, Nieto *et al.*, 2009), mediante proteína kinasas (Dale *et al.*, 1995; Mackintosh *et al.*, 1992; Choi y Bostock, 1994), Ca<sup>++</sup> (Antolín-Llovera *et al.*, 2011; Toroser y Huber 1998) o proteína fosfatasa 2A (Antolín Llovera *et al.*, 2011). El estadio de desarrollo de las plantas también influye en gran medida en la expresión y actividad HMGR ya que, generalmente, en tejidos de crecimiento rápido como los meristemos apicales de tallos y raíces se encuentran elevados niveles de actividad HMGR; por el contrario, en tejidos maduros, los niveles de actividad HMGR son mucho menores (Stermer *et al.*, 1994). Asimismo, en *A. thaliana*, el nivel de actividad HMGR en hojas jóvenes es superior en comparación con hojas maduras (Manzano *et al.*, 2004).

Los niveles de esteroides son uno de los puntos donde mejor se reflejan las alteraciones producidas en el flujo de la vía del MVA a causa de variaciones en la actividad HMGR. El estudio realizado por Wentzinger *et al.* (2002), en células BY-2 de tabaco, evidenció que la inhibición de la SQS con escualestatina y de la escualeno epoxidasa con terbinafina provoca una disminución de los niveles de esteroides y un aumento en la actividad HMGR de entre 2 y 4 veces. Por otro lado, al sobreexpresar la enzima HMGR1 de *Hevea brasiliensis* en plantas de *N. tabacum*, se observó que al incrementar los niveles de esta enzima, se aumentaron también hasta 6 veces los de esteroides (Schaller *et al.*, 1995). Varios estudios realizados en *A. thaliana* apoyan este concepto, por ejemplo en el mutante *hmg1* de Arabidopsis, la pérdida de función del gen *HMG1* provoca una disminución de los niveles de esteroides totales, hasta un 47% en plántulas y de un 25% en inflorescencias (Suzuki *et al.*, 2004). En otro estudio, se observó que al sobreexpresar las isoformas HMGR1S y HMGR2 completas así como también sus dominios catalíticos, el contenido total de esteroides se incrementó hasta 3,6 veces (Gonzalez, 2002; Manzano *et al.*, 2006). En el mutante *dry2/sqe1-5* (que presenta una disminución de la actividad escualeno epoxidasa), se observó que en raíces se produce una acumulación de escualeno, un incremento de 2,8 veces los niveles de actividad HMGR y una disminución del contenido de estigmasterol y

sitosterol, mientras que en la parte aérea, los niveles de estos compuestos y de la actividad HMGR no se encuentran alterados (Posé *et al.*, 2009). Por otro lado, se observó que la inhibición de la vía de biosíntesis de esfingolípidos en plantas de *Arabidopsis*, disminuye los niveles de esteroides totales de la planta, así como la actividad de la enzima HMGR, aunque sin presentar alteraciones a nivel de mRNA o de la proteína HMGR, lo que indica que esta regulación ocurre a nivel post-traducciona (Nieto *et al.*, 2009). Este hecho señala además, la posible existencia de una regulación coordinada entre la vía del MVA y la biosíntesis de esfingolípidos, la cual se tratará en el apartado 4.

## 2. Farnesildifosfato sintasa

La enzima farnesildifosfato sintasa (FPS; EC 2.5.1.1/EC 2.5.1.1.0) pertenece a la familia de las *trans*-(*E*)-preniltrasferas de tipo I y cataliza dos reacciones secuenciales, la primera entre IPP ( $C_5$ ) y DMAPP ( $C_5$ ) para obtener el intermediario GPP (geranildifosfato,  $C_{10}$ ) y posteriormente la condensación del GPP con otra molécula de IPP para formar FPP (farnesildifosfato,  $C_{15}$ ; figura 8).



**Figura 8. Esquema de la reacción catalizada por la enzima FPS.** Reacción de condensación entre el IPP y el sustrato alílico DMAPP para formar GPP y su condensación con la segunda molécula de IPP que da lugar a una molécula de FPP (Imagen obtenida de Szkopińska y Plochocka, 2005).

Hasta el momento se han caracterizado FPS de distintos organismos desde procariontes como *B. stearothermophilus* (Koyama *et al.*, 1993), hasta eucariotes como rata (Clarke *et al.*, 1987), levadura (Eberhardt y Rilling, 1975; Anderson *et al.*, 1989), cerdo (Yeh y Rilling, 1977), pollo (Tarshis *et al.*, 1994), humanos (Barnard y Popjak, 1981; Wilkin *et al.*, 1990), estas últimas también han sido cristalizadas (Tharshis *et al.*, 1996; Rondeau *et al.*,

2006) y numerosas especies de plantas como se detalla en el siguiente apartado. La mayoría de las FPS descritas poseen una masa molecular de aproximadamente 40 kDa y actúan en forma de homodímero, dando lugar a un complejo de 80-84 kDa. Al comparar las secuencias de la enzima FPS de diferentes especies se han identificado 7 regiones conservadas (I a VII), dentro de las cuales, las regiones II y VI poseen dominios ricos en aspartato. El dominio II se llama FARM (*First Arpartate Rich Domain*) y el VI, SARM (*Second Arpartate Rich Domain*; figura 9) (Szkopińska y Plochocka, 2005). Diferentes estudios de mutagénesis dirigida en aminoácidos de estos dominios determinaron que los aminoácidos aspartato conservados en el dominio FARM y las argininas como los aspartatos 1 y 2 del dominio SARM son críticas para la eficiencia catalítica de la enzima FPS (Joly y Edwards 1993; Marrero *et al.*, 1992; Song y Poulter, 1994). Posteriormente se observó en la estructura tridimensional de la enzima FPS de pollo, que estas regiones se encuentran en una cavidad central en el homodímero de FPS donde se localiza el centro activo de la enzima, por lo cual resultan indispensables para la actividad catalítica de la misma (Tarshis *et al.*, 1996). Asimismo, estas secuencias se encuentran conservadas en otras *E*-preniltransferasas como la GGPP, hexaprenil (C<sub>30</sub>) y heptaprenil (C<sub>35</sub>) difosfato sintasas (Chen *et al.*, 1994).

	I	II	FARM	III	IV	
<i>G.g.</i>	69..GGKCNRGLT	107..ELFQAFFLVA	DDI--MD	QSLTRRG	142..AINDSFLLES	184..GQMLD
<i>H.s.</i>	55..GGKYNRGLT	93..ELLQAFFLVA	DDI--MD	SSLTRRG	128..AINDANLLEA	170..GQTLD
<i>S.c.</i>	50..GGKLNRLS	90..ELLQAYFLVA	DDM--MD	KSITRRG	125..AINDAFMLEA	167..GQLMD
<i>A.t.</i>	46..GGKLNRLS	84..EWLQAYFLVL	DDI--MD	NSVTRRG	119..AINDGILLRN	161..GQMID
<i>B.s.</i>	45..GGKRIRPLI	76..EMIHTYSLIH	DDLPSMD	NDDLRRG	115..A-GDGLLTYA	159..GQAAD

	V	VI	SARM	VII	
<i>G.g.</i>	214..KT	250..GEYFQIQ	DDYLD	CFGDPALTGK-VGTD	355..FLGLAQKIYKRQK
<i>H.s.</i>	200..KT	236..GEFFQIQ	DDYLD	LFGDPSVTGK-IGTD	341..FLGLARKIYKRK
<i>S.c.</i>	197..KT	233..GEYFQIQ	DDYLD	CFGTPEQIGK-IGTD	340..LTAFLNKVYKRK
<i>A.t.</i>	191..KT	226..GIYFQVQ	DDYLD	CFADPETLTK-IGTD	331..LKSFLAKIYKRQK
<i>B.s.</i>	183..KT	217..GLAFQIR	DDILD	IEGAEEKIGKPVGSD	285..LAYICELVAARDH

**Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los siete regiones (I a VII) conservadas en las FPS de diferentes especies.** En los recuadros se destacan las regiones FARM y SARM que indican el primer y segundo motivo rico en aspartato, respectivamente. Los números indican la posición del primer aa y en negrita se indican los aa conservados en todas las secuencias. *G.g.*, *Gallus gallus*; *H.s.*, *Homo sapiens*; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *A.t.*, *Arabidopsis thaliana*; *B.s.*, *Bacillus stearothermophilus* (Szkopińska y Plochocka, 2005).

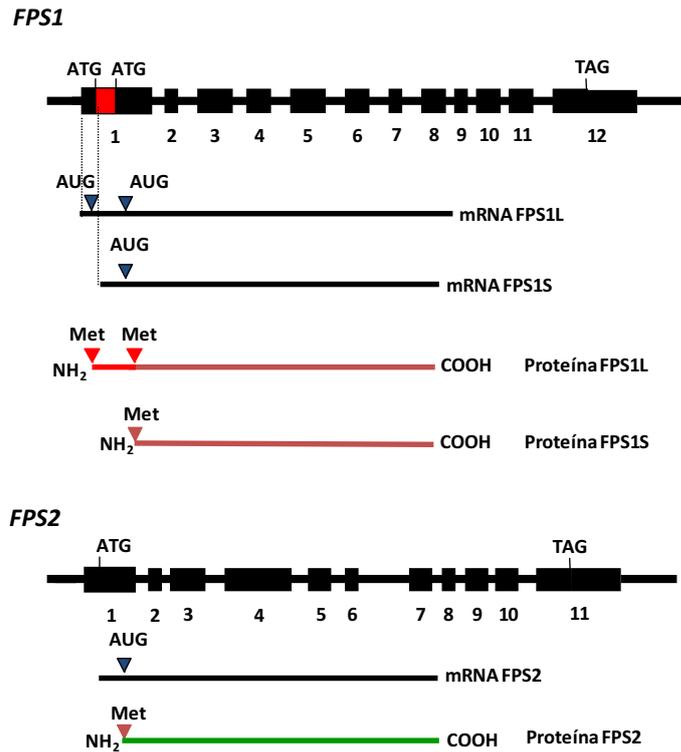
## 2.1 FPS en plantas

En el reino vegetal, la primera secuencia de cDNA clonada de una FPS fue la de *Arabidopsis thaliana* (Delourme *et al.*, 1994) y a partir de ésta, siguieron otras como la de *Lupinus albus* (Attucci *et al.*, 1995<sup>1</sup> y 1995<sup>2</sup>), *Zea mays* (Li y Larkins, 1996), *Artemisia annua* (Matsushita *et al.*, 1996), *Hevea brasiliensis* (Adiwilaga y Kush, 1996), *Capsicum annuum* (Hugueney *et al.*, 1996), *Oryza sativa* (Sanmiya *et al.*, 1997), *Solanum lycopersicum* (Gaffe *et al.*, 2000), *Abies grandis* (Tholl *et al.*, 2001), *Picea abies* (Schmidt y Gershenzon, 2007), *Centella asiatica* (Kim *et al.*, 2005) y *Catharanthus roseus* (Thabet *et al.*, 2011), entre otras.

Las FPS de plantas presentan una característica común con otras enzimas de la vía de síntesis de isoprenoides, que es la presencia de pequeñas familias multigénicas. Por ejemplo en *Artemisia annua* se aislaron hasta 3 cDNAs que codifican FPS (Souret *et al.*, 2003), mientras que en *Artemisia tridentata* se han hallado dos isoformas de la enzima (Hemmerlin *et al.*, 2003<sup>2</sup>). En *Lupinus albus* se clonaron dos cDNAs que codifican FPS con alto grado de homología entre las secuencias aminoacídicas (Attucci *et al.*, 1995<sup>1</sup>). En *Parthenium argentatum* han sido clonadas dos FPS (Pan *et al.*, 1996). En tomate, se encontró un cDNA que codifica FPS y se ha detectado otra secuencia con un alto grado de homología (Gaffe *et al.*, 2000), como ocurre en el caso del *Gingko biloba* (Wang *et al.*, 2004). En el caso del arroz se ha observado la presencia de dos isoenzimas, FPPS1 y FPPS2 (Sanmiya *et al.*, 1999).

*Arabidopsis thaliana* posee dos genes que codifican FPS, *FPS1* (At5g47770) y *FPS2* (At4g17190) (Figura 10A). El gen *FPS2* da lugar a una única población de mRNA que codifica una proteína de 342 aa (FPS2), mientras que el gen *FPS1* es bifuncional ya que expresa dos poblaciones de mRNA diferentes que codifican dos proteínas de 384 y 343 aa, FPS1L y FPS1S, respectivamente. Estas dos isoformas de FPS1, presentan una secuencia aminoacídica idéntica excepto en el extremo N-terminal, donde FPS1L posee una extensión de 41 aa, respecto de FPS1S (Cunillera *et al.*, 1997). Las proteínas FPS1S y FPS2 presentan una identidad del 90,6% y una similitud del 94,5% (Figura 10B; Cunillera *et al.*, 1996).

A



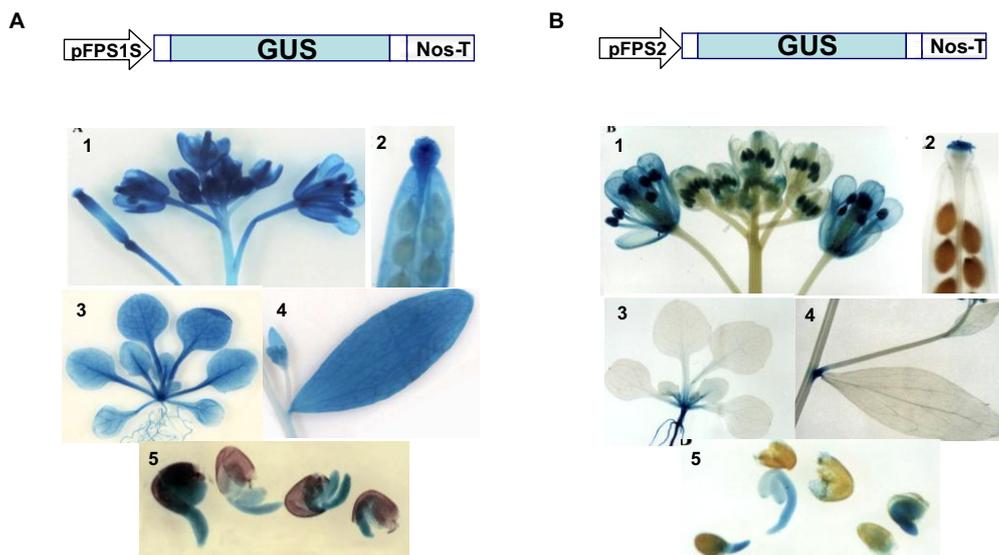
B

<b>FPS1S</b>	1	<b>METDLKSTFLNVYSVLKSDLLHDPSFEFTNESRLWVDRMLDYNVRGGKLNRLSVVDSFKLLK</b>	63
<b>FPS2</b>	1	<b>MA.....D.....Q.....H...Q.LE.....Y.....</b>	62
		I	
<b>FPS1S</b>	64	<b>QGNDLTEQEVFLSCALGWCIEWLQAYFLVLDLDDIMDNSVTRRGQPCWFRVPQVGMVAINDG</b>	123
<b>FPS2</b>	63	<b>..Q...K.T.....I.....K.K...I.....</b>	122
		II	III
<b>FPS1S</b>	124	<b>ILLRNHIHRILKKHFRDKPYVDLVDLDFNEVELQTACGQIMIDLITTFEGEKDLSKYSLSI</b>	183
<b>FPS2</b>	123	<b>.....EM.....F.....D.....Q.....</b>	182
		IV	
<b>FPS1S</b>	184	<b>HRRIVQHKTAAYSYFYPVACALLMAGENLENHIDVKNVLVDMGIYFQVQDDYLDCFADPE</b>	243
<b>FPS2</b>	183	<b>.....EY.....T...T.....A.....</b>	242
		V	VI
<b>FPS1S</b>	244	<b>TLGKIGTDIEDFKCSWLVKALERCSEEQTKILYENYKGTDPNSVAKVKDLYKELDLEGV</b>	303
<b>FPS2</b>	243	<b>.....AE.....A.....A.....</b>	302
		VII	
<b>FPS1S</b>	304	<b>FMEYESKSYEKLGTGAIEGHQSKAIQAVLKSFLAKIYKRQK</b>	343
<b>FPS2</b>	303	<b>.....KE.....KL..A.....</b>	342

**Figura 10. Esquema de la estructura de los genes *FPS1* y *FPS2* de *A. thaliana*.** A) Las cajas negras indican los exones. La caja roja en *FPS1*, representa la secuencia nucleotídica que codifica la extensión N-terminal de la isoforma FPS1L. Debajo de cada gen se indican el mRNA que expresa cada gen y las proteínas codificadas por cada uno. B) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las isoformas FPS1S y FPS2. En este último caso se muestran sólo los aa diferentes entre ambas isoenzimas. Los recuadros grises indican las 7 regiones conservadas, de las cuales las regiones II y VI constituyen los dominios FARM y SARM, respectivamente.

## 2.2 Expresión temporal y espacial de los genes *FPS1* y *FPS2*

La expresión de los genes *FPS* en *Arabidopsis thaliana* fue analizada en plantas transgénicas portadoras de los transgenes *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS*. A través de este estudio, se observó que el gen *FPS1* presenta una expresión generalizada e intensa durante todo el desarrollo de la planta tanto en la fase vegetativa como reproductiva (Figura 11A), mientras que el gen *FPS2* presenta una expresión restringida a órganos florales, semillas y estadios tempranos de la germinación (Figura 11B; Cunillera *et al.*, 2000; Closa *et al.*, 2010).



**Figura 11. Patrones de expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* en plantas de *A. thaliana* transformadas con los genes quiméricos *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS*.** Las imágenes pertenecen a: 1) inflorescencias en distintos estadios de desarrollo, 2) detalle de la parte superior de las silicuas maduras, 3) plántulas de 15 días, 4) tallos secundarios con hojas caulinares y 5) plántulas de 24-48 h de germinación correspondientes a: *FPS1* (A) y *FPS2* (B) (Imagen adaptada de Cunillera *et al.*, 2000).

## 2.3 Localización subcelular de las enzimas FPS

En el caso de las plantas, FPS parece existir en diferentes localizaciones subcelulares. En *Vitis vinífera* se ha detectado actividad FPS en fracciones citosólicas (Feron *et al.*, 1990); esta misma localización se observó en el fruto de *C. annuum*, mediante el uso de anticuerpos anti-FPS (Hugueney *et al.*, 1996) y en tomate no se ha identificado ningún tipo de señal en FPS1 que indique otra localización diferente a la citosólica (Gaffe *et al.*, 2000). En un estudio con *Parthenium argentatum* se ha establecido, mediante inmunodetección, la presencia de FPS en extractos proteicos procedentes de partículas de

látex, las cuales se acumulan en el citosol y poseen la capacidad de sintetizar FPP (Pan *et al.*, 1996). En el caso del arroz, se ha observado mediante inmunocitoquímica y usando anticuerpos anti-FPS, que la isoforma FPPS1 se encuentra en cloroplastos, mientras que la FPP2 lo hace en raíz, lo que sugiere la localización de esta enzima en el citosol (Sanmiya *et al.*, 1999). Por otro lado, mediante *western blot* usando los mismos anticuerpos, también se observó la presencia de FPS en fracciones plastídicas de trigo y tabaco. Recientemente, se ha realizado un estudio sobre la localización subcelular de una FPS en células de *C. roseus* donde observaron que esta proteína, se localiza en los peroxisomas, si bien una parte de esta también se localiza en el citosol (Thabet *et al.*, 2011).

En *A. thaliana* no ha sido posible identificar ninguna señal de localización subcelular en las isoenzimas FPS1S y FPS2. Mediante técnicas de inmunocitoquímica en microsecciones de hojas de roseta basal de plantas transgénicas sobreexpresoras de FPS1S (Manzano, tesis doctoral 2003) o FPS2 (Closa, tesis doctoral 2007), se detectó la presencia de ambas en el citosol. Por otro lado, en la isoenzima FPS1L la extensión N-terminal de 41 aa de la proteína constituye una señal de tránsito a mitocondrias que la dirige a dichos orgánulos (Cunillera *et al.*, 1997). La localización mitocondrial de FPS1L se ha confirmado mediante inmunocitoquímica en plantas sobreexpresoras de esta enzima y se ha demostrado además, que este péptido es capaz de dirigir de manera específica a la proteína GFP a mitocondrias en células epiteliales de hojas de *Arabidopsis*. (Manzano *et al.*, 2006).

## 2.4 Función de las FPS en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas

Si bien se ha visto que la enzima HMGR desempeña una función clave en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en la vía del MVA, no se desestima que otras enzimas estén implicadas también en el control de la vía, como por ejemplo la FPS. La propuesta de función reguladora de la FPS se hace en base a su situación en la vía, ya que tanto los sustratos como el producto de la reacción son encrucijadas metabólicas. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que FPS posee una función relevante en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios de origen isoprenoide como las fitoalexinas (Dudley *et al.*, 1986; Hugueney *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000). Por otro lado, en dos especies de algodón (*G. arboreum* y *G. australe*) se ha detectado un incremento en los niveles de mRNA de las FPS y la cadineno sintasa (sesquiterpeno sintasa) en respuesta al tratamiento con un elicitador fúngico (Liu *et al.*, 1999). Una respuesta similar se ha observado en frutos de pimiento después del tratamiento con celulasa (Hugueney *et al.*, 1996). Al comparar los niveles de expresión de los genes *HMGR*, *DXS*, *DXR* y *FPS* en la producción de artemisinina en cultivos de raíz se observó que sólo los niveles de FPS se incrementaron

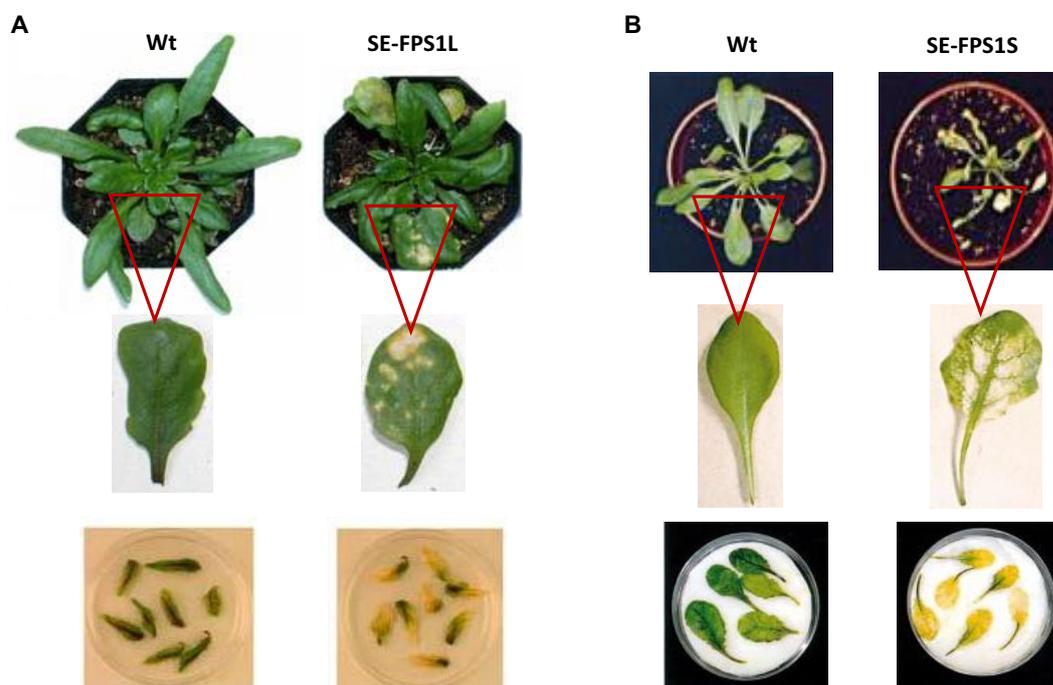
junto con el aumento de los niveles de artemisina (Souret *et al.*, 2003). Además, la sobreexpresión tanto de la FPS de *A. annua* en *G. arboreum* (Chen *et al.*, 2000), como de su propia FPS (Han *et al.*, 2006) producen un incremento en el contenido de artemisina. En un estudio usando metil jasmonato como elicitador en cultivos de *hairy roots* de *C. asiatica* que sobreexpresaban FPS, indicaron la importancia de esta enzima en la síntesis de triterpenos (Kim *et al.*, 2009).

En lo que respecta a la posible función reguladora de la FPS en la síntesis de metabolitos primarios, la cantidad de trabajos realizados es mucho menor. En el caso de plantas de *A. thaliana* donde se sobreexpresó la isoforma FPS1L no se observaron alteraciones en el fenotipo al ser expuestas a condiciones de iluminación de día corto o día largo, pero si al ser expuestas a día continuo, donde exhibieron síntomas de clorosis y muerte celular, que se correlaciona con la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, también manifestaron senescencia prematura en hojas sueltas (Figura 12A) y una alteración del perfil de citoquininas. El fenotipo de senescencia prematura está acompañado de la inducción en hojas del gen *SAG12*, que codifica para una cisteín-peptidasa que se utiliza como marcador de la senescencia natural. En estas plantas, los síntomas de senescencia prematura en hojas aisladas y las alteraciones del perfil de citoquininas, son revertidos al sobreexpresar de manera simultánea HMGR1S o HMGR2. Esto concuerda con la hipótesis de que la aparición de las lesiones podría deberse a una reducción de los niveles de IPP/DMAPP disponibles para sintetizar citoquininas. Sin embargo, la doble sobreexpresión no revierte el fenotipo de clorosis en hojas. Las plantas sobreexpresoras de FPS1L tampoco presentan ninguna alteración en los niveles de esteroides. (Manzano *et al.*, 2006; Busquets T, tesis doctoral 2008).

Las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la isoforma FPS1S no mostraron un incremento de los niveles de esteroides. En cambio, estas plantas se caracterizan por presentar una reducción del tamaño de la roseta basal, lesiones necróticas en las hojas y senescencia prematura en hojas aisladas de la planta (Figura 12B). Este fenotipo va acompañado de una disminución de los niveles de zeatina. Estos resultados sugieren que el incremento en el consumo de IPP debido a la sobreexpresión de FPS1S, provoca una disminución de los niveles de IPP/DMAPP que podrían ser utilizados para la síntesis de zeatina (Masferrer *et al.*, 2002). La presencia de lesiones necróticas provocadas por la sobreexpresión de FPS1S, también indujo una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> junto con un aumento de la expresión de los genes *PR-1* (Pathogenesis Related-1) y *AOX-1a* (Alternative Oxidase-1a). Se ha propuesto que la disminución de IPP citosólico, debido a la sobreexpresión de FPS1S, reduciría la cantidad de IPP que podría ser transportado hacia las mitocondrias, lo que provocaría una alteración en los niveles de algún isoprenoide mitocondrial (por ejemplo, ubiquinonas, grupo hemo A), y produciría una disfunción del orgánulo que provocaría la

acumulación de peróxido de hidrógeno, responsable de las lesiones necróticas, así como de la inducción del gen AOX-1a. La hipótesis de los niveles reducidos de IPP está justificada por el hecho de que todos los fenotipos asociados en la sobreexpresión de FPS1S reversion al sobreexpresar conjuntamente la isoforma completa de HMGR1S, su dominio catalítico, HMGR1-DC (Manzano *et al.*, 2004) o HMGR2 (Busquets T., tesis doctoral 2008).

Respecto a la sobreexpresión de la isoforma FPS2 en plantas de *A. thaliana*, si bien se detecta un aumento de actividad enzimática, no se ha traducido en ninguna alteración fenotípica visible, a diferencia de las plantas que sobreexpresan FPS1S. Los niveles de esteroides tampoco resultan afectados en estas plantas (Closa M, tesis doctoral 2007).

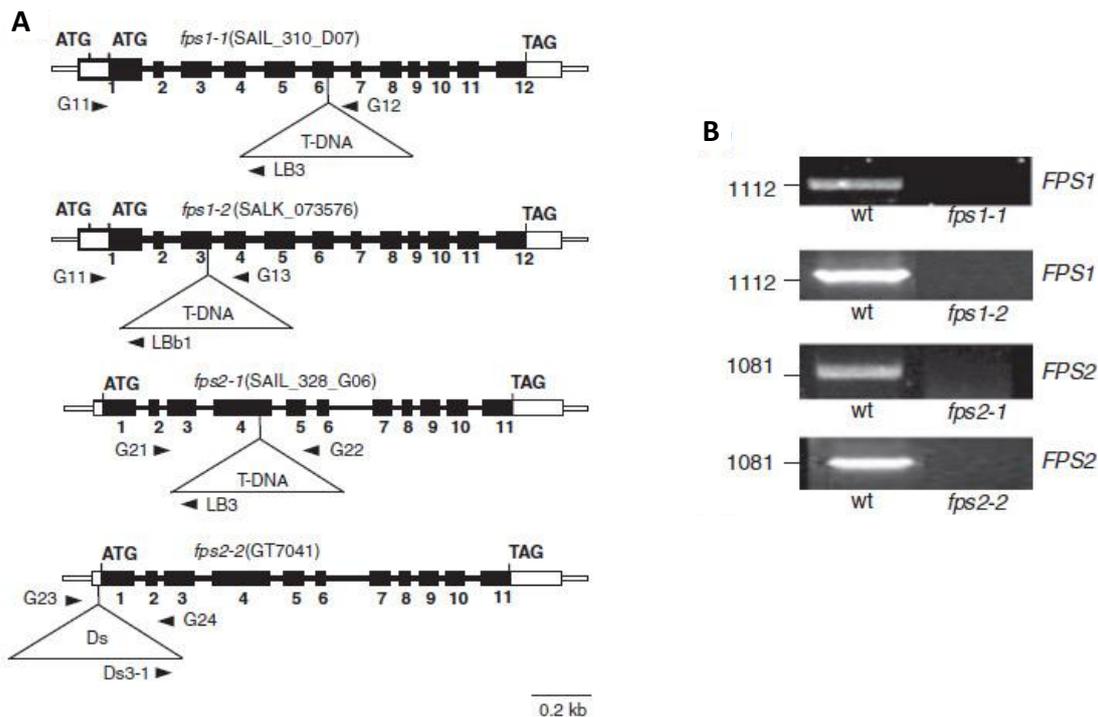


**Figura 12. Plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan FPS1L y FPS1S. A)** Comparación de la roseta basal de plantas Wt y sobreexpresoras de FPS1L (SE-FPS1L). Se muestra también un detalle del fenotipo de clorosis en hojas y de senescencia prematura en hojas sueltas. **B)** Comparación de la roseta basal de plantas Wt y sobreexpresoras de FPS1S (SE-FPS1S). Se muestra además en detalle, las lesiones necróticas en hojas y la senescencia prematura en hojas sueltas. (Imagen adaptada de Masferrer *et al.*, 2002 y Manzano *et al.*, 2006).

## 2.5 Mutantes de Arabidopsis con pérdida de función de los genes *FPS1* y *FPS2*

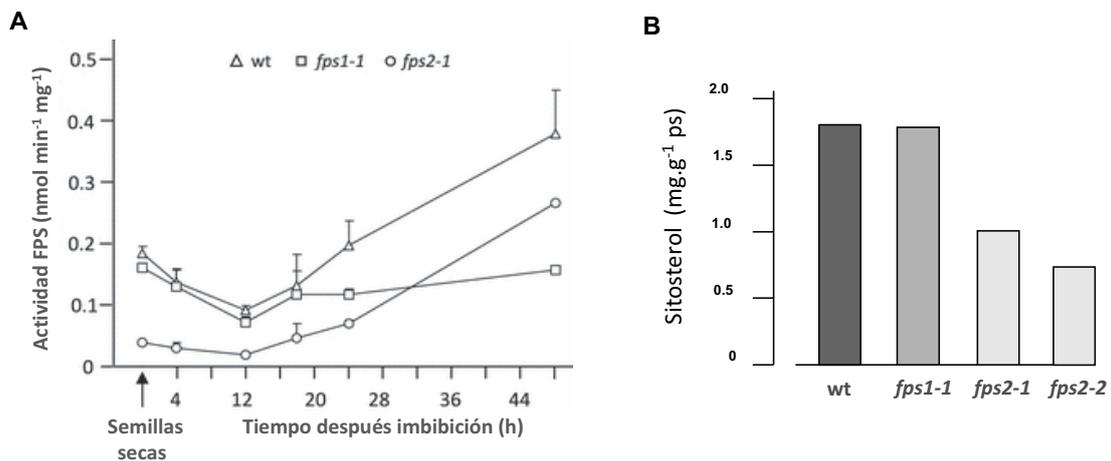
En un estudio realizado en nuestro laboratorio por Closa *et al.* (2010), se caracterizaron dos alelos mutantes nulos por inserción de T-DNA en el gen *FPS1* (*fps1-1* y *fps1-2*) y dos alelos mutantes del gen *FPS2* (*fps2-1* y *fps2-2*) (Figura 13).

En ninguno de los mutantes simples caracterizados se observaron alteraciones fenotípicas durante el crecimiento de la planta, lo que demostró que sólo un gen *FPS* es suficiente para mantener el desarrollo normal de las mismas.



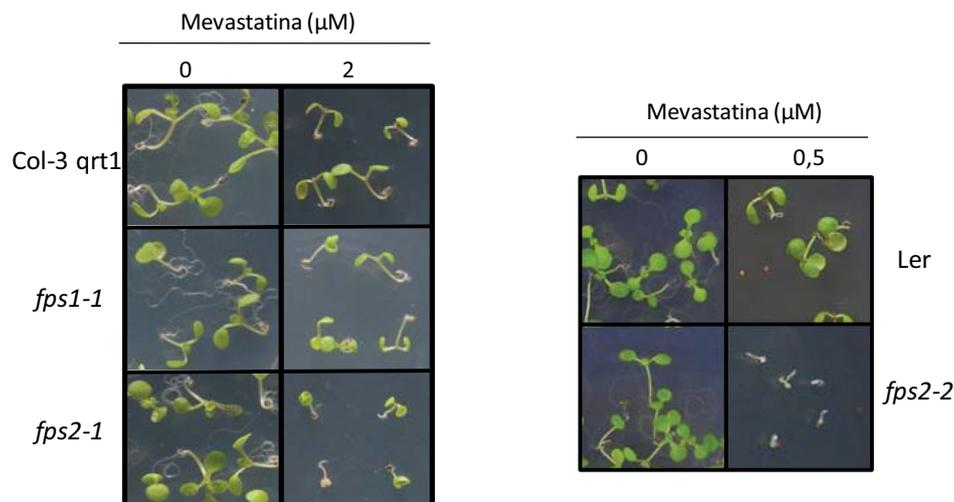
**Figura 13. Caracterización molecular de los mutantes *fps*.** A) Esquema de los alelos mutantes *fps1-1*, *fps1-2*, *fps2-1* y *fps2-2*. Las cajas negras indican exones y las líneas corresponden a los intrones. Los triángulos indican los puntos de inserción del T-DNA o del elemento Ds. B) Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* en los mutantes *fps* (Closa *et al.*, 2010).

Posteriormente, el análisis de los niveles de actividad FPS en semillas de estos mutantes, reveló que el mutante *fps2* (que expresa únicamente *FPS1*) sólo posee el 20% de la actividad total de FPS, mientras que el mutante *fps1* (que sólo expresa *FPS2*) mantiene el 80% (Figura 14A), lo que indica que *FPS2* es la enzima más abundante, y principal responsable de la actividad FPS en las semillas. Los niveles de sitosterol se encontraron disminuídos también en las semillas del mutante *fps2* respecto de los del *Wt* y el mutante *fps1* (Figura 14B).



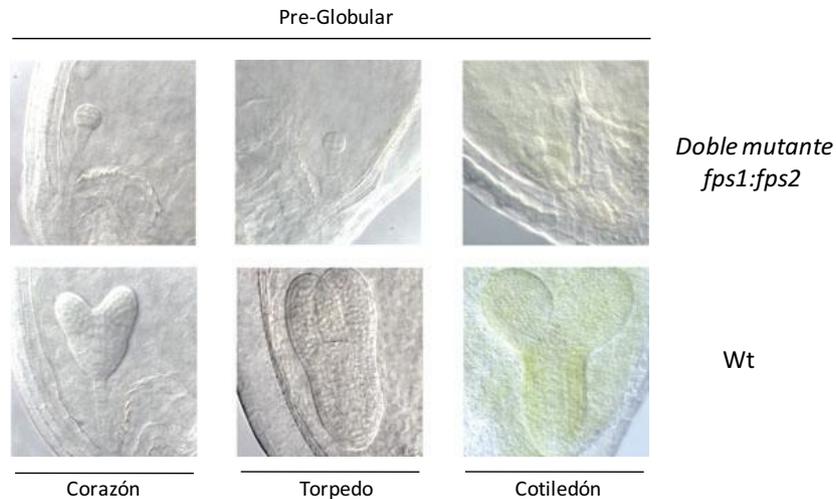
**Figura 14. Niveles de actividad FPS y de sitosterol en mutantes *fps*.** **A)** Medición de los niveles de actividad FPS en semillas secas y germinadas a diferentes tiempos. **B)** Análisis de los niveles de sitosterol en semillas de los mutantes *fps1*, *fps2* y wt (Closa *et al.*, 2010)

Al analizar los niveles de actividad HMGR en semillas, los mutantes *fps1* sólo mostraron un ligero incremento de la actividad de esta enzima respecto a las semillas de las plantas control, al contrario de los mutantes *fps2*, que presentaban un aumento notable en la actividad HMGR, de 2,6 veces en el mutante *fps2-1* y de unas 95 veces en la línea *fps2-2*, respecto a las semillas de las plantas control. Este incremento de actividad HMGR produjo un fenotipo de hipersensibilidad al inhibidor mevastatina en semillas del mutante *fps2-2*, y en menor medida, del mutante *fps2-1*, que no se observó en semillas del mutante *fps1* (Figura 15; Closa *et al.*, 2010).



**Figura 15. Análisis de la sensibilidad a mevastatina de los mutantes *fps*.** Imágenes de plántulas de 8 días de los mutantes *fps1-1*, *2-1* y Col-3 qrt1 (panel izquierdo) y plántulas del mutante *fps2-2* y su control Ler (panel derecho), en presencia de las concentraciones de mevastatina indicadas. (Imagen adaptada de Closa *et al.*, 2010).

En este estudio también se observó que el doble mutante homocigoto con pérdida de función FPS (proveniente del cruzamiento entre los mutantes *fps1-1* y *fps2-1*) es letal debido a que los embriones detienen su desarrollo en el estadio pre-globular (Figura 16; Closa *et al.*, 2010).



**Figura 16. Análisis de la letalidad embrionaria en el doble mutante *fps1:fps2*.** Imágenes del análisis del desarrollo embrionario en el doble mutante *fps1:fps2*, en el panel superior y los embriones del control Wt, panel inferior.

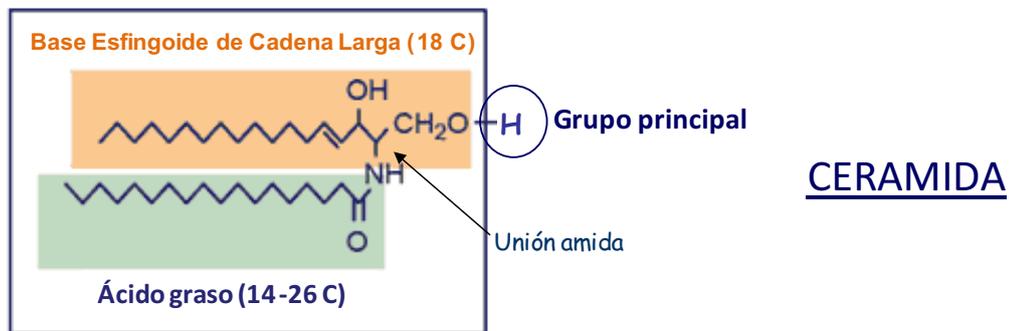
### 3. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son compuestos de naturaleza lipídica presentes en todas las células eucariotas, aunque también es posible encontrarlos en algunos procariontes. Hasta la fecha se conocen al menos 500 clases de esfingolípidos diferentes (Pata *et al.*, 2010), y se ha visto que sólo *Arabidopsis thaliana*, contiene unos 168 (Markham y Jaworsky, 2007). Las vías de síntesis de estos compuestos son muy similares entre mamíferos, hongos y plantas. Sin embargo, cada especie presenta diferencias en las clases de esfingolípidos sintetizados y las proporciones presentes de cada uno; esta diferencia se observa incluso entre plantas, dependiendo de la especie.

#### 3.1 Estructura de los esfingolípidos

La estructura base de los esfingolípidos se denomina ceramida (cer) y consta de una Base Esfingoide de Cadena Larga (BECL), ligada a una molécula de ácido graso, mediante

un enlace tipo amida entre el grupo amino de la base y el grupo ácido. En plantas, la mayoría son ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados y en general de longitud entre 14 y 26 carbonos (Lynch y Dunn, 2004; figura 17).

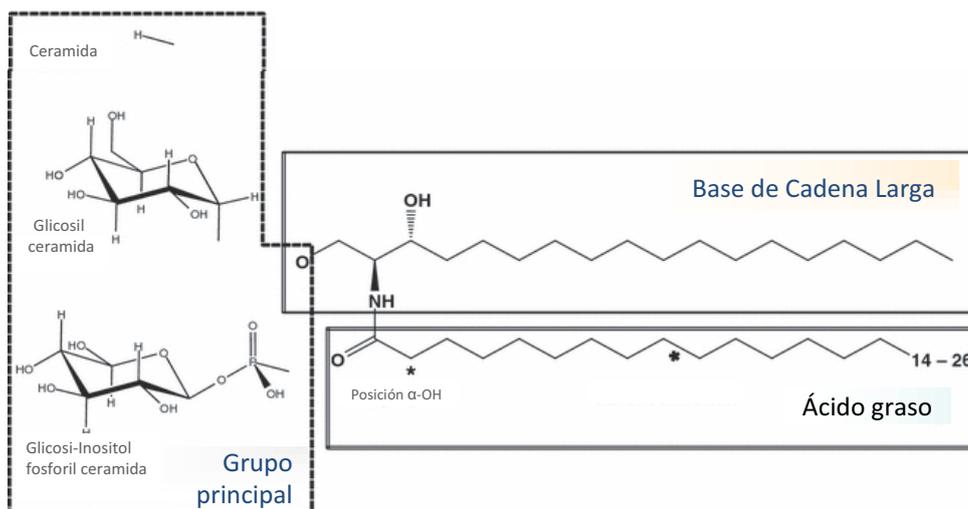


**Figura 17. Esquema de la estructura base de la ceramida.**

Esta estructura base puede ser modificada posteriormente a través de metilaciones, variaciones en el grado de insaturación e hidroxilaciones tanto en la BECL como en el ácido graso. Asimismo, el grupo OH de la BECL, puede unirse a azúcares, fosfatos o inositol, dando lugar a esfingolípidos más complejos.

En plantas, dependiendo de si las BECL se encuentran libres o unidas al ácido graso, y de si la molécula esterificada al grupo hidroxilo principal se trata de inositol o un azúcar, pueden encontrarse 4 grupos principales de esfingolípidos (Figura 18):

1. BECL libres.
2. Ceramidas, en las que el grupo hidroxilo no se encuentra esterificado.
3. Glicosil-inositol-fosfoceramidas (GIPCs), que se forman por la adición de una molécula de inositol al grupo hidroxilo principal de la BECL de la ceramida.
4. Glicosil-ceramidas o cerebrósidos (GCs), donde la molécula esterificada al grupo hidroxilo es un azúcar (generalmente manosa o glucosa).

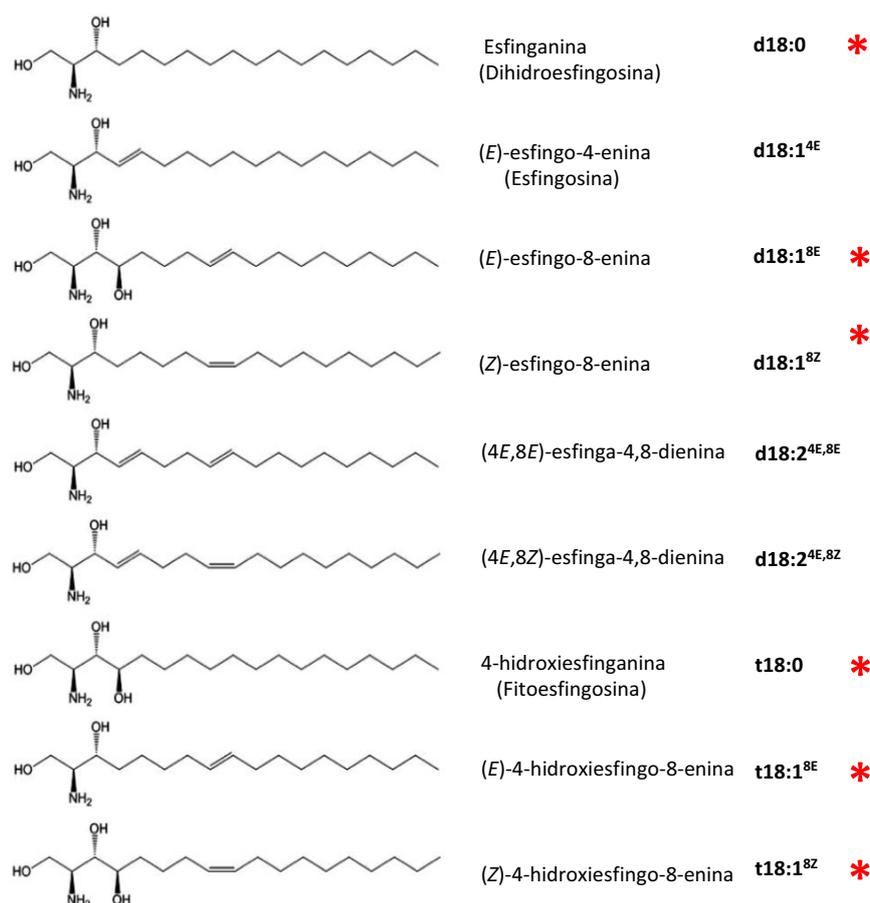


**Figura 18. Esquema de la estructura de los diferentes grupos de esfingolípidos sintetizados en plantas.** (Imagen adaptada de Pata *et al.*, 2010).

En mamíferos la BECL característica y más abundante es la (*E*)-esfingo-4-enina (llamada comúnmente esfingosina, d18:1), mientras que en *S. cerevisiae* la base predominante es 4-hidroxi esfinganina (llamada también fitoesfinganina, t18:0). En plantas, donde se ha estimado que la proporción de esfingolípidos alcanza el 10% del total de lípidos, en especial en tejidos no fotosintéticos (Pata *et al.*, 2010), se ha observado que la composición de las BECL es más heterogénea, siendo posible encontrar hasta 9 clases diferentes de bases  $C_{18}$ . Asimismo, presentan, a diferencia de otras especies, insaturaciones *cis* (*Z*) o *trans* (*E*) en el  $C_8$ . Las BECL mayoritarias en plantas derivan de los isómeros 8-(*E*) y 8(*Z*) de la 4,8-esfingadienina (d18:2) y de la dihidroxi esfinga-8-nina (t18:1). Así, las nueve bases más comunes son: esfinganina (d18:0), (*E*)-esfingo-4-enina, también llamada esfingosina (d18:1<sup>4E</sup>), (*E*)-esfingo-8-enina (d18:1<sup>8E</sup>), (*Z*)-esfingo-8-nina (d18:1<sup>8Z</sup>), (4*E*,8*E*)-esfinga-4,8-dienina (d18:2<sup>4E,8E</sup>), (4*E*,8*Z*)-esfinga-4,8-dienina (d18:2<sup>4E,8Z</sup>), 4-hidroxi esfinganina, también denominada fitoesfingosina (t18:0), (*E*)-4-hidroxi esfingo-8-enina (t18:1<sup>8E</sup>) y (*Z*)-4-hidroxi esfingo-8-enina (t18:1<sup>8Z</sup>).

Como se mencionó anteriormente, incluso entre plantas, las proporciones y clases de BECL difieren. Por ejemplo, de las 9 bases características descritas en plantas, en hojas de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado sólo 6 (destacadas con un asterisco rojo en la figura 19; Markham *et al.*, 2006). De estas bases halladas en *Arabidopsis*, los isómeros 8-(*E*) y 8(*Z*) de la t18:1 son las BECL predominantes, con un 57% y un 32% del total respectivamente, mientras que los isómeros d18:1 constituyen menos del 10% del total (Dunn *et al.*, 2004).

Se ha observado también una gran variabilidad a nivel de la cadena de ácido graso, por lo que existe la posibilidad de combinar las 9 BECL mencionadas, con 10 tipos diferentes de ácidos grasos para formar la ceramida. La mayoría de los ácidos grasos son  $\alpha$ -D-hidroxiados y varían en su longitud entre 14 y 26 carbonos, siendo los más comunes en *A. thaliana*, los de cadenas saturadas con C<sub>16</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub> y C<sub>26</sub> átomos de carbono, constituyendo más del 55% del total los 24:1h y 24:0h (Figura 19; Dunn *et al.*, 2004).



**Figura 19. Bases Esfingoides de Cadena Larga características de plantas.** Los asteriscos rojos indican las BECL encontradas en hojas de *A. thaliana*. A la derecha se indica tanto el número de insaturaciones en la BECL (0, 1 o 2) como su configuración (*E*, *trans* o *Z*, *cis*). El número de grupos OH en la molécula se detalla con la letra **d** (di-hidroxi) o **t** (tri-hidroxi), mientras que el número restante (18), indica el número de átomos de carbono de la base de cadena larga. (Imagen adaptada de Pata *et al.*, 2010).

### 3.2 Biosíntesis de esfingolípidos en plantas

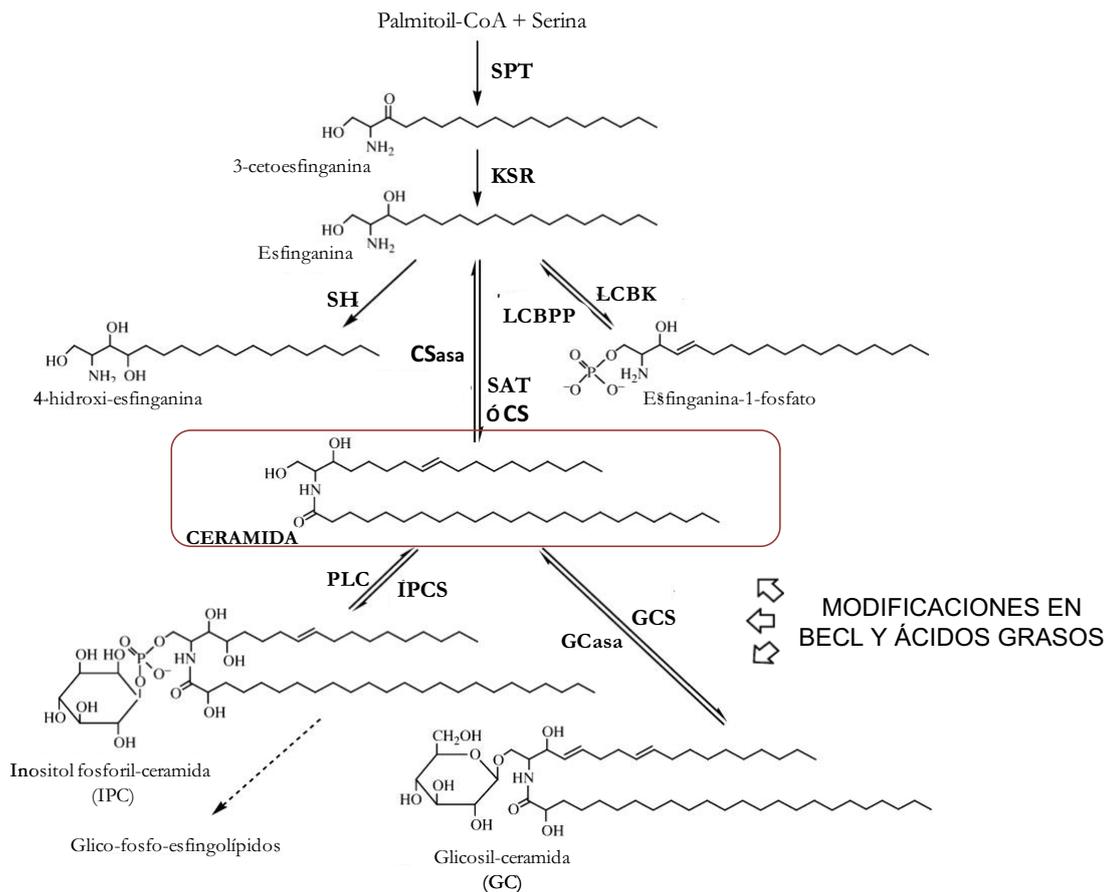
La síntesis de los diferentes esfingolípidos puede llevarse a cabo *de novo* o a través de la liberación de las BECL de ceramidas o esfingolípidos más complejos. En el primer

caso, comienza con dos reacciones secuenciales, que consisten en la condensación de una molécula de palmitoil-CoA y el aminoácido serina, la cual produce 3-cetoesfingina, que es reducida seguidamente, para dar lugar a esfingina (precursora de la ceramida). Estas reacciones están catalizadas por las enzimas serina palmitoiltransferasa (SPT) y 3-cetoesfingina reductasa (KSR), respectivamente. La enzima SPT podría constituir uno de los principales puntos de regulación de la vía, ya que debido a su posición al inicio de la vía, determina el nivel de otros compuestos como las ceramidas y BECL (Zäuner *et al.*, 2010). Una vez sintetizada la esfingina, ésta puede seguir tres vías: puede ser fosforilada, para formar esfingina-1-fosfato; ser hidroxilada para dar lugar a 4-hidroxi-esfingina o bien ser acilada para sintetizar ceramida.

La síntesis de ceramida (la molécula base de todo esfingolípido), se obtiene a partir de una reacción de condensación entre el grupo amino de la esfingina y el grupo ácido de un ácido graso, catalizada por las enzimas CS (Ceramida sintasa) o SAT (Sphinganine-Acyl Transferase), dependiendo de si el donante es un ácido graso libre o unido a CoA, respectivamente.

A partir de este punto, las ceramidas divergen hacia diferentes vías donde serán modificadas mediante hidroxilaciones (como la  $\alpha$ -OH en el C<sub>4</sub>), desaturaciones (en las posiciones C<sub>4</sub> o C<sub>8</sub>) o condensaciones con otras moléculas para dar lugar a esfingolípidos más complejos como las GIPCs o las GCs. Asimismo, son utilizadas como sustratos para la síntesis de ceramida-fosfatos (Liang *et al.*, 2003) o bien son degradadas por ceramidasa, formando BECL libres (Figura 20).

Las GCs, se obtienen mediante la adición de un azúcar al grupo hidroxilo primario de la molécula de ceramida, en una reacción catalizada por la enzima glucosil ceramida sintasa (GCS); mientras que la síntesis de GIPCs ocurre mediante la transferencia del grupo inositolfosfato a partir de la molécula de fosfatidilinositol, al grupo OH en el C<sub>1</sub> de la molécula de ceramida. Esta reacción está catalizada por la enzima IPC sintasa (Inositol Phosphorylceramide), dando lugar al inositolfosforil ceramida. Se ha observado que, en algunas especies, las glucosilceramidas se sintetizan en el RE/membrana plasmática, mientras que los GIPCs se formarían en el aparato de Golgi (Bromley *et al.*, 2003; Hillig *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).



**Figura 20. Esquema simplificado de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas.** SPT: Serina palmitoil transferasa. KSR: 3-cetoesfingánina reductasa. LCBK: LCB kinasa. LCBPP: LCB fosfatasa. SH: Esfingánina hidroxilasa. CS: Ceramida sintasa. SAT: Esfingánina-acil transferasa. IPCS: Inositol fosforil ceramida sintasa. PLC: Fosfolipasa C. GCS: Glucosil-ceramida sintasa. GCasa: Glucosil ceramidasa. (Imagen adaptada de Dunn *et al.*, 2004).

### 3.3 Funciones de los esfingolípidos

Hay un gran número de estudios realizados sobre las funciones de los esfingolípidos en mamíferos y levaduras; sin embargo, aunque existe relativamente poca información sobre este tema en plantas, cada vez son más numerosos los estudios que involucran los esfingolípidos en funciones de señalización celular. Por ejemplo, se ha descrito que las GIPCs podrían desempeñar un papel determinante en la comunicación entre células y la exportación de ciertas proteínas (Worrall *et al.*, 2008). También, se han realizado estudios donde se describe que durante la interacción planta-patógeno (Raffaello *et al.*, 2009), al interrumpir la síntesis de esfingolípidos, se produce un aumento de la concentración de BECL libres, lo que produce una respuesta de hipersensibilidad asociada a mecanismos de defensa por parte de la planta (Abbas *et al.*, 1994, 1998; Wright *et al.*, 2003).

Otra función que ha sido estudiada es la influencia de los esfingolípidos en el proceso de la apertura estomática, donde parecen desempeñar un papel clave como reguladores de este proceso (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2005; Worrall *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2012).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso donde se ha evidenciado la participación de las ceramidas. Estos compuestos se encuentran en menor abundancia en las membranas, pero al igual que en mamíferos y levaduras, donde se ha comprobado su capacidad para inducir este proceso, en las plantas se ha observado que cumple una función similar (Reape y McCabe, 2008; Alden *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha observado que las GCs y las GIPCs, se encuentran implicadas en la regulación de la estabilidad y la permeabilidad de las membranas, ya que al aumentar el número de hidroxilaciones de las cadenas de las BECL, aumenta la estabilidad y disminuye la permeabilidad de las mismas (Karlsson y Larson, 1982). Es por ello que en las membranas plasmáticas y en las del tonoplasto se encuentran grandes cantidades de GCs altamente hidroxiladas, junto a una mezcla de otros lípidos complejos, que contribuyen a mantener su integridad (Warnecke y Heinz, 2003). Se ha estudiado la importancia en la composición e interacción entre los diferentes lípidos presentes en las membranas, ya que de ello dependen las propiedades y el comportamiento frente a diferentes tipos de estrés.

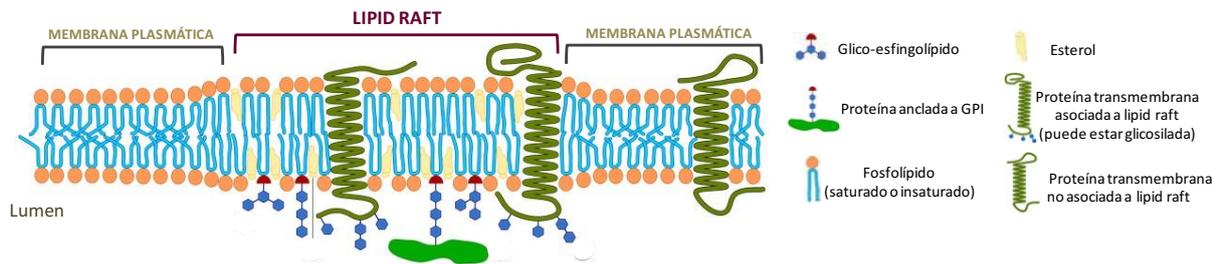
También, se ha descrito que las moléculas de GPI desempeñan una función muy importante en el transporte de proteínas hacia la membrana celular, donde pueden permanecer retenidas o bien ser liberadas a la pared celular, previa separación (mediada por una fosfolipasa) de la molécula de GPI (Thompson y Okuyuma, 2000). En *A. thaliana* se han identificado al menos 210 posibles proteínas unidas a GPI, con diferentes funciones, como señalización, adhesión o respuesta a estrés (Borner *et al.*, 2002). En levaduras, la síntesis de ceramidas (y/o IPC) es imprescindible para el transporte de proteínas ancladas a GPI desde el RE al Golgi, posiblemente para estabilizar la unión entre la proteína unida a GPI y la membrana (Watanabe *et al.*, 2002).

## **4. Interacción entre esteroides y esfingolípidos**

### **4.1 Concepto de “lipid rafts”**

Desde hace varias décadas, se ha determinado la existencia en la membrana plasmática de estructuras diferenciadas compuestas por clases y proporciones específicas de proteínas, esteroides y lípidos, los cuales interactúan entre sí y constituyen plataformas de señalización que se encuentran implicadas en diversas funciones celulares. Estas

agrupaciones, se han denominado “*lipid rafts*” (balsas lipídicas) o bien, más recientemente, “*membrane rafts*” (Figura 21).



**Figura 21. Representación esquemática de la organización de *lipid rafts* en la membrana plasmática.** (Imagen adaptada de <http://www.nanofunction.org/lipid-membrane-nanostructure>).

En el reino vegetal, las *membrane rafts* comenzaron a ser estudiadas en el año 2000 por el grupo de Peskan *et al.*, quienes detectaron la presencia de estas agrupaciones, como membranas insolubles en detergentes (DIMs) y desde entonces ha surgido un gran número de estudios que han aportado información acerca de su estructura, organización y funciones. En plantas, las DIMs representan entre un 5-10% del total del contenido de proteínas de la membrana plasmática y entre los componentes lipídicos presentes en ellas se encuentra una mezcla de esteroides libres y conjugados (esterilglucósidos acilados y no acilados), esfingolípidos como GIPCs y GCs y glicerolípidos. Las proporciones, varían según la especie, que en algunos casos han sido caracterizadas, como por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* (Simon-Plas *et al.*, 2011).

Se ha observado que la composición proteica de las DIM, es diferente a la del resto de la membrana y hasta el momento se identificaron cientos de proteínas involucradas en señalización, respuesta frente a estreses bióticos y abióticos, tránsito celular e interacciones célula-célula (Beck *et al.*, 2007; Men *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009; Raffaele *et al.*, 2009; Titapiwatanakun *et al.*, 2009; Keinath *et al.*, 2010). Todos estos procesos son posibles debido a la capacidad de las *membrane rafts* de organizarse espacial y temporalmente en la membrana plasmática, permitiendo la disposición óptima de los elementos proteicos específicos y en las proporciones necesarias, para llevar a cabo la regulación de los mismos.

#### 4.2 Regulación coordinada de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos

Como se ha establecido en apartados anteriores, los esteroides y los esfingolípidos son compuestos sumamente importantes, debido a su implicación en procesos biológicos

esenciales, tanto a nivel estructural, como funcional, lo que sustenta la idea de que la coordinación y regulación de su metabolismo debe estar perfectamente coordinada.

Los mecanismos de co-regulación de los niveles de esteroides y esfingolípidos han sido ampliamente estudiados en mamíferos y levaduras. Uno de los principales mecanismos elementos de esta regulación coordinada son las SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) cuya función es regular, a nivel transcripcional, el metabolismo del colesterol, así como también controlar la síntesis de varios lípidos en diferentes etapas (Worgall *et al.*, 1998). En células de mamíferos, el transporte extracelular de ambos compuestos se realiza a través de las mismas partículas lipoproteicas, y cuando ocurren mutaciones en enzimas claves en la biosíntesis ya sea de esteroides o bien de esfingolípidos, se produce la acumulación de ambos productos (Bektas *et al.*, 2010; Ginzburg *et al.*, 2004). De manera similar, en levaduras, al producirse alteraciones en enzimas del metabolismo de esteroides, frecuentemente ocurren cambios específicos en los niveles de esfingolípidos y viceversa (Swain *et al.*, 2002; Eisenkolb *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2009).

La información existente en plantas, sobre la regulación coordinada de esteroides y esfingolípidos, en comparación con mamíferos y levaduras es notablemente menor. Por ejemplo, se ha realizado un estudio en plántulas de puerro (*Allium porrum L.*), crecidas en presencia de *fenpropimorph*, un inhibidor de la biosíntesis de esteroides, que puso de manifiesto una variación del perfil de estos compuestos, junto con una disminución notable de los niveles de GCs y fosfatidilserina, así como la acumulación de triacilglicéridos (Hartmann *et al.*, 2002). Por otro lado, un estudio realizado en nuestro laboratorio, donde se trataron plantas de *Arabidopsis thaliana* con miriocina, un inhibidor específico de la SPT, que cataliza el primer paso en la síntesis de esfingolípidos, pone de manifiesto una reducción tanto de los niveles de esteroides, como de la actividad de la enzima HMGR (Nieto *et al.*, 2009). Otro estudio llevado a cabo en plántulas de *Triticum aestivum L.* tratadas con nistatina, un compuesto que altera la estabilidad de las membranas, manifestaron una disminución de los niveles de esteroides totales acompañada de un aumento de los niveles de GCs después de 2 h de iniciado el tratamiento (Valitova *et al.*, 2011).

Si bien hay varios estudios que avalan la relación entre el metabolismo de esteroides y esfingolípidos, los mecanismos de regulación que controlan estos procesos no han sido dilucidados aún, sobre todo en plantas, donde la información es todavía más escasa. Sin embargo, se ha observado que, debido a la asociación física entre esteroides y esfingolípidos, cuando ocurren alteraciones en la homeostasis de un tipo de compuesto, se produce un desbalance en el metabolismo del otro. En este contexto, se ha sugerido la participación de la proteína Arv1 (proteína objeto de esta tesis, que será tratada en detalle en el próximo apartado), en la regulación coordinada del metabolismo de esteroides y esfingolípidos en levadura.

## 5. Las proteínas Arv

### 5.1 Arv en levaduras y mamíferos

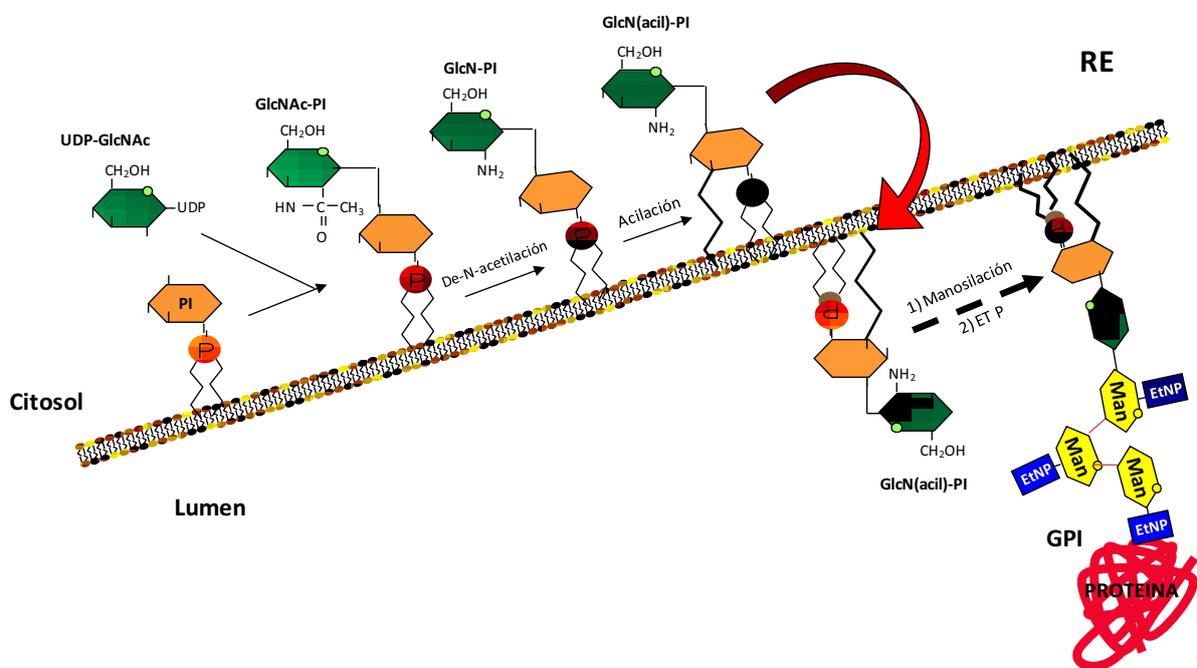
En levaduras se ha identificado el gen *ARV1* que codifica una proteína cuya función podría estar implicada en la regulación coordinada del metabolismo de esteroides y esfingolípidos. La proteína Arv1p fue descubierta en el año 2000 por Tinkelenberg *et al.* cuando realizaban un escrutinio en levadura, para detectar mutantes inviables en ausencia de los genes que codifican las proteínas Are (ACAT-Related Enzymes, enzimas relacionadas a ACAT: Acil-CoenzimaA: colesterol O-aciltransferasa). Estas enzimas, codificadas por los genes *ARE1* y *ARE2*, intervienen en la esterificación de los esteroides libres (ya que los niveles elevados de esteroides libres en la célula son citotóxicos). En el escrutinio se obtuvo un mutante de levadura que se identificó como *arv* (ARE2 Required for Viability), el cual no es capaz de crecer a 37°C incluso en presencia del gen *ARE2*. El triple mutante *arv1Δ-are1Δ-are2Δ* también es letal, lo que evidencia la necesidad de la esterificación de esteroides para mantener la viabilidad de estas células. Este mutante *arv1Δ*, se caracteriza por su sensibilidad a nistatina, un aumento del 50% de los niveles de los esteroides libres y del 75% de los de esteril-ésteres, lo cual vincula la función de la proteína Arv1p con la regulación de los niveles de esteroides en la célula. El análisis de la composición lipídica de diferentes fracciones de membranas en este mutante, indica que existe un aumento en los niveles de esteroides en las membranas del RE y las vacuolas, y una disminución en la membrana plasmática, lo que sugiere también la participación de Arv1p en la distribución intracelular de los esteroides. El mutante *arv1Δ* crecido en anaerobiosis (entorno donde las células necesitan obtener esteroides y ácidos grasos exógenamente) es inviable, lo que indica que Arv1p es también esencial en la captación de esteroides del medio externo.

El gen *ARV1* de *S. cerevisiae* (*ScARV1*) codifica una proteína de 321 aa. Al comparar la secuencia aminoacídica de ScArv1, con la correspondiente homóloga de otras especies (*A. thaliana*, *C. elegans* y *H. sapiens*), se identificó una secuencia de 61 aa en el extremo NH<sub>2</sub> terminal, denominada Dominio de Homología de Arv (AHD), con un alto grado de identidad, el cual incluía un posible motivo *dedo de zinc* (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C), descrito en factores de transcripción y otras proteínas de unión a DNA o que interaccionan con otras proteínas, y un bloque conservado de 33 aa, que constituye el subdominio C-terminal. (Figura 22; Tinkelenberg *et al.*, 2000; Forés *et al.*, 2006).



esfingolípidos complejos como MIPC o MIP<sub>2</sub>C. Los niveles de ácidos grasos presentan también una disminución en general, mientras que la biosíntesis de fosfolípidos no se ve afectada, lo que indica que Arv1p no es necesaria para este proceso en condiciones normales de crecimiento (Swain *et al.*, 2002).

Si bien Arv1p había sido identificada y relacionada con el metabolismo de esteroides y esfingolípidos, no se disponía de información acerca de su función concreta, hasta que en el año 2008, Kajiwara *et al.*, vincula esta proteína a la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en levadura. El GPI, es un glicolípido complejo presente en eucariotas, que se une covalentemente al extremo C-terminal de algunas proteínas de secreción y permite su anclaje a la membrana (Pittet y Conzelmann, 2007). La síntesis de GPI comienza en la cara citosólica del RE hasta obtener una molécula de pre-GPI que debe ser translocada desde la cara citosólica a la luminal del RE para continuar su maduración (Figura 24).



**Figura 24. Esquema general de la biosíntesis de GPI en mamíferos y levaduras.** UDP-GlcNAc: UDP-N-Acetilglucosamina. PI: Fosfatidilinositol. GlcNAc-PI: N-acetilglucosaminil-PI. GlcN-PI: Glucosaminil-PI. GlcN(acil)-PI: Glucosaminil-acil-PI. Man: manosa. EtNP: fosforiletanolamina. GPI: Glicosil-fosfatidilinositol. La biosíntesis se inicia en la cara citoplasmática del RE con la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc a una molécula de PI. El GlcNAc-PI es N-desacetilado y luego la molécula de inositol es acilada a GlcN(acil)-PI. A continuación, se transloca hacia el lumen (mediante la posible acción de una flipasa, indicada con la flecha roja) donde es manosilada y posteriormente se producen modificaciones por adición de residuos de fosforiletanolamina. La estructura final del GPI se une entonces a proteínas translocadas al lumen del RE que contienen en su extremo C-terminal una secuencia señal de unión a GPI, dando lugar a la proteína anclada a la membrana interna del RE.

Estudios *in vitro* sobre la síntesis de GPI en membranas obtenidas del mutante *arv1Δ*, sugieren que Arv1 podría actuar como una *flipasa*, es decir, una proteína que transloca moléculas de la síntesis de GPI de la cara citosólica a la luminal del RE, o bien, como una proteína reguladora, que proporciona la molécula de GlcN(acil)-PI para las reacciones de manosilación posteriores en el lumen del RE. Asimismo, se observó que alteraciones en la síntesis de GPI, afecta también la regulación del transporte de ceramidas desde el RE al Golgi. En este estudio también se observa que los mutantes *arv1Δ* de levadura, presentan una disminución de los niveles de esfingolípidos, una acumulación de ceramidas y una distribución alterada de los esteroides en las membranas de las células. Por otro lado, empleando mutantes *gpi* de levadura defectivos en la biosíntesis de GPI establece la implicación de Arv1 en la alteración de su síntesis, y además algunos de estos mutantes *gpi* presentan las mismas alteraciones a nivel de esteroides que los mutantes *arv1Δ*. Por último, sugiere que la modificación en la distribución de esteroides en el mutante *arv1Δ*, podría deberse a un efecto indirecto derivado de la alteración en la síntesis de esfingolípidos y de su transporte.

Más recientemente, en un estudio realizado por Schechtman *et al.* (2011), se ha propuesto una relación entre la pérdida de función del gen *ARV1* y la inducción de la UPR (Unfolded Protein Response). La UPR es un mecanismo de respuesta a estrés celular en el RE que se activa cuando se detectan altos niveles de proteínas con mal plegamiento o defectuosas. En este trabajo demuestran que las alteraciones en el metabolismo lipídico observadas en el mutante de levadura *arv1Δ* produce fallos en la homeostasis del RE, suficientes para inducir la UPR de manera independiente al mecanismo por el que la induce la presencia de proteínas defectuosas. Asimismo, observaron que al inducir químicamente la UPR en este mutante, la respuesta fue notablemente mayor, probablemente debido a un efecto sinérgico entre las alteraciones lipídicas y la acumulación de proteínas defectuosas. Sin embargo, no está claro si el estrés en el RE observado en estos mutantes deficientes en Arv1 es una consecuencia de los defectos en el transporte de esteroides o un efecto secundario del transporte, posiblemente mediado por Arv1, de diferentes especies lipídicas (Schechtman *et al.*, 2011).

En otro estudio, se demostró la importancia de Arv1 en el proceso de gemación en levaduras. Este proceso es dependiente de compuestos lipídicos, por lo que se sugiere que las alteraciones del metabolismo lipídico afectan al proceso de polarización durante la formación de la yema, lo que imposibilita llevar a cabo la gemación en el mutante *arv1Δ*. Finalmente, se observó que sólo el dominio AHD de Arv1 es necesario para llevar a cabo procesos involucrados durante la gemación, como el arresto celular en la fase G1 del ciclo,

la correcta distribución de esteroides, la conjugación y la formación de la yema (Villasmil *et al.*, 2011).

La relevancia de Arv1 en mamíferos, se ha estudiado en ratones en los que se ha atenuado la expresión del gen *ARV1* mediante un oligonucleótido antisentido con el fin de suprimir su expresión en diferentes tejidos, en los cuales, se observó una notable disminución de la expresión de este gen, lo que produjo una acumulación de colesterol en plasma (hipercolesterolemia) y de ácidos biliares, así como también un aumento de la actividad de FXR (farnesoid X receptor), un receptor nuclear que interviene como sensor en la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares. Los resultados, en concordancia con los obtenidos anteriormente en otros estudios, demuestran que Arv1 está implicado en la regulación de la distribución y el metabolismo de esteroides (en este caso, del colesterol), así como también de los ácidos biliares en mamíferos (Tong *et al.*, 2010).

## 5.2 Arv en plantas

Hasta la fecha la única información disponible sobre Arv en plantas se remite a la identificación y caracterización de los dos genes de la familia *ARV* en *Arabidopsis thaliana*, *AtARV1* (At1g01020) y *AtARV2* (At4g01510). Estos genes codifican las proteínas, AtArv1 (245 aa) y AtArv2 (228 aa), respectivamente.

Ambas proteínas poseen una identidad del 66% y una similitud del 76% entre sí (Figura 25). Al comparar con las secuencias de las proteínas Arv de diferentes especies, se observa que AtArv1 presenta una identidad del 14% (y una similitud del 32%) respecto a la proteína Arv1 de levadura y un 20% (36% de similitud) con la Arv1 humana; mientras que en el caso de AtArv2p posee un 17% de identidad (33% de similitud) con Arv1 de levadura y un 33% de identidad (39% similitud) con Arv1 humana. Tanto AtArv1 como AtArv2 son funcionales ya que complementan la cepa mutante YNJ1756 (*arv1Δ*). Las proteínas AtArv también poseen en el extremo N-terminal el AHD que es esencial para su funcionalidad (Forés *et al.*, 2006).

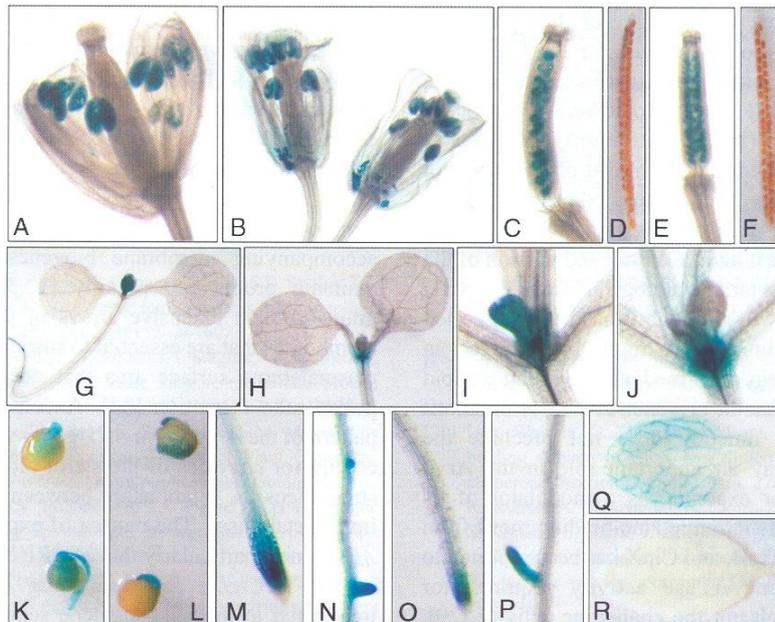
Estudios de complementación funcional del mutante *arv1* de levadura con versiones mutadas y truncadas de la proteína AtArv1, han demostrado que la proteína en la que se había delecionado los 46 aa del extremo N-terminal no era capaz de restaurar la funcionalidad de la cepa de levadura *arv1Δ*, ni tampoco la resultante al delecionar desde el aminoácido 36 al 46. Por otro lado, al mutagenizar simultáneamente las 4 cisteínas conservadas en la región AHD de AtArv, se demostró que no son esenciales para la

funcionalidad de la proteína, aunque si es indispensable la integridad del subdominio C-terminal del AHD (Forés *et al.*, 2006).

ARV1	MAREKKT	<b>CVE</b>	<b>CGHKVKSLEFI</b>	QYSPGN	<b>FRLM</b>	<b>KCENC</b>	EEVAD	EYVECE	LLII	50
ARV2	MAASEHR	<b>CVG</b>	<b>CGFRVKSLEFI</b>	QYSPGN	<b>IRLM</b>	<b>KCGNC</b>	KEVAD	EYIECER	MI	50
Arv1	<b>FIDLILHKT</b>	<b>K</b>	<b>AYRHLLYNV</b>	<b>NQESANVQHL</b>	<b>LWKLVLAYLL</b>	<b>LDTYRSLLLR</b>				100
Arv2	<b>FIDLILHRPK</b>	<b>VYRHVLYNAI</b>	<b>NPATVNIQHL</b>	<b>LWKLVEFAYLL</b>	<b>LDCYRSLLLR</b>					100
Arv1	<b>RTNDGSNVSM</b>	<b>SFLFESLEVL</b>	<b>VNVLSANFAF</b>	<b>VFSFAFAAKL</b>	<b>MLV-MPRGKE</b>					149
Arv2	<b>KSDEESSFSD</b>	<b>SPVLLS KVL</b>	<b>IGVLSANAFAF</b>	<b>IISFAIATKG</b>	<b>LLNEVSRRE</b>					150
Arv1	<b>ILLTILISSY</b>	<b>VKIFLEAMPV</b>	<b>WEFPVSVIFI</b>	<b>VDMLVLTNSA</b>	<b>VALKVMTESA</b>					199
Arv2	<b>IMLGIFISSY</b>	<b>FKIFLLAMLV</b>	<b>WEFPMSVIFI</b>	<b>VDILLLTSNS</b>	<b>MALKVMTES</b>					200
Arv1	<b>TSRCLAVCFI</b>	<b>AHSIRFLVDQ</b>	<b>ISG-----H</b>	<b>IGSVM*</b>						228
Arv2	<b>MTRCIAVCLI</b>	<b>AHLIRFLVGQ</b>	<b>IFEPTIFLIQ</b>	<b>IGSLLQYMSY</b>	<b>FF*</b>					242

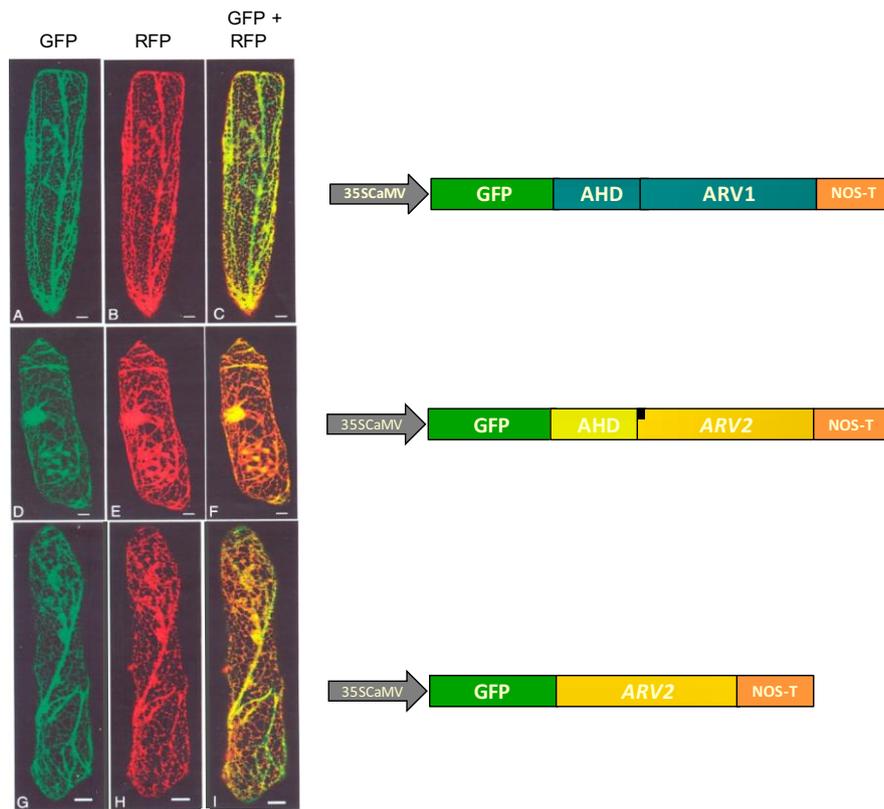
**Figura 25. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de las proteínas AtArv1 y AtArv2.** El AHD se destaca subrayado en negro. Las cajas negras indican los residuos conservados en las 2 proteínas y las grises señalan los aminoácidos similares. El recuadro corresponde al posible motivo de dedo de zinc en cuya secuencia destacan en letras rojas las cisteínas potencialmente involucradas en su formación (Forés, tesis doctoral 2007).

La expresión de los genes *AtARV1* y *AtARV2*, fue analizada mediante la fusión de las correspondientes regiones promotoras al gen reportero *uidA*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Al examinar los patrones de expresión de los genes quiméricos *AtARV1::GUS* y *AtARV2::GUS* en diferentes tejidos de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, se observó que los promotores de ambos genes dirigen patrones altamente solapantes entre si pero no idénticos. Su expresión se restringe mayormente a zonas meristemáticas (radiculares y apicales), granos de polen y semillas; es decir, en aquellos tejidos donde existe una alta actividad metabólica de crecimiento y división celular. La mayor diferencia entre los patrones de ambos genes puede observarse en hojas de la roseta basal, donde *AtARV1* se expresa en el tejido vascular, a diferencia de *AtARV2*, cuya expresión no se detecta (Figura 26, Forés *et al.*, 2006).



**Figura 26. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los genes quiméricos *AtARV1::GUS* y *AtARV2::GUS*.** Ensayo histoquímico de la actividad GUS realizado en diferentes tejidos. Flores (A y B), silicuas jóvenes (C y E), silicuas maduras (D y F), plántulas de 3 días (G y H), meristema apical del tallo de plántulas de 6 días (I y J), plántulas después de 24 h de germinación (K y L), meristemo apical de la raíz (M y O), meristemo lateral de la raíz (N y P), hojas de roseta basal (Q y R). Las imágenes A, C, D, G, I, K, M, N y Q pertenecen a los patrones expresados por el gen *AtARV1::GUS* y las imágenes B, E, F, H, J, L, O, P y R corresponden a *AtARV2::GUS*.

Como se ha indicado anteriormente, la proteína Arv1 de *S. cerevisiae* se localiza en el retículo endoplasmático (RE) o en el aparato de Golgi, probablemente dependiendo de la fase de crecimiento (Swain *et al.*, 2002), mientras que en humanos la proteína Arv1p se localiza en el RE (Liu, 2004). En el caso de las proteínas AtArv1 y AtArv2 se ha confirmado, mediante expresión en células de cebolla de fusiones con la GFP, que se trata de proteínas de RE (Figura 27). Asimismo se observó que esta localización en el RE no depende de la presencia del dominio AHD, ya que estudios con la proteína AtArv2 a la cual se le habían delecionado los 68 aminoácidos del extremo N-terminal (dominio AHD) también se localizaba en el reticulo endoplasmatico (Forés *et al.*, 2006).



**Figura 27. Localización subcelular de AtArv1 y AtArv2 fusionadas a la proteína GFP.** Imágenes de células de cebolla transformadas transitoriamente con los genes quiméricos representados a la derecha de cada imagen. **GFP**, representa la fluorescencia de las proteínas (GFP-AtArv1, GFP-AtArv2 y GFP-AtArv2- $\Delta$ AHD), **RFP** indica la fluorescencia de la proteína DsRed, control de RE y **GFP+RFP** corresponde a la superposición de las dos imágenes anteriores (Imagen adaptada de Forés *et al.*, 2006).

## **OBJETIVOS**



Los esteroides son compuestos isoprenoides imprescindibles para las plantas donde actúan como reguladores del crecimiento y desarrollo, así como componentes estructurales. En esta última función interactúan con algunos esfingolípidos y proteínas modulando las propiedades de las membranas celulares, y a su vez, los esfingolípidos simples (ceramidas y bases esfingoides libres) pueden actuar como mensajeros secundarios. Durante los últimos años, se han acumulado evidencias sobre la regulación coordinada del metabolismo de esteroides y esfingolípidos, proceso en el cual, la proteína Arv parece desempeñar un papel importante.

En el momento de iniciar este trabajo, los estudios de caracterización sobre la proteína Arv han sido realizados mayormente en levaduras y mamíferos. En cambio, en plantas, la única información acerca de esta proteína proviene del trabajo realizado en nuestro laboratorio donde se identificaron y caracterizaron los genes *AtARV1* y *AtARV2* de *Arabidopsis* que codifican dos proteínas de retículo endoplasmático funcionales, AtArv1 y AtArv2, respectivamente. Para profundizar en la caracterización de las proteínas AtArv de *Arabidopsis thaliana* se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la topología de AtArv en la membrana del retículo endoplasmático.
- 2) Identificar y caracterizar nuevos mutantes simples con pérdida total de función del gen *AtARV1*
- 3) Estudiar el efecto de la pérdida simultánea de función de los genes *AtARV1* y *AtARV2* sobre el metabolismo de esteroides y esfingolípidos, así como también en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis*.

Por otra parte, si bien se ha visto que la enzima HMGR es el punto de regulación principal en la biosíntesis de isoprenoides en la vía del MVA, la enzima farnesildifosfato sintasa también cumple un papel importante, ya que constituye el punto de partida para la síntesis de diferentes productos finales imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En *Arabidopsis* existe una pequeña familia multigénica constituida por los genes *FPS1* y *FPS2*, que codifican tres isoenzimas FPS: FPS1S, FPS1L y FPS2. La isoenzima FPS1L contiene un péptido de tránsito que le confiere una localización mitocondrial, mientras que en las isoenzimas FPS1S y FPS2 (que comparten una identidad en la

secuencia aminoacídica del 90,6%), no se ha identificado ninguna secuencia que permita predecir la localización subcelular, por lo que se asume que son citosólicas. Al iniciar este trabajo, se había realizado el análisis de los mutantes *fps1* y *fps2* de *Arabidopsis thaliana*, que si bien demostró que sólo un gen *FPS* es suficiente para mantener el crecimiento y desarrollo normal de la planta, también puso de manifiesto que las funciones de los genes *FPS1* y *FPS2* no son del todo redundantes, ya que *FPS1* parece cumplir un papel preponderante durante la mayor parte del ciclo de vida de la planta, mientras que *FPS2* desempeñaría una función más importante en las semillas y en los estadios más tempranos de la germinación. La pérdida de la función de *FPS2* pero no de *FPS1* en semillas conduce a una disminución de los niveles de sitosterol, un aumento de la actividad HMGR e hipersensibilidad a la mevastatina (inhibidor de esta enzima) (Closa *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Realizar la caracterización bioquímica de las isoenzimas FPS1S y FPS2 recombinantes de *A. thaliana*.
- 2) Determinar la localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2.
- 3) Analizar los patrones de expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* en las semillas de *A. thaliana*.
- 4) Estudiar la posible redundancia funcional de las isoenzimas FPS1S y FPS2 mediante la reversión de los fenotipos observados en el mutante *fps2-1*

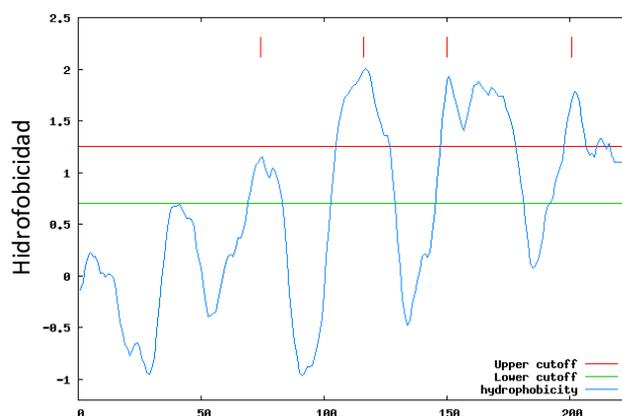
## RESULTADOS I



## CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES *arv* DE *Arabidopsis thaliana*

### 1. Determinación de la topología de la proteína AtArv1 de *Arabidopsis thaliana*

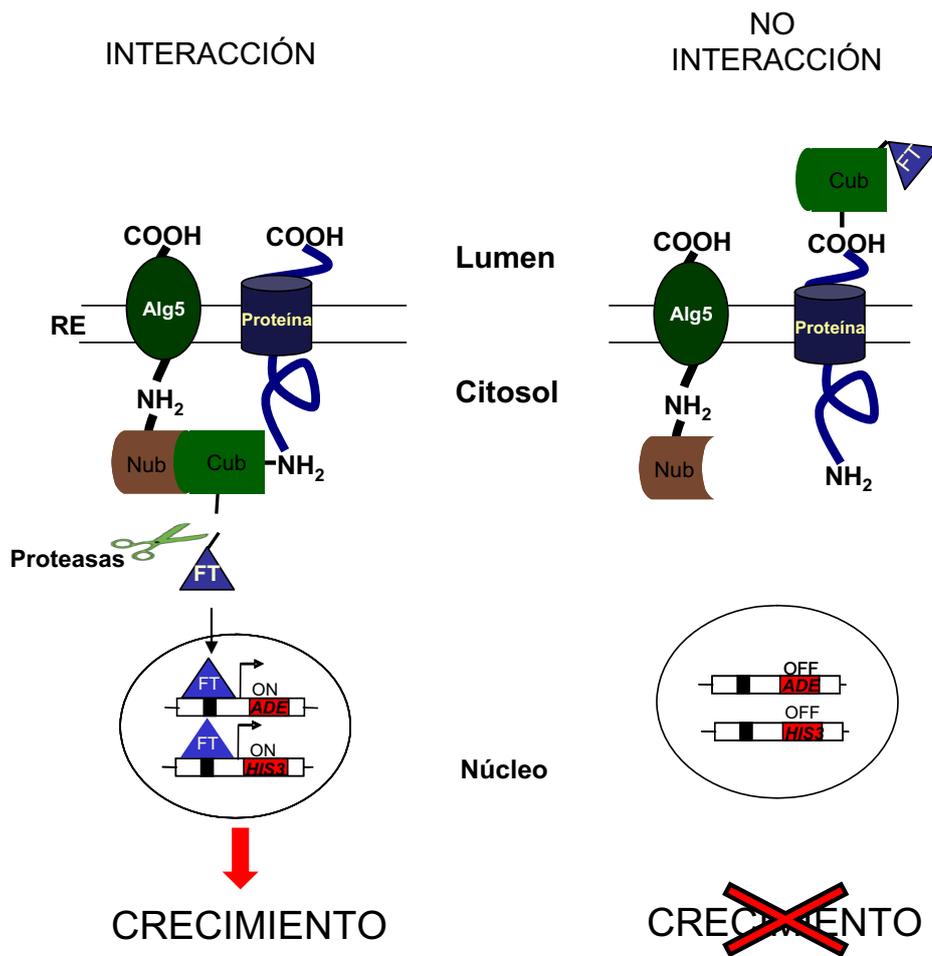
Hasta el momento sólo el estudio realizado por Villasmil y Nickels (2011) ha proporcionado información, basada en resultados experimentales, sobre la topología de la proteína Arv1p de levadura en la membrana del retículo endoplasmático (RE). Al iniciar este trabajo todavía no se disponía de información experimental acerca de la topología de Arv de *Arabidopsis thaliana* (AtArv), sólo se habían realizado análisis del perfil de hidrofobicidad, los cuales sugerían que la proteína AtArv1 tendría 4-6 dominios transmembrana (Figura 28). Por ello, se planteó llevar a cabo un estudio para determinar la orientación de AtArv1 en la membrana del RE, empleando una aproximación basada en la técnica *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two Hybrid* que permite identificar proteínas de membrana que interaccionan entre sí, pero que también se utiliza para determinar la orientación de los extremos N- y C-terminal de una proteína en el RE.



**Figura 28. Perfil de hidrofobicidad de la proteína AtArv1.** Predicción del perfil de hidrofobicidad a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína AtArv1 mediante el programa TopPred (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>). Las líneas rojas verticales en la parte superior de la imagen indican los 4 posibles dominios transmembrana.

En primer lugar, se procedió al clonaje de la región del cDNA que codifica la proteína AtArv1 en los plásmidos pBT3N y pBT3C, los cuales poseen la secuencia que codifica para la mitad C-terminal de la proteína ubiquitina fusionada al factor de transcripción LexA-VP16 (Cub-FT), ubicada en el extremo 5'- y 3'- de la secuencia clonada, respectivamente. El clonaje del cDNA de AtArv1 se llevó a cabo de manera que la secuencia que codifica Cub-

FT quedase situada tanto en el extremo 5'-, como 3'- respecto de la secuencia de cDNA de *AtArv1*, dando lugar a los plásmidos pBT3N-ARV1 y pBT3C-ARV1, respectivamente. Cada uno de estos plásmidos fue co-transformado en células de la cepa NMY51 de *S. cerevisiae* (auxotróficas para adenina e histidina) junto con el plásmido pAI-Alg5. Este plásmido expresa la proteína Alg5, cuya localización es la membrana del RE, fusionada por su extremo N-terminal a la mitad N-terminal de la ubiquitina (Nub). El factor de transcripción (FT) unido a Cub se libera sólo en el caso que ambas mitades de la ubiquitina interaccionen, para lo cual es necesario que se encuentren próximas y orientadas hacia la cara citosólica del RE, lo que permite la regeneración de la ubiquitina, y por consiguiente, la identificación por parte de las proteasas específicas que la reconocen y actúan escindiendo el FT. Una vez liberado, el FT se traslada al núcleo donde activa la expresión de los genes marcadores de crecimiento auxotrófico *ADE2* e *HIS3* (Figura 29). La levadura transformada es capaz de crecer en un medio carente de los aminoácidos adenina e histidina, sólo en el caso de producirse la activación de la expresión de los genes *ADE2* e *HIS3* por el FT liberado.



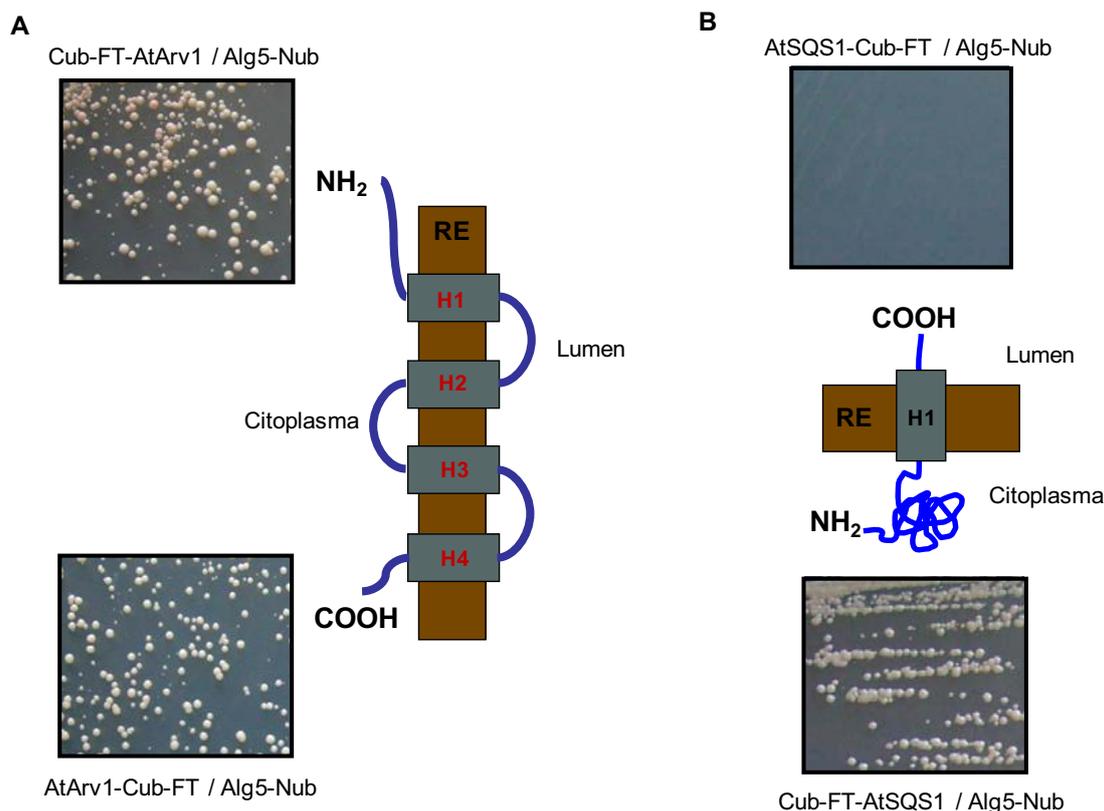
**Figura 29. Esquema representativo del funcionamiento del sistema *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two Hybrid* para determinar la orientación de una proteína en la membrana del RE.** Alg5, proteína anclada al RE; Nub y Cub corresponden a las mitades N- y C-terminal de la ubiquitina, respectivamente. FT representa el factor de transcripción LexA-VP16. *ADE2* e *HIS3* son genes involucrados en la síntesis de adenina e histidina, respectivamente. En la situación de crecimiento, Cub-FT (fusionado a la proteína en estudio) se encuentra orientada hacia el citosol, donde se encuentra con Nub, lo que produce la regeneración la ubiquitina y la escisión del FT que migra al núcleo activando los genes que permiten el crecimiento de la levadura en el medio selectivo. En el caso de no interacción, la mitad Cub-FT, quedaría orientada hacia el lumen y por lo tanto no es capaz de regenerar la ubiquitina, ni activar los genes *ADE2* ni *HIS3*; por consiguiente, no se produce crecimiento.

Las parejas de plásmidos pBT3N-ARV1/pAl-Alg5 y pBT3C-ARV1/pAl-Alg5 fueron co-transformadas en la cepa NMY51 y sembradas en medio mínimo YNB sin adenina e histidina (apartado de materiales y métodos 5.2). En paralelo, se co-transformaron células de la misma cepa con los plásmidos pBT3N-AtSQS o pBT3C-AtSQS junto a pAl-Alg5, como control positivo. La proteína AtSQS tiene una única secuencia transmembrana de anclaje al RE, de manera que el extremo N-terminal está orientado hacia el citosol, mientras que el extremo C-terminal se localiza en el lumen (Busquets *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos mostraron que tanto las levaduras que co-expresaban las proteínas AtArv1-Cub-FT y Alg5-Nub como las que co-expresaban FT-Cub-AtArv1 y Alg5-Nub, eran capaces de crecer en el medio YNB en ausencia de histidina y adenina, lo que demuestra que los extremos N- y C-terminales de la proteína AtArv1 se encuentran orientados hacia el lado citosólico del RE (Figura 30A). Esto a su vez, también indica que la proteína AtArv1 ha de poseer un número par de secuencias transmembrana, ya que de ser impar uno de los extremos estaría orientado hacia el lumen del RE y por lo tanto, en una de las dos combinaciones AtArv1/Alg5 no se observaría crecimiento en el medio auxotrófico mencionado.

Esto es lo que ocurre en el caso de la combinación AtSQS1-Cub-FT/Alg5-Nub en la que el extremo C-terminal de AtSQS se ha fusionado a Cub-FT y está orientado hacia el lumen del RE y no es posible la interacción entre las mitades Nub y Cub-FT, y por lo tanto, no es posible el crecimiento de la cepa (Figura 30B).

Los resultados obtenidos en el análisis de topología de AtArv1, que indican que esta proteína posee un número par de dominios transmembrana y que ambos extremos se encuentran en la cara citoplasmática del RE.



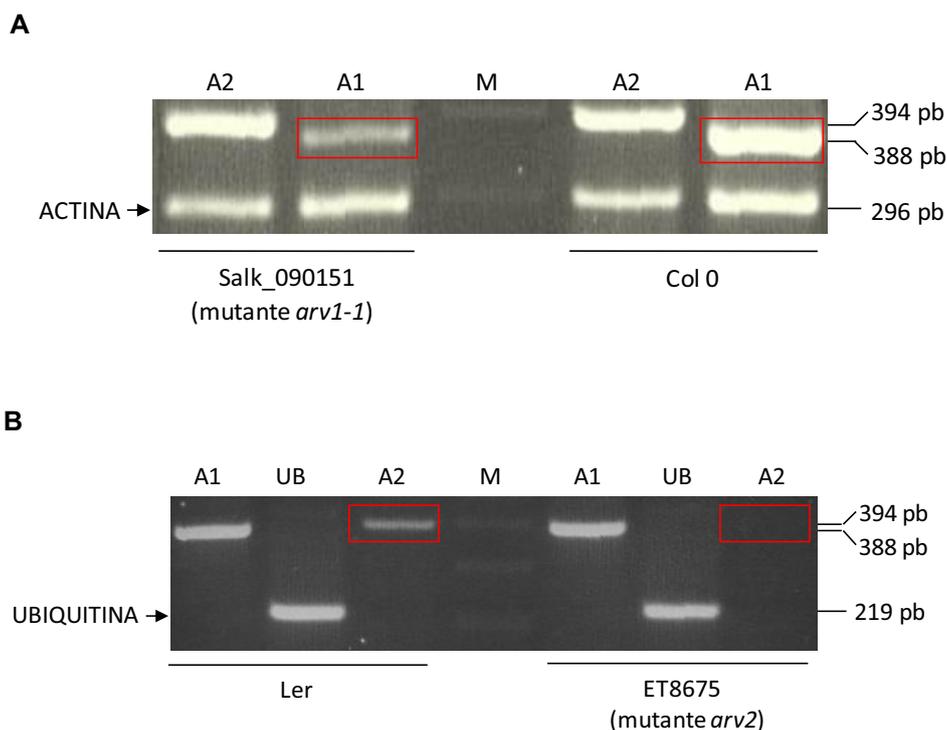
**Figura 30. Determinación de la topología de la proteína AtArv1 mediante el sistema *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two Hybrid*.** **A)** Diagrama donde se indica la posible topología de la proteína AtArv1 en la membrana del RE. H1-H4 representan los posibles dominios transmembrana de la proteína. Las imágenes de la izquierda del diagrama pertenecen a la cepa NMY51 que expresan las proteínas AtArv1-Cub-FT/Alg5-Nub o Cub-FT-AtArv1/Alg5-Nub, crecidas en medio mínimo YNB en ausencia de histidina y adenina. **B)** Diagrama representativo de la topología de la proteína AtSQS1 en la membrana del RE. H1 representa el dominio transmembrana de la proteína. Las imágenes en los recuadros superior e inferior del esquema, muestran el crecimiento de las levaduras NMY51 que expresan las proteínas AtSQS1-Cub-FT/Alg5-Nub o la ausencia de crecimiento en las levaduras que expresan Cub-FT-AtSQS1/Alg5-Nub, respectivamente.

## 2. Obtención y caracterización del doble mutante *arv1-1:arv2*

Con anterioridad al inicio de este trabajo y para investigar la función biológica de las proteínas AtArv1 y AtArv2, se habían caracterizado los mutantes de inserción *arv1-1* (Salk\_090151) de la colección SALK (Salk Institute - CA, USA) y *arv2* (ET8675) de la colección “*Enhancer Trap*” (Cold Spring Harbor). Según la información proporcionada acerca de estos mutantes, la inserción de la secuencia de T-DNA en el mutante *arv1-1* se encontraba a +16 pb respecto a la primera base del codón de inicio de la traducción del gen

*AtARV1*, mientras que el mutante *arv2*, contenía un elemento Ds insertado a -6 pb respecto al codón de inicio de la traducción del gen *AtARV2*.

Al analizar los niveles de mRNA expresados a partir de cada alelo mutante, se observó que el mutante simple *arv1-1* era un mutante *knock down* (Figura 31A), mientras que el mutante *arv2* era un mutante *knock out* (Figura 31B). En cualquier caso, ninguno de los mutantes mostraba diferencias de fenotipo con respecto a su correspondiente fondo *wild type* (Forés O., tesis 2007).



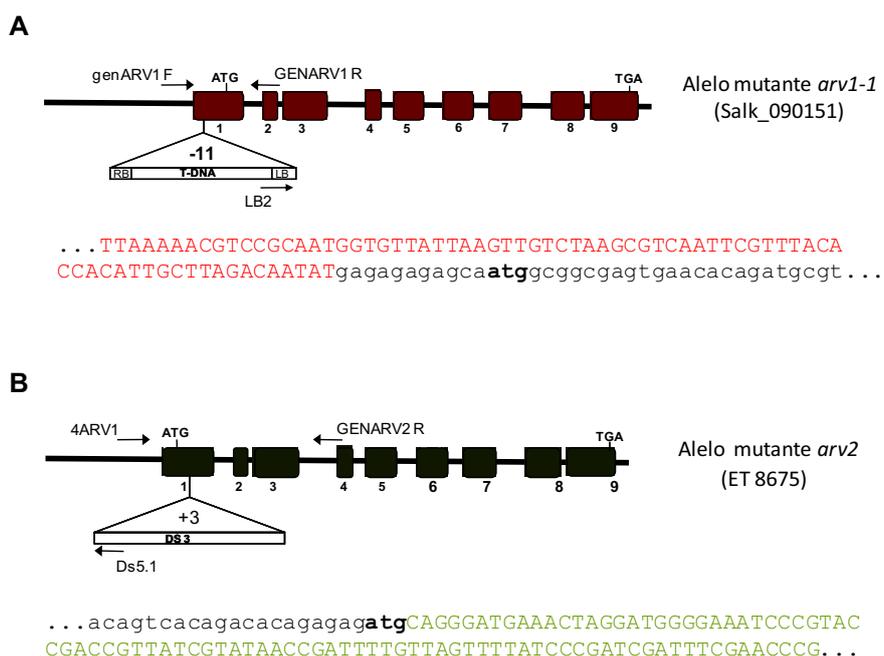
**Figura 31. Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes *AtARV* en los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* de *Arabidopsis thaliana*.** Amplificación de fragmentos de cDNA de 388 pb del gen *AtARV1* (carriles A1) y de 394 pb del gen *AtARV2* (carriles A2) obtenidos a partir de RNA proveniente de: **A**) Plantas del mutante *arv1-1* y Col 0, que confirma la expresión atenuada del gen *AtARV1* (recuadro rojo). **B**) Plantas del mutante *arv2* y Ler, que muestra la ausencia de la banda correspondiente a la expresión del mRNA de *AtARV2* en el mutante *arv2* (recuadro rojo). M: marcador de tamaño de DNA. UBIQUITINA: Amplificación de un fragmento de 219 pb del cDNA del gen de la ubiquitina (carriles UB), utilizado como control interno. ACTINA: amplificación de un fragmento de 296 pb del cDNA del gen de la actina, utilizado como control interno (Forés O., tesis 2007).

## 2.1 Determinación de la posición de la inserción en los mutantes *arv1-1* y *arv2*

Con el fin de establecer la posición exacta de la inserción del T-DNA o del elemento Ds en los mutantes *arv1-1* y *arv2*, respectivamente, se secuenció la región flanqueante de

los elementos de inserción, a partir de la correspondiente región genómica amplificada por PCR procedente de plántulas de los mutantes homocigotos *arv1-1* y *arv2*.

El resultado de la secuenciación usando el *primer* LB2, ubicado en el *left border* (LB) del T-DNA, indicó que la inserción de esta secuencia en el mutante *arv1-1* se encontraba ubicada a -11 pb respecto de la primera base del codón de inicio de la traducción del gen *AtARV1* (Figura 32A), en lugar de estar a +16 pb; mientras que la secuencia correspondiente al mutante *arv2* (utilizando el *primer* Ds5.1) reveló que la inserción del elemento Ds se hallaba ubicada en la posición +3, respecto del codón de inicio de la traducción, en lugar de la posición -6 (Figura 32B).

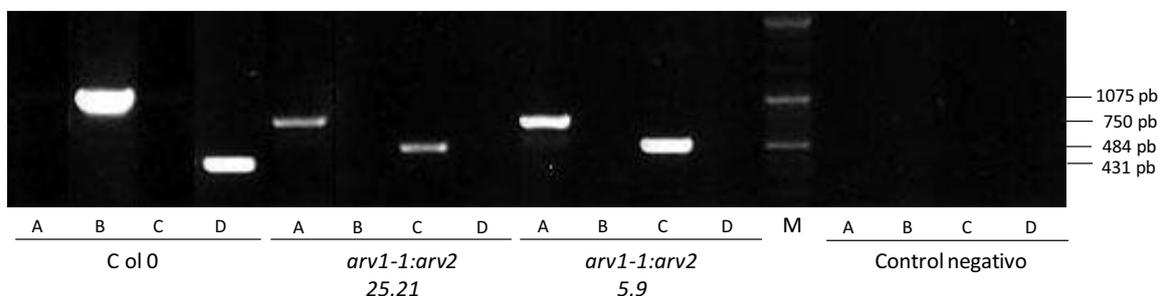


**Figura 32. Esquema de la posición de las inserciones en los genes *AtARV1* y *AtARV2* de los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* de *Arabidopsis thaliana*.** **A)** Esquema de la inserción del T-DNA en el alelo mutante *arv1-1*. La flecha indica la posición y orientación del *primer* LB2. La secuencia correspondiente al T-DNA se muestra en letras mayúsculas en rojo y la secuencia flanqueante que corresponde al gen *AtARV1* se indica en letras minúsculas. **B)** Esquema de la inserción del elemento Ds en el mutante *arv2*. La flecha indica la posición y orientación del *primer* Ds5.1. La secuencia correspondiente al elemento Ds se muestra en letras mayúsculas en verde y la secuencia flanqueante correspondiente al gen *AtARV2* se indica en letras minúsculas. En negrita se destaca el codón de inicio de la traducción.

## 2.2 Obtención del doble mutante *arv1-1:arv2*

Debido a que las plantas homocigotas de los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* no presentaban alteraciones fenotípicas y con el fin de determinar el efecto que produce la

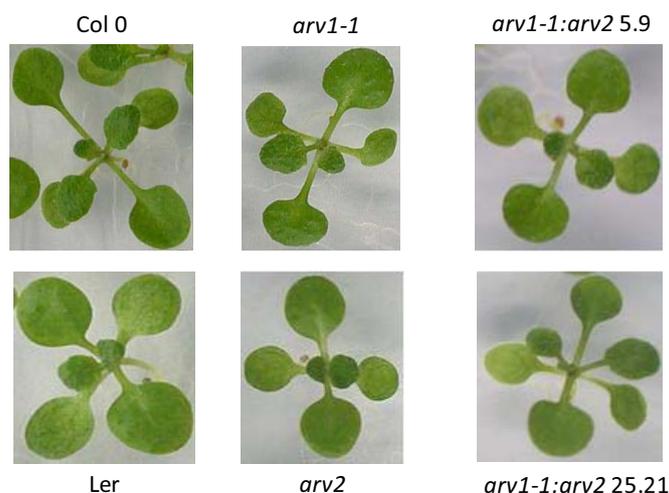
disminución de la expresión del gen *AtARV1* sumada a la pérdida total de función del gen *AtARV2*, se procedió a la obtención del doble mutante *arv1-1:arv2*, a través del cruzamiento de los mutantes simples *arv1-1* y *arv2*. Para ello, se obtuvieron plantas adultas en fase reproductiva del mutante *arv1-1*, que fueron utilizadas como plantas receptoras y, en paralelo, plantas del mutante *arv2*, que se utilizaron como plantas donadoras de polen. La decisión de utilizar cada mutante simple como donador o receptor de polen se realizó en base a que el mutante *arv1-1* carece de resistencia a antibiótico (esta pérdida de la resistencia se ha descrito en numerosos mutantes de la colección Salk), mientras que el mutante *arv2* posee resistencia a kanamicina, lo que facilitaba la selección posterior de las semillas doble mutante. Así pues, las semillas resultantes del cruzamiento, se seleccionaron en presencia de kanamicina y las plantas resistentes (plantas T<sub>1</sub>) se autofecundaron y se seleccionaron semillas que correspondían a plantas heterocigotas para los dos alelos, *arv1-1* y *arv2* (semillas T<sub>2</sub>). Con las plantas resultantes se repitió el proceso de autofecundación y con la siguiente generación de plantas (T<sub>3</sub>) se procedió a la búsqueda de líneas homocigotas para los dos alelos mutantes. Para ello, se genotiparon por PCR 35 plantas y se obtuvieron dos líneas doble homocigota, *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21 que fueron seleccionadas para su posterior caracterización (Figura 33).



**Figura 33. Genotipado por PCR de las dos líneas doble mutante de *Arabidopsis thaliana*, *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21.** Amplificación de los fragmentos del gen *AtARV1* y *AtARV2* a partir de DNA genómico obtenido de hojas de roseta basal de plantas Col0, *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21. Amplificación de un fragmento de 431 pb del gen endógeno *AtARV1* (carriles D) con la pareja de *primers* genARV1-F y GENARV1-R, y de 1075 pb del gen *AtARV2* (carriles B) con los *primers* 4ARV1 y GENARV2-R. En los carriles C se muestra la amplificación de 484 pb de un fragmento del alelo mutante *arv1-1* con los *primers* LB2 y GENARV1-R y en los carriles A la amplificación de un fragmento de 750 pb del alelo mutante *arv2* con la pareja de *primers* 4ARV1 y DS 5.1. M: marcador de tamaño de DNA.

### 2.2.1 Análisis fenotípico de las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*

Una vez seleccionados los doble mutantes homocigotos *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, se procedió a su análisis fenotípico. Para ello, se crecieron plantas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, así como los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* y sus respectivos fondos, Col 0 y Ler, en diferentes condiciones de fotoperíodo. Al analizar el fenotipo de las plántulas, no se detectaron alteraciones durante el desarrollo vegetativo (Figura 34) o reproductivo en ninguna de las condiciones de crecimiento; sólo se observaron algunas diferencias derivadas del cruzamiento entre los dos fondos genéticos Col 0 y Ler.



**Figura 34. Fenotipo de los doble mutantes *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21* de *A. thaliana*.** En las fotos se muestran plántulas de 15 días correspondientes a los doble mutantes, *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* y sus correspondientes fondos genéticos Col 0 y Ler, crecidas en condiciones de día largo.

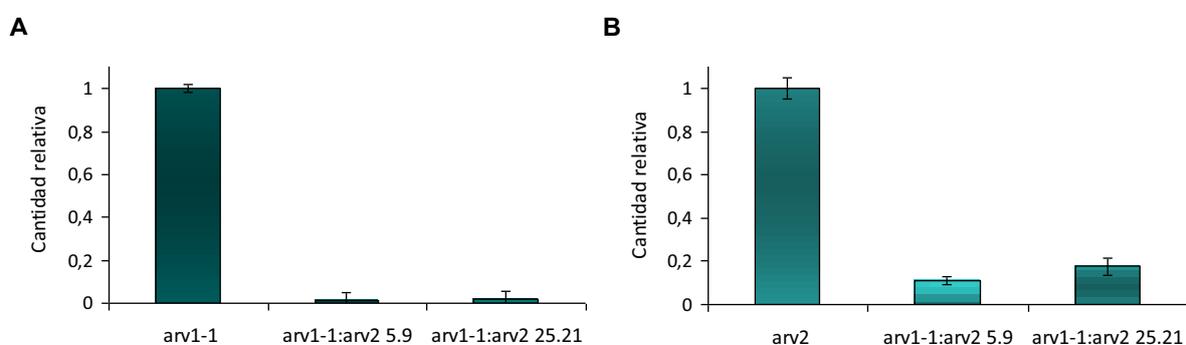
### 2.2.2 Análisis de los niveles de mRNA del gen *AtARV1* en las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21* mediante PCR cuantitativa

A partir de muestras de RNA total de las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, así como de los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* (que se emplearon como controles), se midieron los niveles de mRNA *AtARV1* por PCR cuantitativa. Los *primers* utilizados en el análisis de PCR cuantitativa no son específicos para el gen *AtARV1* debido a la elevada similitud entre las secuencias nucleotídicas de los genes *AtARV1* y *AtARV2* y a los requerimientos particulares necesarios en el diseño de los mismos. Por lo tanto, lo que se determinó en realidad fue la expresión conjunta de los dos genes *AtARV*. Así, en el mutante simple *arv1-1*, se cuantificó la expresión atenuada del gen *AtARV1* sumada a la expresión

del gen *AtARV2*, mientras que en el mutante *arv2* y los doble mutantes *arv1-1:arv2*, sólo se midió la expresión del gen *AtARV1*.

En la figura 35A se observa que los niveles de expresión de *AtARV1* en los doble mutantes *arv1-1:arv2* 5.9 y 25.21 se redujeron en un 98%, al ser comparados con los niveles de mRNA de los genes *AtARV* en el mutante *arv1* (Figura 35A), mientras que al comparar los niveles de mRNA de ambas líneas doble mutante con los del mutante *arv2*, se observó una disminución aproximada del 95% (Figura 35B).

Los resultados obtenidos, demuestran que la doble mutación *arv1-1:arv2* produce una reducción drástica de los niveles de mRNA de los genes *AtARV*, aunque esta disminución no se traduce en una alteración fenotípica. Esto sugiere que la expresión remanente de *AtARV1* es aún suficiente para mantener los niveles mínimos de proteína *AtArv* en la planta.



**Figura 35. Análisis de los niveles de mRNA *AtARV* mediante RT-PCR cuantitativa.** El análisis se realizó a partir de RNA extraído de plántulas de 12 días de edad de los doble mutantes *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21 y los mutantes simples *arv1-1* y *arv2*, crecidas en MS o MS kanamicina (en el caso de los doble mutante y el mutante *arv2*). La expresión de los genes *AtARV* se normalizó en relación a los niveles de expresión del gen de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*; *At3g26650*). Los niveles de mRNA de los genes *AtARV* en los doble mutantes se han expresado en relación a los niveles de mRNA de los genes *AtARV* del mutante simple *arv1-1* (A) o *arv2* (B) a los cuales se les ha atribuido el valor de 1. El análisis cuantitativo fue realizado mediante la ecuación de Pfaffl (que incluye el valor de eficiencia de las parejas de *primers* utilizadas). Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

### 2.2.3 Análisis bioquímico de los doble mutantes *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21

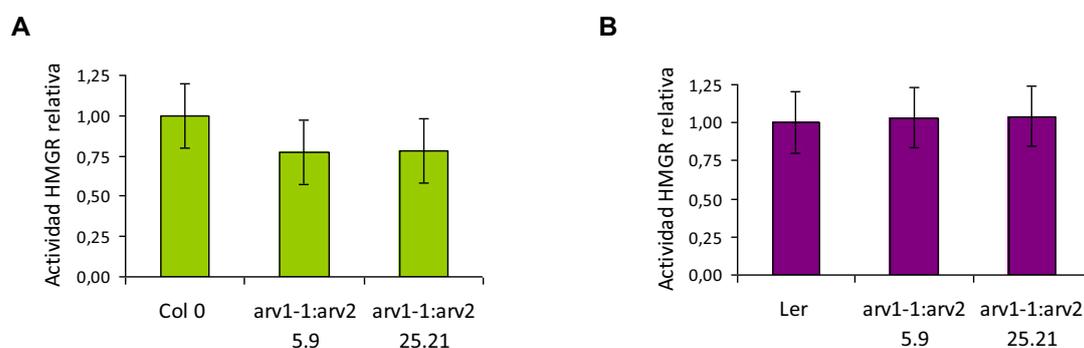
Como se describe en el apartado 4.2 de la introducción de este trabajo, en estudios previos en otros modelos, se propuso una implicación de la proteína *Arv1* en el metabolismo

de esfingolípidos y de esteroides. Para profundizar en el estudio de la función de los genes *AtARV* y su posible vinculación en la regulación coordinada de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos en plantas, se continuó con el análisis de los efectos producidos por la disminución de los niveles de mRNA *AtARV* en los doble mutantes *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*. Para ello se realizó también, la medición de la actividad de la enzima HMGR (uno de los principales enzimas reguladores de la síntesis de esteroides) y los niveles de esteroides, así como el análisis del perfil de esfingolípidos.

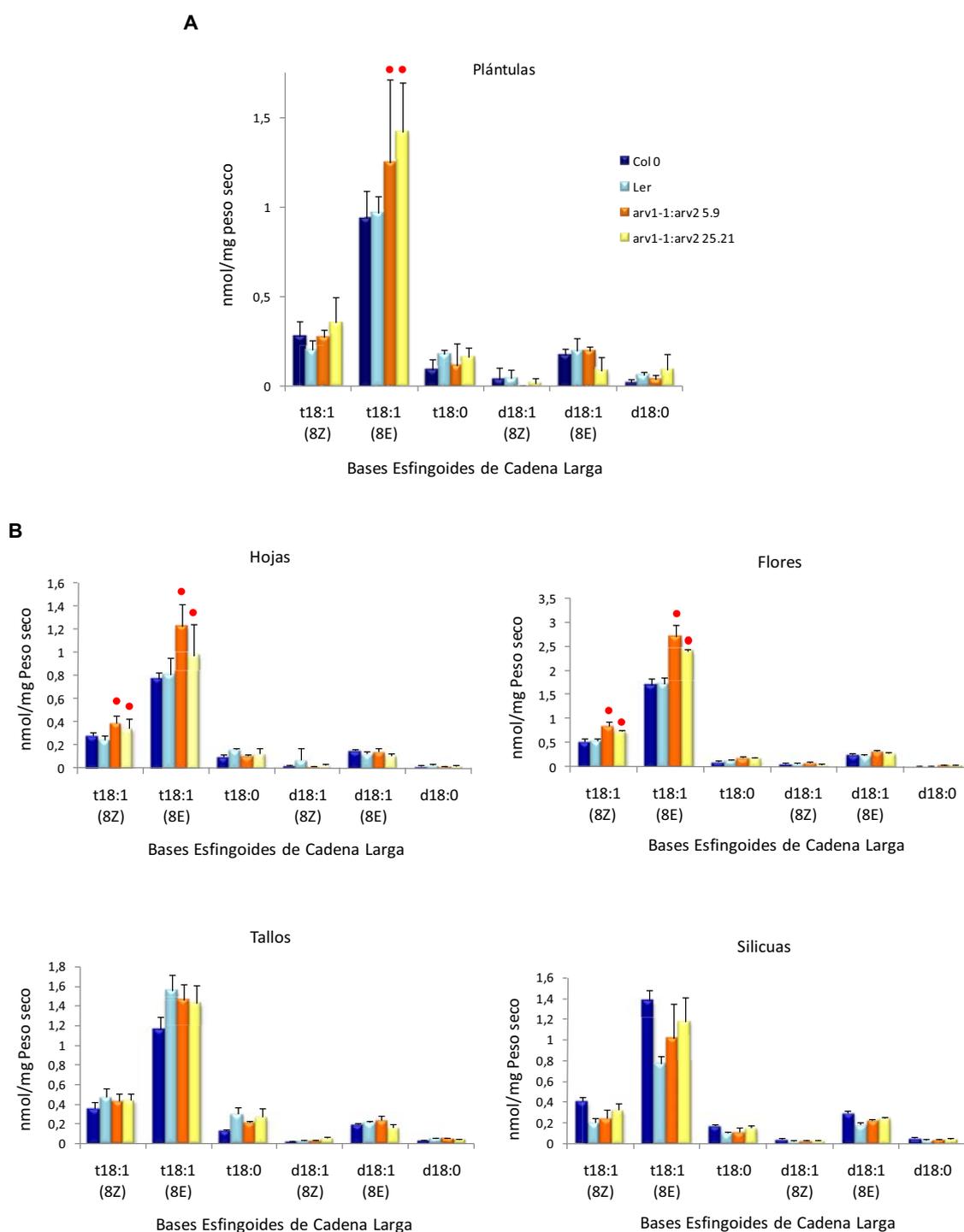
### 2.2.3.1 Análisis de la actividad HMGR en las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*

La actividad de la enzima HMGR se midió en la fracción proteica del sobrenadante de 200 x g procedente de plántulas de 15 días de edad de las líneas *arv1-1:arv2 5.9*, *arv1-1:arv2 25.21*, Col 0 y Ler. Como se muestra en los resultados de la Figura 35, los niveles de actividad HMGR en las plántulas doble mutante *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21* no presentaron variaciones significativas respecto a las plantas Col 0 (Figura 36A) o Ler (Figura 36B).

Los resultados indicaron que la disminución de los niveles de mRNA *AtARV1* en las plantas doble mutante *arv1-1:arv2* no produjeron alteraciones en los niveles de la actividad de la enzima HMGR.



**Figura 36. Niveles de actividad HMGR en las líneas doble mutante *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*.** Actividad HMGR analizada en plántulas de 15 días de líneas doble mutantes *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, crecidas en medio MS y MS kanamicina en condiciones lumínicas de día largo. La actividad HMGR se ha medido en todos los casos en la fracción 200 x g de extractos proteicos de plántulas enteras. Los resultados se expresan como actividad relativa respecto al control Col 0 (A) o Ler (B), a las cuales les fue asignado el valor de 1. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 37. Niveles de Bases Esfingoides de Cadena Larga (BECL) en las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*.** Los análisis se realizaron en (A) plántulas de 15 días de las líneas *arv1-1:arv2 5.9*, *arv1-1:arv2 25.21*, Col 0 y Ler, y (B) en diferentes tejidos de plantas adultas: hojas, tallos, flores y silicuas. Los círculos rojos indican diferencias significativas respecto a los fondos Col 0 y Ler. En la nomenclatura usada en las BECL, 0 o 1 corresponde al número de insaturaciones de la base; *E* o *Z*, (*trans* o *cis*) indica su configuración; la letra *d* (di-hidroxi) o *t* (tri-hidroxi) indica el número de grupos OH; y 18, el número de átomos de carbono de la BECL. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos  $\pm$  el SE.

### 2.2.3.2 Análisis de esfingolípidos en las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*

Como se mencionó anteriormente, las proteínas Arv1 estarían relacionadas también con la homeostasis de los esfingolípidos. En eucariotas, los esfingolípidos están compuestos por una cadena de ácido graso unida a través de un enlace amida a una base esfingoide de cadena larga (BECL). Las BECL pueden liberarse mediante hidrólisis alcalina, permitiendo a través de su cuantificación, conocer los niveles de esfingolípidos. Este método se utilizó para analizar los niveles de esfingolípidos en diferentes tejidos de las líneas *arv1-1:arv2 5.9*, *arv1-1:arv2 25.21*, Col 0 y Ler (el análisis fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. E. Cahoon en el Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri – USA).

En los resultados obtenidos del análisis en plántulas, sólo se observó un incremento de la base mayoritaria t18:1 8(E) [(E)-4-hidroxi esfingo-8-enina], en las dos líneas doble mutante *arv1-1:arv2 5.9*, *arv1-1:arv2 25.21*, respecto a los controles Col 0 y Ler; mientras que no se detectaron variaciones significativas de los niveles del resto de bases analizadas (Figura 37A, página anterior).

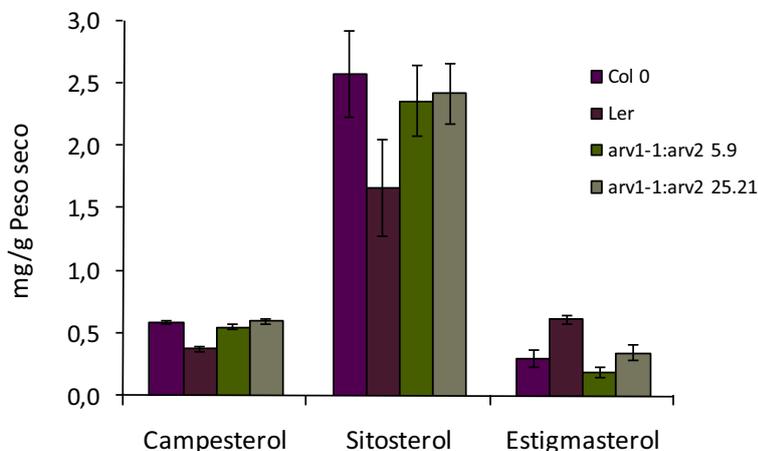
Respecto al análisis en diferentes tejidos, concretamente en hojas, tallos, flores, y silicuas de plantas adultas en fase reproductiva, sólo se observó un aumento de los niveles de las BECL t18:1(8Z) [(Z)-4-hidroxi esfingo-8-enina] y t18:1(8E) en flores y hojas de los doble mutantes, mientras que en los demás tejidos las variaciones de las BECLs no fueron significativas (Figura 37B, página anterior).

El conjunto de resultados obtenidos mostraron un efecto muy limitado de la disminución de la expresión de los genes *AtARV* en los doble mutantes sobre los niveles de algunos tipos de esfingolípidos concretos y que se restringe a plántulas y ciertos tejidos (flores y hojas).

### 2.2.3.3 Análisis del perfil de esteroides en las líneas doble mutante *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*

A pesar de no observarse cambios destacables en el perfil de esfingolípidos de los doble mutantes *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21* ni en los niveles de actividad HMGR, se decidió medir los niveles de esteroides en estas líneas, ya que como se comentó inicialmente, las proteínas *AtArv* podrían estar involucradas en la regulación coordinada de los niveles de ambos compuestos. Por ello, se analizaron los niveles de los esteroides mayoritarios (campesterol, sitosterol y estigmasterol), en plántulas de las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*.

Los resultados obtenidos tampoco muestran variaciones significativas en los niveles de los esteroides medidos en ninguna de las líneas doble mutante en comparación con sus controles Col 0 o Ler (Figura 38).



**Figura 38. Análisis de los niveles de esteroides mayoritarios de las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*.** Niveles de campesterol, estigmasterol y sitosterol en plántulas de 15 días de edad de las líneas *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21* y sus controles Col 0 y Ler, crecidas en condiciones de día largo. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

En conjunto, los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica de los doble mutantes *arv1-1:arv2 5.9* y *arv1-1:arv2 25.21*, al ser comparados con los controles Col 0 y Ler, no evidenciaron alteraciones en el fenotipo de las plantas o en los niveles de actividad HMGR, ni cambios significativos en los perfiles de esfingolípidos y esteroides. Todo ello sugiere que la expresión remanente de *AtARV1* es suficiente para mantener su función biológica con aparente normalidad.

### 3. Identificación y caracterización de nuevas líneas mutante con pérdida de función del gen *AtARV1*

Al observar que las líneas doble mutante *arv1-1:arv2 5.9*, *arv1-1:arv2 25.21* no presentaron ninguna alteración en el fenotipo, se procedió a la búsqueda de nuevos mutantes simples con pérdida total de función del gen *AtARV1*, con el fin de cruzarlos

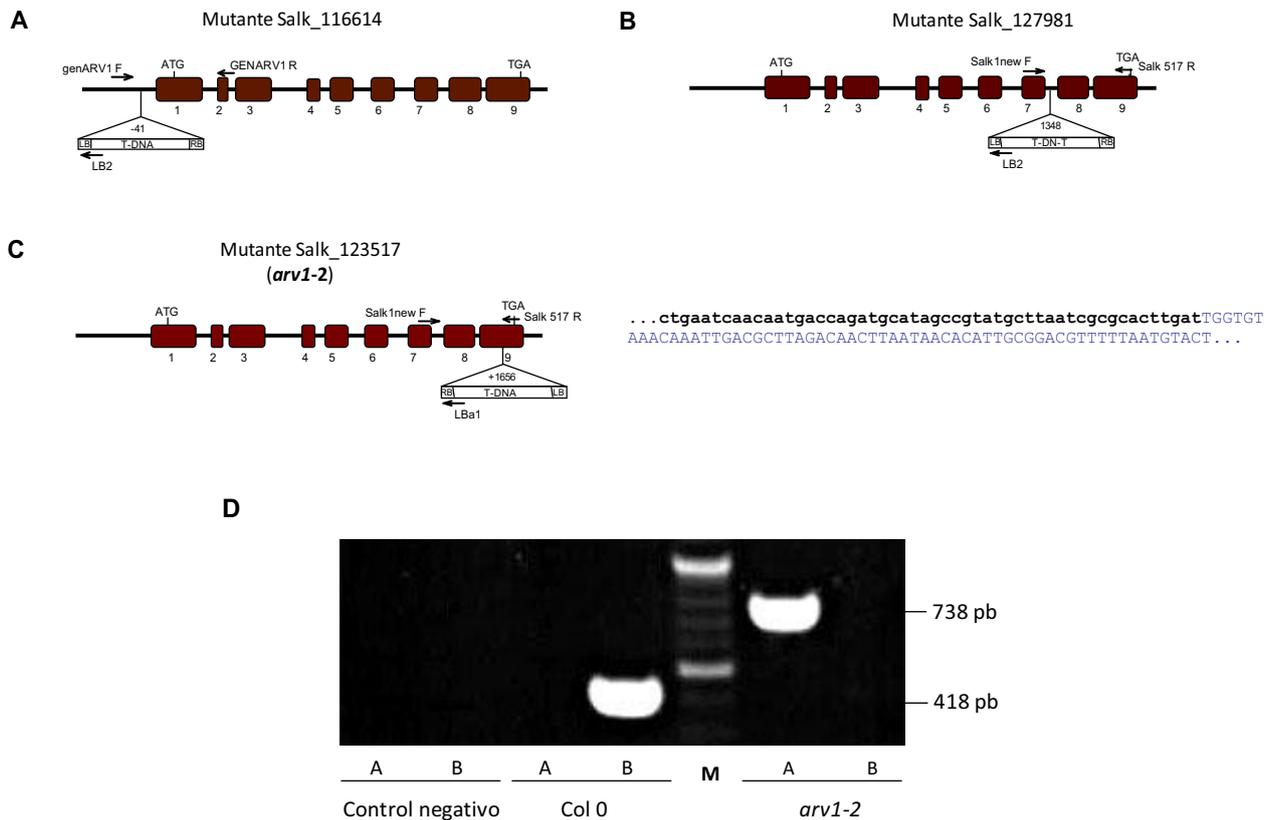
nuevamente con el mutante simple *arv2* y obtener líneas con pérdida total de función de los genes *AtARV1* y *AtARV2*.

### 3.1 Identificación y análisis de nuevas líneas mutante con pérdida de función del gen *AtARV1*

Una nueva búsqueda de mutantes con pérdida total de función del gen *AtARV1* permitió identificar 3 nuevos posibles candidatos pertenecientes a la colección SALK; líneas Salk\_116614, Salk\_127981 y Salk\_123517.

Según la información disponible sobre la posición de la inserción de T-DNA en estos nuevos mutantes, en el caso de la línea Salk\_116614, ésta se encontraría en la posición +271 pb; en la línea Salk\_127981 estaría a +1348 pb y en la línea Salk\_123517 tendría la inserción a +1464 pb (en todos los casos la posición se refiere respecto a la primera base del codón de inicio de la traducción). Sin embargo, al determinar la posición exacta de la inserción en estas líneas (de manera similar a como se describió en el apartado 2 para los mutantes *arv1-1* y *arv2*) se observó que en el mutante Salk\_116614, el T-DNA se encuentra ubicado en la posición -41 (Figura 39A); en el mutante Salk\_127981 la inserción de T-DNA se encuentra, efectivamente en la posición +1348, y por lo tanto, ubicada en el intrón 7 del gen (Figura 39B), y por último, el mutante Salk\_123517 posee el T-DNA en la posición +1656 interrumpiendo el exón 9 (en todos los casos la posición se refiere respecto a la primera base del codón de inicio de traducción) (Figura 39C).

A continuación, se procedió al genotipado mediante PCR de 45 plantas de cada una de las líneas mutantes con el fin de hallar individuos homocigotos para los alelos mutantes, empleando las parejas de *primers* indicadas en los esquemas de la figura 39A, B y C. Del análisis de un total de 135 plantas sólo se identificó un individuo de la línea Salk\_123517 que fuera homocigoto (Figura 39D). Debido a que sólo fue posible hallar un individuo homocigoto correspondiente a la línea Salk\_123517, y teniendo en cuenta que la inserción del T-DNA se encontraba en el último exón del gen *AtARV1*, se decidió continuar con la caracterización de esta línea (*arv1-2*, desde ahora) a pesar de que tampoco mostraba ninguna alteración fenotípica en las diferentes condiciones de fotoperiodo analizadas.



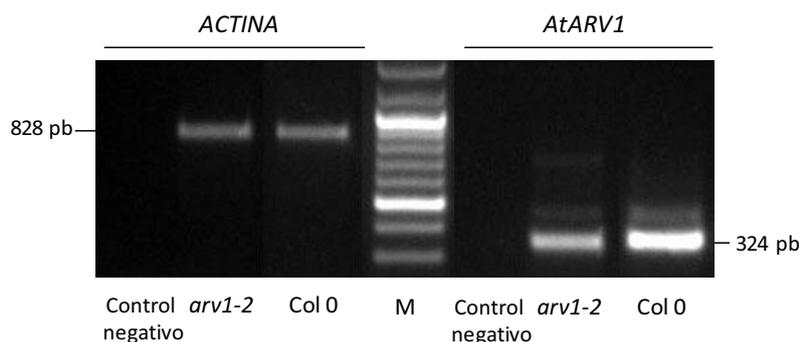
**Figura 39. Genotipado por PCR de la línea mutante Salk\_123517.** Esquema de los alelos mutantes Salk\_116614 (**A**), Salk\_127981 (**B**) y Salk\_123517 (**C**) del gen *AtARV1* donde se indica la posición de la inserción del T-DNA. Las flechas indican la posición y el sentido de los *primers* utilizados en el genotipado por PCR y la secuenciación de las regiones adyacentes al T-DNA. A la derecha del esquema se indica parte de la secuencia quimérica del alelo mutante Salk\_123517, formada por el gen *AtARV1* (letras minúsculas en negrita) y el T-DNA (letras mayúsculas en azul). **D**) Resultado del genotipado por PCR del mutante *arv1-2* (Salk\_123517) y su control Col 0. Los carriles B muestran el resultado de la amplificación del fragmento de 418 pb del gen endógeno *AtARV1* (*primers* Salk1new F y Salk 517 R) y los carriles A corresponden al resultado de la amplificación de un fragmento de 738 pb del alelo mutante *arv1-2* (*primers* Salk1new F y LBa1). M: Marcador de tamaño de DNA.

### 3.2 Determinación de los niveles de mRNA del gen *AtARV1* en la línea mutante *arv1-2*

A continuación, se procedió a analizar los niveles de mRNA del gen *AtARV1* mediante RT-PCR en muestras de RNA total de plantas de la línea mutante *arv1-2* y de su fondo genético Col 0.

Como se puede ver en la Figura 40, en el mutante *arv1-2* existe aún expresión del mRNA de *AtARV1*, aunque sensiblemente atenuada, respecto al control, Col 0. Por lo tanto,

los resultados demuestran que se trata de un nuevo mutante *knock down* para el gen *AtARV1*.



**Figura 40. Determinación de los niveles de mRNA del gen *AtARV1* en el mutante *arv1-2*.** Separación electroforética en gel de agarosa al 1% de los fragmentos de cDNA de *AtARV1* de 324 pb (carriles *AtARV1*) amplificados mediante RT-PCR a partir de RNA total proveniente de plántulas de 15 días del mutante *arv1-2* y Col 0 (derecha) y de la amplificación del fragmento de 828 pb del gen de la Actina 2 (*At3g18780.2*; izquierda) utilizado como control interno. M, marcador de tamaño de DNA.

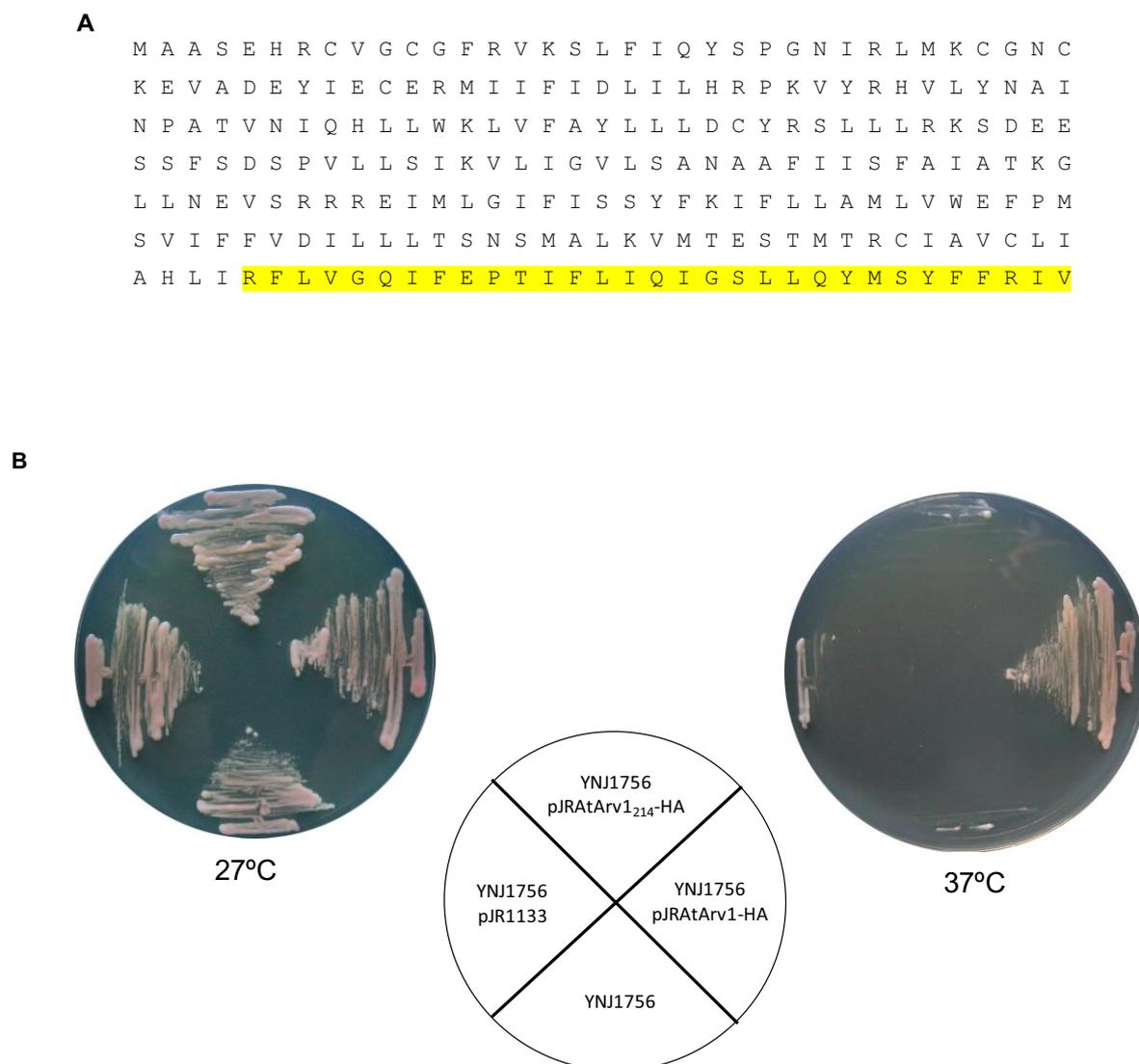
### 3.3 Estudio de la funcionalidad de la proteína *AtArv1*<sub>214</sub> en la cepa de levadura YNJ1756

Como se determinó anteriormente, en el mutante *arv1-2* el gen *AtARV1* se encuentra interrumpido en la posición +1656. Debido a la posición donde se encuentra la inserción de T-DNA, la expresión del alelo *arv1-2* podría dar lugar a una proteína *AtArv1* truncada de 214 aa (aminoácidos), en lugar de los 245 aa que posee la proteína *AtArv1* normal (Figura 41A). Por lo tanto, para evaluar la funcionalidad de esta posible proteína *AtArv1* truncada (a partir de ahora llamada *AtArv1*<sub>214</sub>), se realizó un ensayo de complementación funcional de la cepa de levadura YNJ1756 que es defectiva en *Arv1p* (*Arv1Δ*). Esta levadura mutante es termosensible, de tal manera que puede crecer a 27°C (temperatura permisiva), pero no a 37°C (temperatura restrictiva) (Tinkelenberg *et al.*, 2000).

Para realizar el ensayo, se transformaron células de la levadura YNJ1756 con el plásmido pJR*AtArv1*<sub>214</sub>-HA que portaba la secuencia de cDNA que codifica la proteína truncada *AtArv1*<sub>214</sub> fusionada al epitopo de hemaglutinina (HA). La misma cepa YNJ1756 se transformó en paralelo con el plásmido pJR*AtArv1*-HA que contiene el cDNA que codifica la proteína *AtArv1* completa, también fusionada al epitopo HA, la cual fue utilizada como control positivo, ya que había sido demostrado anteriormente que complementaba el fenotipo de termosensibilidad del mutante YNJ1756 (Forés *et al.*, 2006).

Las levaduras transformadas con cada plásmido se sembraron en medio de cultivo YPG y se incubaron en paralelo a 27°C y 37°C. También se incluyeron en el ensayo, la cepa YNJ1756 transformada con el vector vacío pJR1133 y la cepa sin transformar, como

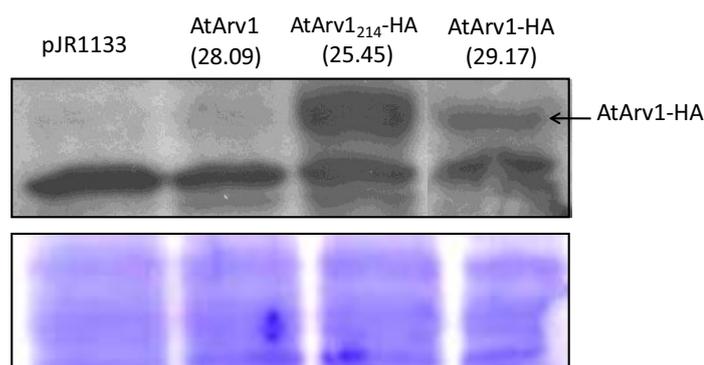
controles negativos. Tras 48 h de incubación, crecieron colonias de todas las cepas en las placas incubadas a 27°C (temperatura permisiva), como era de esperar; mientras que, en el caso de las placas incubadas a 37°C sólo fue capaz de crecer la cepa YNJ1756 transformada con el plásmido pJRAtArv1-HA, que expresaba la proteína AtArv1 completa (Figura 41B). Este resultado indicó que la proteína truncada AtArv1<sub>214</sub>-HA no es capaz de rescatar la termosensibilidad de la cepa YNJ1756, lo cual sugiere que se trata de una versión no funcional de la proteína AtArv1.



**Figura 41. Complementación funcional de la cepa de levadura YNJ1756 mediante la expresión de las proteínas AtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1-HA. A)** Secuencia aminoacídica de la proteína AtArv1. En amarillo se destacan los 31 aa deletados de AtArv1 que dan origen a la proteína AtArv1<sub>214</sub>. **B)** Crecimiento en medio YPG a 27°C (izquierda) y a 37°C (derecha) durante 48 h de la cepa de levadura YNJ1756 transformada con los plásmidos pJR1133, pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA, pJRAtArv1-HA y la cepa YNJ1756 (esquema central).

### 3.3.1 Análisis del nivel de expresión de la proteína AtArv1<sub>214</sub> en la cepa de levadura YNJ1756 mediante Western blot

Con el fin de determinar si la falta de complementación de la levadura YNJ1756 por parte de la proteína AtArv1<sub>214</sub> se debía a la ausencia de la proteína o bien a que ésta no era funcional, se analizaron los niveles de proteína AtArv1<sub>214</sub> producida en esta cepa mediante *Western blot* con anticuerpos antiHA. Se obtuvieron extractos proteicos de la cepa YNJ1756 transformada con los plásmidos pJR1133, pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA, pJRAtArv1-HA y pJRAtArv1 (este último expresa una proteína AtArv1 no fusionada al epítopo HA, que se usó como control negativo). Los resultados mostrados en figura 42 ponen de manifiesto la detección de las proteínas AtArv1-HA y AtArv1<sub>214</sub>-HA en los extractos de las cepas YNJ1756 transformada con los plásmidos pJRAtArv1-HA y pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA, respectivamente, a diferencia de lo que ocurre en los extractos de las cepas pJR1133 y pJRAtArv1, donde no se observó proteína AtArv1-HA. Cabe destacar también, el elevado nivel de expresión de la proteína AtArv1<sub>214</sub>-HA en comparación con el de la proteína AtArv1-HA.



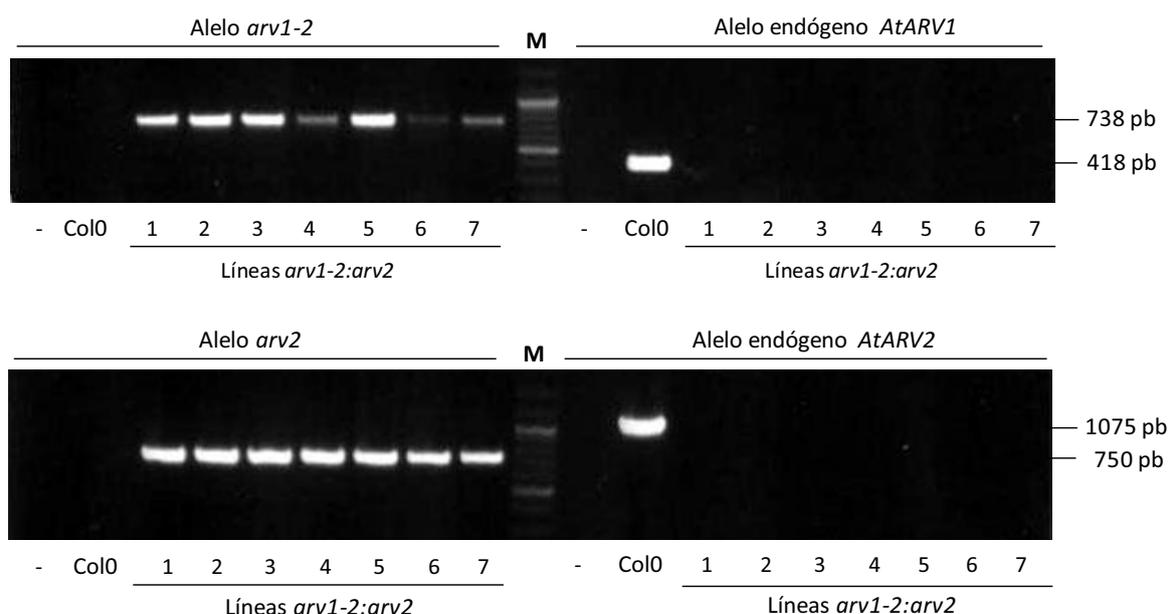
**Figura 42. Análisis mediante *Western blot* de los extractos proteicos de las cepa de levadura YNJ1756 transformadas con los plásmidos pJR1133, pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA, pJRAtArv1-HA y pJRAtArv1.** Se fraccionaron 35 mg de proteína de extractos de las cepas indicadas en un gel de SDS-PAGE al 12,5%. Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primario anti-HA y secundario fueron 1:200 y 1:10000, respectivamente. La masa molecular teórica de cada proteína AtArv1 se indica en kDa entre paréntesis. El panel inferior muestra la región de la membrana donde se localizan las proteínas analizadas teñida con Coomassie blue.

En conjunto, estos datos indican que la incapacidad de la proteína AtArv1<sub>214</sub>-HA para complementar funcionalmente a la cepa YNJ1756 deficiente en Arv1p, no se debe a la ausencia de proteína AtArv1<sub>214</sub>, sino a que la proteína trunca no es funcional debido a que carece de los 31 aa del extremo C-terminal.

### 3.4 Obtención del doble mutante *arv1-2:arv2*

Una vez demostrado que el mutante *arv1-2* poseía niveles disminuidos de un transcrito que podría dar lugar a una proteína truncada *AtArv1*<sub>214</sub> que no es funcional, se procedió a la obtención del doble mutante (*arv1-2:arv2*). Para ello, se cruzó el mutante *arv1-2* (que carecía de resistencia a antibiótico, por lo que se empleó como planta aceptora del polen), con el mutante *arv2* (utilizado como donador por su resistencia a kanamicina), siguiendo la misma estrategia empleada en la obtención de los doble mutantes *arv1-1:arv2* 5.9 y *arv1-1:arv2* 25.21 (procedimiento descrito en el apartado 2.2 de resultados). Habiendo genotipado 100 plantas T<sub>3</sub> se encontraron 7 individuos doble homocigotos (Figura 43).

Se analizaron los fenotipos de los 7 individuos en estadio de plántula, así como también en planta adulta, tanto en fase vegetativa como reproductiva, crecidas bajo condiciones de día corto y día largo, sin hallar alteraciones destacables al ser comparadas con sus respectivos controles, los mutantes simples *arv1-2*, *arv2* o los correspondientes fondos genéticos Col 0 y Ler.



**Figura 43. Genotipado por PCR de líneas doble mutante *arv1-2:arv2*.** Los carriles 1 a 7, corresponden a 7 plantas del doble mutante homocigoto *arv1-2:arv2*. En el panel superior se observa el resultado de la amplificación por PCR de un fragmento de 418 pb del alelo endógeno *AtARV1* utilizando los *primers* Salk1new F y Salk 517 R, y de un fragmento de 738 pb del alelo *arv1-2* usando los *primers* Salk1new F y LBa1. En el panel inferior, se muestra el resultado de la amplificación de un fragmento de 1075 pb del alelo endógeno de *AtARV2* con los *primers* 4ARV1 y GENARV2 R, y de un fragmento de 750 pb del alelo *arv2* empleando los *primers* 4ARV1 y DS 5.1. M: marcador de tamaño de DNA. (-): Controles negativos de la reacción de PCR (sin DNA).

### 3.4.1 Estudio de la expresión del mRNA quimérico AtARV1<sub>214</sub>/T-DNA del mutante *arv1-2*

Debido a que los resultados obtenidos indicaron que la proteína AtArv1<sub>214</sub>, posiblemente expresada en el mutante *arv1-2*, no es funcional y que las plantas del doble mutante *arv1-2:arv2* se desarrollan de manera aparentemente normal, se realizó un análisis detallado de la secuencia correspondiente a la fusión entre el gen AtARV1 y la inserción de T-DNA. Se observó que la secuencia insertada no interrumpe el marco de lectura del último exón del gen, sino que éste permanece abierto, de tal manera que el alelo *arv1-2* tenía la capacidad potencial para codificar una proteína quimérica de 243 aa (en lugar de los 245 aa que posee la proteína AtArv1), formada por 214 aa de AtArv1 y 29 aa codificados por el T-DNA flanqueante (Figura 44A).

Para determinar si existía un mRNA híbrido con capacidad para codificar dicha proteína, se amplificó el cDNA correspondiente mediante RT-PCR a partir de RNA total proveniente de plántulas del mutante *arv1-2*, utilizando los *primers* ARV1-BamHI F (cuya secuencia comienza en el codón de inicio de la traducción) y SalkTDNA R (ubicado en la posición +88, respecto del comienzo del *left border* del T-DNA). El resultado mostrado en la figura 44B indicó que el mutante *arv1-2* es capaz de sintetizar un mRNA AtARV1 híbrido de 729 pb que incluye las primeras 88 bases del T-DNA, lo cual indica que no se está expresando una proteína truncada de 214 aa como se pensó previamente, sino que se estaría produciendo una proteína quimérica de 243 aa.

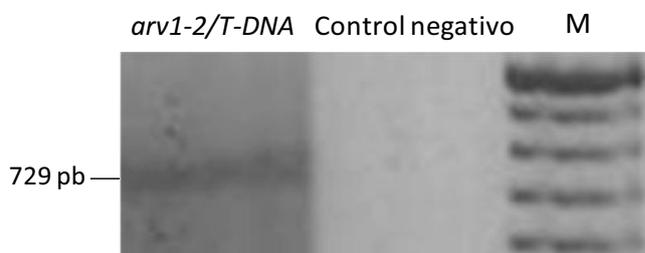
**A**

```

...ttttttt tgtcgatata ctctctttaa catcaaactc catggctctt aaagtgatga
ctgaatcaac aatgaccaga tgcatagccg tatgcttaat cgcgcacttg atTGGTGTA
ACAAATTGAC GCTTAGACAA CTTAATAACA CATTGCGGAC GTTTTTAATG TACTGGGGTG
GTTTTTCTTT TCACCAG

```

**B**



**Figura 44. Análisis de la expresión del mRNA quimérico *arv1-2*/T-DNA en el mutante *arv1-2*.** **A)** Secuencia nucleotídica quimérica de la fusión *arv1-2*/T-DNA (las letras minúsculas indican la secuencia de AtARV1 y las mayúsculas en azul, a las bases del T-DNA). **B)** RT-PCR donde se observa la expresión del mRNA quimérico *arv1-2*/T-DNA de 729 pb en el mutante *arv1-2*. M: marcador de tamaño de DNA.

### 3.5 Estudio de la funcionalidad de la proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA en la cepa de levadura YNJ1756

Una vez confirmado que el alelo mutante *arv1-2* expresa un mRNA quimérico que podría traducirse dando lugar a una proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA con sólo 2 aa menos que AtArv1, en lugar de la proteína truncada de 214 aa (Figura 45A) y habiendo observado que el doble mutante *arv1-2:arv2* era viable, se procedió a estudiar la posible funcionalidad de dicha proteína quimérica AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA mediante complementación fenotípica de la cepa de levadura YNJ1756.

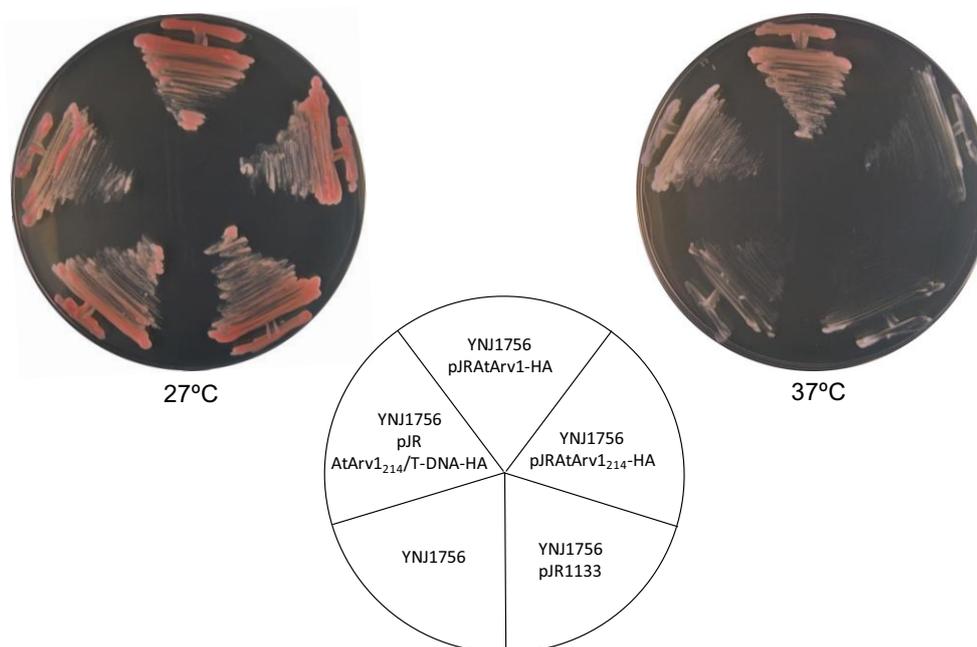
**A**

```

M A A S E H R C V G C G F R V K S L F I Q Y S P G N I R L M K C G N C K E V
A D E Y I E C E R M I I F I D L I L H R P K V Y R H V L Y N A I N P A T V N
I Q H L L W K L V F A Y L L L D C Y R S L L L R K S D E E S S F S D S P V L
L S I K V L I G V L S A N A A F I I S F A I A T K G L L N E V S R R R E I M
L G I F I S S Y F K I F L L A M L V W E F P M S V I F F V D I L L L T S N S
M A L K V M T E S T M T R C I A V C L I A H L I R F L V G Q I F E P T I F L
I Q I G S L L Q Y M S Y F F R I V

```

**B**



**Figura 45. Complementación funcional de la cepa de levadura YNJ1756 por expresión de las proteínas AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, AtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1-HA. A)** Secuencia aminoacídica de la proteína quimérica Arv1<sub>214</sub>/T-DNA (las letras negras corresponden a los aa de AtArv1 y en rojo, se destacan los aa codificados por el T-DNA). **B)** Crecimiento en medio YPG a 27°C (izquierda) y a 37°C (derecha) durante 48 h de la cepa de levadura YNJ1756 transformada con los plásmidos pJRArV1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, pJRArV1<sub>214</sub>-HA, pJRArV1-HA, pJ1133, y sin transformar (esquema central).

Para realizar este estudio, se transformó la cepa YNJ1756 con el plásmido, pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA que contiene la secuencia quimérica formada por 642 pb del cDNA de *AtARV1* y 88 pb del T-DNA, que codifica la proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA, fusionada al epitopo HA. Asimismo, se incluyeron en este ensayo, los plásmidos pJRAtArv<sub>214</sub>-HA, pJRAtArv1-HA y pJR1133, así como la cepa YNJ1756 sin transformar, como control negativo adicional. Las levaduras transformadas con cada uno de los plásmidos mencionados, fueron sembradas por duplicado en placas de medio de cultivo YPG y crecidas en paralelo a 27°C y 37°C. Tras 48 h de incubación, se visualizó crecimiento de todas las cepas en las placas incubadas a 27°C (temperatura permisiva), mientras que, en el caso de las placas incubadas a 37°C, sólo fueron capaces de crecer las cepas YNJ1756 que portaban los plásmidos pJRAtArv1-HA y pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA. Este resultado indica que la proteína quimérica AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA, es capaz de complementar la deficiencia de Arvp en la cepa YNJ1756 (Figura 45B) y por lo tanto, que dicha proteína es funcional. Este resultado permitía explicar el hecho que el doble mutante *arv1-2:arv2* pueda desarrollarse de forma normal.

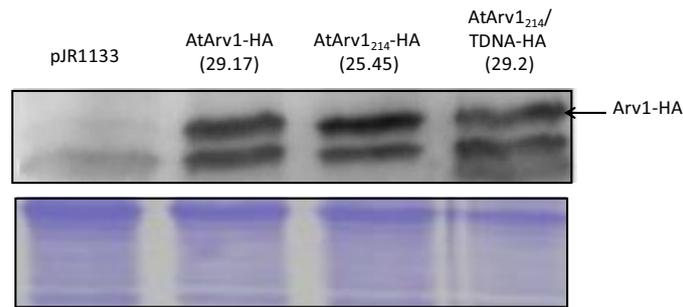
### 3.5.1 Análisis del nivel de expresión de la proteína AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA por Western blot

Con el fin de confirmar la expresión de la proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos anti-HA, extractos proteicos provenientes de la cepa YNJ1756 transformada con los plásmidos pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, pJRAtArv<sub>214</sub>-HA, pJRAtArv1-HA y pJR1133.

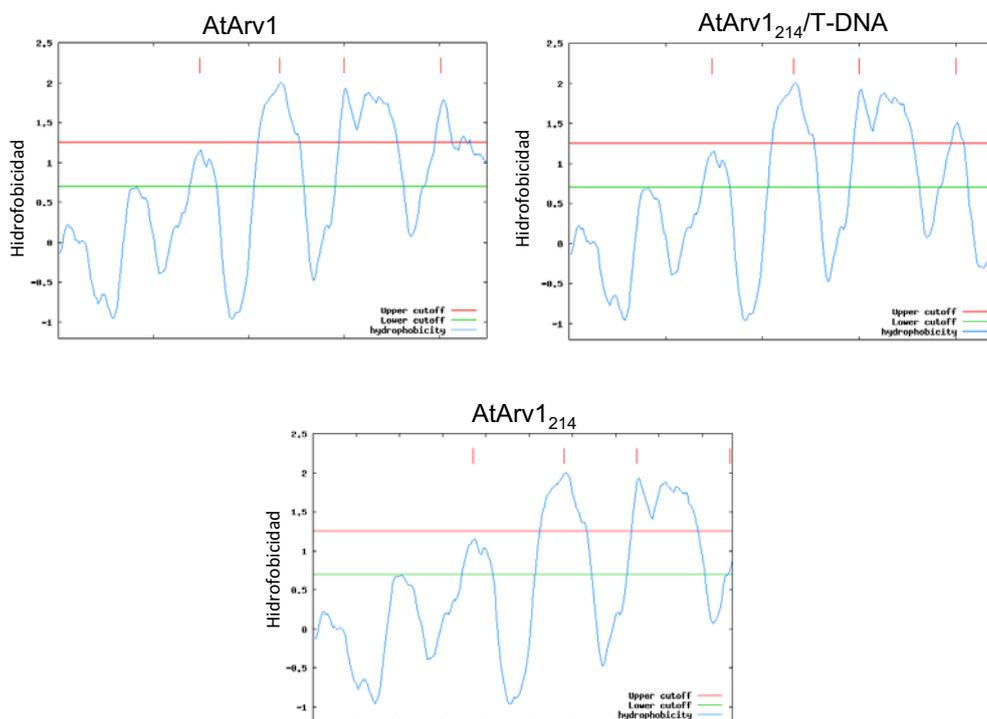
En la figura 46 se observan las bandas correspondientes a las proteínas AtArv1-HA, AtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, mientras que no se detectó ninguna banda en los extractos proteicos de la cepa transformada con el vector vacío (pJR1133). Estos datos confirmaron la expresión de la proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, la cual es capaz de complementar funcionalmente a la cepa YNJ1756 deficiente en Arv1p y respaldan la idea que los 31 aa del extremo C-terminal son imprescindibles para mantener la funcionalidad de la proteína AtArv1.

Al analizar la predicción del perfil de hidrofobicidad de la proteína truncada AtArv1<sub>214</sub>, se observa que la delección de los últimos 31 aa provoca la pérdida del cuarto dominio transmembrana, lo que altera la topología de AtArv1. Mientras que en el caso de la proteína híbrida AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA mantiene los 4 dominios transmembrana, al igual que AtArv1 (Figura 47), lo cual concuerda con los resultados de los análisis funcionales de estas proteínas. Por otra parte, el conjunto de resultados obtenidos en la caracterización de los mutantes *arv*, parece indicar que la función de la proteína AtArv1, a diferencia de la de

AtArv2, es esencial, ya que no ha sido posible encontrar ningún mutante con pérdida total de función *AtARV1*.



**Figura 46. Análisis mediante *Western blot* de los niveles de proteína Arv1-HA de extractos proteicos de las cepas de levadura YNJ1756 transformadas con los plásmidos pJR1133, pJRAtArv1-HA, pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA.** Se fraccionaron 35 mg de proteína de extractos obtenidos de las cepas indicadas en un gel de SDS-PAGE al 12,5%. Las diluciones utilizadas para el anticuerpo HA y el secundario fueron 1:200 y 1:10000, respectivamente. La masa de las proteínas se detalla en kDa entre paréntesis. El panel inferior muestra la región de la membrana teñida con Coomassie blue en el rango equivalente a donde se localizan las proteínas analizadas.



**Figura 47. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas AtArv1, AtArv1<sub>214</sub> y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA.** Predicción de los perfiles de hidrofobicidad a partir de la secuencia aminoacídica de las proteínas AtArv1, AtArv1<sub>214</sub> y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA mediante el programa TopPred (<http://mobile.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>). Las líneas rojas verticales en la parte superior de cada imagen indican los posibles dominios transmembrana en cada caso.

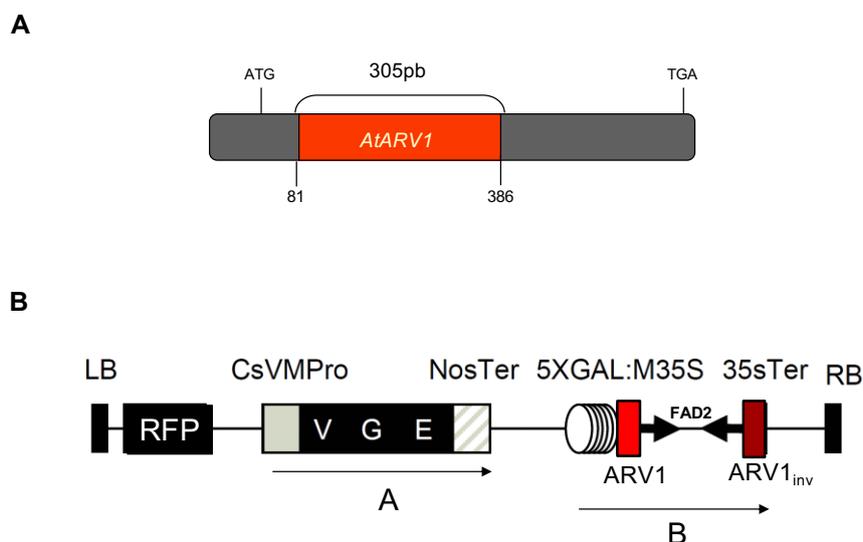
#### 4. Silenciamiento inducible de la expresión residual del alelo mutante *arv1-1* en el doble mutante *arv1-1:arv2 25.21* mediante siRNA

Al observar que mediante el mutante *arv1-2* tampoco fue posible obtener un doble mutante *knockout* para los dos genes *AtARV*, se planteó una nueva estrategia basada en el silenciamiento inducible mediado por siRNA de la expresión residual del alelo mutante *arv1-1*, en la línea doble mutante *arv1-1:arv2 25.21* y analizar su repercusión en el desarrollo de estas plantas.

Para llevar a cabo el objetivo planteado, se utilizó en concreto el sistema de silenciamiento inducible basado en el receptor de la hormona ecdisona de insectos, que es un miembro de la familia de receptores esteroideos. En insectos, este sistema hormona-receptor cumple una importante función en la regulación del crecimiento, el desarrollo y el proceso de muda. Dicho sistema fue adaptado en un plásmido (pBIN-2800B) para su uso en laboratorio (Padidam *et al.*, 2003 y Koo *et al.*, 2004). Este plásmido fue modificado, añadiéndole un gen que expresa la proteína DsRed (proteína fluorescente roja), que permite la detección visual de las semillas transgénicas sin necesidad de realizar los *screenings* rutinarios de crecimiento en medio de cultivo en presencia de antibióticos (Cahoon E., Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA), dando lugar al vector pBINRed-2800B (apartado 3.4.1 de materiales y métodos). Para activar el sistema, se utiliza un agonista no esteroideo de la ecdisona llamado metoxifenocida, comercializado por la empresa Bayer bajo el nombre comercial de Runner<sup>®</sup>, que presenta la ventaja de no ser tóxico para la planta y ser efectivo a muy bajas concentraciones, del orden nanomolar.

Para silenciar la expresión de *AtARV1*, se ha clonado en el plásmido pBINRed-2800B un fragmento de 305 pb comprendido entre las posiciones +81 y +386 del cDNA *AtARV1* (Figura 48A), por duplicado y en orientación invertida a ambos lados de la secuencia del intrón FAD2, dando origen al plásmido pRed-Arv1 (Figura 48B). En presencia del compuesto metoxifenocida, el factor de transcripción VGE, que se expresa constitutivamente, activa la expresión de la secuencia del hRNA (RNA de doble cadena con un bucle de cadena simple), que al madurar, genera un dsRNA (RNA de cadena doble) que es reconocido como señal específica para activar los mecanismos de silenciamiento del mRNA de *AtARV1*.

El plásmido pRed-Arv1 obtenido se utilizó para infiltrar plantas del doble mutante *arv1-1:arv2 25.21* y del mutante simple *arv2*. Los transformantes se seleccionaron a través de la detección de la fluorescencia roja emitida por aquellas semillas que portaban el gen DsRed y finalmente se obtuvieron 4 líneas T<sub>3</sub> homocigotas Red-25.21 y 2 líneas Red-*arv2*, las cuales fueron posteriormente caracterizadas.



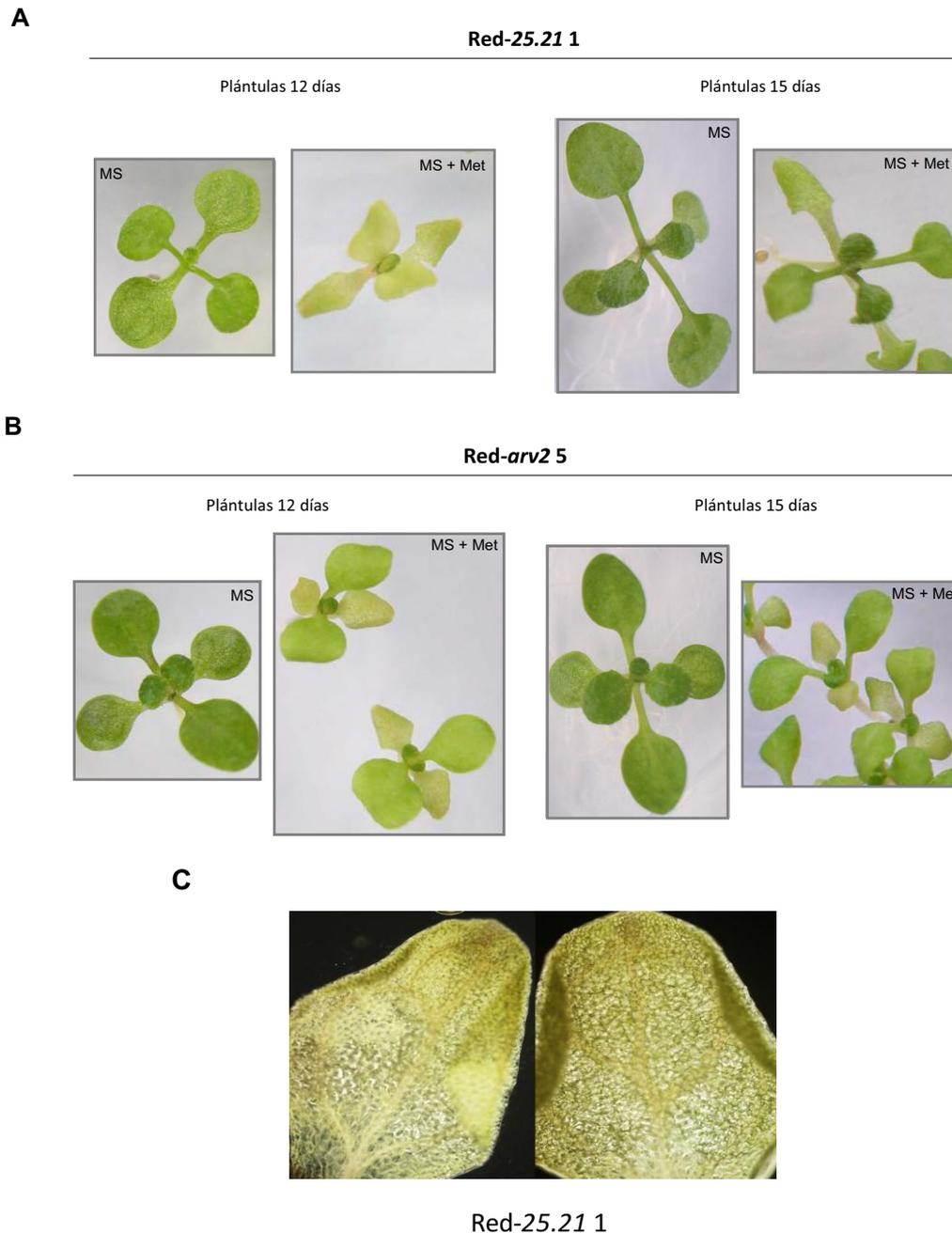
**Figura 48. Diagrama de la construcción Red-Arv1 para atenuar la expresión del gen *AtARV1* mediante siRNA inducible. A)** La caja roja, representa la secuencia de cDNA seleccionada para la construcción del plásmido pRed-Arv1. **B)** Sistema de silenciamiento inducible. RFP: secuencia que codifica la proteína fluorescente roja utilizada como marcador de selección. El cassette A contiene el dominio de activación VP16 (V), el dominio de unión a DNA Gal4 (G) y el dominio del receptor de ecdisona (E), todos bajo el control del promotor del virus del mosaico de la casava (CsVMPro). NosTer: Terminador de la nopalina sintasa. El cassette B contiene 5 copias del elemento de respuesta Gal4 y el promotor mínimo 35S que dirige la expresión del hpRNA específico para silenciar el gen *AtARV1*. FAD2: secuencia intrónica que separa los fragmentos ARV1 (cajas rojas) clonados en orientación invertida.

#### 4.1 Estudio de los efectos causados por el silenciamiento del gen *AtARV1* en las diferentes líneas homocigotas con sistema de silenciamiento inducible

##### 4.1.1 Análisis del fenotipo en plántulas de las líneas silenciadas Red-*arv2* y Red-25.21

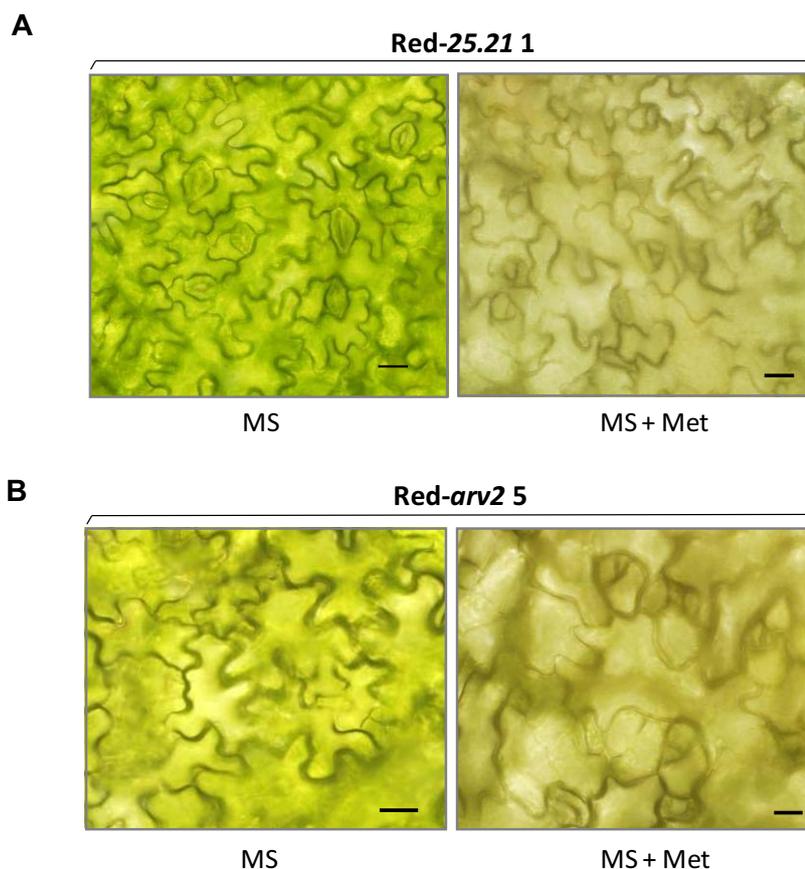
Para determinar las consecuencias del silenciamiento de *AtARV1*, en primer lugar, se analizó el fenotipo de las plantas de las líneas Red-25.21 y Red-*arv2*. Para ello, se sembraron en paralelo semillas de todas las líneas homocigotas Red-25.21 y Red-*arv2* en medio MS y MS suplementado con el inductor metoxifenocida y se mantuvieron bajo condiciones de luz de día largo durante 15 días. A partir del día 7, fue posible visualizar una alteración del fenotipo en las plántulas germinadas en presencia de metoxifenocida en 1 línea Red-*arv2* (Red-*arv2* 5) y en 4 líneas Red-25.21 (Red-25.21 1, Red-25.21 3, Red-25.21 14 y Red-25.21 15) al ser comparadas con las plántulas de las mismas líneas crecidas en MS en ausencia de inductor. Las diferentes líneas presentaban el mismo fenotipo, pero con diferente intensidad. La figura 49 muestra los fenotipos observados en las líneas Red-25.21 1 (Figura 49A) y Red-*arv2* 5 (Figura 49B) cuando las plántulas fueron crecidas en presencia

del inductor. Se observó una disminución del tamaño de las plántulas en general, sobre todo en la parte aérea, que presentaron cotiledones con pérdida de coloración (amarillentos) y que además, presentaron una curvatura de los bordes hacia el interior de la cara abaxial, adoptando una estructura en forma de “punta de flecha” (Figura 49C).



**Figura 49. Análisis del fenotipo en mutantes silenciados Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5.** Imágenes de plántulas de 12 y 15 días de las líneas Red-25.21 1 (A) y Red-*arv2* 5 (B), crecidas en medio MS o MS suplementado con metoxifenocida (MS+Met) desde la germinación de las semillas. C) Detalle de la curvatura hacia la cara abaxial de un cotiledón de una plántula de la línea Red-25.21 1. Imagen obtenida con microscopio Zeiss Axiophot.

Para profundizar en el análisis del fenotipo producido por el silenciamiento del gen *AtARV1*, se procedió al estudio de la morfología de las células epidérmicas de las hojas de las plántulas de las líneas Red-*arv2* 5 y Red-25.21 1 crecidas durante 12 días en medio MS y MS con metoxifenocida en condiciones de día largo. Como se observa en las imágenes de la figura 50, las células epidérmicas de las hojas de las plántulas Red-25.21 1 (Figura 50A) y Red-*arv2* 5 (Figura 50B) crecidas en presencia de metoxifenocida, adquirieron una apariencia más redondeada en comparación con las mismas plántulas crecidas sólo en MS.



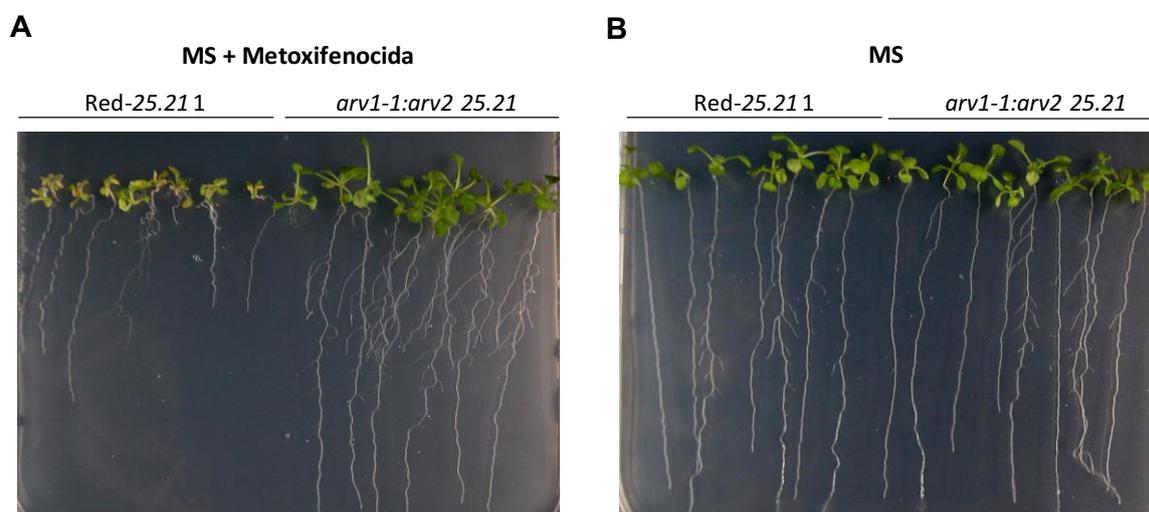
**Figura 50. Efecto del silenciamiento de *AtARV1* sobre la morfología de las células epidérmicas en hojas de las líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5.** Imágenes obtenidas con microscopio Zeiss Axiophot de células de la cara abaxial de hojas de plántulas de 12 días de las líneas Red-25.21 1 (objetivo 40x, panel superior) y Red-*arv2* 5 (objetivo 63x, panel inferior), crecidas en placas con medio MS (imagen izquierda) o MS con metoxifenocida (MS+Met; imagen derecha). Barra de escala= 20  $\mu$ m.

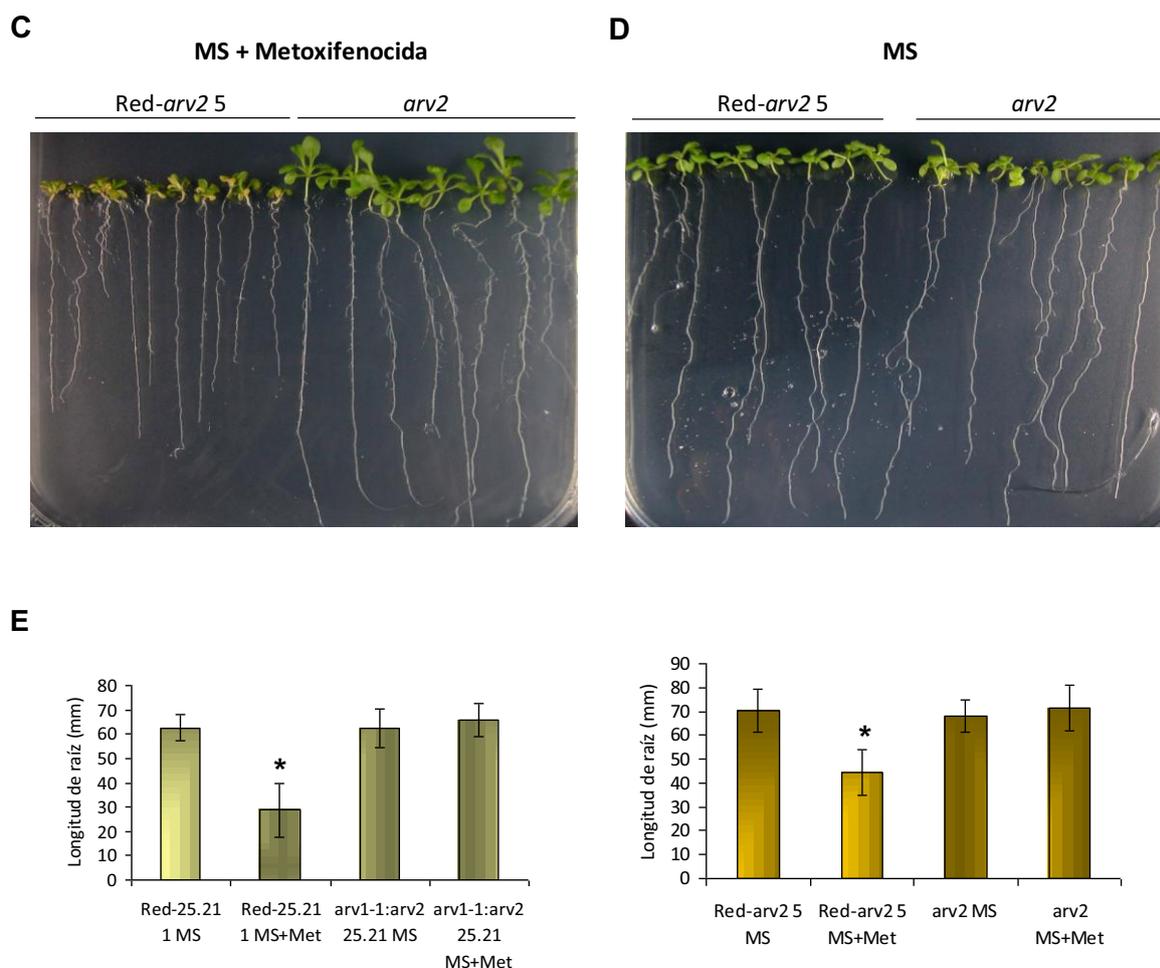
#### 4.1.2 Efecto del silenciamiento del gen *AtARV1* sobre las raíces de plántulas de las líneas Red-*arv2* 5 y Red-25.1 1

Como se describió al comienzo de este apartado, el silenciamiento del gen *AtARV1* tanto en el doble mutante Red-25.21 1 como en el mutante simple de *arv2*, Red-*arv2* 5, afecta considerablemente al crecimiento de las plántulas.

Con el fin de analizar el efecto producido por el silenciamiento de *AtARV1* sobre la longitud de las raíces, se procedió al crecimiento de plantas de las líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5 en placas con MS verticales en presencia y ausencia del inductor metoxifenocida. Una vez crecidas las plántulas, se midió la longitud de las raíces de 4 grupos: Red-25.21 1 y *arv1-1:arv2* 25.21 crecido en MS con metoxifenocida (Figura 51A), Red-25.21 1 y *arv1-1:arv2* 25.21 crecido en MS (Figura 51B) y por otro lado Red-*arv2* 5 y *arv2* en MS con metoxifenocida (Figura 51C) y Red-*arv2* 5 y *arv2* en MS (Figura 51D).

Como se observa en las imágenes de las figuras 51A y C (izquierda de la placa), las raíces de las plántulas de las líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5 crecidas en presencia de metoxifenocida, fueron claramente más cortas que las de las mismas plántulas crecidas en ausencia del inductor (Figuras 51B y D, izquierda de la placa) y que las raíces de los controles *arv1-1:arv2* y *arv2* crecidas en MS o MS con metoxifenocida en las mismas placas. El análisis cuantitativo de la longitud de las raíces de estas líneas determinó que la disminución es significativa (Figura 51E), siendo aún más evidente en las plántulas de la línea Red-25.21 1 que en las de la línea Red-*arv2* 5, en comparación con sus respectivos controles. También se observó que, estas mismas líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5 crecidas en MS en ausencia de metoxifenocida no presentaron ninguna variación en la longitud de las raíces comparadas con sus respectivos controles *arv1-1:arv2* 25.21 y *arv2*, respectivamente, lo que indica que la disminución no es debida a posibles efectos del sistema de silenciamiento sin inducir, que portan las líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5.



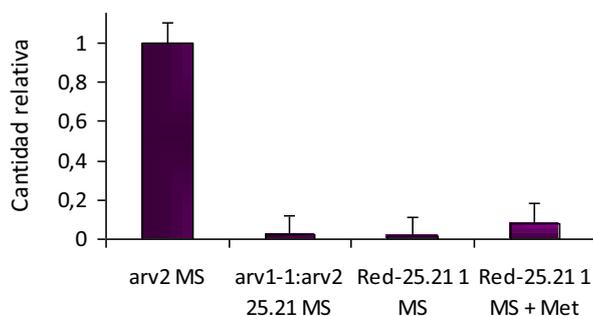


**Figura 51. Efecto del silenciamiento de *AtARV1* sobre la longitud de las raíces en plántulas de las líneas Red-25.21 1 y Red-*arv2* 5.** Comparación de la longitud de la raíz de plántulas de 15 días de las líneas Red-25.21 1 y *arv1:arv2* 25.21 crecidas en MS con metoxifenocida (A) y en MS (B) y de las líneas Red-*arv2* 5 y *arv2*, crecidas en MS con metoxifenocida (C) o MS (D). E) Los asteriscos indican una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ ). Los resultados corresponden a una media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar donde se cuantificaron aproximadamente 60 plantas de cada línea en MS y en MS+Metoxifenocida.

#### 4.2 Determinación de los niveles de mRNA *AtARV1* en las líneas Red-25.21 1 mediante PCR cuantitativa

Los niveles de mRNA de *AtARV1* en las plantas de la línea Red-25.21 1 tratadas con metoxifenocida, se determinaron mediante PCR cuantitativa. Esta determinación se realizó en la línea Red-25.21 1 ya que mostraba la alteración fenotípica más intensa. Como puede apreciarse en la figura 52, los niveles de mRNA de *AtARV1* en las plantas Red-25.21 1 y *arv1-1:arv2* 25.21 en ausencia de metoxifenocida fueron muy similares y disminuyeron un

99%, en comparación con los valores obtenidos en el mutante simple *arv2* utilizado como control. Sorprendentemente, las plantas de la línea Red-25.21 1 crecidas en presencia de metoxifenocida, presentaron niveles ligeramente incrementados de mRNA *AtARV1* respecto a los observados en las mismas plantas en ausencia del inductor, cuando lo que se esperaba, era que estuvieran disminuidos en relación a las plantas crecidas en estas condiciones.



**Figura 52. Análisis de los niveles de mRNA de *AtARV1* mediante PCR cuantitativa.** Niveles de mRNA de *AtARV1* en plántulas de las líneas Red-25.21 1, *arv1-1:arv2* 25.21 y *arv2* de 12 días, germinadas en MS o en MS con metoxifenocida (MS + Met). La expresión de los transcritos de *AtARV1* se normalizaron en relación a los niveles de expresión del gen *GAPDH*. Los niveles de expresión se indican en relación a los valores de la línea control de *arv2* a los que se les ha atribuido el valor de 1. El análisis cuantitativo fue realizado con la ecuación de Pfaffl (que incluye el valor de eficiencia de las parejas de *primers* utilizadas). Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

#### 4.3 Análisis de los niveles de expresión de *AtARV1* en respuesta al estrés de RE en la línea Red-25.21 1

Recientemente, Shechtman *et al.* (2011) observaron que en levaduras deficientes en Arv1p (*arv1* $\Delta$ ) se producía la activación del sistema UPR (*Unfolded Protein Response*), una respuesta de estrés celular que se desencadena cuando se acumulan proteínas sin plegar o plegadas incorrectamente en el lumen del RE.

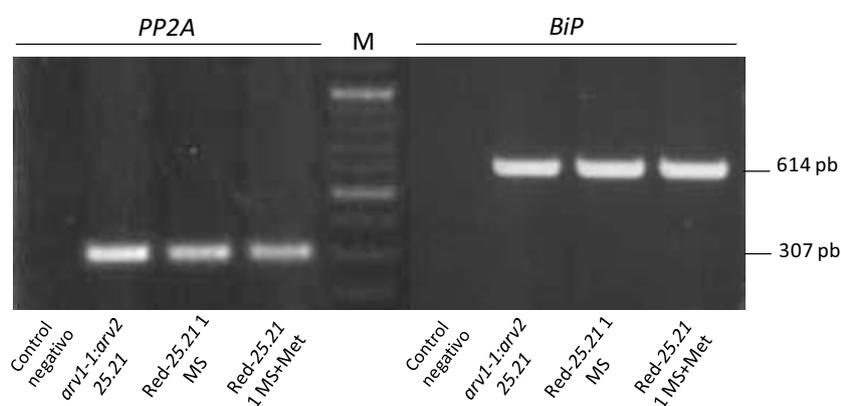
Debido al alto grado de similitud entre la proteína Arv1p de levadura y AtArv1 de *A. thaliana*, se propuso determinar si existía alguna relación entre la proteína AtArv1 y la activación de la UPR, como ocurre en levaduras.

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron dos genes control que expresan proteínas ampliamente estudiadas por su participación en procesos de estrés de RE como, *BiP* (*Binding Protein*, Alvim *et al.*, 2001; Gething *et al.*, 1999 y Muench *et al.*, 1997) y *PDI6* (*Protein Disulfide Isomerase*; Rowling *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 2009; Lu y Christopher,



Al no observar cambios en los niveles del mRNA del gen *AtARV1* después de la inducción del estrés de RE en las plantas wt, se propuso determinar si en las plantas de la línea Red-25.21 1 tratadas con metoxifenocida, se producía la inducción de la respuesta a estrés en el RE.

Para ello, se analizaron por RT-PCR los niveles de expresión del gen *BiP* en plántulas de las líneas Red-25.21 1 y *arv1-1:arv2* 25.21, crecidas en medio MS y MS con metoxifenocida. Como se observa en la figura 54, los niveles de expresión del gen *BiP* en plántulas Red-25.21 1 crecidas en presencia de metoxifenocida no presentaron variaciones respecto a los de las mismas plantas sin inducir o a los del doble mutante *arv1-1:arv2* 25-21. Esto indica que el silenciamiento del gen *AtARV1* en plantas Red-25.21 1, no produce la activación del sistema de respuesta frente a estrés en el RE que incluya la participación del gen *BiP*.



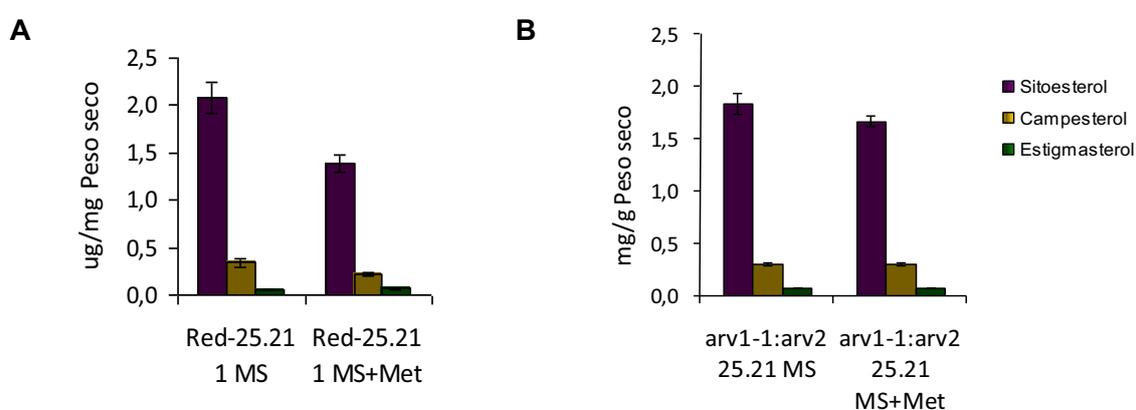
**Figura 54. Análisis de la expresión del gen *BiP* en la línea Red-25.21 1.** RT-PCR realizada a partir de RNA total de plántulas de 12 días de las líneas Red-25.21 1 crecidas en medio MS y en MS con metoxifenocida (MS+Met) y *arv1-1:arv2* 25.21 en condiciones de día largo donde se amplificó un fragmento de 614 pb del cDNA del gen *BiP*, así como también el fragmento de 307 pb del cDNA del gen *PP2A* como control.

#### 4.4 Caracterización bioquímica del mutante Red-25.21 1

##### 4.4.1 Análisis de los niveles de esteroides de la línea Red-25.21 1

Como se ha mencionado en el apartado 2.2.3, los esteroides constituyen uno de los principales puntos de interés, debido a la posible implicación de la proteína Arv en el mantenimiento de la homeostasis intracelular de estos compuestos. Por ello, se analizaron

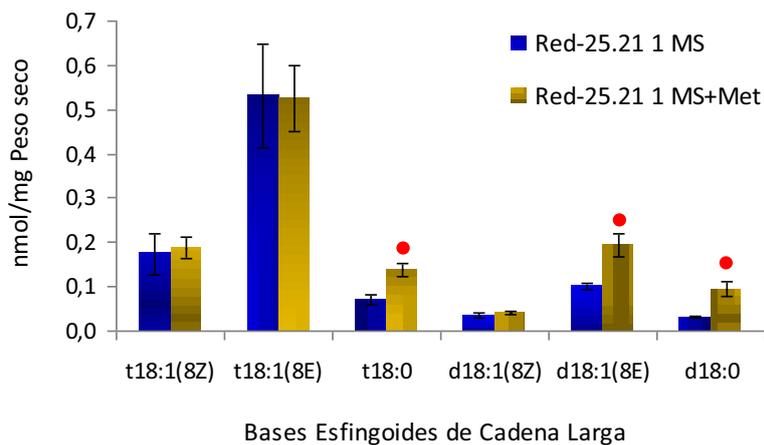
los niveles de esteroides contenidos en plántulas de la línea Red-25.21 1 crecidas en placas con MS o MS suplementado con metoxifenocida. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de los niveles de esteroides analizados, siendo más evidente en el caso del sitosterol, que presenta una reducción del 33% en el caso de la línea Red-25.21 1 tratada con metoxifenocida, respecto a la misma línea crecida en MS (Figura 55A). Por otro lado, también se realizaron mediciones de esteroides en plántulas del doble mutante *arv1-1:arv2* 25.21 crecidas tanto en MS como en MS con metoxifenocida, sin observarse diferencias significativas, lo que indica que la metoxifenocida no afecta los niveles de esteroides (Figura 55B). Estos resultados sugieren que la proteína AtArv1 estaría efectivamente relacionada con el metabolismo de esteroides en *A. thaliana*.



**Figura 55. Análisis de los niveles de esteroides de las líneas Red-25.1 1 y *arv1-1:arv2* 25.21.** Los niveles de campesterol, sitosterol y estigmasterol se determinaron en plántulas de 15 días de las líneas **A)** Red-25.1 1 y **B)** *arv1-1:arv2* 25.21, crecidas en MS o MS con metoxifenocida (MS+Met). Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

#### 4.4.2 Análisis de los niveles de esfingolípidos de la línea Red-25.21 1

Como se ha comentado (apartado 4.2 de la introducción), la función de Arv podría estar vinculada al metabolismo de los esfingolípidos, por ello, se planteó determinar los niveles de estos compuestos en plántulas de la línea Red-25.21 1 crecidas en MS y MS presencia de metoxifenocida. Los resultados muestran, una tendencia de aumento de algunas BECL, (t18:0, d18:1(8Z) y d18:0) en el caso de la línea Red-25.21 1 crecida en MS con metoxifenocida, en comparación con la misma línea germinada en MS (Figura 56).



**Figura 56. Análisis de los niveles de las BECL de la línea Red-25.1 1.** El perfil de bases esfingoides de cadena larga se determinó en plántulas de 12 días de la línea Red-25.21 1 crecidas en MS y MS con metoxifenocida. Los círculos rojos indican una diferencia significativa respecto a la línea en MS. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

## DISCUSIÓN I



## 1. TOPOLOGÍA DE LA PROTEÍNA AtArv1 DE *Arabidopsis thaliana*

Si bien la proteína Arv se ha identificado en varios organismos eucariotas, como levadura (Tinkelenberg *et al.*, 2000) o humano y rata (Tinkelenberg *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2010), la información existente en cuanto a su estructura y función es todavía limitada, y aún más en el caso de las plantas, donde sólo ha sido descrita en *Arabidopsis thaliana* (Forés *et al.*, 2006). El estudio de Arv1p en levadura ha revelado que esta proteína se localiza en el RE y Golgi (Swain *et al.*, 2002; Schetman *et al.*, 2011) e inicialmente se propuso que podría tener hasta 6 posibles dominios transmembrana (Tinkelenberg *et al.*, 2000). La caracterización de esta proteína en *Arabidopsis*, demostró que se localiza solamente en el RE y que contendría 4-6 posibles dominios transmembrana (Forés *et al.*, 2006). En ambos casos las hipotéticas secuencias de transmembrana fueron determinadas por predicciones *in silico*, ya que hasta ese momento no se habían realizado ensayos experimentales. Sin embargo, un estudio más reciente de topología llevado a cabo por Villasmil y Nickels (2011) determinó que la proteína Arv1p de *S. cerevisiae* posee sólo 3 dominios transmembrana de tal manera que el extremo N-terminal está orientado hacia el citosol y el C-terminal hacia el lumen del RE.

En este trabajo, se ha realizado un estudio de topología de inserción de la proteína AtArv1 en la membrana del RE de levadura, usando la técnica *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two Hybrid*, que ha permitido establecer que esta proteína posee un número par de dominios transmembrana y que ambos extremos se encuentran en la cara citosólica del RE (Figura 30). Este resultado concuerda parcialmente con el obtenido por Villasmil y Nickels, ya que ambas proteínas Arv comparten la orientación en la membrana del RE de la secuencia correspondiente al AHD altamente conservada, que en ambos casos se encuentra orientada hacia el citosol. Se ha descrito que este dominio AHD es imprescindible en procesos como la gemación en levadura (Villasmil *et al.*, 2011), si bien no es esencial para establecer la localización subcelular de la proteína AtArv1 en *Arabidopsis* (Forés *et al.*, 2006). Por otro lado las proteínas Arv de levadura y *Arabidopsis* presentan un número de dominios transmembrana diferente, mientras que en levadura se observan 3, en *Arabidopsis* serían 4 o 6. Estos resultados concuerdan con los perfiles de hidrofobicidad obtenidos a través del análisis con programas de predicción de dominios transmembrana como SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) o TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>). Así, se observa que en el caso de Arv1p de levadura se predice un número impar de dominios transmembrana (que varía entre 3 o 5), mientras que en el caso de AtArv1 de *Arabidopsis*, se predice un número par (que varía entre 4 o 6). Al comparar las secuencias aminoacídicas, se ve que Arv1p de levadura posee 76 aa más que AtArv1 y al analizar el alineamiento de las mismas encontramos una similitud global con *S.*

*cerevisiae* del 32% que se concentran sobre todo en la región correspondiente al AHD, y en menor medida, hacia el extremo C-terminal. A pesar de las diferencias observadas en la longitud, la baja similitud en la secuencia primaria y la diferente topología de inserción en la membrana del RE, se ha demostrado que las proteínas AtArv1 y AtArv2 de *Arabidopsis* son funcionalmente equivalentes a Arv1p ya que su expresión complementa la cepa deficiente en Arv1p de levadura, así como la expresión AtArv2 revierte la alteración en los niveles de esteroides y ceramidas asociada a la pérdida de función de esta proteína en células *arv1Δ* (Forés *et al.*, 2006). Por lo cual no se excluye la posibilidad que el plegamiento o la estructura terciaria de la proteína AtArv1 sea suficiente para emular la función de Arv1p de levadura como se ha observado en ensayos de complementación de cepas de levadura deficientes en Arv1p. Dada las limitaciones en la información disponible sobre la estructura de la proteína Arv, su cristalización permitiría lograr un conocimiento más profundo acerca de su plegamiento y proporcionaría una importante información que ayudaría en la dilucidación de su estructura y comparación entre diferentes especies.

## **2. ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS GENES *AtARV1* Y *AtARV2***

En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio se habían caracterizado los mutantes simples con pérdida de función *arv1-1* (Salk\_090151) y *arv2* (ET8675) que, según la información proporcionada en las correspondientes bases de datos, tendrían las inserciones de T-DNA y del elemento Ds a +16 pb y a -6 pb, respecto a la primera base del codón de inicio de la traducción del gen *AtARV1* y *AtARV2*, respectivamente. Sin embargo, el resultado obtenido en este trabajo al determinar la posición real de las mismas indicó que la inserción de la secuencia de T-DNA se encontraba ubicada, en realidad, a -11 pb en el mutante *arv1-1* (Figura 32A), mientras que el elemento Ds se hallaba ubicado en la posición +3 en el mutante *arv2*, (Figura 32B) respecto de la primera base del codón de inicio de la traducción de los respectivos genes. La posición real de la inserción del elemento Ds, permitió explicar los resultados obtenidos en el análisis de la expresión del mRNA *AtARV2* en el mutante simple *arv2*, donde al interrumpir el codón ATG, se produce la pérdida total de expresión del gen *AtARV2* (mutante *knock out*). En cambio, en el caso del mutante simple *arv1-1*, a pesar de que la inserción del T-DNA se encuentra en la zona *leader* del gen *AtARV1*, tuvo un efecto más moderado en la expresión del mismo (mutante *knock down*).

Al realizar la caracterización de los mutantes simples *arv1-1* y *arv2* no se observaron alteraciones fenotípicas, por lo que se decidió obtener plantas doble mutante, mediante el cruzamiento entre ellos, con el fin de determinar si la disminución de la expresión de

*AtARV1* sumada a la ausencia de expresión de *AtARV2* producía algún tipo de anomalía. Sin embargo, las plantas del doble mutante *arv1-1:arv2* tampoco mostraron alteraciones fenotípicas detectables durante su desarrollo (Figura 34) al ser comparadas con los mutantes simples o bien con los correspondientes fondos genéticos *wild type* (con excepción de cierta variabilidad fenotípica debida al cruzamiento de las variedades Ler y Col 0), a pesar de mostrar una reducción en los niveles totales de mRNA *AtARV* (Figura 35) en relación con la expresión observada en los mutantes simples. El hecho de no hallar alteraciones en el fenotipo, no excluía la posibilidad de que pudieran producirse variaciones a nivel bioquímico. Hasta la fecha se han llevado a cabo varios estudios que vinculan la función de Arv a la regulación del metabolismo de esteroides y esfingolípidos, como el realizado en *S. cerevisiae* donde determinaron que en una cepa deficiente en Arv1p se veían disminuídos los niveles de ergosterol y zimosterol, así como también una alteración en el metabolismo de esfingolípidos, con un incremento en la concentración de ceramidas y defectos en la síntesis de esfingolípidos complejos (Swain *et al.*, 2002); en el año 2008, Kajiwara *et al.* sugieren además de una posible función de Arv1p en la síntesis de GPI, que los defectos en la distribución de los esteroides en el mutante *arv1Δ* podrían deberse a un efecto indirecto derivado de la alteración en la síntesis y transporte de esfingolípidos. Por ello, se realizaron análisis de estos metabolitos en las plantas del doble mutante, así como también de la actividad de la enzima HMGR. Esta última fue incluida en el análisis debido a que la enzima HMGR se considera la principal reguladora de la síntesis de esteroides (Burg y Epenshade, 2011; Hemmerlin *et al.*, 2011) y por lo tanto, su actividad podría resultar alterada, como se observó en células humanas HepG2 tratadas con un oligonucleótido antisentido *ARV1* que reduce los niveles de Arv1, y provoca indirectamente una disminución de los niveles de la enzima HMGR en estas células (Tong *et al.*, 2010). Tras haber determinado los niveles de actividad HMGR (Figura 36), esfingolípidos (Figura 37) y esteroides (Figura 38) se observó que en todos los casos los valores obtenidos eran similares a los obtenidos en los controles. La ausencia de alteraciones fenotípicas y de cambios en los niveles de esteroides, esfingolípidos y de actividad HMGR observados en la caracterización de los doble mutante *arv1-1:arv2*, sugiere que a pesar del bajo nivel de expresión de *AtARV1* en el doble mutante, la expresión residual de este gen continúa siendo suficiente para mantener la función normal de *AtArv*.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MUTANTES DE INSERCIÓN DEL GEN *AtARV1*

El estudio realizado sobre el doble mutante *arv1-1:arv2* no permitió establecer el efecto de la pérdida total de la función *AtArv*, por lo cual se intentó identificar nuevas líneas mutantes con pérdida total de función del gen *AtARV1*. Para ello se analizaron diferentes

colecciones de mutantes donde se seleccionaron 3 nuevos posibles candidatos: las líneas Salk\_116614, Salk\_127981 y Salk\_123517. Se llevó a cabo la caracterización de cada una de ellas y finalmente fue seleccionada la línea Salk\_123517 (denominada mutante *arv1-2*) ya que mediante secuenciación se determinó que la inserción del T-DNA se encontraba exactamente en la posición +1656 (ubicación referida respecto a la primera base del codón de inicio de traducción) interrumpiendo el exón 9 (Figura 39C) y sólo fue posible hallar homocigotos en dicha línea. Sin embargo, al realizar el análisis fenotípico del nuevo mutante tampoco se observaron alteraciones durante su desarrollo. Tras el análisis de los niveles de expresión del mRNA AtARV1, este mutante resultó ser otro mutante *knock down*. La inserción de T-DNA en la posición +1656 (último exón del gen *AtARV1*), sugería la posibilidad de la expresión de una proteína AtArv1 truncada de 214 aa en lugar de los 245 que posee AtArv1. Por otro lado, en el estudio llevado a cabo por Villasmil y Nickels (2011) determinaron que la longitud que necesita tener la proteína Arv1p para suprimir (al menos parcialmente) algunos de los fenotipos de la cepa de levadura mutante *arv1*, era a partir de 213 aa (de un total de 321 aa). Esto indicaría que de producirse la proteína truncada AtArv1<sub>214</sub>, podría ser suficiente para mantener su función. Por ello, se investigó la funcionalidad de esta posible proteína truncada mediante complementación funcional de la cepa de levadura YNJ1756 deficiente en Arv1p, la cual se había utilizado en estudios anteriores para demostrar la funcionalidad tanto de la proteína Arv humana (Swain *et al.*, 2002) como de las proteínas AtArv de *A. thaliana* (Forés *et al.*, 2006). Los resultados de este ensayo demostraron que la proteína truncada AtArv<sub>214</sub>, no era funcional en levadura (Figura 41), sin embargo, dicha incapacidad no se debía a la ausencia de la proteína, ya que se detectó su expresión mediante *Western blot* en extractos proteicos provenientes de levaduras transformadas que expresaban AtArv<sub>214</sub> (Figura 42). Al analizar el perfil de hidrofobicidad de la proteína AtArv<sub>214</sub> se observó que perdería el último dominio transmembrana, lo que conlleva a la pérdida de funcionalidad de la misma.

Una vez determinado que la proteína AtArv<sub>214</sub> no era funcional, se obtuvo el doble mutante por cruzamiento con el mutante *knock out arv2*, con el fin de alcanzar el objetivo inicial de analizar los efectos de la pérdida de función total de *AtARV*. Sin embargo, sorprendente este doble mutante también era viable y tampoco presentaba alteraciones en el fenotipo durante el desarrollo de las plantas. Al analizar en detalle la secuencia nucleotídica del alelo mutante *arv1-2* se observó que el marco de lectura que da lugar a la proteína AtArv1 no estaba realmente interrumpido por la inserción de T-DNA en la posición predicha, sino que, continuaba abierto en la secuencia del T-DNA insertado. La predicción de la proteína codificada por esta secuencia quimérica, determinó que se podría producir una proteína híbrida constituida por 214 aa de la secuencia de AtArv1 y 29 aa provenientes del T-DNA, dando lugar a una proteína de 243 aa en lugar de los 245 aa de AtArv1. En

primer lugar se confirmó la expresión del mRNA híbrido en este mutante (Figura 44) y posteriormente, se comprobó la funcionalidad de esta proteína híbrida AtArv<sub>214</sub>/T-DNA, mediante complementación funcional de la cepa YNJ1756. El resultado indicó que, efectivamente, se trataba de una proteína funcional (Figura 45) lo que explicaría que las plantas doble mutante se desarrollaran de manera normal, sin alteraciones fenotípicas observables.

Al comparar las predicciones de los perfiles de hidrofobicidad de las 3 proteínas: AtArv1, AtArv<sub>1214</sub> y AtArv<sub>1214</sub>/T-DNA (Figura 47) se observó que la delección de los 31 aa del extremo C-terminal de la proteína AtArv1 afecta notablemente a la estructura de la proteína, ya que forman parte de la última secuencia transmembrana y del extremo C-terminal citosólico. Esto es coherente con la observación de que AtArv<sub>1214</sub> no es funcional y demuestra que esta región es esencial para la funcionalidad de la proteína. En levadura se ha visto que la proteína Arv1p truncada en el aa 113 no es capaz de revertir algunos fenotipos del mutante *arv1*, mientras que son revertidos parcialmente al expresar la proteína Arv1p de 213 aa y completamente cuando la proteína contiene los primeros 263 aa (Villasmil y Nickels, 2011). Estos autores sugieren que la región entre los aa 113 y 213 de Arv1p podrían participar en la interacción con Erg11. Esta proteína es una lanosterol 14-demetilasa de la familia del citocromo P450, involucrada en la síntesis de ergosterol en levaduras, la cual se ha demostrado interacciona con Arv1p (Parsons *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005). En varias especies de plantas se ha identificado la proteína Cyp51, una obtusifoliol 14-demetilasa del grupo del citocromo P450 funcionalmente equivalente a Erg11, aunque la interacción entre Cyp51 y AtArv1 no se ha confirmado experimentalmente (Cabello-Hurtado *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). Por lo tanto, no se descarta la idea de que estas proteínas podrían interaccionar mediante la unión a secuencias específicas, como ocurriría en la caso de levadura. Por otro lado, al analizar la secuencia de la proteína híbrida AtArv<sub>1214</sub>/T-DNA (Figura 45A) y su perfil de hidrofobicidad (Figura 47), se observa que a pesar que esta posee 3 aa menos que AtArv1 y que difiere en 11 de los 13 aa codificados por el T-DNA del extremo C-terminal, se mantiene la topología de inserción en el RE y conserva los cuatro dominios transmembrana predichos en la proteína AtArv1 completa (según la predicción realizada con el programa TopPred). Esto explicaría por qué el cambio en la secuencia no afectaría a la funcionalidad, como se demuestra tanto por la complementación de la cepa de levadura deficiente en Arv1p como por la total viabilidad del doble mutante *arv1-2:arv2*, donde la expresión de esta proteína híbrida sería suficiente para mantener la función AtArv en estas plantas y el desarrollo aparentemente normal de las mismas.

Estos resultados sugieren además, que AtArv1 podría estar involucrada en la síntesis de esfingolípidos o GPI a través de interacciones proteína-proteína o proteína-lípido, donde

la estructura sea un factor crucial en la mediación de estas interacciones y por ello es imprescindible mantener su plegamiento y topología en la membrana del RE.

#### **4. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN RESIDUAL DEL ALELO MUTANTE *arv1-1* EN EL DOBLE MUTANTE *arv1-1:arv2* 25.21**

La imposibilidad de conseguir un mutante *knock out* simple *arv1* sugería que este gen era esencial para las plantas, a diferencia del gen *AtARV2* para el que sí se encontró un mutante *knock out*. Ante estas circunstancias, y para conseguir analizar el efecto de la pérdida simultánea de función de ambos genes *AtARV*, se optó por intentar disminuir la expresión residual de *AtARV1* en el doble mutante *arv1-1:arv2*. Para ello se utilizó concretamente el sistema de silenciamiento inducible basado en el receptor de ecdisona con la finalidad de lograr el silenciamiento del gen *AtARV1* mediante siRNAs (small interfering RNAs) generados a partir de la expresión de hpRNAs (hairpin RNAs). Se prefirió usar el mecanismo de silenciamiento a través de estructuras intermediarias tipo *hairpin* por demostrarse su eficacia en una comparación realizada en dos estudios para la obtención de siRNAs. Se observó que aquellos provenientes de hpRNAs lograron mayor porcentaje de silenciamiento (Chuang y Meyerowitz, 2000 y Wesley *et al.*, 2001). La elección de un sistema inducible, se llevó a cabo debido a la posibilidad que el gen *AtARV1* fuera esencial. Este tipo de sistema permite su activación una vez la planta ha germinado y en el estadio de desarrollo deseado. De entre los múltiples sistemas inducibles disponibles, se escogió uno basado en el receptor de la hormona ecdisona (Padidam *et al.*, 2003 y Koo *et al.*, 2004) debido a que se ha demostrado que la activación de este sistema puede controlarse muy estrictamente mediante agonistas sintéticos de la ecdisona. Una sustitución en el aminoácido 110 del receptor de la ecdisona (Ala-Pro) de *C. fumiferana* conlleva la pérdida de la capacidad de respuesta a las hormonas ecdisteroideas y sin embargo, no altera el reconocimiento de compuestos no esteroideos sintéticos como la metoxifenocida (Kumar *et al.*, 2002). Este sistema resultó ser sumamente efectivo en la regulación de la expresión génica tanto en mamíferos como en plantas (Palli *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2004; Tavva *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010) y concretamente esta misma estrategia se había utilizado con éxito para el silenciamiento del gen *AtLCB2b*, uno de los dos genes que codifican para la subunidad LCB2 de la enzima SPT (Serina Palmitoil Transferasa), que cataliza el primer paso en la biosíntesis de esfingolípidos (Dietrich *et al.*, 2008).

Para lograr el objetivo planteado, se generaron plantas transgénicas del doble mutante, *Red-25.21 1*, así como plantas del mutante simple, *Red-arv2 5* que contenían el

sistema de silenciamiento inducible descrito. Al comparar el fenotipo de las líneas *Red-25.21 1* y *Red-arv2 5*, crecidas en MS y en MS con metoxifenocida, se observó que las plántulas crecidas en presencia del inductor (donde se activó el sistema de silenciamiento del gen *AtARV1*) mostraron una disminución del tamaño de las plántulas y presentaron alteraciones tanto en la parte aérea como radicular. Se observó una pérdida de coloración en los cotiledones y una curvatura de los bordes hacia el interior de la cara abaxial, adoptando una estructura en forma de “punta de flecha” (Figura 49). Por otro lado, las raíces de las plántulas también se vieron afectadas por el silenciamiento de *AtARV1*. Las líneas *Red-25.21 1* y *Red-arv2 5* presentaron una disminución del 56% y 45%, respectivamente, en la longitud de la raíz, respecto a las mismas líneas crecidas en MS (Figura 51). Profundizando en la caracterización, al analizar la morfología de las células epidérmicas de las hojas, se observó que adoptaron un aspecto más redondeado en comparación con las mismas crecidas en MS (Figura 50). En general, el grado de afectación de las plántulas del doble mutante *Red-25.21 1* fue mayor que el de la línea *Red-arv2 5*, probablemente debido al diferente grado de silenciamiento entre ambas. Respecto a los estudios bioquímicos, se observó que los esteroides mayoritarios se encontraban disminuidos en plántulas de la línea *Red-25.21 1* crecidas en MS con el inductor metoxifenocida, hasta un 33% en el caso del sitosterol y un 38% en el del campesterol, respecto a las plántulas control *Red-25.21 1* crecidas en MS (Figura 55). En el caso de los niveles de las BECL, se observó un aumento de dos veces en las bases t18:0, d18:1(8Z) y de hasta 3 veces en la base d18:0, respecto a los valores en las plántulas de la misma línea crecidas en MS (Figura 56). El incremento selectivo de algunos intermediarios de la síntesis de esfingolípidos, se ha observado también en levadura, donde se detectó una acumulación de las ceramidas B y C derivadas de la fitoesfingosina, en levaduras deficientes en *Arv1p*, mientras que los niveles de aquellas derivadas de la dihidroesfingosina (ceramidas A y B') no se vieron alterados (Swain *et al.*, 2002).

Por una parte, se ha sugerido que la proteína *AtArv* es importante para la división y expansión celular (Forés *et al.*, 2006) ya que las células en estas etapas necesitan un aporte constante y un transporte activo de esteroides junto con otras especies lipídicas para sintetizar y mantener la estructura de las membranas plasmáticas (Clouse *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha propuesto que la proteína *Arv* se encuentra involucrada en la regulación de la homeostasis lipídica celular en levadura (Tinkelenberg *et al.*, 2000; Swain *et al.*, 2002; Kajiwara *et al.*, 2008; Schechtman *et al.*, 2011), mamíferos (Tong *et al.*, 2010) y plantas (Forés *et al.*, 2006). Estas observaciones sugieren que la alteración tanto en el fenotipo de los cotiledones y la morfología de las células epidérmicas como en la longitud de la raíz de las plántulas donde se ha disminuido la función *AtArv*, podría deberse a la alteración del metabolismo de esteroides y esfingolípidos observada, debido a la inactivación de los genes

*AtARV*. Habiendo observado que los niveles de esteroides mayoritarios (sobre todo sitosterol y estigmasterol) se encuentran reducidos, así como los niveles de algunas BECL se encuentran aumentados en plantas del doble mutante crecidas en presencia de metoxifenocida, se plantea la posibilidad de que la inactivación de los genes *AtARV* en *Arabidopsis*, conlleve a la disminución en los niveles de esteroides, lo que produciría indirectamente una desestabilización en la regulación de los esfingolípidos produciendo su aumento (como fue sugerido en el estudio de Kajiwara *et al.*, 2008), o bien la situación inversa, es decir, que la disminución de los niveles de esteroides sea un efecto secundario de la alteración en los niveles de algunas BECL. Actualmente existen cada vez más estudios que respaldan la hipótesis de una interacción funcional entre esfingolípidos y esteroides, gran parte de los cuales se han realizado en levaduras (Swain *et al.*, 2002b; Valachovic *et al.*, 2004; Veen y Lanh, 2005; Guan *et al.*, 2009), e incluso se ha desarrollado un modelado matemático basado en la integración de las vías metabólicas del ergosterol y de los esfingolípidos para simular los efectos ante el tratamiento con diferentes fármacos (Alvarez-Vasquez *et al.*, 2011). También en humanos se han realizado estudios que avalan esta interacción entre esteroides y esfingolípidos, como por ejemplo, se ha visto que deficiencias en la relación entre estos compuestos derivan en patologías como la enfermedad de *Niemann Pick*, la cual se caracteriza por un defecto en la localización y acumulación de esfingolípidos y colesterol en los lisosomas (Karten *et al.*, 2009), o bien que la disminución en los niveles de esfingolípidos influyen en la vía de las SREBP, afectando la biosíntesis de lípidos como el colesterol (Scheek *et al.*, 1997). En plantas, la mayoría de los estudios en los que se relacionan esteroides y esfingolípidos están focalizados en los llamados “*lipid o membrane rafts*” (revisado en Simon Plas *et al.*, 2011), y en un número mucho más limitado, otros tipos de estudios que avalan la regulación coordinada de estos compuestos. Un ejemplo lo constituye el realizado por Nieto *et al.* (2011), donde observaron en plantas de *Arabidopsis* que la inhibición de la vía de síntesis de esfingolípidos mediante un tratamiento con miriocina (inhibidor específico de la SPT) provocaba también una disminución en la actividad de la enzima HMGR y de los niveles de esteroides; o bien como se ha observado en plántulas de *Allium porrum L.* donde la inhibición de la vía de esteroides con fenpropimorph también afectó la biosíntesis de esfingolípidos complejos como las glucosilceramidas (Hatmann *et al.*, 2002); por otro lado, se ha observado en raíces de *Triticum aestivum L.*, que la disminución en los niveles de esteroides causados por un tratamiento con nistatina, produjo un aumento en las glucoceramidas totales (Valitova *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan información que respalda la idea de la interrelación entre los metabolismos de esteroides y esfingolípidos en *Arabidopsis thaliana* y la vinculación de la función de *AtArv* en el mantenimiento de la homeostasis de estos compuestos.

Como se había observado previamente, los niveles de expresión de mRNA AtARV1 en el doble mutante *arv1-1:arv2*, eran notablemente bajos, por lo tanto, para poder detectar reducciones adicionales en los niveles de mRNA en las líneas doble mutante silenciadas se recurrió al análisis a través de RT-PCR en tiempo real debido a la mayor sensibilidad de esta técnica (Figura 52). Al comparar los resultados obtenidos en el análisis de los niveles de mRNA AtARV de plántulas del doble mutante con sistema de silenciamiento inducible (línea *Red-25.21 1*) crecidas en medio MS, se observó una disminución del 98% en los niveles de mRNA AtARV respecto a la línea del mutante simple *arv2* (que sólo expresa AtArv1). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la misma línea *Red-25.21 1* crecida en MS en presencia del inductor metoxifenocida, presentaba niveles de este mRNA ligeramente mayores a los de la misma línea crecida en MS, con sólo una disminución del 92%, comparada con los niveles del mutante *arv2*. Como se ha observado en estudios realizados sobre regulación génica en plantas por silenciamiento mediados por siRNAs, se trata de un proceso complejo que actúa a diferentes niveles, ya sea por degradación del RNA diana, metilación del DNA o histonas diana o bien inhibiendo la traducción proteica mediante mecanismos aún desconocidos, aunque no se descarta que pueden ser varias acciones combinadas (Voinnet 2009). Analizando los resultados obtenidos de los niveles de expresión del mRNA AtARV, y habiendo observado este incremento en el caso del mutante *Red-25.21 1* inducido, cabe suponer que se está produciendo, al menos parcialmente, este último mecanismo inhibiendo la síntesis de la proteína AtArv1 en lugar de producirse la degradación de su mRNA. Para confirmar esta hipótesis, se deberían realizar ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpos anti-Arv para analizar los niveles de proteína AtArv expresada en las líneas *Red-25.21 1* en presencia y ausencia del inductor metoxifenocida. De hecho, y con esta finalidad, se obtuvo un anticuerpo contra el péptido comprendido entre los aminoácidos 98 y 111 de la proteína AtArv1 de *A. thaliana* que corresponde a una zona de elevada divergencia con AtArv2, sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos de *Western blot* usando este anticuerpo no fueron satisfactorios.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la función de AtArv, y habiéndose descrito que la proteína Arv de levadura y de macrófagos murinos está involucrada en la respuesta UPR (Unfolded Protein Response) (Schechtman *et al.*, 2011), se llevó a cabo un estudio para determinar si en *Arabidopsis* podría tener un papel similar. Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que los niveles de mRNA AtARV1 no se ven alterados cuando se induce la UPR mediante el tratamiento con tunicamicina o DTT en plántulas Col 0 o Ler (Figura 53) y además, que el silenciamiento de *AtARV1* tampoco produce alteraciones en la expresión del gen *BiP* (que constituye un marcador de la UPR, Figura 54). La respuesta UPR ha sido ampliamente estudiada desde levadura hasta mamíferos (Mori,

2009) donde se ha visto que en levadura se activa hasta el 6% de su genoma durante la UPR (Travers *et al.*, 2000) mientras que en mamíferos sólo llega al 1% (Martinez y Chrispeels, 2003). Sin embargo, en plantas existe mucho menos información acerca de los mecanismos por los cuales ocurre este tipo de respuesta (Moreno y Orellana, 2011) aunque, se ha descubierto una nueva vía que se encuentra únicamente en plantas e involucra al factor de transcripción AtbZIP60 y parece tener un mecanismo de regulación alternativo a otras vías de inducción de la respuesta UPR (Iwata y Koizumi, 2005; Iwata *et al.*, 2008). Al realizar un análisis de transcriptómica en mutantes *bzip60* no se observaron incrementos en los genes mayoritarios que codifican proteínas relacionadas con el RE lo que sugiere que muchos de estos genes dependen de AtbZIP60 (Iwata *et al.*, 2008). Asimismo, se ha visto que en levaduras deficientes de Arv1p no se produce una activación de todos los genes diana de la UPR (Shechtman *et al.*, 2011). Por lo tanto, el hecho de no haber encontrado una alteración en los niveles de expresión del gen *BiP* en los mutantes *Red 25.21 1* donde se había inducido el silenciamiento de *AtARV1*, no descarta la posibilidad que se pueda estar activando otras vías de respuesta a UPR que involucren otros genes.

Como conclusión general, en este trabajo se obtuvo información experimental sobre la topología de inserción de las proteínas AtArv de plantas en el RE. Respecto a su función, si bien no se descarta la posibilidad de que cumpla un papel similar como transportador de moléculas en la síntesis de GPI o relacionada con su regulación, como fue propuesto en el estudio realizado por el grupo de Kajiwara (2008), debido a que se ha observado que estas moléculas son un grupo funcionalmente diverso que se encuentran en diferentes especies eucariotas desde protozoos y hongos hasta plantas y mamíferos (Paulick y Bertozzi, 2008), los resultados obtenidos todavía no permiten atribuir a las proteínas AtArv una función específica. Sin embargo, los estudios realizados en esta tesis refuerzan la existencia de una regulación coordinada del metabolismo lipídico en plantas, y respaldan la importancia de las proteínas AtArv en *A. thaliana* donde desempeña un papel esencial en el desarrollo normal de las plantas. Asimismo, durante este trabajo se han generado un conjunto de herramientas experimentales que constituyen una plataforma de partida para futuros estudios que permitirán profundizar en el conocimiento de las proteínas Arv en plantas.

## CONCLUSIONES



- 1) La proteína AtArv1 posee un número par de dominios transmembrana y los extremos N- y C-terminales se encuentran orientados hacia la cara citosólica de la membrana del RE.
- 2) El doble mutante *arv1-1:arv2*, a pesar de tener una atenuación de la expresión del gen *AtARV1* y una pérdida total de función del gen *AtARV2*, no presenta alteraciones fenotípicas visibles ni tampoco muestra niveles alterados de actividad HMGR, esteroides y esfingolípidos.
- 3) La caracterización del mutante *arv1-2* demuestra que los últimos 31 aa del extremo C-terminal de la proteína AtArv1 son imprescindibles para su funcionalidad.
- 4) El gen *AtARV1* es esencial para la viabilidad de las plantas ya que no ha sido posible encontrar un mutante con pérdida total de función para dicho gen.
- 5) El silenciamiento mediante siRNA de la expresión residual del gen *AtARV1* en el doble mutante *arv1-1:arv2* produce una alteración notable en el fenotipo de las plántulas, donde se observa disminución de la longitud de las raíces y del tamaño de los cotiledones, que presentan además un color amarillo y con forma de “punta de flecha”. Los niveles de esteroides también están reducidos y algunas BECL se ven incrementadas.
- 6) En *Arabidopsis thaliana*, la activación de la *Unfolded Protein Response* no altera los niveles de expresión del gen *AtARV1*, como ocurre en el caso de *S. cerevisiae*.



## RESULTADOS II



## CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOENZIMAS FARNESIL DIFOSFATO SINTASA 1S (FPS1S) Y 2 (FPS2) DE *Arabidopsis thaliana*

### 1. Caracterización bioquímica de las isoenzimas FPS1S y FPS2 purificadas

Con el fin de comprender mejor los mecanismos implicados en la función diferencial de las isoenzimas FPS1S y FPS2, se analizaron las propiedades bioquímicas de ambas proteínas. Para ello, se decidió expresar las dos isoenzimas en *E. coli* y posteriormente, purificarlas en su estado nativo.

#### 1.1 Expresión de las isoenzimas FPS1S y FPS2 de *A. thaliana* en *E. coli*

Para expresar las isoenzimas FPS1S y FPS2 en *E. coli* se utilizó el vector pGEX-3X-NotI (Montella *et al.*, 2005) que deriva del vector comercial pGEX-3X (Pharmacia Biotech), el cual permite la expresión inducible por IPTG de las proteínas de interés fusionadas al extremo C-terminal de la GST (Glutación S-Transferasa) (Figura 57A). La modificación introducida (diana NotI) permite que la proteína de fusión, una vez purificada por cromatografía de afinidad en una columna con resina de Glutación-sefarosa, pueda ser digerida con la proteasa factor Xa, liberándose la proteína de interés en su forma nativa, es decir, sin ningún aminoácido extra, con lo que se evita que la GST pueda interferir en la función de la enzima.

En el plásmido pGEX-3X-NotI se clonaron las secuencias de cDNA de FPS1S y FPS2, obteniéndose las construcciones pGEXFPS1S y pGEXFPS2 (procedimiento detallado en materiales y métodos, apartado 9). Ambos plásmidos se transformaron en células de *E. coli* BL21 (DE3) portadoras del plásmido pUBS520 que codifica para un tRNA<sup>Arg</sup> poco abundante en *E. coli* (Brinkmann *et al.*, 1989).

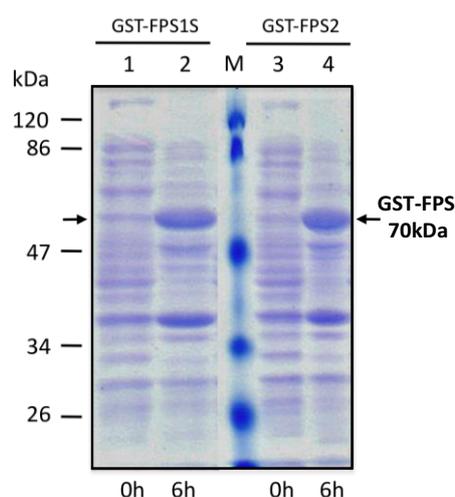
Una vez obtenidas las células transformadas con los vectores pGEXFPS1S y pGEXFPS2, se establecieron las condiciones óptimas de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción de la expresión de las proteínas recombinantes GST-FPS1S y GST-FPS2 en forma soluble. Para optimizar todos estos factores se realizaron experimentos de expresión a 20, 22, 30 y 37°C y para cada una de las temperaturas ensayadas se probaron concentraciones de IPTG de 0,1 y 0,4 mM. En todos los casos se recogieron muestras de cada uno de los cultivos a diferentes tiempos (1, 3, 6 y 16 h) de inducción. La eficiencia de la expresión de ambas proteínas recombinantes GST-FPS1S y GST-FPS2 se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la fracción soluble procedente del sobrenadante de 16000 x g de las células lisadas (resultados no mostrados).

A partir de los resultados obtenidos se determinaron las condiciones óptimas para la expresión de ambas enzimas, que consistían en una concentración de IPTG de 0,4 mM, una temperatura de 20°C y un tiempo de expresión de 6 h. Como se muestra en la figura 57B, en estas condiciones en la fracción soluble se detectó una banda de 70 kDa, compatible con la masa molecular predicha para las proteínas GST-FPS1S y GST-FPS2.

A



B

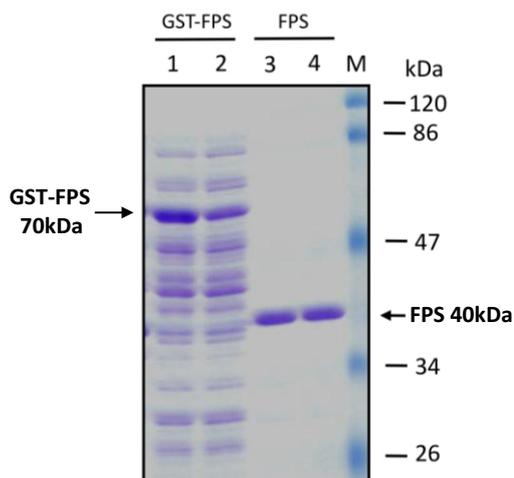


**Figura 57. Expresión de las proteínas GST-FPS1S y GST-FPS2 de *A. thaliana* en *E. coli*.** **A)** Esquema de las proteínas recombinantes GST-FPS1S y GST-FPS2. **B)** Tinción con Coomassie blue de la separación electroforética en gel poliacrilamida-SDS al 10% de la fracción soluble de cultivos de *E. coli* transformados con los plásmidos pGEXFPS1S (izquierda) y pGEXFPS2 (derecha), antes (carriles 1 y 3) y después de 6 h de inducción (carriles 2 y 4) con 0,4 mM de IPTG a 20°C. Las flechas indican la posición correspondiente a las proteínas de fusión GST-FPS1S y GST-FPS2 de 70 kDa. M: Marcador de masa molecular de proteína indicada en kDa.

## 1.2 Purificación de las isoenzimas FPS1S y FPS2

Una vez establecidas las condiciones óptimas para expresar las proteínas recombinantes de forma soluble, se procedió a su purificación en cantidad suficiente para realizar los análisis previstos para su caracterización, partiendo de cultivos de 50 ml de *E. coli* (descrito en materiales y métodos, apartado 14.1). Purificadas las proteínas, se añadió

glicerol hasta una concentración final del 15% (v/v), para evitar la pérdida de actividad al almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El resultado de este procedimiento fue la obtención de preparaciones altamente purificadas de las isoenzimas FPS1S y FPS2 (Figura 58), las cuales fueron utilizadas posteriormente para su caracterización bioquímica.

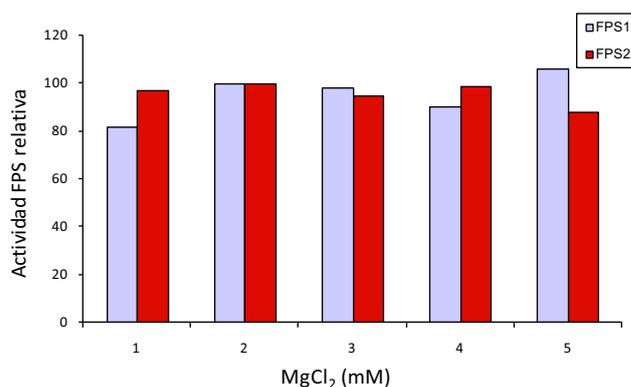


**Figura 58. Purificación de las proteínas FPS1S y FPS2 de *A. thaliana*.** Electroforesis en gel de SDS-PAGE de alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de la fracción soluble de extractos de *E. coli* transformados con los plásmidos pGEXFPS1S y pGEXFPS2 e inducidos durante 6 h con IPTG, para permitir la expresión de las proteínas de fusión GST-FPS1S (carril 1) y GST-FPS2 (carril 2). Proteínas FPS1S (carril 3) y FPS2 (carril 4) obtenidas después de la purificación por cromatografía de afinidad y digestión con factor Xa. Las flechas indican la posición correspondiente a las proteínas recombinantes GST-FPS1S y GST-FPS2 y a las proteínas purificadas FPS1S y FPS2. M: Marcador de masa molecular de proteína indicada en kDa.

### 1.3 Estudio del efecto del $\text{Mg}^{2+}$ sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2

Las preniltransferasas requieren iones divalentes para su función catalítica (Liang *et al.*, 2002), por lo que en primer lugar se determinaron las concentraciones óptimas de  $\text{Mg}^{2+}$  para cada isoenzima FPS. Para ello, se analizó el efecto de diferentes concentraciones entre 1 y 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  sobre la actividad de FPS1S y FPS2.

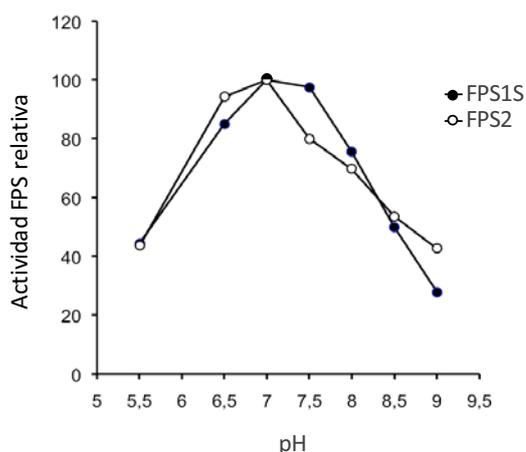
Los resultados muestran que los niveles de actividad en ambas isoenzimas se mantuvieron constantes, independientemente de la concentración de  $\text{MgCl}_2$  utilizada en el ensayo (Figura 59).



**Figura 59. Análisis del efecto del MgCl<sub>2</sub> sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2.** Se determinaron los niveles de actividad de ambas isoenzimas en presencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> comprendidas entre 1 y 5 mM. La actividad FPS se expresa en valores de actividad relativa respecto a la actividad máxima en cada caso a la que se le ha dado el valor de 100.

#### 1.4 Determinación del pH óptimo de las isoenzimas FPS1S y FPS2

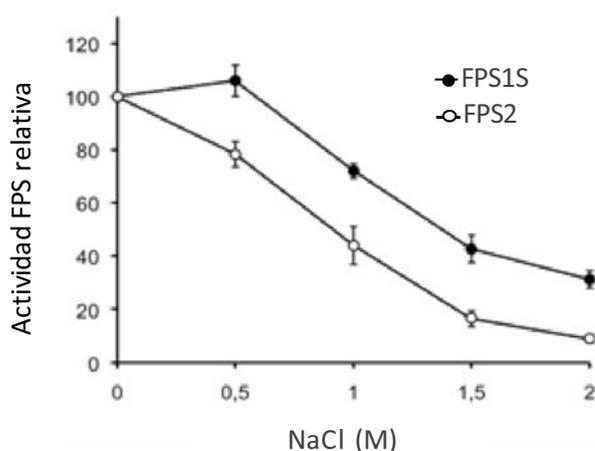
El efecto del pH del medio sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2 se estudió en un rango comprendido entre 5,5 y 9,0. Los tampones empleados para la dilución de las enzimas FPS y los utilizados para realizar la reacción enzimática fueron MES para el de 5,5; PIPES para 6,5; fosfato sódico para 7,0 y Tris para los pH comprendidos entre 7,5 y 9,0. En todos los casos, la concentración de tampón utilizada fue de 50 mM. Tal y como se observa en la figura 60, FPS1S y FPS2 mostraron un comportamiento muy similar con sólo ligeras diferencias frente a las variaciones del pH del medio. Ambas presentaron un máximo de actividad a pH 7.



**Figura 60. Efecto del pH sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2.** La actividad de las proteínas purificadas FPS1S y FPS2 fue determinada en un rango de pH entre 5.5 y 9.0. La actividad FPS de las enzimas se expresa en valores de actividad relativa respecto a la actividad máxima en cada caso a la que se le ha dado el valor de 100.

### 1.5 Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2

A continuación se procedió a analizar el efecto de concentraciones crecientes de cloruro de sodio (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M) sobre la actividad de las isoenzimas FPS. El resultado mostrado en la figura 61 señaló que la actividad de FPS2 comenzó a disminuir desde el inicio del ensayo, mientras que la actividad de FPS1S se mantuvo estable hasta una concentración de 0,5 M de NaCl. A partir de este punto la actividad de ambas proteínas disminuyó progresivamente con el aumento de la concentración de NaCl. Sin embargo, la actividad de FPS1S se mantuvo en todo momento alrededor de un 25% por encima de la de FPS2, lo que indica que FPS2 es más sensible que FPS1S al efecto inhibitorio del NaCl.



**Figura 61. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2.** La actividad de las proteínas purificadas FPS1S y FPS2 fue analizada frente a concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M). La actividad FPS de las enzimas se expresa en valores relativos respecto a la actividad de cada isoenzima en ausencia de NaCl a la cual se le ha atribuido el valor de 100. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  el SE.

### 1.6 Determinación de las constantes cinéticas de las isoenzimas FPS1S y FPS2 para los sustratos IPP, DMAPP y GPP

La actividad de idéntico número de unidades de FPS1S y de FPS2 fue analizada frente a concentraciones crecientes de IPP (comprendidas entre 1 y 100  $\mu$ M) y una concentración fija de 200  $\mu$ M de GPP o bien de DAMPP; DMAPP (entre 6,25 y 200  $\mu$ M) y una concentración fija de IPP de 100  $\mu$ M; y GPP (entre 6,25 y 200  $\mu$ M) y a una concentración fija de IPP de 100  $\mu$ M.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2 y mostraron que ambas enzimas poseen valores de  $K_m$  similares en el rango  $\mu\text{M}$  (entre 8.3 y 31.5  $\mu\text{M}$ ) para ambos, IPP y los sustratos alílicos DMAPP y GPP. La afinidad ( $K_m$ ) de FPS1S y FPS2 por el intermediario de la reacción GPP fue aproximadamente 2.7 veces mayor que por DMAPP, lo que indica la preferencia de ambas isoenzimas por el intermediario alílico. Asimismo, al comparar las constantes específicas ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) se observó una eficiencia catalítica 2 veces mayor por GPP que por DMAPP.

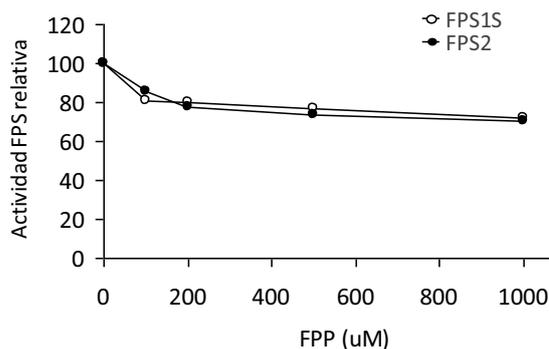
Sustrato variable	Parámetros cinéticos	FPS1S	FPS2
IPP	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$23,1 \pm 0,4$	$31,3 \pm 0,5$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	62,5	269,0
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	2,7	8,6
DMAPP	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$22,7 \pm 2,1$	$31,5 \pm 0,5$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	52,2	197,3
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	2,3	6,2
GPP	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$8,3 \pm 1,2$	$11,3 \pm 1,0$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	36,4	132,8
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	4,4	11,7

**Tabla 2. Constantes cinéticas de las isoenzimas FPS1S y FPS2.** Los valores de la media de las  $K_m$  y la SE son el resultado de 3 experimentos independientes. Los valores de  $k_{\text{cat}}$  se calcularon a partir de la forma dimérica de la enzima.

Por otro lado, los extractos de FPS2 mostraron mayor actividad específica comparados con los de FPS1S, ya que los valores de  $k_{\text{cat}}$  obtenidos en FPS2 para IPP, DMAPP y GPP fueron 3.2, 2.7 y 2.7 veces mayores, respectivamente, que los de FPS1S. Esto indica que FPS2 es catalíticamente más eficiente que FPS1S. Estos resultados indican que ambas isoenzimas son indistinguibles respecto a su afinidad por los distintos sustratos, ya que el valor de  $K_m$  en ningún caso presenta diferencias significativas. Sin embargo, existe una divergencia en la eficiencia catalítica, es decir, que la interacción enzima-sustrato y la obtención de los productos parece ser más efectiva para todos los sustratos en el caso de la isoenzima FPS2 que en el de FPS1S.

### 1.7 Estudio de la inhibición por FPP de las isoenzimas FPS1S y FPS2

Para estudiar el efecto de inhibición por el producto de reacción FPP sobre las FPS1S y FPS2 se ensayaron ambas isoenzimas en presencia de diferentes concentraciones de FPP (de 0 a 1000  $\mu\text{M}$ ). El perfil de inhibición obtenido (Figura 62) señaló una progresión muy similar para las dos isoenzimas, que culminó con una reducción de actividad del 30% por parte de ambas, a la concentración máxima de FPP ensayada.

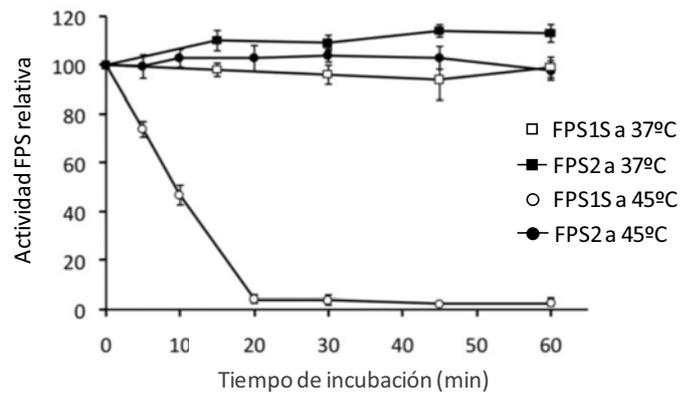


**Figura 62. Efecto inhibitorio del FPP sobre las isoenzimas FPS1S y FPS2.** Análisis de la actividad FPS1S y FPS2 en presencia de FPP (0 a 1000  $\mu\text{M}$ ). La actividad enzimática se expresa en relación a las actividades de las isoenzimas ensayadas sin FPP a las que se les ha atribuido el valor de 100.

### 1.8 Análisis de la estabilidad térmica de las isoenzimas FPS1S y FPS2

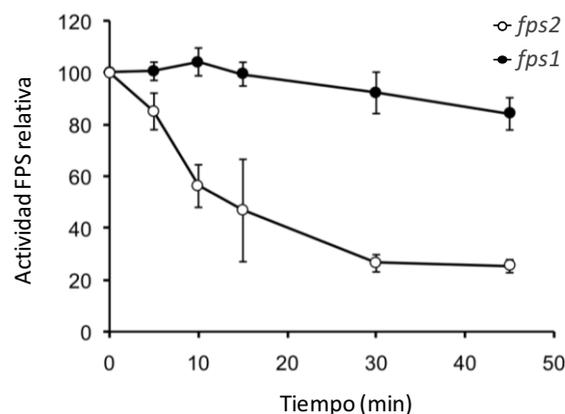
Con el fin de estudiar la estabilidad térmica de FPS1S y FPS2, se midió la actividad de ambas isoenzimas después de incubarlas durante diferentes intervalos de tiempo entre 0 y 60 min, a 37°C y 45°C.

Como puede observarse en la figura 63, a 37°C la actividad de ambas enzimas se mantuvo prácticamente inalterada a lo largo del tiempo de incubación; sin embargo, a 45°C, mientras FPS2 conservó totalmente su actividad al cabo de 60 min, FPS1S ya se había inactivado casi en su totalidad a los 20 min, manteniendo sólo alrededor del 3% de su actividad inicial. Estos resultados demuestran que la isoenzima FPS2 es mucho más resistente a la inactivación por calor que la FPS1S.



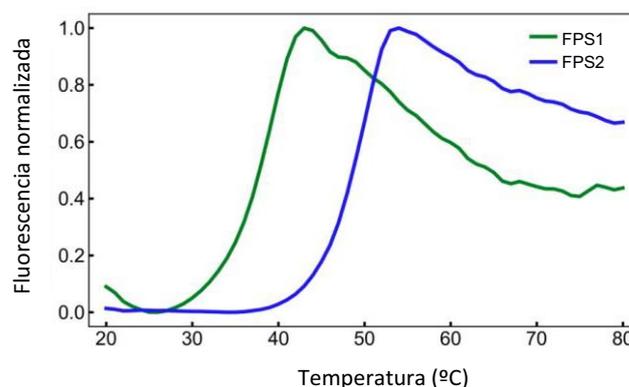
**Figura 63. Efecto de la incubación a 37 y 45°C sobre la actividad de las isoenzimas FPS1S y FPS2.** Niveles de actividad de las enzimas FPS1S y FPS2 después de la incubación a diferentes intervalos de tiempo a 37°C y 45°C. La actividad FPS se expresa en relación a la actividad correspondiente al tiempo cero, a la que se le ha dado el valor de 100. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  el SE.

El mismo análisis de estabilidad térmica se llevó a cabo también con extractos proteicos obtenidos de plántulas de los mutantes *fps1* (donde sólo se expresa FPS2) y *fps2* (donde sólo se expresa FPS1) incubados a 45°C. En el resultado obtenido (Figura 64), se observó que la actividad FPS del extracto del mutante *fps2* disminuyó drásticamente con el tiempo hasta quedar con un 25% de su actividad inicial, mientras que la actividad FPS en el extracto del mutante *fps1*, se mantuvo prácticamente inalterada.



**Figura 64. Análisis de la actividad FPS en extractos proteicos de plántulas de mutantes *fps* incubados a 45°C.** Niveles de actividad FPS en extractos proteicos de plántulas de 10 días de los mutantes *fps1* y *fps2* incubados a diferentes tiempos a 45°C. La actividad FPS se expresa en relación a la actividad correspondiente al tiempo cero, a la que se le ha dado el valor de 100. Los valores son la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  el SE.

Las diferencias observadas en la estabilidad térmica en los ensayos anteriores entre FPS1S y FPS2 se confirmaron mediante análisis DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*; Niesen *et al.*, 2007). Esta técnica se basa en que una mayor estabilidad térmica está asociada a un incremento en la  $T_m$  (*melting temperature*) respecto a una temperatura de referencia  $T_0$  (y viceversa) y se utilizó para el análisis de ambas isoenzimas. Los resultados evidenciaron una temperatura de 37°C en el caso de FPS1S y 48.3°C para FPS2 (Figura 65). Esta diferencia de 11.3°C indicó que FPS2 es termodinámicamente más estable que FPS1S (ensayo realizado en el Departamento de Biología Estructural y Cuantitativa del Centro de Investigación Biológica CIB-CSIC en Madrid).



**Figura 65. Análisis de la estabilidad térmica de FPS1S y FPS2 por DSF.** La gráfica corresponde a las curvas resultantes de las variaciones en la intensidad de fluorescencia emitida durante el ensayo DSF realizado con 6 µg de proteína purificada de FPS1S y FPS2 y en un rango de temperatura entre 20 y 80°C.

## 2. Localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2 en células epidérmicas de cebolla

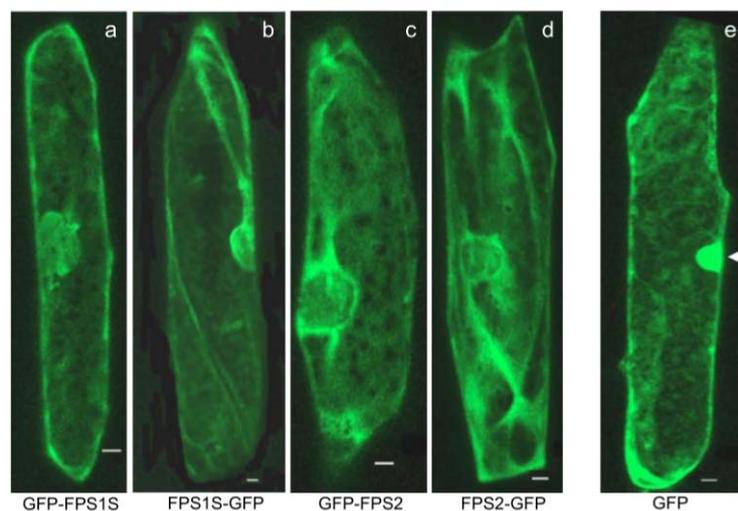
Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que FPS1L de *Arabidopsis* posee un péptido de tránsito en el extremo N-terminal que dirige esta proteína a las mitocondrias (Cunillera *et al.*, 1997, Manzano *et al.*, 2004). Sin embargo, en las isoenzimas FPS1S y FPS2 no se ha observado ningún tipo de secuencia señal conocida que indique una localización específica en la célula que no sea citosólica. Análisis previos de localización subcelular en *Arabidopsis thaliana* mediante inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos anti-FPS y microscopía electrónica, en hojas de plantas sobreexpresoras de FPS1S y FPS2, sugerían que ambas isoenzimas se encontraban distribuidas de manera uniforme en el citosol (Manzano D., tesis doctoral 2003 y Closa M, tesis doctoral 2007). No

obstante, un estudio muy reciente, sugiere que la enzima FPS de *C. roseus* estaría localizada, al menos parcialmente, en peroxisomas (Thabet *et al.*, 2011).

Con el fin de establecer definitivamente la localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2, se expresaron fusiones de ambas con la proteína fluorescente verde (GFP) en células epidérmicas de cebolla. Para ello, se generaron, en primer lugar, las construcciones que codifican las proteínas quiméricas GFP-FPS1S, FPS1S-GFP, GFP-FPS2 y FPS2-GFP, en las que la proteína GFP se fusionó tanto en el extremo N- como en el C-terminal de ambas isoenzimas FPS.

Una vez obtenidas las construcciones, se expresaron de forma transitoria en células epidérmicas de cebolla mediante microbombardeo (materiales y métodos 10.2) y después de una incubación de 16 h en oscuridad, se visualizaron los patrones de fluorescencia obtenidos mediante microscopía láser confocal.

Como puede observarse en la figura 66, las 4 proteínas quiméricas, GFP-FPS1S (a), FPS1S-GFP (b), GFP-FPS2 (c) y FPS2-GFP (d) se localizaron en todo el citosol. Este patrón de fluorescencia es idéntico al obtenido en el caso de la proteína GFP (e), excepto por la presencia de fluorescencia en el núcleo de las células, que sólo se detectó en el caso de la GFP. Esto se debe a que el tamaño de la GFP es lo suficientemente pequeño para atravesar la membrana del núcleo, mientras que las proteínas GFP-FPS1S, FPS1S-GFP, GFP-FPS2 y FPS2-GFP al ser de mayor tamaño, no pueden entrar en él. Este resultado indica que ambas isoenzimas FPS de *Arabidopsis* se localizan exclusivamente en el citosol.



**Figura 66. Localización subcelular de las proteínas FPS1S y FPS2 fusionadas a GFP y expresadas en células epidérmicas de cebolla.** Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal de células epidérmicas de cebolla que muestran la fluorescencia proveniente de la expresión de las proteínas GFP-FPS1S (a), FPS1S-GFP (b), GFP-FPS2 (c), FPS2-GFP (d) y GFP (e). La flecha indica la expresión de la GFP en el núcleo. Las imágenes son una proyección tridimensional de entre 17 y 20 secciones de 1,5 μm cada una. Las barras blancas indican una escala de 10 μm.

### 3. Estudio del patrón de expresión espacial y temporal de los genes *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* en semillas de *Arabidopsis thaliana*

Resultados previos obtenidos al analizar la expresión de los transgenes *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* en diferentes tejidos de *Arabidopsis*, realizados en nuestro laboratorio, indicaron que *FPS1S* se expresa de forma generalizada e intensa durante todo el desarrollo de la planta, tanto en fase vegetativa como reproductiva, mientras que la expresión de *FPS2* se detecta de forma más restringida en órganos específicos y en determinados estadios de desarrollo (Cunillera *et al.*, 2000). Posteriormente, se observó que *FPS2* aporta hasta el 80% de la actividad FPS total en semillas y que a medida que esta germina, la actividad de *FPS2* decae rápidamente y aumenta la actividad de *FPS1*; es decir, que *FPS1* sustituye progresivamente la función de *FPS2* en el desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* (Closa *et al.*, 2010).

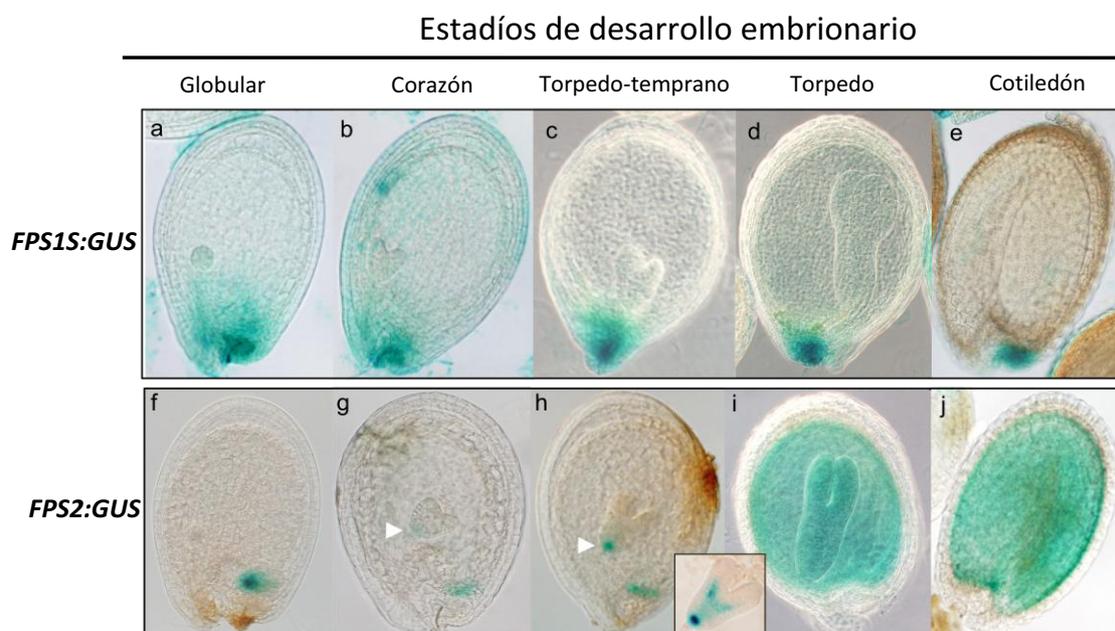
Teniendo en cuenta estos antecedentes, sumados a la escasa información sobre los patrones de expresión de los genes relacionados con la síntesis de isoprenoides en el estadio de semilla, y con el fin de intentar establecer las razones por las que *FPS2* es la isoenzima mayoritaria en este estadio, se procedió a analizar la expresión de los transgenes *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* en las semillas de las mismas líneas transgénicas analizadas en Cunillera *et al.* (2000).

El análisis histoquímico de la expresión del gen *GUS* (apartado de materiales y métodos 11) se realizó en semillas de las plantas transgénicas *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* con embriones en todos los estadios de desarrollo, desde el más temprano (globular) hasta la formación completa de los cotiledones (cotiledón).

En los resultados obtenidos, se observa que el gen *FPS1S::GUS*, se expresa de forma intensa y localizada en la cubierta chalazal de la semilla (Figura 67a-e). En las etapas globular, corazón y en menor medida en torpedo temprano se observó una cierta tinción *GUS* en áreas circundantes, la cual podría ser debida a la difusión de la tinción. En cualquier caso, no se observó actividad *GUS* en el embrión, independientemente del estadio de desarrollo.

El gen *FPS2::GUS*, en cambio, presentó un patrón notablemente diferente (Figura 67f-j). En el estadio globular, se observó tinción *GUS* sólo en el endoespermo chalazal (Figura 67f). Sin embargo, a partir del estadio corazón, la tinción se detectó también en el embrión, concretamente en la región del meristemo apical de la raíz (Figura 67g y h, señalada con flechas) y en tejidos pre-vasculares (recuadro entre figuras 63h e i). En estadios más avanzados se observó actividad *GUS* en todo el embrión así como también en el endospermo (Figura 67i) y en semillas maduras, se detectó una intensa actividad *GUS* en todo el embrión.

Estas observaciones en conjunto, indican que los patrones de expresión de los genes *FPS1S* y *FPS2*, son complementarios entre sí, particularmente en las etapas más avanzadas del desarrollo embrionario y además concuerdan con la observación de que la isoenzima *FPS2* es la que contribuye mayoritariamente a la actividad *FPS* total en las semillas maduras (Closa *et al.*, 2010), ya que el gen *FPS2* se expresa en todo el embrión en este estadio y éste ocupa prácticamente la totalidad de la semilla en el estadio cotiledón.



**Figura 67. Análisis histoquímico de la actividad GUS en semillas de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con los genes quiméricos *FPS1S::GUS* (a-e) y *FPS2::GUS* (f-j).** Silicuas en diferentes estadios de desarrollo fueron incubadas con el sustrato X-Gluc durante 24 h y tratadas como se describe en el apartado 11 de materiales y métodos. El análisis de las semillas se realizó mediante un microscopio Zeiss Axiophot, adaptado con óptica Nomarski.

#### **4. Complementación del mutante nulo *fps2-1* de *Arabidopsis thaliana* con los genes quiméricos *FPS1Sp::FPS2* y *FPS2p::FPS1S***

##### **4.1 Reversión del fenotipo del mutante *fps2-1* mediante expresión de la proteína *FPS1S*, bajo el control del promotor *FPS2***

Se ha descrito que las semillas del mutante *fps2-1*, debido a la drástica disminución de la actividad *FPS*, presentan una reducción de los niveles de esteroides y un aumento de

aproximadamente 4 veces la actividad de la enzima HMGR, lo que produce una respuesta de hipersensibilidad a la mevastatina.

Con la finalidad de investigar si FPS1S es capaz de revertir los fenotipos mencionados, se transformaron plantas del mutante *fps2-1* con dos genes quiméricos constituidos por el promotor del gen *FPS2* fusionado a la secuencia genómica codificante del gen *FPS1*.

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvo, por un lado, la construcción *FPS2p::FPS1S-mutdis*, que contiene una secuencia de 1375 pb del promotor del gen *FPS2* que incluye la región *leader*, fusionada a la secuencia codificante de 3838 pb del gen *FPS1* en la que el codón ATG distal que da lugar a la isoforma FPS1L se transformó en un codón ATC; por otro lado, se utilizó también la construcción *FPS2p::FPS1S*, similar a la anterior, pero que carece de la región de 126 pb que codifica para el péptido de tránsito de la isoforma FPS1L. De esta manera, se conseguía que ambos genes quiméricos sólo pudiesen expresar la isoforma corta, FPS1S (Figura 68). Esta estrategia se planteó con el fin de determinar si el fragmento comprendido entre el primer y el segundo codón ATG, podía influir en la expresión de FPS1S, reflejándose a nivel funcional en la complementación del mutante *fps2-1*.



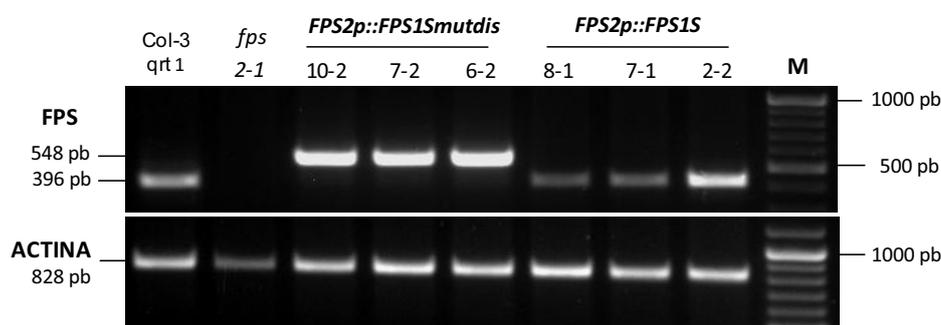
**Figura 68. Esquema de las construcciones *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S* utilizadas para la complementación del mutante *fps2-1*.** Las cajas gris oscuro representan la secuencia de 1375 pb del promotor y el *leader* del gen *FPS2*. En gris claro, se indica la secuencia genómica codificante del gen *FPS1*, a partir del primer codón ATG, pero mutado en la tercera base en *FPS2p::FPS1S-mutdis*, o a partir del segundo codón ATG en *FPS2p::FPS1S*. Las cajas blancas representan las secuencias 3' no traducidas.

Una vez disponibles las dos construcciones *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*, se obtuvieron plantas transgénicas del mutante *fps2-1*, las cuales se denominaron de la misma manera que cada construcción. Posteriormente, se propagaron las semillas hasta obtener las correspondientes líneas homocigotas en cada caso y, de éstas, se seleccionaron tres líneas portadoras de cada gen quimérico para proceder a los estudios de reversión del fenotipo de *fps2-1* en semillas. Las líneas seleccionadas en cada caso fueron:

*FPS2p::FPS1S-mutdis* 10-2, 7-2 y 6-2      *FPS2p::FPS1S* 8-1, 7-1 y 2-2

4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de mRNA y proteína FPS de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*

La expresión del transgén *FPS2p::FPS1S-mutdis* en las líneas 10-2, 7-2 y 6-2 y del transgén *FPS2p::FPS1S* en las líneas 8-1, 7-1 y 2-2 se analizó por RT-PCR. Como se puede observar en la figura 69, las tres líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* presentaron unos niveles de mRNA similares entre ellas. En las líneas *FPS2p::FPS1S* los niveles de expresión fueron más bajos que en el caso anterior; las líneas 8-1 y 7-1 presentaron niveles similares entre sí, mientras que en la línea 2-2 fue sensiblemente mayor que en las anteriores. Cabe destacar, como se puede observar en el carril correspondiente a Col-3 qrt1, la amplificación de un fragmento equivalente al observado en las líneas *FPS2p::FPS1S*. Esto se debe a que el *primer* antisentido utilizado en la amplificación, no es específico, por lo tanto, la banda observada corresponde a la amplificación de un fragmento del cDNA del gen *FPS2* endógeno, ya que de provenir del cDNA del gen *FPS1*, tendría un tamaño de 548 pb y debería verse también en el carril del mutante *fps2-1*, que sólo expresa el gen *FPS1*.

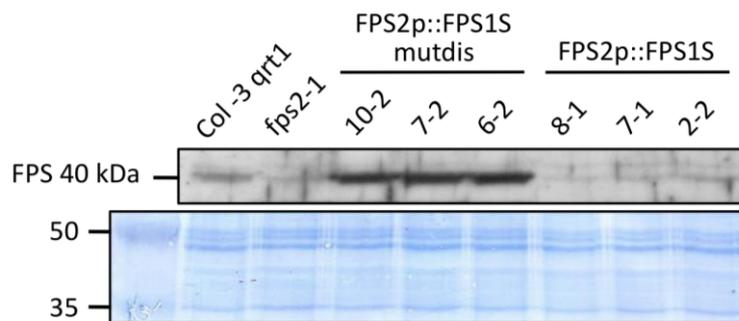


**Figura 69.** Determinación por RT-PCR de los niveles de mRNA FPS de los genes quiméricos *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S* transformados en el mutante *fps2-1*. A partir de RNA obtenido de plántulas de 12 días de 3 líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S* se amplificaron fragmentos de 548 pb y 396 pb, respectivamente. Se amplificó también un fragmento de 828 pb del cDNA del gen de la actina (AT3G18780.2) que se utilizó como control. M: marcador de tamaño molecular.

Posteriormente, se analizaron los niveles de proteína FPS mediante *Western blot* con anticuerpos anti-FPS en extractos proteicos de 16000 x g obtenidos de semillas de las mismas líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*. En la figura 70 se observan niveles similares de proteína FPS en las 3 líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, que eran mayores que los

observados en el control Col-3 *qrt1*. En el caso de las tres líneas *FPS2p::FPS1S*, los niveles de proteína fueron similares entre sí y equivalentes a los observados en el caso de *fps2-1*.

Al comparar los niveles de proteínas (Figura 70) con los de mRNA (Figura 69), se observa una clara correlación en el caso de las 3 líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, que no se mantiene en el caso de las líneas *FPS2p::FPS1S*, ya que se detectó expresión de mRNA en las 3 líneas, pero los niveles de proteína observados no se diferenciaron de los detectados en el mutante *fps2-1*.

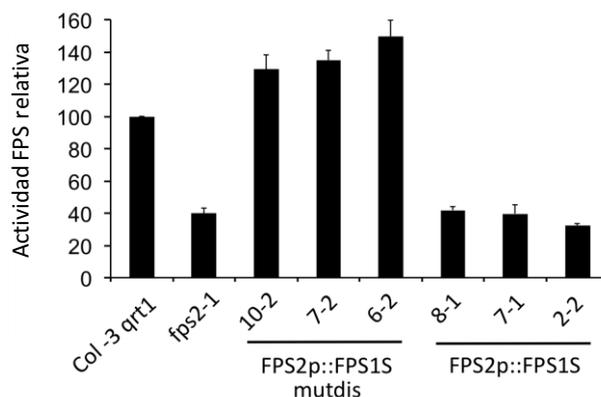


**Figura 70. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína FPS en semillas provenientes de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.** Extractos proteicos de 16000 x g de semillas de las líneas mencionadas se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE al 10% y fueron transferidos a una membrana de PVDF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-FPS a una dilución 1:8000 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Amersham), conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:60000). El tamaño de la proteína FPS se indica a la izquierda de la imagen. El panel inferior muestra la región de la membrana de PDVF correspondiente a la zona que comprende las proteínas entre 35 y 50 kDa, teñida con Coomassie blue.

#### 4.1.2 Determinación de la actividad FPS de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*

Una vez confirmada la expresión de los dos genes quiméricos y analizados los niveles de proteína FPS, se procedió a determinar los niveles de actividad FPS en semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*. Para ello, se midió su actividad en alícuotas de los mismos sobrenadantes de 16.000 x g utilizados en los ensayos de *Western blot*.

Los resultados obtenidos en el caso de las tres líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* indicaron niveles de actividad FPS incluso superiores a los observados en semillas Col-3 *qrt1*, mientras que las líneas *FPS2p::FPS1S* presentan niveles de actividad FPS similares a los obtenidos en el mutante *fps2-1* (Figura 71).



**Figura 71. Actividad FPS en las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.** Los niveles de actividad FPS se determinaron en el sobrenadante 16000 x g de extractos proteicos provenientes de semillas de las líneas indicadas. Los valores de actividad FPS se expresan como actividad relativa a la de Col-3 qrt1, a la cual se le ha atribuido el valor de 100. Los valores obtenidos son la media  $\pm$  el SE de 3 experimentos independientes.

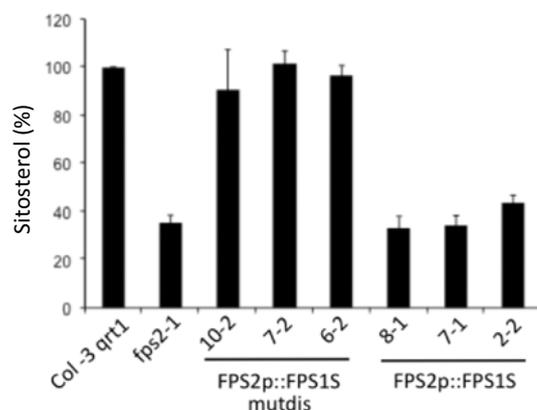
#### 4.1.3 Determinación de los niveles de esteroides en semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*

Como se ha comentado con anterioridad, los esteroides constituyen los productos finales mayoritarios de la vía del MVA y como se ha visto en las semillas de los mutantes *fps2-1*, el contenido de sitosterol (el esteroide más abundante) presenta una disminución del 55% respecto al contenido de las semillas de las plantas control Col-3 qrt1 (Closa *et al.*, 2010).

Para determinar si la enzima FPS1S expresada bajo el control del promotor del gen *FPS2* era capaz de restablecer los niveles normales de sitosterol en el mutante *fps2-1*, se procedió a la determinación del nivel de dicho compuesto en semillas maduras de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.

En la figura 72 se observa que los niveles de sitosterol medidos en las semillas de las tres líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, fueron similares entre sí y cercanos a los valores contenidos en Col-3 qrt1, lo que indica que FPS1S, expresada en estas condiciones, fue capaz de restablecer los valores normales en las semillas del mutante *fps2-1*. Por el contrario, las semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S* mantuvieron niveles de sitosterol reducidos, similares a los que presentó el mutante *fps2-1*, es decir, el transgén *FPS2p::FPS1S* no fue capaz de restaurar los niveles normales de sitosterol en las semillas *fps2-1*.

Estas observaciones concuerdan con los resultados observados en el análisis de actividad FPS en semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*, ya que los niveles de actividad FPS obtenidos en cada caso correlacionan con los niveles de sitosterol observados.



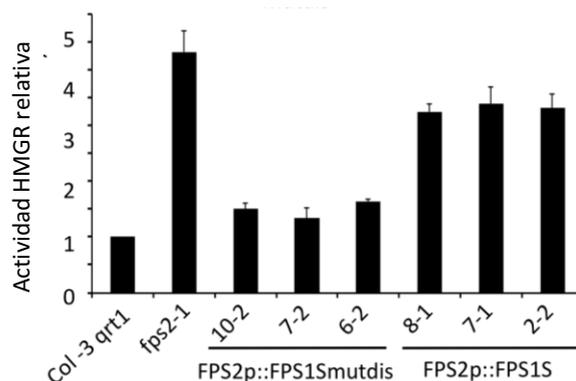
**Figura 72. Niveles de sitosterol en semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.** Los niveles de sitosterol se determinaron en semillas maduras. Los valores se expresan como cantidad relativa a Col-3 qrt1, a la cual se le ha atribuido el valor de 100. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el SE de 3 experimentos independientes.

#### 4.1.4 Estudio de los niveles de actividad HMGR y la respuesta a mevastatina en semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*

La mevastatina, inhibidor de la familia de las estatinas, cuya diana de acción es la enzima HMGR produce inhibición en el crecimiento de la raíz y detiene el desarrollo de las hojas verdaderas en plantas de *Arabidopsis*. Como se mencionó al comienzo de este apartado, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que los mutantes *fps2* presentan hipersensibilidad a la mevastatina cuando las semillas germinan en presencia de este compuesto. Dicho efecto se debe a que estos mutantes poseen niveles incrementados de la actividad HMGR, que son entre 3 y 4 veces superiores que los encontrados en semillas maduras de las plantas control (Closa *et al.*, 2010). Estos fenotipos de los mutantes *fps2* se utilizaron como parámetro para completar el estudio de reversión del mutante *fps2-1*. Para ello se analizaron los niveles de actividad HMGR, así como el efecto de la mevastatina, en semillas maduras de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.

La actividad HMGR se midió en el sobrenadante 200 x g proveniente de extractos proteicos de las semillas maduras de cada una de las líneas mencionadas. Los resultados

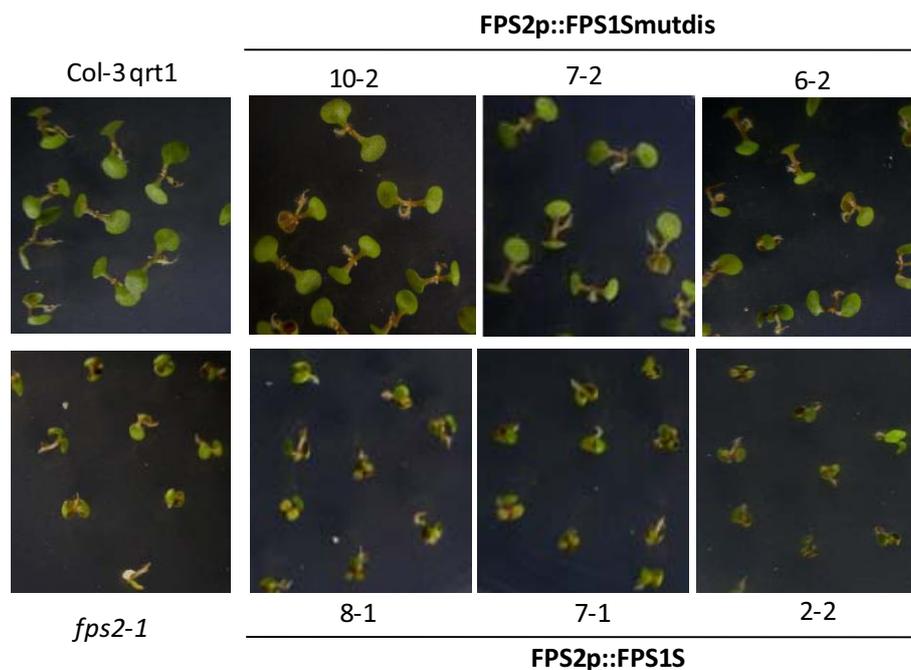
obtenidos (Figura 73) muestran que las 3 líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* presentaron valores similares a los obtenidos en el caso de Col-3 qrt1, indicando claramente que se restablecen los niveles de actividad HMGR normales; mientras que en el caso de las tres líneas *FPS2p::FPS1S*, se observó que los valores de actividad HMGR se mantienen altos y cercanos a los obtenidos en el mutante *fps2-1*, aproximadamente 3,5 veces mayores que la actividad de las semillas Col-3 qrt1. Asimismo, los niveles de actividad HMGR observados, correlacionan perfectamente tanto con los niveles de sitosterol como de actividad FPS obtenidos en cada caso.



**Figura 73. Actividad HMGR en las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*.** Los niveles de actividad HMGR se determinaron en el sobrenadante 200 x g de extractos proteicos de semillas maduras de las líneas mencionadas. Los valores se expresan en referencia a la actividad HMGR de Col-3 qrt1, a la cual se le ha atribuido el valor de 1. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  el SE.

Posteriormente, se determinó el efecto de la mevastatina sobre la germinación de las semillas de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*. En la figura 74 se puede apreciar que en las tres líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis* el fenotipo de hipersensibilidad que presenta el mutante *fps2-1*, se ha revertido completamente, ya que el aspecto de las plántulas es similar al que presentan las plantas Col-3 qrt1 en presencia de mevastatina. Sin embargo, en el caso de las tres líneas *FPS2p::FPS1S*, ninguna de ellas fue capaz de revertir el fenotipo de hipersensibilidad, ya que las plántulas presentan un aspecto comparable a las del mutante *fps2-1*.

Asimismo, semillas de cada una de las líneas fueron crecidas también en medio MS en ausencia de mevastatina, donde crecieron normalmente, descartando así la presencia de alteraciones fenotípicas en ausencia del inhibidor (resultados no mostrados).



**Figura 74. Estudio de la reversión del fenotipo de hipersensibilidad a la mevastatina en las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, *FPS2p::FPS1S*, *fps2-1* y *Col-3qrt1*.** Imágenes de plántulas de 12 días de las líneas mencionadas crecidas en medio MS suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de mevastatina y en condiciones de día largo.

En el conjunto de resultados obtenidos en el caso de las líneas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, fue posible establecer una clara correlación entre los niveles de mRNA, proteína y actividad FPS, que se vieron reflejados en una recuperación de los niveles de sitosterol y actividad HMGR, similares a los obtenidos en el caso de *Col-3qrt1*. Esta reversión permitió el rescate del fenotipo de hipersensibilidad a mevastatina en las 3 líneas analizadas, lo que sugiere que la isoenzima FPS1S puede sustituir la función de FPS2 en las semillas del mutante *fps2-1*.

Por otro lado, en las líneas que portan el transgén *FPS2p::FPS1S*, si bien se confirma la expresión del mRNA en las tres líneas, los niveles de proteína y actividad FPS fueron notablemente bajos y no permitieron restablecer los valores de sitosterol y actividad HMGR normales ni revertir el efecto de hipersensibilidad a mevastatina. Esto podría deberse a una alteración en la traducción del mRNA, producida posiblemente por la modificación de la región que contiene el codón UAG del mRNA de *FPS2p::FPS1S*.

#### 4.2 Reversión del fenotipo del mutante *fps2-1* mediante complementación con la proteína FPS2, expresada bajo el control del promotor *FPS1*

Habiendo observado que la expresión de FPS1S bajo el control del promotor *FPS2* compensaba la pérdida de función FPS2 en las semillas del mutante *fps2-1*, se propuso determinar si la expresión de FPS2 bajo el control del promotor de *FPS1* podría también lograr el mismo objetivo. Para ello, se utilizó la construcción *FPS1p::FPS2*, que posee una secuencia de 1526 pb correspondiente al promotor *FPS1* que incluye la secuencia *leader* y la secuencia de 126 pb que contiene los dos codones ATG de inicio de traducción (región correspondiente al péptido señal de FPS1L) fusionada a la secuencia genómica codificante del gen *FPS2* (Closa M., tesis 2007). Esta construcción podría dar lugar simultáneamente a la isoenzima FPS2 y a una versión larga de FPS2 (FPS2L) equivalente a FPS1L. Por otro lado, se obtuvo la construcción *FPS1mutdisp::FPS2*, similar a la anterior, pero en la que el codón ATG distal se ha convertido en ATC, de tal manera que daría lugar sólo a la isoforma FPS2 (Figura 75).



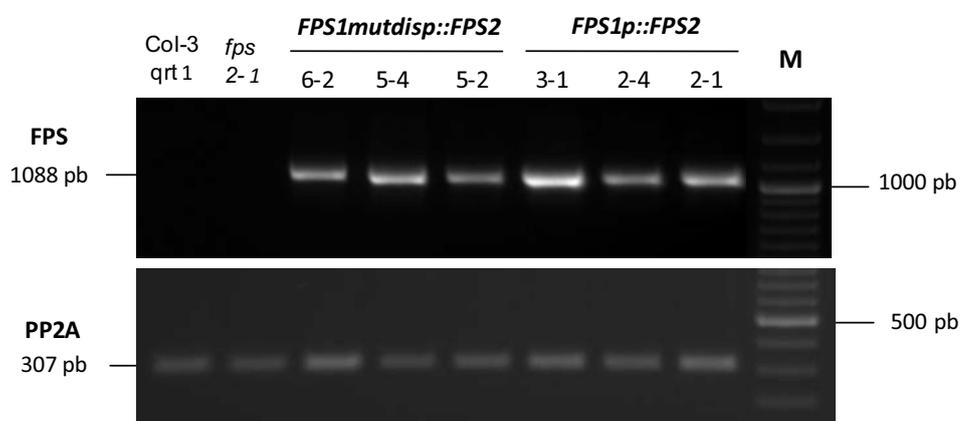
**Figura 75. Esquema de los genes quiméricos *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.** Las cajas gris claro representan la secuencia de 1526 pb del promotor del gen *FPS1* que incluye la secuencia *leader* y la secuencia entre los dos ATG, el primero de los cuales se ha mutado a ATC en la construcción *FPS1mutdisp::FPS2*. Las cajas gris oscuro corresponden a la secuencia genómica codificante del gen *FPS2*. Las cajas blancas representan las regiones 3' no traducidas.

Una vez disponibles las dos construcciones, *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*, se transformaron plantas del mutante *fps2-1* generándose líneas transgénicas que se denominaron de la misma manera que cada construcción. Las semillas de estas se propagaron hasta obtener líneas homocigotas, de las cuales se seleccionaron 3 para cada gen quimérico para proceder a los estudios de reversión del fenotipo de las semillas *fps2-1*, de manera similar a los descritos en el apartado 4.1. Las líneas seleccionadas fueron:

*FPS1p::FPS2* 3-1, 2-4 y 2-1 *FPS1mutdisp::FPS2* 6-2, 5-4 y 5-2

#### 4.2.1 Análisis de los niveles de expresión de mRNA y proteína FPS de las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*

La expresión de los transgenes *FPS1p::FPS2* en las líneas 3-1, 2-4 y 2-1 y *FPS1mutdisp::FPS2* en las líneas 6-2, 5-4 y 5-2 se analizó mediante RT-PCR. Como se puede observar en la figura 76 en cada una de las líneas se detectó expresión de los transgenes, con ligeras diferencias entre sí, independientemente del gen quimérico expresado. La línea *FPS1p::FPS2* 3-1 presentó el nivel de expresión más alto, seguido por la 2-1 y la 2-4; mientras que en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2*, la línea 5-4 presentó niveles más elevados en comparación con los de las líneas 5-2 y 6-2. En cualquier caso, los niveles de expresión en estas líneas fueron menores que los observados en la línea *FPS1p::FPS2* 3-1.

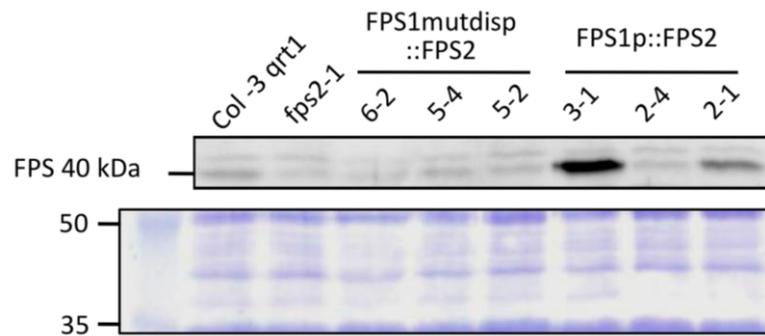


**Figura 76. Determinación por RT-PCR de los niveles de mRNA FPS en las líneas *FPS1p::FPS2* y *FPS1mutdisp::FPS2*.** A partir de RNA obtenido de plántulas de 12 días de las líneas *FPS1p::FPS2* y *FPS1mutdisp::FPS2* se amplificó un fragmento de 1088 pb del cDNA de los genes quiméricos *FPS1p::FPS2* y *FPS1mutdisp::FPS2*. Se amplificó un fragmento de 307 pb del cDNA del gen *PP2A* como control. M: marcador de tamaño molecular

Seguidamente se analizaron los niveles de proteína FPS mediante *Western blot* con anticuerpos anti-FPS en el sobrenadante de 16.000 x g provenientes de extractos proteicos de semillas de las líneas analizadas en el apartado anterior.

En la figura 77 se observa que en el caso de las 3 líneas *FPS1mutdisp::FPS2* los niveles de proteína FPS fueron similares entre sí y comparables a los obtenidos en el caso del mutante *fps2-1*. Sin embargo, al analizar las líneas *FPS1p::FPS2*, se vió que la línea 3-1 presentó niveles mucho más altos que los de Col-3 *qrt1*. La línea 2-1 también presentó niveles superiores a los de Col-3 *qrt1*, aunque en menor medida que la línea 3-1, y en el caso de la línea 2-4, el nivel de proteína FPS expresado fue similar al del mutante *fps2-1*.

Teniendo en cuenta estos resultados y los niveles de mRNA FPS obtenidos anteriormente, mientras que las líneas *FPS1p::FPS2* presentaron una clara correlación entre ambos, en el caso de las líneas *FPS1mutdisp::FPS2*, a pesar de detectarse niveles de mRNA similares a *FPS1p::FPS2*, en las 3 líneas la expresión de proteína fue similar entre ellas y sumamente baja.

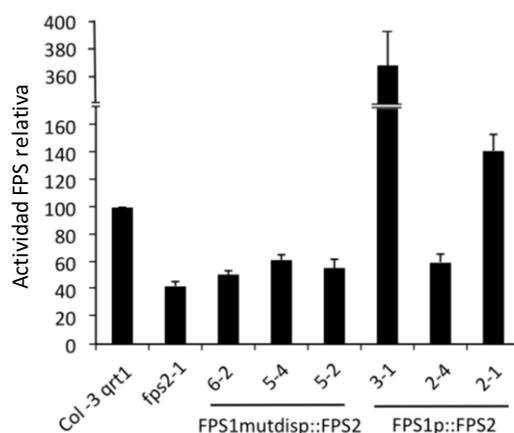


**Figura 77. Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína FPS en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.** Extractos proteicos de 16000 x g de semillas de las líneas mencionadas se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE al 10% y fueron transferidos a una membrana de PVDF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-FPS a una dilución 1:8000 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Amersham), conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:60000). El tamaño de la proteína FPS se indica a la izquierda de la imagen. El panel inferior muestra la zona de la membrana de PDVF correspondiente a la región que comprende las proteínas entre 35 y 50 kDa, teñida con Coomassie blue.

#### 4.2.2 Determinación de la actividad FPS en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*

Para analizar los niveles de actividad FPS en semillas de las líneas *FPS1p::FPS2* y *FPS1mutdisp::FPS2* se utilizaron los mismos extractos proteicos empleados para el análisis por *Western blot* descritos en el apartado anterior.

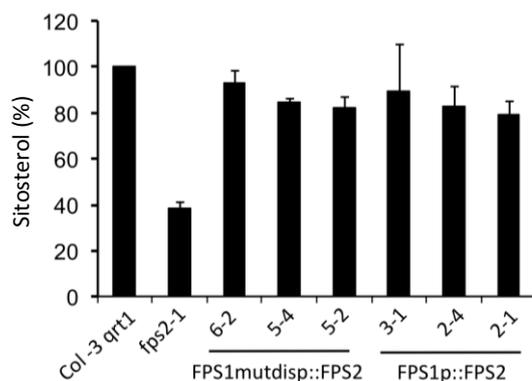
Los resultados de la figura 78 muestran niveles de actividad muy variados en las seis líneas analizadas que, sin embargo superaban en todos los casos el nivel obtenido en el caso del mutante *fps2-1*. Particularmente, en las líneas *FPS1p::FPS2* 3-1, y en menor medida en la 2-1, se observaron niveles de actividad FPS incluso mayores que en las semillas Col-3 qrt1, los cuales se correlacionan con los niveles de proteína FPS detectados por *Western blot*.



**Figura 78. Actividad FPS en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.** Los niveles de actividad FPS se determinaron en el sobrenadante 16000 x g de extractos proteicos provenientes de semillas de las líneas mencionadas. Los valores de actividad FPS se expresan como actividad relativa a Col-3 qrt1, a la cual se le ha atribuido el valor de 100. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el SE de 3 experimentos independientes.

#### 4.2.3 Determinación de los niveles de sitosterol en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*

Para analizar los efectos de los niveles de actividad FPS observados en los ensayos anteriores sobre los niveles de esteroides en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*, se procedió a su determinación en semillas maduras de estas líneas. En la figura 79 se observa que los niveles de sitosterol obtenidos en las tres líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2* son, en todos los casos, semejantes a los de las semillas de Col-3 qrt1, es decir, que la expresión de ambos transgenes es capaz de restablecer los valores normales de sitosterol en las semillas del mutante *fps2-1*.

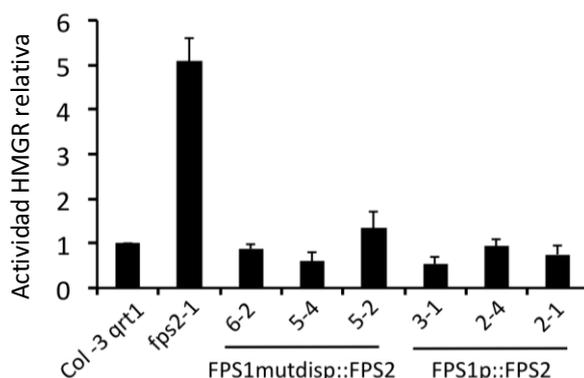


**Figura 79. Niveles de sitosterol en semillas de las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.** El análisis se realizó en semillas maduras. Los valores se expresan como cantidad relativa a Col-3 qrt1, a la cual se le ha atribuido el valor de 100. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el SE de 3 experimentos independientes.

#### 4.2.4 Estudio de la actividad HMGR y el efecto de la mevastatina en semillas de las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *pFPS1S::FPS2*

Finalmente, se analizaron los niveles de actividad de la enzima HMGR, en el sobrenadante 200 x g proveniente de extractos proteicos de semillas maduras de las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.

En la figura 80 se observa que las 6 líneas analizadas presentan niveles similares entre ellas de actividad HMGR, que son además, semejantes a los determinados en las semillas de las plantas Col-3 qrt1.

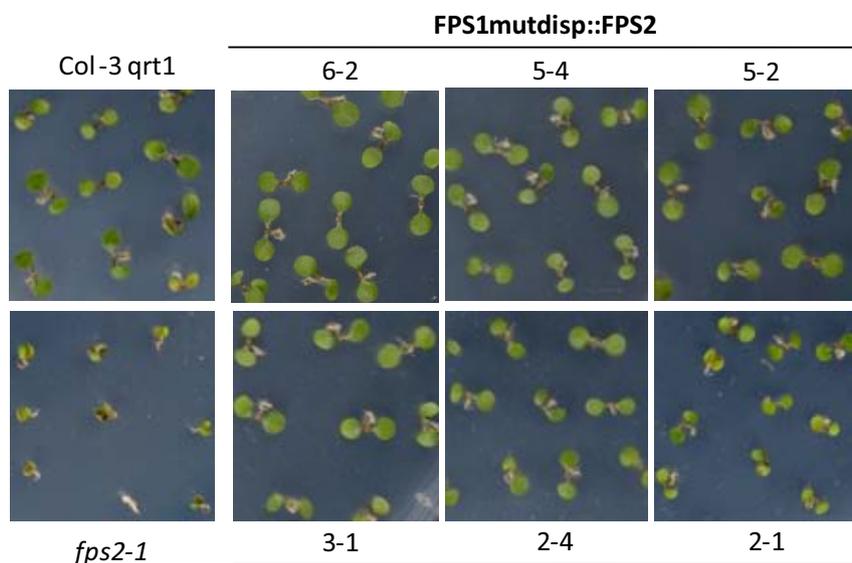


**Figura 80. Actividad enzimática HMGR en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*.** Los niveles de actividad HMGR se determinaron en el sobrenadante 200 x g de extractos proteicos de semillas maduras de las líneas mencionadas. Los valores se expresan en actividad HMGR relativa en referencia a Col-3 qrt1, al cual se le ha atribuido el valor de 1. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el SE de 3 experimentos independientes.

Habiendo observado que los niveles de actividad HMGR en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2* se restauraron, se procedió a analizar el fenotipo de sensibilidad a mevastatina. Para ello se sembraron semillas de estas líneas en presencia del inhibidor, las cuales presentaron, en todos los casos, una clara reversión del fenotipo de hipersensibilidad a la mevastatina observado en las semillas *fps2-1* (Figura 81).

El conjunto de resultados obtenidos durante la caracterización de las líneas que expresan los transgenes *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*, indican que en todas las líneas existe una correlación entre la cantidad de proteína expresada y los niveles de actividad FPS observada en las semillas en todas las líneas. Respecto al análisis de los niveles de sitosterol, actividad HMGR y el rescate del fenotipo de hipersensibilidad a mevastatina, se ha visto que todas las líneas recuperan los niveles normales y revierten el fenotipo observado en los mutantes *fps2*. Esta complementación, se produce aún en líneas

que expresan niveles de actividad FPS ligeramente mayores (1.2 veces más, en el caso de la línea 6-2) al expresado en el mutante *fps2-1*. Lo cual indica que la actividad FPS residual del mutante *fps2-1* se encuentra sólo ligeramente por debajo del umbral de actividad que desencadena la aparición de los fenotipos observados en las semillas de este mutante.



**Figura 81. Estudio de la reversión del fenotipo de hipersensibilidad a la mevastatina en las líneas *FPS1mutdisp::FPS2*, *FPS1p::FPS2*, *fps2-1* y *Col-3 qrt1*.** Imágenes de plántulas de 12 días de las líneas mencionadas crecidas en medio MS suplementado con 1  $\mu$ M de mevastatina y en condiciones de día largo.



## DISCUSIÓN II



Como se ha mencionado en la introducción, la enzima FPS se encuentra en una encrucijada metabólica en la vía del MVA, ya que a partir de los sustratos IPP y DMAPP, y el producto FPP, de la reacción que cataliza, parten diferentes ramificaciones (Figura 3) que darán lugar a compuestos isoprenoides esenciales para las plantas como los brasinoesteroides, dolicoles, poliprenoles, grupo farnesilo, cadenas laterales de la ubiquinona, esteroides, triterpenos y sesquiterpenos. Teniendo en cuenta el gran número y la importancia de los compuestos sintetizados a partir de los intermediarios implicados en la reacción catalizada por la FPS, se torna imprescindible un estricto nivel de regulación con el fin de asegurar una síntesis adecuada ante los requerimientos de cada uno de ellos. De hecho, algunos estudios avalan su función como punto de regulación de la síntesis de isoprenoides en diferentes especies vegetales (Hugueney *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Souret *et al.*, 2003 y Han *et al.*, 2006).

En *A. thaliana* existe una pequeña familia multigénica formada por dos genes, *FPS1* y *FPS2*, que codifican tres isoenzimas, *FPS1L*, *FPS1S* y *FPS2* (Cunillera *et al.*, 1996 y Cunillera *et al.*, 1997). Estos genes poseen patrones de expresión claramente diferenciados. El gen *FPS1* tiene una expresión intensa y generalizada, mientras que *FPS2* muestra una expresión restringida a determinados órganos y estadios de desarrollo (Cunillera *et al.*, 2000). Si bien se han observado en otras especies algunos ejemplos de enzimas identificadas como FPS pero que han mostrado otro tipo de actividad preniltransferasa (Hemmerlin *et al.*, 2003 y Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006), en *A. thaliana* se ha comprobado que las isoenzimas *FPS1S* y *FPS2* catalizan *in vitro* la síntesis de un único producto de reacción, FPP (Closa, tesis doctoral 2007). La mayoría de la información disponible sobre la posible función biológica de las isoenzimas FPS en plantas, se ha obtenido a partir de los patrones de expresión de los correspondientes genes (Atucci *et al.*, 1995<sup>1</sup>; Li y Larkins 1996; Pan *et al.*, 1996; Sanmiya *et al.*, 1999; Gaffe *et al.*, 2000 y Cunillera *et al.*, 2000) así como de la caracterización de mutantes nulos *fps* en *Arabidopsis* (Closa *et al.*, 2010). En este último caso se observó que si bien sólo se necesita un gen funcional *FPS* para producir los niveles de isoprenoides necesarios para un desarrollo normal de la planta, las funciones de *FPS1S* y *FPS2* durante el desarrollo no son del todo redundantes, ya que *FPS1* tiene un papel más relevante durante la mayor parte del ciclo de vida de la planta, mientras que *FPS2* podría cumplir una función más importante en las semillas y durante los primeros estadios de la germinación, como lo sugiere la observación que la pérdida de *FPS2* produce una disminución notable de los niveles de esteroides en las semillas, asociada a un aumento en la actividad de la enzima HMGR que a su vez provoca una hipersensibilidad de estas plantas al inhibidor mevastatina. Otra fuente de información sobre las isoenzimas FPS, proviene de la caracterización de los mutantes de sobreexpresión. Al analizar los fenotipos de plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de *FPS1S* se ha

observado la presencia de lesiones necróticas en las hojas, una reducción de los niveles de citoquininas, la expresión de marcadores característicos de la respuesta hipersensible (inducción del gen PR-1 y acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) así como senescencia prematura en hojas aisladas respecto de las plantas control (Masferrer *et al.*, 2002 y Manzano *et al.*, 2004). Sin embargo, en las plantas sobreexpresoras de FPS2 no se han detectado alteraciones fenotípicas, a pesar de que los niveles de actividad FPS en estas plantas son tan elevados como en las plantas sobreexpresoras de FPS1S (Closa, tesis doctoral, 2007).

## 1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LAS ISOENZIMAS FPS1S Y FPS2

Para determinar si los efectos diferenciales mencionados anteriormente podrían ser consecuencia de que las isoenzimas FPS1S y FPS2 presentan propiedades bioquímicas diferentes, se realizó la caracterización de ambas. Para ello, se expresaron las proteínas FPS1S y FPS2 fusionadas a la GST en *E. coli* (Figura 57), las cuales fueron posteriormente digeridas mediante la proteasa factor Xa (Figura 58). Tanto la elección del *tag* para la purificación como el método para su eliminación se eligieron con el fin de obtener las proteínas en estado nativo, ya que la presencia del mismo o bien de aminoácidos extra podrían tener efectos negativos sobre la actividad biológica de la enzima (Arnau *et al.*, 2006). Para la eliminación del *tag*, se optó por usar el factor Xa, un método enzimático específico, que actúa en condiciones menos agresivas que otros compuestos químicos y no deja residuos de aminoácidos, como otros métodos de eliminación (Jenny, 2003). En el caso de la elección del *tag* para la purificación de FPS, se plantearon dos opciones entre la fusión a la GST o a una secuencia de histidinas. Por un lado, en un estudio llevado a cabo por Mekkriengkrai *et al.* (2004) decidieron emplear fusiones con la GST para la purificación la proteína LcFPS de *L. chrysothraux*, ya que en la primera prueba que realizaron con la fusión de la misma a un *tag* de histidinas, la enzima no mostró actividad. Sin embargo, en el proceso de purificación de las proteínas FPS de *A. tridentata* se empleó un *tag* de histidinas con resultados satisfactorios (Hemmerlin *et al.*, 2003). Al no haberse descrito resultados negativos en el uso de la GST, se optó por utilizarla para realizar la purificación de la FPS de *Arabidopsis*.

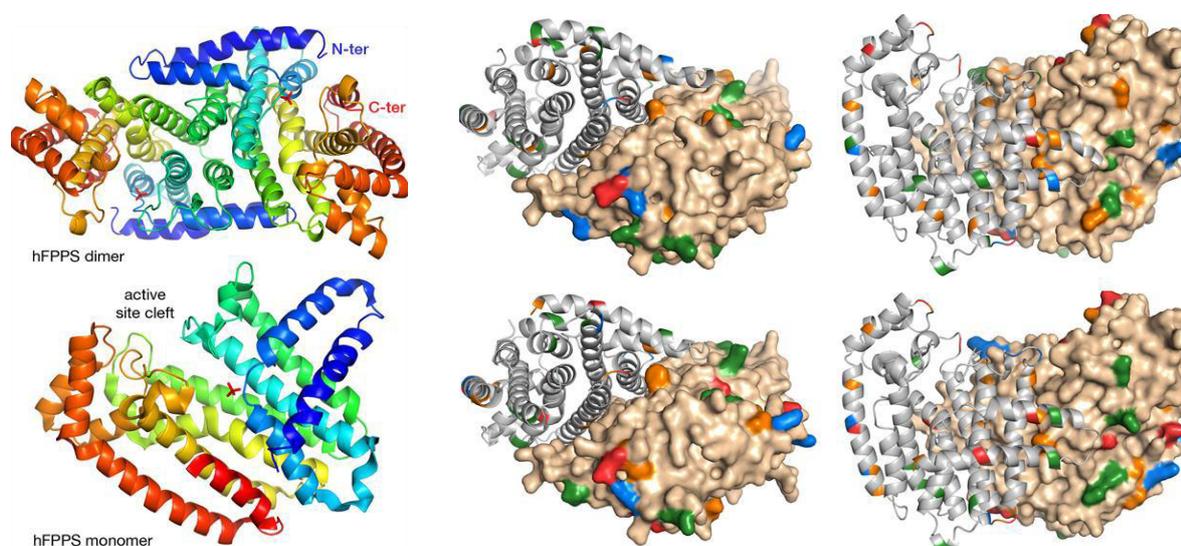
En los estudios bioquímicos realizados en este trabajo con las proteínas FPS1S y FPS2 purificadas se observó que la actividad de ambas isoenzimas presenta un comportamiento similar, tanto en presencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (Figura 59) como a distintos valores de pH, siendo el óptimo a pH 7 (Figura 60). Este resultado estaría relacionado, como se verá más adelante en el apartado dedicado a la localización subcelular de las mismas, con el hecho que el pH del citoplasma en las células vegetales se mantiene ligeramente alcalino entre 7.2-7.5, en condiciones no elicitanes (Felle, 2001).

Para obtener información sobre una posible regulación diferencial de las isoenzimas FPS1S y FPS2 se analizó el efecto inhibitorio del producto de la reacción, el FPP, sobre ambas enzimas. En un estudio realizado por Tholl *et al.*, (2001) con *Abies grandis*, se ensayó este efecto inhibitorio *in vitro* sobre la FPPS de esta gimnosperma y observaron una inhibición del 50% de la actividad de la enzima a una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . El ensayo realizado en *Arabidopsis* con las isoenzimas FPS1S y FPS2, demostró un comportamiento similar de ambas frente a concentraciones crecientes de FPP, ya que tanto FPS1S como FPS2 disminuyeron su actividad hasta un 30%, a la concentración máxima de FPP ensayada, 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 62), lo que indica que la enzima FPPS de *A. grandis* posee una mayor sensibilidad al efecto inhibitorio de FPP que las FPS de *Arabidopsis*. Al comparar las constantes cinéticas de FPS1S y FPS2 (Tabla 2), se observó que ambas isoenzimas poseen valores similares de  $K_m$  para los sustratos IPP, DMAPP y GPP, así como una notable preferencia por el GPP respecto al DMAPP como sustrato alílico en la reacción de síntesis de FPP. Este comportamiento también se observó en las FPS de otras especies donde se ha realizado la caracterización cinética de esta enzima, como en *A. grandis* (Schmidt y Gershenzon, 2007) y en la isoenzima FDS1 de *A. tridentata* (Hemmerlin *et al.*, 2003), que poseen valores de  $K_m$  menores para el GPP (1,8 y 1,6  $\mu\text{M}$ ) que para el DMAPP (9 y 7,1  $\mu\text{M}$ ), aunque en el caso de la isoenzima FDS2 de *A. tridentata* ocurre lo contrario, presenta más afinidad por el DMAPP que por el GPP (6 y 13,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Al comparar las constantes cinéticas obtenidas para el IPP con otras especies, se observan valores muy variados, desde 0,55  $\mu\text{M}$  en el caso de la FPS humana (Ding *et al.*, 1991), 6,73  $\mu\text{M}$  en *L. chrysolreus* (Mekkriengkrai *et al.*, 2004); 17,4  $\mu\text{M}$  en *T. gondii* (Ling *et al.*, 2007); 51  $\mu\text{M}$  en *E. fusca* (Ranzer *et al.*, 2008); 31  $\mu\text{M}$  en el caso de *D. melanogaster* (Sen *et al.*, 2007), que es similar a los valores correspondientes a FPS1S y FPS2 de *Arabidopsis*, hasta 230  $\mu\text{M}$  para *P. abies* (Schmidt *et al.*, 2007). Las similitudes cinéticas entre FPS1S y FPS2 son coherentes con el alto grado de conservación en la secuencia de ambas isoenzimas (90,6% de identidad). Sin embargo, FPS1S y FPS2 también mostraron algunas diferencias notables ya que al comparar los parámetros de eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ), FPS2 resultó ser entre 2.5-3 veces más eficiente que FPS1S (Tabla 2).

Todas las proteínas FPS conocidas contienen 7 dominios aminoacídicos altamente conservados (Koyama *et al.*, 1993) los cuales se encuentran involucrados en la catálisis enzimática y la determinación de la longitud de la cadena hidrocarbonada del producto final de la reacción (Vandermoten *et al.*, 2009 y Szkopińska y Plochocka, 2005). Se ha visto que FPS es una enzima homodimérica donde cada subunidad interacciona con la otra, para formar un centro catalítico compartido, en lugar de hacerlo de manera independiente en cada subunidad (Koyama *et al.*, 2000). Las secuencias aminoacídicas de FPS1S y FPS2 de *Arabidopsis* difieren entre sí en sólo 32 de los 343 y 342 aa de que consta cada enzima,

respectivamente. Estos cambios se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia. Sin embargo, ninguno de ellos afecta a los motivos conservados involucrados en el proceso catalítico (Cunillera *et al.*, 1996). Por ello resulta difícil atribuir las diferencias observadas en la eficiencia catalítica de ambas enzimas a un cambio en particular, más bien la causa podría deberse a variaciones en la estructura tridimensional de las enzimas, resultado de la combinación de varios cambios de aminoácidos individuales.

El análisis de la actividad de las isoenzimas FPS a 45°C, demostró que FPS2 es más estable que FPS1S (Figura 82). Esta diferencia se confirma también por los resultados obtenidos en el estudio de DSF (Figura 65) los cuales mostraron que FPS2 es una proteína termodinámicamente más estable que FPS1S. Para comenzar a establecer las bases estructurales de la diferente estabilidad térmica observada en las isoenzimas FPS1S y FPS2, se obtuvieron modelos por homología de ambas isoenzimas FPS de *Arabidopsis* a partir de la estructura cristalina de la FPS humana (PDB 2F7M; Rondeau *et al.*, 2006), en un estudio realizado en colaboración con el grupo de la Dra. C. Vega en el Dpto. de Biología Estructural y Cuantitativa del CIB-CSIC en Madrid. En los modelos tridimensionales de las isoenzimas FPS1S y FPS2 se identificaron las posiciones de cada uno de los aminoácidos diferentes entre ambas (Figura 82).



**Figura 82. Modelado por homología de FPS1S y FPS2.** (Izquierda) Representación de las estructuras de la FPS humana (PDB 2F7M) utilizada como molde para la obtención de la estructura de FPS1S y FPS2 de *Arabidopsis thaliana*. (Derecha) Estructuras diméricas resultantes del modelado de FPS1S (arriba) y FPS2 (abajo) de *Arabidopsis*. El monómero del lado izquierdo de cada figura corresponde a la estructura de cinta y en el del lado derecho se muestra la superficie molecular. El código de colores de los aminoácidos empleado es: rojo, ácido (Asp, Glu); azul, básico (Arg, Lys, His); verde, polar (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr); naranja, apolar (Met, Phe, Pro, Trp, Val, Leu, Ile, Ala). (Modelado realizado por el grupo de la Dra. C. Vega en el Dpto. de Biología Estructural y Cuantitativa del CIB-CSIC en Madrid).

Así se observó que la gran mayoría de estos aminoácidos se encuentran en la superficie externa de las proteínas. El análisis detallado de cada una de estas 32 diferencias indicó que FPS2 posee 4 residuos con carga más que FPS1S (de los cuales 3 son básicos y uno ácido) y que las cadenas laterales de los aminoácidos polares y con carga en FPS2 tienden a tener mayor longitud en promedio que los de FPS1S, los cuales confieren mayor libertad de rotación que facilita la formación de interacciones polares en la superficie de la proteína. El incremento de la polaridad en la superficie de FPS2 le permitiría establecer hasta 3 puentes salinos y varios puentes de hidrógeno más en comparación con FPS1S. En síntesis, al analizar los modelos se observa que FPS2 podría formar 31 puentes de hidrógeno (de los cuales 4 son fuertes) mientras que FPS1 sólo formaría 30 (de los cuales, 2 fuertes), así como también 7 puentes salinos en FPS2, respecto a los 5 de FPS1, en la interfase del dímero. Finalmente, en FPS2 parece haber un número mayor de interacciones entre aa tipo aromático-aromático, aromático-azufre y cationes pi. Todos estos factores en conjunto proporcionan a FPS2 una mayor termoestabilidad. Los efectos de estabilidad electrostática, debidos a la secuencia aminoacídica, concuerdan con estudios realizados anteriormente como en el caso de Kumar y Tsai (2000) donde al realizar un estudio comparativo entre proteínas termofílicas y mesofílicas frente a deleciones/inserciones o sustituciones aminoacídicas observaron que las diferencias que confieren una mayor estabilidad térmica eran los enlaces de hidrógeno y los puentes salinos.

Estas diferencias estructurales observadas entre FPS1S y FPS2 también podrían explicar la mayor sensibilidad al efecto inhibitorio del NaCl (Figura 61) que se observa en el caso de FPS2 respecto a FPS1S, así como la gran diferencia de estabilidad térmica mostrada por las proteínas FPS1S y FPS2 purificadas (Figura 63 y 64). Observaciones similares se han visto en estudios de la enzima malato deshidrogenasa de la bacteria termófila *H. marismortui*, donde incluso la sustitución de un solo aminoácido es suficiente para provocar un aumento en la sensibilidad a la temperatura y la sal sin modificar la actividad catalítica o las constantes cinéticas de la misma (Madern *et al.*, 1995); así como la mutación de dos aminoácidos, que conllevan a una disminución prematura de su actividad a altas temperaturas, además de alteraciones en su estructura (Madern *et al.*, 2000) o bien en un estudio comparativo de adaptación de diferentes variedades geográficas de *Lottia*, en que se observó que la diferencia entre 1 y 17 aminoácidos en la enzima malato deshidrogenasa son las responsables de diferencias en las propiedades cinéticas y la estabilidad térmica de las mismas (Dong y Somero 2009).

## 2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS ISOENZIMAS FPS1S Y FPS2

En un estudio realizado por Martin *et al.*, (2007) se observó que uno de los mRNA sintetizados por el gen *FPS* humano codifica una isoforma que posee una secuencia N-terminal de tránsito a mitocondria, la cual estaría presente en otros mamíferos e insectos, como se demostró experimentalmente en el caso de *D. melanogaster*; o bien como se ha observado en la proteína FPS del insecto *A. grandis* el cual posee también una secuencia similar a la mencionada (Taban *et al.*, 2009). En una de las 3 proteínas FPS expresadas en *A. thaliana*, FPS1L, se ha identificado una secuencia aminoacídica que constituye un péptido de tránsito a mitocondrias, y cuya funcionalidad se ha demostrado experimentalmente (Cunillera *et al.*, 1997; Manzano *et al.*, 2006). En el caso de las isoenzimas FPS1S y FPS2, no se ha identificado ninguna secuencia que permita predecir su localización en ningún orgánulo, por lo cual se ha inferido que su localización es citosólica. Para demostrar dicha localización, en este trabajo se expresaron de manera transitoria las proteínas FPS1S y FPS2 fusionadas a la GFP, tanto por su extremo N- como C-terminal, en células epidérmicas de cebolla microbombardeadas. La observación mediante microscopia confocal de los patrones de fluorescencia generados por las cuatro proteínas de fusión demostró que tanto FPS1S como FPS2, se encuentran localizadas exclusivamente en el citosol (Figura 66). Este resultado es coherente con el hecho que las isoenzimas FPS1S y FPS2 exhiban un pH óptimo de 7.0, ya que en condiciones normales, el pH del citoplasma de las células vegetales oscila entre 7.2 y 7,5 (Felle, 2001).

Estos resultados descartan la posibilidad de que las isoenzimas posean señales crípticas que las dirijan a peroxisomas, como fue descrito recientemente en el caso de la enzima FPS de *C. roseus*. A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, al expresar en células de *C. roseus* fusiones entre la CrFPS y la YFP, se observó que se localizaban tanto en los peroxisomas como en el citosol, a pesar de que en la secuencia de esta enzima no se han detectado señales de localización peroxisomal (Thabet *et al.*, 2011). Las primeras evidencias acerca de una localización peroxisomal tanto de la enzima FPS como de las enzimas previas de la vía del MVA (mevalonato kinasa, fosfomevalonato kinasa, mevalonato descarboxilasa e IPP isomerasa), se han obtenido en mamíferos en estudios en hígado de rata mediante microscopía de inmunofluorescencia (Olivier *et al.*, 2000). Una localización en peroxisomas se ha observado también en *C. roseus* para las enzimas PMK y MVD, sin embargo la enzima MVK se localiza en el citosol (Simkin *et al.*, 2011). En general, se ha descrito que la mayoría de las FPS identificadas se encuentran ubicadas en el citosol, como es el caso también de los parásitos *L. major* (Ortiz-Gomez *et al.*, 2006), *T. Cruzi* y *T. brucei* (Ferella *et al.*, 2008) donde fueron localizadas mediante la técnica de microscopía de inmunofluorescencia. En plantas como *V. vinifera* (Feron *et al.*,

1990), *C. annuum* (Hugueney *et al.*, 1996) *G. arboreum* (Liu *et al.*, 1999) y en tomate (Gaffe *et al.*, 2000) se han caracterizado enzimas FPS y no se han identificado secuencias señal que indiquen otra localización que no sea la citosólica. Sin embargo en otros estudios se han encontrado también en otros compartimentos subcelulares como la localización de FPS en partículas de látex en el caso de *H. brasiliensis* (Adiwilaga y Kush, 1996) y de *P. argentatum*, mediante el uso de anticuerpos antiFPS (Pan *et al.*, 1996); en el caso del arroz, se ha observado a través de ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti-FPS, que la isoforma FPPS1 se encuentra en cloroplastos de células del mesófilo; o bien en fracciones cloroplastídicas de hojas de trigo y tabaco (Sanmiya *et al.*, 1999). En un análisis bioinformático realizado por Sapir-Mir *et al.* (2008) se han detectado secuencias de señalización a peroxisomas en la mayoría de las enzimas de la vía del MVA en *Arabidopsis*, como la acetoacetil tiolasa, HMG sintasa, mevalonato kinasa y fosfomevalonato descarboxilasa, así como las isoformas cortas de IPI1 e IPI2 (y también de manera experimental mediante fusiones con GFP en este último caso), sin embargo en estudios de proteómica a partir de fracciones enriquecidas en peroxisomas donde se han identificado en *Arabidopsis thaliana* al menos unas 45 proteínas relacionadas con estos orgánulos (de las cuales también se ha verificado su localización mediante estudios independientes), a excepción de la enzima acetoacetil tiolasa (Reumann *et al.*, 2007), ninguna de las isoenzimas FPS1S y FPS2 de *Arabidopsis* se encuentra incluida (Reumann, 2011). Una posible explicación para la diferencia en la localización de las isoenzimas FPS citosólicas de *Arabidopsis* y *C. roseus* podría estar relacionada con los diferentes perfiles de isoprenoides sintetizados por estas dos especies (Tholl y Lee, 2011 y Guirimand *et al.*, 2010). Debido a la controversia suscitada en relación a la localización de las enzimas FPS (así como en otras enzimas de la vía del MVA) y teniendo en cuenta la posibilidad de que la fusión con proteínas fluorescentes podría dar lugar a interferencias en su localización, es necesario llevar a cabo aproximaciones experimentales alternativas para confirmar la localización subcelular de estas enzimas.

### **3. PATRONES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *FPS1* Y *FPS2* EN SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana***

Diversos estudios han mostrado que los genes *FPS* se expresan en diferentes tejidos o momentos específicos del desarrollo, como en el caso de *W. somnifera* en que se observó, mediante RT-PCR semicuantitativa, una mayor expresión del gen *WsFPPS* en flores, hojas jóvenes y tallos (Gupta *et al.*, 2011); o bien a través de sondas específicas para *FPS* se detectó mRNA de *LeFPS1* en raíces, frutos maduros o hipocotilos (de plantas

adultas), pero no en plántulas (Gaffe *et al.*, 2000). También se ha observado en algunos casos que estos genes se expresan de manera diferencial, como ocurre con la expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* en *Arabidopsis thaliana* que fue analizada mediante el gen reportero *GUS*, y se observó que el gen *FPS1* presenta una expresión generalizada e intensa durante todo el desarrollo de la planta tanto en la fase vegetativa como reproductiva, mientras que el gen *FPS2* presenta una expresión restringida a órganos florales, semillas y estadios tempranos de la germinación (Cunillera *et al.*, 2000). Por otro lado, la reciente caracterización de los mutantes simples *fps* de *Arabidopsis* ha demostrado que tanto *FPS1S* como *FPS2* son capaces de suplir casi por completo la pérdida de función del otro durante la mayor parte del ciclo de vida de la planta, lo que indica que *FPS1S* y *FPS2* poseen funciones fisiológicas mayoritariamente redundantes entre sí. El único indicio de una posible especialización funcional se observó en las semillas, donde *FPS2* es la isoenzima que contribuye mayoritariamente a la actividad FPS total, mientras que la actividad residual de *FPS1S* en semillas no es capaz de proporcionar cantidades suficientes de FPP para sintetizar los niveles normales de esteroides requeridos. Esta alteración provoca el aumento de la actividad HMGR como un mecanismo de compensación, imprescindible para el proceso de germinación de las semillas (Closa *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta la relevancia de la función de *FPS2* en las semillas, se decidió llevar a cabo un estudio de la expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* durante el desarrollo de la semilla utilizando el gen reportero *GUS*. Los resultados obtenidos evidenciaron una notable diferencia entre los patrones de expresión correspondientes a los genes *FPS1* y *FPS2*, que a partir del estadio de torpedo en adelante mostraron un alto grado de complementariedad (Figure 67), es decir, que sólo una copia del gen se expresa en ciertos tejidos mientras que la otra copia lo hace en otros tipos (Liu *et al.*, 2011), como ocurre en estadios más avanzados del desarrollo de la semilla, cuando la expresión de *FPS2* se convierte de manera evidente en la mayoritaria respecto a la de *FPS1*. Claramente, el gen *FPS2* se expresa en todo el endospermo y en el embrión en el estadio cotiledón, mientras que *FPS1* sólo se expresa puntualmente en la cubierta chalazal (durante los diferentes estadios de la semilla) y en ningún caso se observó su expresión en el embrión.

En *Arabidopsis* la síntesis de FPP es esencial para el desarrollo del embrión más allá del estadio pre-globular, ya que la pérdida simultánea de los genes *FPS* detiene su desarrollo en este estadio (Closa *et al.*, 2010). A partir del análisis de los patrones de expresión de los genes *FPS*, puede deducirse que en estadios tempranos, el embrión no estaría sintetizando el FPP necesario para sustentar su desarrollo ya que ninguno de los genes *FPS* comienza a expresarse en el embrión al menos hasta el estadio de corazón, donde se empieza a detectar la expresión del gen *FPS2* (Figura 67). Este hecho, implicaría que el embrión en estadios anteriores deba obtener FPP u otros precursores de

isoprenoides desde otros tejidos de la semilla como la cubierta o el endospermo chalazal, donde se produciría FPP, ya que se ha observado la expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* en estas zonas. Ambos se han considerado tejidos especializados en procesos de captación, re-procesamiento y liberación de metabolitos en el endospermo relacionados con el mantenimiento de la embriogénesis (Nguyen *et al.*, 2000; Ingram, 2010). La hipótesis de que en el endoespermo chalazal se sintetizan precursores de isoprenoides durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario concuerda con los resultados de un estudio llevado a cabo por Miyawaki *et al.* (2004) sobre la expresión en semillas de los genes que codifican isopenteniltransferasas, enzimas involucradas en la biosíntesis de las citoquininas. Las enzimas isopenteniltransferasas catalizan el primer paso de la vía de síntesis de citoquininas que consiste en la isopentenilación de compuestos como el AMP, ADP y ATP a partir de DMAPP (Sakakibara, 2006). En este trabajo se analizó la expresión de los genes *IPT* de *Arabidopsis thaliana* mediante la fusión con el gen reportero *GUS*. En particular, los genes *AtIPT4::GUS* y *AtIPT8::GUS* se expresan activamente en la zona del endospermo chalazal y en mucha menor medida, en el resto del endospermo. La expresión observada, fue disminuyendo hasta su completa desaparición en el estadio de corazón temprano, en el caso de *AtIPT4* y tardío en el caso de *AtIPT8*.

El hecho de que el gen *FPS2* comience a expresarse en el embrión a partir del estadio de corazón, parece indicar que el embrión adquiere la capacidad de sintetizar su propio FPP desde este momento, a pesar de que la síntesis de FPP en el propio embrión no parece ser imprescindible para su correcto desarrollo, ya que como se ha observado, la ausencia de la actividad *FPS2* en las semillas del mutante *fps2* no impide el desarrollo normal del embrión (Closa *et al.*, 2010). Estas observaciones refuerzan la hipótesis que la cubierta chalazal (donde se expresa *FPS1*) es capaz de suministrar cantidades suficientes de FPP (o de otros precursores de los isoprenoides) al embrión para asegurar su desarrollo normal, aunque la cantidad de estos compuestos no parece ser suficiente para asegurar la producción de niveles normales de esteroides en las semillas de los mutantes *fps2* (Figura 72).

#### 4. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN CRUZADA DE LOS MUTANTES *fps2-1*

Como se ha descrito, las semillas de los mutantes *fps2* poseen un conjunto de características alteradas como la disminución de los niveles de esteroides que es responsable del incremento de la actividad HMGR y que conlleva a una hipersensibilidad a la mevastatina (Closa *et al.*, 2010). Con el fin de determinar si *FPS1S* era capaz de revertir estos fenotipos, se analizaron los efectos de la expresión de esta isoenzima bajo el control

del promotor del gen *FPS2* sobre los fenotipos de las semillas del mutante *fps2-1*. Las dos construcciones obtenidas, *FPS2p::FPS1S-mutdis* y *FPS2p::FPS1S*, expresan la isoforma corta (*FPS1S*), pero difieren entre sí, en que *FPS2p::FPS1S-mutdis* contiene una extensión que corresponde a la secuencia comprendida entre el primer y segundo codón ATG de inicio de la traducción del gen *FPS1* (donde el primer ATG fue mutado a ATC), mientras que *FPS2p::FPS1S* sólo posee el segundo codón ATG. Los estudios de reversión de estos fenotipos mostraron que la expresión de *FPS2p::FPS1S-mutdis* en las semillas del mutante *fps2-1* (Figuras 68-70) es capaz de restaurar los niveles normales de actividad FPS (Figura 71), sitosterol (Figura 72) y HMGR (Figura 73), así como también la sensibilidad normal a la mevastatina (Figura 74), lo que indica que en condiciones normales, *FPS1S* y *FPS2* son completamente intercambiables a nivel funcional. Esta reversión no se observó en las semillas que expresan el gen *FPS2p::FPS1S*, lo que sugiere que la secuencia comprendida entre los codones ATC y ATG de las construcciones *FPS2p::FPS1S-mutdis* es importante en el proceso de la síntesis de *FPS1S*. Esto podría estar relacionado con la relevancia que poseen las secuencias circundantes al codón AUG en el mRNA de *FPS1*, las cuales parecen cumplir una importante función estructural que podría influir en el inicio de la traducción (Reineke *et al.*, 2008 y Blaszczyk y Ciesiolka, 2011). Existe una amplia evidencia que indica que la estructura secundaria y elementos en las secuencia de las UTRs 5' y 3' del mRNA son puntos de interacción con proteínas de unión a RNA involucradas en la regulación de la estabilidad del mRNA y el control de la traducción (Adeli, 2011). Las UTRs pueden inducir o bien inhibir la traducción, así como también los nucleótidos circundantes al codón UAG pueden ser un factor determinante en el reconocimiento por parte del complejo 43S de pre-iniciación de la traducción (Kozak, 1986); asimismo, la longitud de la secuencia *leader* UTR 5' también influye en la eficiencia de la traducción, ya que aumentando la longitud, se incrementa la eficiencia de la traducción del mRNA (Kozak, 1991); por último, la estructura secundaria en el extremo 5' podría causar un impedimento estérico impidiendo la unión del complejo 43S (Day y Tuite, 1998).

Para completar el estudio de complementación cruzada, se analizó la capacidad de revertir los fenotipos del mutante *fps2-1* mediante la expresión de *FPS2* bajo el control del promotor *FPS1S* (Figura 75). Para ello se obtuvieron dos construcciones, *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*. Ambas poseen la secuencia promotora del gen *FPS1* con los dos codones ATG de inicio de traducción (región correspondiente al péptido señal de *FPS1L*) fusionada a la secuencia genómica codificante del gen *FPS2*, pero en *FPS1mutdisp::FPS2* el codón ATG distal se ha convertido en ATC. Los resultados obtenidos mostraron que tanto las plantas transgénicas que expresaban *FPS1mutdisp::FPS2* como las que expresaban *FPS1p::FPS2* fueron capaces de revertir los fenotipos observados en los mutantes *fps2-1*; asimismo, indicaron que niveles de actividad FPS sólo ligeramente

superiores a los observados en semillas del mutante *fps2-1* son suficientes para mantener las condiciones normales de la biosíntesis de esteroides en semillas, ya que sólo con un incremento de 1.2 veces la actividad FPS respecto al nivel en el mutante *fps2-1* (Figura 78) fue suficiente para revertir los fenotipos descritos para este mutante (Figuras 79 a 81).

Estos resultados indicaron que la expresión de FPS2 bajo el control del promotor *FPS1*, cuya actividad se encuentra restringida a la cubierta chalazal (Figura 67), fue capaz de restablecer los niveles normales de esteroides en semillas del mutante *fps2-1*, lo que respalda la hipótesis que la cubierta chalazal estaría actuando como una fuente de FPP para el desarrollo del embrión y refuerza la idea de que tejidos especializados en la semilla proporcionan los precursores de los esteroides utilizados en el desarrollo del embrión (Rasbery *et al.*, 2007). Asimismo, la expresión de *FPS2* en el embrión en el estadio cotiledón (el cual ocupa la mayor parte de la semilla), sumado a la mayor eficiencia catalítica de la isoenzima FPS2 permiten explicar por qué FPS2 es el principal contribuyente a la actividad total de FPS en semillas maduras (Closa *et al.*, 2010)

La viabilidad de las semillas es imprescindible para la supervivencia en plantas superiores y por ello están adaptadas para soportar largos períodos de exposición a condiciones ambientales adversas como altas temperaturas que pueden causar la desnaturalización e inactivación de ciertas proteínas, entre otros efectos. Las semillas de *Arabidopsis* son capaces de germinar incluso después de haber sido expuestas a tratamientos a altas temperaturas (45°C) durante más de 3,5 h (Larkindale *et al.*, 2005). Estas temperaturas resultan sin embargo, letales para las plántulas (Burke *et al.*, 2000). Este hecho, plantea la hipótesis que FPS2 sería la isoenzima predominante en semillas de *Arabidopsis* debido a su elevada termotolerancia, la cual contribuiría a mantener la capacidad germinativa de las mismas en situaciones de exposición a altas temperaturas.



## CONCLUSIONES II



- 1) Las isoenzimas FPS1S y FPS2 de Arabidopsis muestran valores similares de  $k_m$  para los sustratos IPP, DMAPP y GPP; no obstante, FPS2 es catalíticamente más eficiente, más sensible al efecto inhibitorio del NaCl y más resistente a la inactivación térmica debido a su mayor estabilidad termodinámica, que FPS1S.
- 2) La modelización por homología y el análisis de las diferencias aminoacídicas entre ambas isoenzimas indican que FPS2 puede establecer más interacciones polares superficiales y establecer más enlaces de hidrógeno e interacciones salinas entre las dos subunidades del dímero, que FPS1S.
- 3) Las isoenzimas FPS1S y FPS2 de Arabidopsis se localizan exclusivamente en el citosol, a diferencia de lo observado en *C. roseus*, en donde la FPS se localiza parcialmente en los peroxisomas.
- 4) Los genes *FPS1* y *FPS2* poseen patrones de expresión mayoritariamente complementarios en las semillas, particularmente en los estadios avanzados de desarrollo, lo que sugiere que en las semillas de Arabidopsis el FPP tiene dos orígenes segregados espacial y temporalmente.
- 5) Las isoenzimas FPS1S y FPS2 son funcionalmente intercambiables ya que al ser expresadas bajo el control de los promotores *FPS2* y *FPS1*, respectivamente, son capaces de rescatar los fenotipos de las semillas del mutante *fps2-1*.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Material vegetal

Los experimentos que se presentan en esta tesis se han llevado a cabo utilizando como material vegetal la especie *Arabidopsis thaliana*, concretamente, las variedades de Columbia 0 (Col 0), Columbia 3 *qrt1/qrt1* (Col3 *qrt1*), Landsberg (Ler).

Se ha trabajado con 4 mutantes de pérdida de función del gen *AtARV1* provenientes de la colección Salk, de fondo genético Col 0 y un mutante del gen *AtARV2* de la colección *Cold Spring Harbor Laboratory*, de fondo genético Ler:

***arv1-2*** (Salk\_123517): Posee la inserción de T-DNA en la posición +2948 (exón 9) del gen *AtARV1*. No posee ningún tipo de resistencia a antibiótico o herbicidas.

***arv1-1*** (Salk\_090151): Mutante *knock down*. Contiene una inserción de T-DNA en la posición -11, respecto del codón de inicio de traducción del gen *AtARV1* (At1g01020). No posee ningún tipo de resistencia a antibiótico o herbicida.

***arv1*<sub>614</sub>** (Salk\_116614): El T-DNA se encuentra en la posición -41 (41pb *upstream* del codón ATG de inicio de la traducción) del gen *AtARV1*. No posee resistencia a antibiótico o herbicidas.

***arv1*<sub>981</sub>** (Salk\_127981): En este mutante el T-DNA se encuentra en la posición +1348 del gen *AtARV1* (en el intrón 7). No posee ningún tipo de resistencia.

***arv2*** (ET8675): Posee una inserción de un elemento Ds en la posición +2 (2pb después del codón de inicio de la traducción) del gen *AtARV2* (At4g01510). Se trata de un mutante *knock out*. Su fondo genético es Ler y es resistente al antibiótico kanamicina.

Asimismo, se han generado las líneas doble mutante *arv1-1:arv2* 5.9, *arv1-1:arv2* 25.21 y *arv1-2:arv2* que provienen del cruzamiento del mutante *arv1-1* o *arv1-2* con el mutante *arv2*.

Respecto a la pérdida de función del gen *FPS2* se ha trabajado con la línea:

***fps2-1*** (SAIL\_328\_G06): Mutante simple con pérdida de función del gen *FPS2* (At4g17190). Posee una inserción de T-DNA en el cuarto exón del mismo gen. En fondo Col3 *qrt1* y es resistente al herbicida BASTA™.

En función del análisis realizado, se ha utilizado semillas o plantas en diferentes estadios de desarrollo, desde plántulas (de 7 a 15 días crecidas en placa estéril), hasta plantas adultas (de 5 a 6 semanas, crecidas inicialmente en placa estéril y posteriormente transplantadas a tierra), tanto en fase vegetativa como en fase reproductiva.

## 1.1 Cultivos estériles *in vitro*

### 1.1.1 Esterilización de semillas

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante el tratamiento con una solución etanólica de cloro activo, la cual se prepara en dos etapas, primero se obtiene una solución concentrada, disolviendo una pastilla de *Deterclor* (dicloroisocianurato de sodio al 45%, *DETERCO*<sup>®</sup>) en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelta, se prepara la solución de trabajo diluyendo 5 ml de esta solución hasta completar 50 ml con etanol al 96%.

El proceso de esterilización de las semillas se realiza en una cámara de flujo laminar. En primer lugar se reparten las semillas en tubos *ependorf* en una cantidad equivalente a 100 µl como máximo, se añade 1 ml de la solución de esterilización y se agita por rotación durante 8 min. Se realizan dos lavados con etanol al 96% para eliminar los restos de cloro y se dejan secar 12 h en la cabina de flujo laminar para eliminar completamente el etanol, ya que su presencia podría interferir en la germinación de las mismas.

### 1.1.2 Siembra de semillas

Una vez que las semillas están esterilizadas, se distribuyen homogéneamente, ya sea por dispersión desde el tubo o bien sembradas una a una mediante el uso de pinzas y agua estéril, en placas de Petri que contienen medio Murashige y Skoog<sup>1</sup> (MS), en cabina de flujo laminar. Las placas se sellan con esparadrapo transpirable (*Leukopor*<sup>®</sup>) y se dejan a 4°C de 2 a 4 días en oscuridad. El objetivo de este proceso, denominado estratificación, es sincronizar la germinación de las semillas sembradas.

#### **Medio Murashige y Skoog<sup>1</sup> (MS) - 1 L**

Murashige & Skoog con vitaminas (Sigma)*	4,4 g
MES (Sigma)	0,5 g
Sacarosa	10 g
Ajustar el pH a 5,7 con KOH	
Agar para plantas	0,8 g
Autoclavar a 120°C durante 20 min	

\* Para preparar MS 0,5 X se añade la mitad (2,2 g) de este reactivo.

NOMBRE	SOLVENTE	STOCK	CONC. FINAL
Higromicina	Agua	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicina	Metanol	25 mg/ml	150 µg/ml
Pestanal® (BASTA)	Agua	5 mg/ml	10 µg/ml
Mevastatina	*	10 mM	1 µM
Metoxifenocida (Runner®)	-	22,7%	1:10000
Gentamicina	Agua	100 mg/ml	50 µg/ml
X-Gal	DMF	20 mg/ml	64 µg/ml
IPTG	Agua	1 M	1 mM
Kanamicina	Agua	100 mg/ml	50 µg/ml
Tunicamicina	DMSO	5 mg/ml	5 µg/ml
DTT	Agua	1 M	10 mM
Ampicilina	Agua	100 mg/ml	100 µg/ml

\* Preparación mevastatina Sigma (M2537-5mg). Preparar la sal sódica y neutralizar. Disolver el contenido en 350 µl de etanol absoluto, añadir 450 µl de NaOH 0,5 N y calentar a 50°C durante 2 h. Añadir 450 µl de ClH 0,5 N para neutralizar. Ajustar el pH a 7-7.4. La mevastatina Calbiochem (474705-5 mg) se disuelve directamente en 1,161 ml de etanol absoluto, ya que es la sal sódica.

**Tabla 3. Listado de antibióticos, herbicidas y reactivos añadidos en diferentes medios de cultivo.** En aquellos casos en que fueron requeridos inductores, inhibidores, antibióticos o herbicidas, fueron añadidos en las concentraciones correspondientes, en el medio autoclavado y en condiciones estériles y a una temperatura no mayor de 50°C, con el fin de evitar la degradación de la molécula añadida, debido a las altas temperaturas a la cual fue sometido el medio durante el proceso.

### 1.1.3 Condiciones de crecimiento

Una vez transcurrido el periodo de estratificación, las semillas se trasladan para su germinación a una cámara de cultivo en condiciones ambientales controladas, a una temperatura de 22°C e intensidad lumínica de 100 µEinsteins m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. En función del experimento, se utilizan diferentes fotoperíodos: día corto, de 8 h de luz y 16 h oscuridad, día largo, de 16 h de luz y 8 h de oscuridad o día continuo, de 24 h de luz.

## 1.2 Cultivo de plantas en tierra

En aquellos casos en que fue necesario realizar estudios de plantas en estadio adulto y/o en fase reproductiva, se transplantaron plántulas de 10-15 días (que presentan el primer par de hojas verdaderas) crecidas en placas de cultivo *in vitro* a tiestos de 55 mm de diámetro, con una mezcla de turba/vermiculita (1/1) hidratada con agua normal, dispuestos en una bandeja. Durante el procedimiento de transplantado, las plantas se separan cuidadosamente del medio de germinación de la placa con ayuda de unas pinzas *Millipore* y se colocan sobre un agujero realizado previamente en el sustrato de cada maceta. Posteriormente, se cubre la raíz con sustrato y se recubre la bandeja con un film plástico (Saram Wrap®), con el fin de mantener condiciones de humedad elevada, dado que las plántulas crecidas *in vitro* son muy sensibles a la deshidratación. A los 2-3 días se realizan agujeros en el plástico, para que las plantas se adapten a las nuevas condiciones ambientales, y finalmente transcurridos 2-3 días, este plástico se retira completamente. Se procede al riego de los tiestos con solución nutritiva<sup>2</sup> por capilaridad, con periodicidad variable, según los requerimientos de las mismas, debido a que el sustrato no posee la cantidad de nutrientes necesarios para soportar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

### Solución nutritiva<sup>2</sup>

REACTIVO	STOCK	CONC. FINAL	Volumen p/15 L
KNO <sub>3</sub>	1 M	5 mM	75 ml
EDTA Férrico	20 mM	50 µM	37,5 ml
MgSO <sub>4</sub>	1 M	2 mM	30 ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 M	2 mM	30 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5,5)	1 M	2,5 mM	37,5 ml
Micronutrientes*			15 ml

\* MnCl<sub>2</sub> 14 µM, CuSO<sub>4</sub> 0,5 µM, ZnSO<sub>4</sub> 1 µM, NaMoO<sub>4</sub> 0,2 µM, NaCl 10 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 µM, CoCl<sub>2</sub> 10 nM

## 1.3 Cultivo líquido

Para realizar el ensayo de estrés de RE, se utilizaron cultivos en medio líquido de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en erlenmeyers con 50 ml de medio nutritivo MS 0,5X, en ausencia o presencia de metoxifenocida (en el

caso de la línea *Red-25.21 1* inducida). Las semillas estériles de Col 0, Ler, *arv1-1:arv2 25.21* y *Red-25.21 1* colocadas en el medio líquido, y previamente estratificadas (apartado 1.1.2), se colocaron bajo condiciones de día largo y en agitación constante de 50 rpm durante 7 días. Al séptimo día, se recogió una parte de las plántulas de cada cultivo, como control no inducido y seguidamente se suplementaron con los inductores de estrés de retículo correspondientes, 5 µg/ml de tunicamicina, o bien 10 mM de DTT. A las 5 h se recolectó el resto de material para ser analizado.

## 2. Material bacteriológico

### 2.1 Cepas bacterianas

- ***Escherichia coli* DH5α**: *sup E44 Δlac U169 (80 lacZΔM15) hsd R17 rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1*.
- ***Escherichia coli* BL21 (DE3)**: *hsdsS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*.
- ***Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90)**: Resistencia a gentamicina y rifampicina

### 2.2 Cepas de levadura

- ***Saccharomyces cerevisiae* YNJ1756**: (*arv1::Kan ade2, his3, leu2, trp1, ura3* (Esta cepa fue cedida amablemente por el Dr. J.T. Nickels del Dep. of Biochemistry, MCP Hahnemann University, Philadelphia, USA)
- **NMY51**: *MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2 LYS2:(lexAop)<sub>4</sub>-HIS3 ura3:(lexAop)<sub>8</sub>-LacZ ade2:(lexAop)<sub>8</sub>-ADE2 GAL4* (Cepa incluida en el kit comercial DUALmembrane kit 3 - Dualsystems Biotech). Cepa auxotrófica para adenina e histidina.

### 2.3 Medios de cultivo

Se ha utilizado el medio YNB<sup>3</sup> e YPG<sup>4</sup> para el cultivo de levaduras, el medio LB<sup>5</sup> para el cultivo de diferentes cepas de *E. Coli* y el medio YEB<sup>6</sup> para el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **YNB<sup>3\*</sup>** - 1litro

YNB (sin aa ni sulfato amónico)	1,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
HEPES	9,5 g
Aminoácidos**	
Agua c.s.p	900 ml
Agar bacteriológico (medio sólido)	15 g
Glucosa (20%)	100 ml

#### **YPG<sup>4\*</sup>** – 1litro

Extracto de levadura	10 g
Peptona	10 g
Agua c.s.p	900 ml
Agar bacteriológico	15 g
Glucosa (20%)	100 ml
Ajustar el pH a 7 con NaOH	

#### **Medio Luria-Bertani<sup>5</sup> (LB)** - 1litro

NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
Agar bacteriológico	15 g
Ajustar el pH a 7.4 con NaOH	

#### **YEB<sup>6</sup>** - 1litro

Extracto de levadura	1 g
Extracto de carne	5 g
Peptona	5 g
Sacarosa	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Agar bacteriológico	15 g
Ajustar el pH a 7 con NaOH	

En el caso de los medios sólidos, se añadió el agar antes de autoclavar el medio durante 20 min a 120°C y 1 atm. Los antibióticos se añaden al medio después de autoclavar y atemperar a 50°C.

\* En estos medios, es necesario esterilizar por autoclave en ausencia de la glucosa, y una vez atemperados a 50°C, añadirla (preparada y autoclavada por separado), de lo contrario se carameliza el azúcar y la solución se torna de color caramelo.

\*\*Se han utilizado los siguientes aminoácidos, según el caso: adenina (40 mg), histidina (20 mg), leucina (60 mg), triptófano (40 mg) y uracilo (20 mg). Añadidos antes de la esterilización por autoclave.

### 3. Vectores plasmídicos

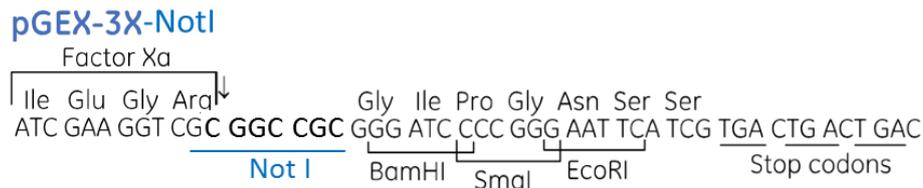
#### 3.1 Vectores para subclonaje

Para la obtención de las construcciones empleadas en diferentes experimentos se han utilizado los vectores intermediarios pBluescript (*Stratagene*) y pGEM-Teasy® (*Promega*). La replicación de estos plásmidos se ha llevado a cabo por transformación en la cepa DH5α de *E. coli*. Las células de la cepa DH5α competentes fueron obtenidas en nuestro laboratorio mediante el método del cloruro cálcico descrito por Seidman *et al.* (1997), con algunas modificaciones.

#### 3.2 Vector para la expresión de proteínas en *E. coli*

El vector pGEXNotI fue utilizado para llevar a cabo la sobreexpresión de las proteínas FPS1S y FPS2, utilizadas para el estudio de cinética y bioquímica de estas isoenzimas. Este plásmido proviene del vector comercial pGEX-3X (Pharmacia Biotech) al cual le fue añadida una diana de restricción *NotI* en el sitio de clonaje múltiple, delante de la diana BamHI, que permite obtener la proteína expresada de manera nativa, con el extremo N-terminal sin ningún aminoácido extra después del tratamiento con la proteasa, el Factor Xa (Montella *et al.*, 2005).

El plásmido pGEX-3X permite expresar una proteína fusionada a la glutatión-S-transferasa (GST), el que facilita la posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Este vector contiene la secuencia del promotor *tac*, el gen que codifica la proteína glutatión-S-transferasa y a continuación una secuencia que codifica para los aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg-X reconocidos por el Factor Xa, lo que permite separar la proteína de interés de la GST. La modificación se había realizado introduciendo por PCR la diana *NotI* en el vector pGEX-3X (Figura 83). El vector modificado se digiere con la enzima *NotI* y se trata a continuación con nucleasa S1 para proporcionar un extremo romo que permite la clonación, manteniendo el marco de lectura, en el extremo 5'- del cDNA de FPS1S o de FPS2, y el extremo 3'- con BamHI.

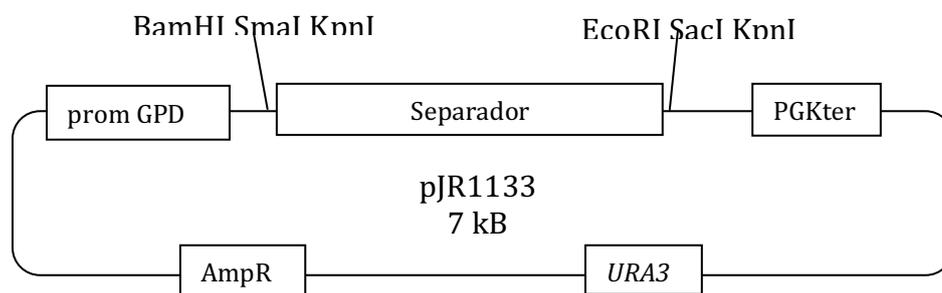


**Figura 83. Esquema de la modificación del sitio de clonaje múltiple del vector pGEX-3X mediante la introducción de la diana NotI.**

### 3.3 Vectores para la expresión de proteínas en levadura

#### 3.3.1 Plásmido pJ1133 usado en el ensayo de complementación funcional en levaduras YNJ1756

Con el fin de expresar diferentes variantes de proteínas AtArv1 en la cepa mutante YNJ1756 se usó el vector pJR1133 (Figura 84) que posee el promotor de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de levadura (GPD), una zona de clonaje múltiple y un terminador de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el gen involucrado en la síntesis de uracilo (*URA3*) y un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Este plásmido ha sido amablemente cedido por el Dr. M. Rodríguez Concepción (CRAG). El vector es idéntico al pJR1138 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999), sólo que en lugar de portar el gen de selección en levadura *LEU2*, lleva el gen *URA3*, lo que permite el crecimiento de las mismas en ausencia de este aminoácido.

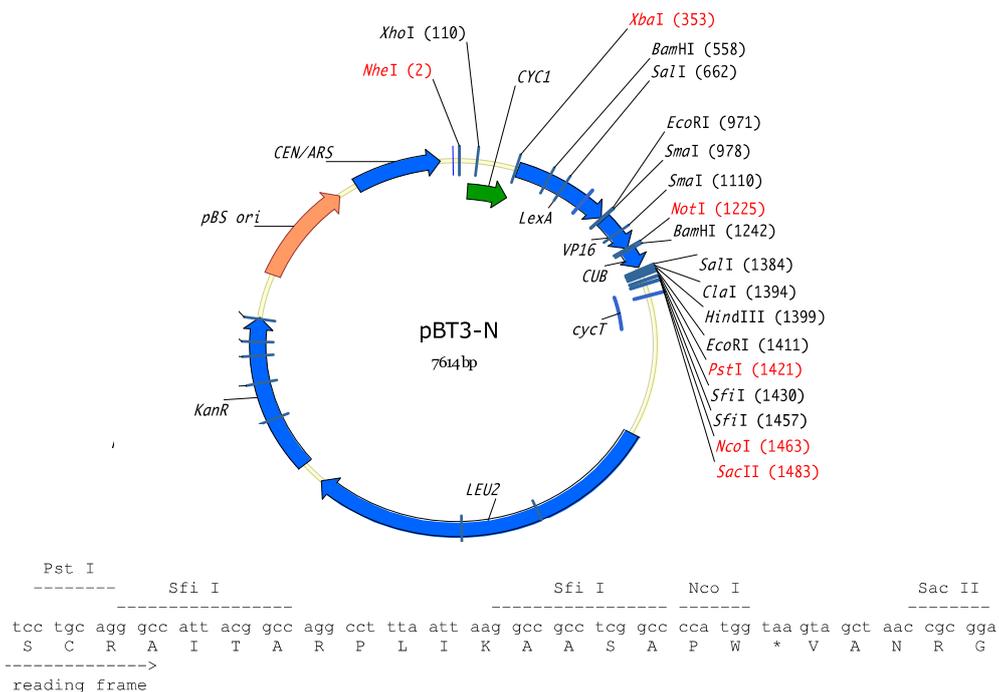


**Figura 84. Vector de expresión en levadura pJR1133. promGPD:** promotor de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa. **PGKter:** terminador de la fosfoglicerato quinasa; **AmpR:** gen marcador de resistencia a ampicilina y **URA3:** gen involucrado en la síntesis de uracilo.

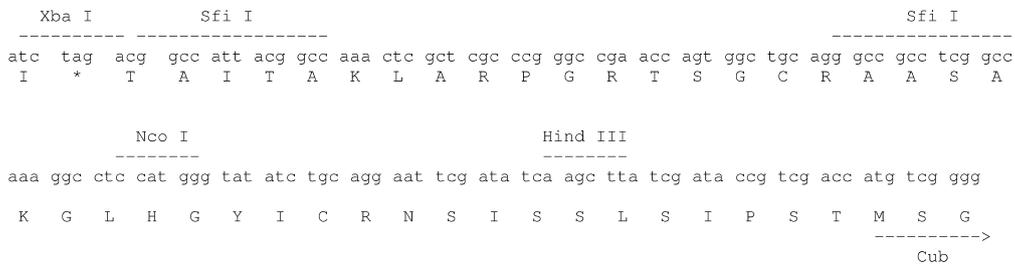
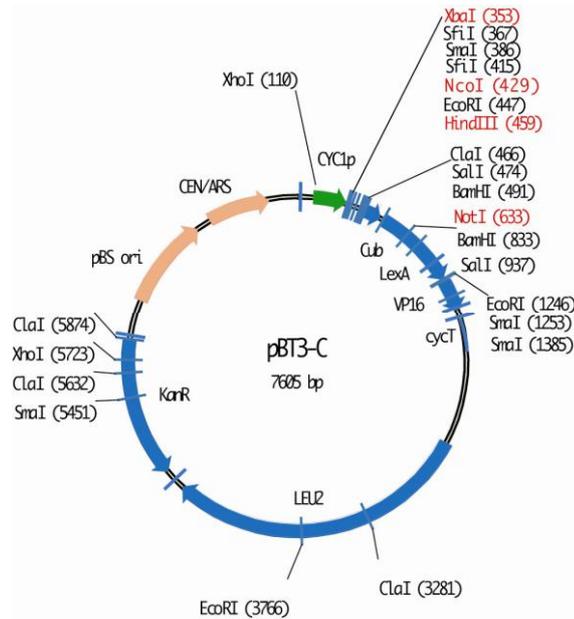
### 3.3.2 Vectores usados en la determinación de la topología de AtArv1

Para llevar a cabo el ensayo basado en el doble híbrido en levaduras para identificar interacciones entre proteínas de membrana mediante la técnica *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two-hybrid*, se utilizaron los plásmidos pBT3N y pBT3C (Dualsystems Biotech) (Figura 85A y B), que contienen la secuencia que codifica la mitad C-terminal de la ubiquitina (Cub) fusionada a un factor de transcripción artificial LexA-VP16, la cual queda fusionada al extremo N- o C-terminal de la proteína de interés clonada (en este caso la proteína AtArv1) respectivamente. Estos vectores poseen, además, un gen que codifica una enzima que interviene en la síntesis del aminoácido leucina, y le confiere la capacidad a la célula de levadura que porta uno de estos plásmidos, de crecer en un medio carente del mismo. Se utilizó también un plásmido control, pAl-Alg5 que codifica la proteína Alg5, proteína del RE en levadura fusionada por su extremo N-terminal a la mitad N-terminal de la ubiquitina (Figura 85C).

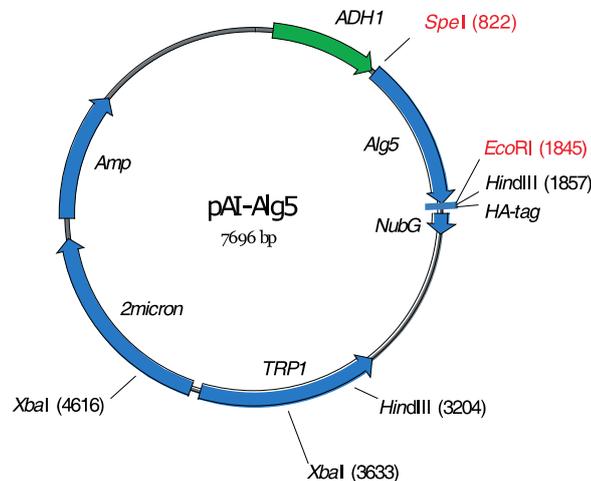
**A**



B



C



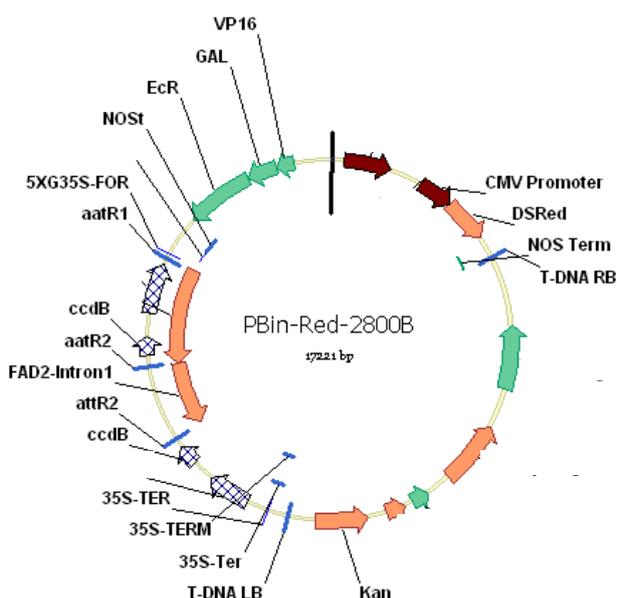
**Figura 85. Esquema de los plásmidos utilizados en el ensayo de *Split Ubiquitin Membrane Yeast Two-hybrid* para determinar la topología de la proteína AtArv1. Plásmidos PBT3 que contienen la secuencia que codifica la mitad C-terminal de la ubiquitina fusionada al factor de transcripción LexA-VP16 y una secuencia de clonaje múltiple donde se ha clonado el cDNA de AtArv1, tanto en el extremo 3' - en el caso del plásmido pBT3-N (A) como en 5' - de Cub, pBT3-C (B). Plásmido pAI-Alg5 que expresa la proteína Alg5 fusionada a la mitad N-terminal de la ubiquitina (C).**

### 3.4 Vectores para la expresión estable de proteínas en plantas de *Arabidopsis*

Para conseguir la expresión estable de proteínas en plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron plásmidos que contienen las secuencias necesarias para la transferencia desde el DNA plasmídico al genoma de la planta y han sido transformados posteriormente en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) con el fin de obtener plantas transgénicas.

#### 3.4.1 Vector de expresión inducible de RNA de interferencia del gen *AtARV1*

Para llevar a cabo el estudio del efecto del silenciamiento del gen *AtARV1* mediante RNA de interferencia (siRNA) inducible, se utilizó el vector pBinRed-2800B (Figura 86), cedido amablemente por el Dr. E. Cahoon, del Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA. Este vector posee los elementos derivados del sistema del receptor de ecdisona. Contiene el dominio de activación VP16 (proteína 16 del virus del herpes humano), el dominio GAL4 de unión a DNA y el dominio del receptor de ecdisona de insecto (miembro de la familia de los receptores de esteroides); todos bajo el control del promotor del virus del mosaico de Cassava (CMV). El plásmido posee también, el gen que confiere resistencia a kanamicina para selección en bacteria y el gen *DsRed* que expresa la Proteína Fluorescente Roja (RFP), la cual permite la selección de semillas transgénicas, a través de la visualización de dicha fluorescencia emitida por las semillas portadoras del transgén. La detección de la fluorescencia se realiza a través de la iluminación con luz verde sobre las semillas e interponiendo un filtro rojo entre el observador y la luz.



**Figura 86. Esquema del vector pBinRed-2800B, utilizado para el silenciamiento del gen *AtARV1* por siRNA.** VP16: proteína 16 del virus del herpes humano; GAL4: dominio de unión a DNA; EcR: dominio receptor de ecdisona; CMV: promotor del virus del mosaico de Cassava; NOSTerm: Terminador de la Nopalina sintasa. Kan: gen de resistencia a kanamicina. ccdB: gen de selección en bacteria. aatR1/aatR2 y attR1/attR2 corresponden a las secuencias para el subclonaje de la secuencia sentido y antisentido del cDNA de *AtARV1* mediante el sistema Gateway®.

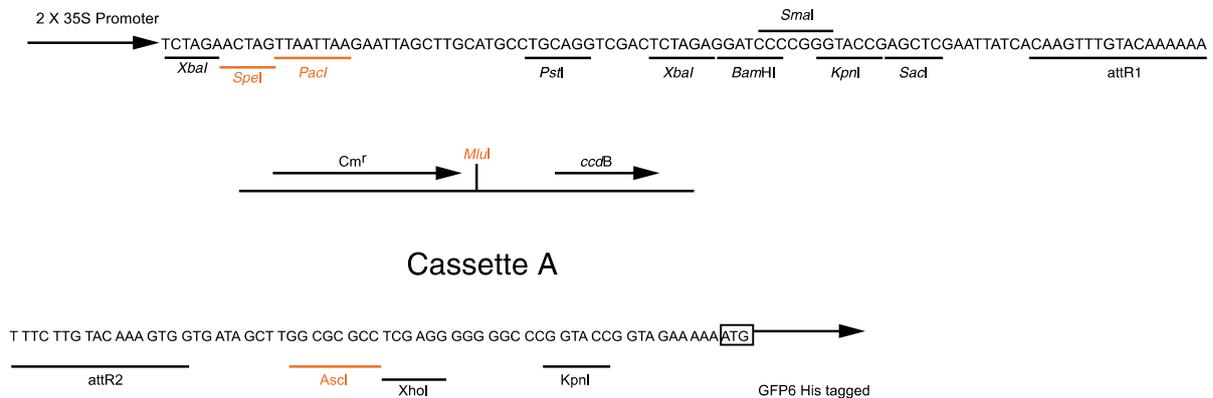
### 3.4.2 Vectores de expresión de los genes quiméricos usados para la reversión de los fenotipos del mutante *fps2-1*

Con el fin de analizar la posible reversión del fenotipo observado anteriormente en nuestro laboratorio en el mutante *fps2-1*, se utilizaron cuatro construcciones denominadas *FPS2p::FPS1S-mutdis*, *FPS2p::FPS1S*, *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*. Éstas se obtuvieron en el plásmido pCA-NOS, que consiste en un vector pCAMBIA1300 modificado, al cual se le añadió entre las dianas de restricción *SacI* y *EcoRI* el terminador de la Nopalina Sintasa, NOS, obtenido a partir del plásmido pBI221 con las mismas enzimas de restricción. El plásmido pCAMBIA1300 confiere resistencia a kanamicina en bacteria y a higromicina en plantas.

### 3.5 Vectores utilizados en la localización subcelular de las enzimas FPS

Para llevar a cabo el estudio de localización subcelular se utilizaron plásmidos comerciales pMDC, Gateway® Technology (Invitrogen), que contienen la secuencia que codifica la proteína GFP, ubicada, según el vector, en el extremo 5' o 3' de la secuencia donde se encuentra la inserción del cDNA de interés. Los vectores pMDC43 poseen la secuencia del gen que codifica la GFP en el extremo 5' del cDNA subclonado (Figura 87A), mientras que el vector pMDC83 posee la secuencia que codifica la GFP en el extremo 3' (Figura 87B). Los plásmidos pMDC actúan bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, poseen dos sitios de recombinación homóloga (los cuales permiten el subclonaje de la secuencia de interés), un gen que confiere resistencia a la kanamicina para selección bacteriana y un gen de resistencia a higromicina para la selección en plantas. Además contiene un gen *ccdB* que facilita la selección en bacterias, impidiendo el crecimiento de aquellas que no contienen el plásmido.



**B****pMDC83**

**Figura 87. Esquema parcial de los plásmidos pMDC.** Se muestran el promotor 35S, los sitios de clonaje por recombinación (attR1 y attR2) y la secuencia que codifica GFP en 5'- en pMDC43 (A) y en 3'- en pMDC83 (B), respecto de la posición de clonaje del fragmento de interés.

#### 4. Determinación de la topología de AtArv1

##### 4.1 Obtención de los plásmidos utilizados para determinar la topología de AtArv1

En primer lugar se amplificó la secuencia de cDNA AtARV1 (con y sin codón de *stop*) utilizando como molde la construcción pMRC-ARV1NGFP y los *primers* ARV1Sfi-S y ARV1Sfi-AS o ARV1SfiNoStop-AS y la DNA polimerasa Pfu. Posteriormente, estos cDNAs amplificados con y sin codón de *stop*, fueron clonados en el plásmido pGEMT, y luego, previa digestión con la enzima SfiI, subclonados en los plásmidos pBT3N y pBT3C, dando lugar a las construcciones finales pBT3N-ARV1 y pBT3C-ARV1, en donde la secuencia del cDNA del gen *AtARV1*, se encuentra clonada en el extremo N- y C-terminal, respectivamente, de la mitad C-terminal de la ubiquitina (Cub) fusionada al factor de transcripción LexA-VP16. Para la obtención de los plásmidos pBT3N-SQS y pBT3C-SQS que portan la secuencia de cDNA que codifica la proteína SQS, se realizó la misma estrategia de subclonado descrita, pero los *primers* utilizados en estos casos fueron SQS SfiI-5 y SQS SfiI-3 o SQS SfiI-3 n/s.

- ARV1SfiI-S  
5'-CGGGCCATTACGGCC**ATGGCGGCGAGTGAACAC**-3'. *Primer* sentido desde el codón ATG de inicio de la traducción del cDNA AtARV1 (en negrita). En gris se indica la secuencia para la diana de la enzima de restricción SfiI.
  
- ARV1Sfi-AS  
5'-CGGGCCGAGGCGGCCTCATACGATTCTGAAAAATAAGAC -3'  
*Primer* antisentido de la secuencia del cDNA AtARV1. En gris se indica la secuencia para la diana de restricción SfiI. El codón de *stop* está subrayado.
  
- ARV1SfiNoStop-AS  
5'-CGGGCCGAGGCGGCCCTACGATTCTGAAAAATAAGAC -3'  
*Primer* antisentido de las últimas bases del cDNA AtARV1 sin codón de *stop*. En gris se indica la secuencia para la diana de la enzima de restricción SfiI.
  
- SQSSfiI-5  
5'-GGCCATTACGGCC**ATGGGGAGCTTGGGGACG**-3'  
*Primer* sentido desde el codón ATG de inicio de la traducción del cDNA SQS1 (en negrita). En gris se indica la secuencia para la diana de la enzima de restricción SfiI.
  
- SQSSfiI-3: 5'-GGCCGAGGCGGCCTCAGTTTGCTCTGAG -3'  
*Primer* antisentido de la secuencia del cDNA SQS1. En gris se indica la secuencia para la diana de restricción SfiI. El codón de *stop* está subrayado.
  
- SQSSfiI-3 n/s: 5'-GGCCGAGGCGGCCCTCAGTTTGCTCTGAGATATG -3'  
*Primer* antisentido de las últimas bases del cDNA SQS1 sin codón de *stop*. En gris se indica la secuencia para la diana de la enzima de restricción SfiI.  
Para lograr el clonaje dirigido en el vector, la secuencia central de la diana SfiI en los *primers* sentido y antisentido son ligeramente diferentes.

#### 4.2 Determinación de la topología de AtArv1 mediante el sistema *Split Ubiquitine Membrane Yeast Two Hybrid* en levadura.

Una vez obtenidas las construcciones pBT3N-ARV1 y pBT3C-ARV1, junto a la construcción pAI-Alg5 incluida en el kit comercial (Dualsystem), se procedió a la co-transformación de la levadura NMY51 con cada una de ellas, pBT3N-ARV1 o pBT3C-ARV1 en combinación con pAI-Alg5, siguiendo indicaciones del protocolo del kit comercial ([www.dualsystems.com](http://www.dualsystems.com)), las cuales fueron posteriormente utilizadas en los ensayos para

determinar la topología de AtArv1, que consiste en sembrar cada cepa transformada con un combinación de plásmidos, por duplicado en una placa YPG e incubarlas a 27°C y 37°C durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se visualiza el crecimiento en la placa incubada a 27°C y se analizan aquellas que crecieron en la placa a 37°C.

## 5. Complementación funcional de la cepa de levadura *S. cerevisiae* YNJ1756

### 5.1 Obtención de los plásmidos pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA para el ensayo de complementación funcional en levadura

Para realizar los ensayos de complementación funcional de la cepa levadura deficiente en Arv1, se obtuvieron las construcciones pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA y AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA. En el caso de la construcción pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA, se utilizó como molde un plásmido pGEMT-ARV1, para amplificar el fragmento de 642pb, AtArv1<sub>214</sub> (desde el codón ATG de inicio de la traducción hasta la última base antes del comienzo de la inserción del T-DNA), mientras que en el caso de la construcción pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA, se utilizó como molde el cDNA obtenido a partir de RNA de muestras de plántulas del mutante *arv1-2* para obtener un fragmento de 729pb, AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA (desde el codón ATG de AtARV1 hasta el primer codón de *stop*, que se encuentra a 88pb hacia el interior de la secuencia del T-DNA). Para la amplificación de ambos fragmentos se utilizaron los *primers* ARV1-BamHI F (sentido) y A1-713 HASall o SalkTDNA HA R (antisentido), respectivamente. En ambos casos, los *primers* antisentido contenían la secuencia que codifica para la hemaglutinina (HA), la cual fue utilizada para la posterior detección de las proteínas mediante *Western blot*. Una vez obtenidos los cDNAs truncado y el quimérico fueron clonados en el plásmido pGEMT y a partir de allí, subclonados en el plásmido pJR1133, mediante digestión con las enzimas BamHI y Sall. Se ha usado la construcción pJRAtArv1-HA como control positivo de complementación funcional de la cepa YNJ1756 (Forés *et al.*, 2006).

- ARV1-BamHI F: 5'-CGGGATCC**ATGGCGGCGAGTGAACACAG**-3'

*Primer* sentido que comienza en el codón ATG de inicio de la traducción (en negrita). En gris se indica la secuencia para la diana de restricción BamHI.

- A1-713 HASall:

5'GTCGAC**TCACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGT**AAATCAAGTGC GCGATTAA  
GC -3'

*Primer antisentido que contiene la secuencia del epítopo HA (marcado en negrita) y parte de la secuencia del cDNA de AtARV1. En gris se indica la secuencia para la diana de restricción Sall. El codón de stop está subrayado.*

- SalkTDNA HA R

5'GTCGAC**TCACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGT**ACTGGTGAAAAGAAAAACC  
AC-3'

*Primer antisentido que contiene la secuencia del epítopo HA (destacada en negrita) y las últimas bases del T-DNA de inserción del mutante arv1-2. En gris se indica la secuencia para la diana de restricción Sall. El codón de stop está subrayado.*

## 5.2 Transformación de la cepa de levadura YNJ1756

La cepa de levadura YNJ1756 es un mutante termosensible capaz de crecer a 27°C, pero no a 37°C debido a una inactivación del gen *ARV1* y necesita el aporte exógeno de los aminoácidos adenina, histidina, leucina, triptófano y uracilo para posibilitar su crecimiento.

Esta cepa fue transformada con las construcciones pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA y pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA mediante el método del acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992), que se detalla a continuación:

1. Inocular una colonia de la cepa YNJ1756 crecida en medio sólido YNB suplementado con los aminoácidos: leucina (60 mg/l) uracilo (20 mg/l) adenina (40 mg/l), histidina (20 mg/l), triptófano (40 mg/l) (YNB ade/his/leu/trp/ura) en 10 ml de medio mínimo líquido suplementado con los mismos aminoácidos e incubar en agitación a 23°C durante toda la noche.
2. Inocular 100-500 µl del cultivo anterior en 100 ml de medio YNB ade/his/leu/trp/ura líquido e incubar toda la noche en agitación a 23°C.
3. Dejar creciendo hasta tener un cultivo que presente una DO<sub>600</sub>= 0,6-0,8 y dividirlo equitativamente en dos tubos falcon 50. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 min a 2500 rpm.
4. Resuspender cada *pellet* de levadura con 10 ml de la solución I. Reunir las dos soluciones de levadura y centrifugar durante 10 min a 2500 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el *pellet* de levadura con un volumen apropiado de solución I, de manera que la concentración final de las células sea 2

x  $10^9$  células/ml, teniendo como referencia del manual *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1997), el cual indica que cuando la absorbancia de un cultivo se encuentra entre 0,3 y 0,5, este posee aproximadamente  $10^7$  células/ml. Incubar 1 h a 23°C. En este momento tenemos las levaduras preparadas para introducir los diferentes plásmidos. Para ello en un tubo *ependorf* se añaden los siguientes componentes:

5  $\mu$ l DNA (aprox. 200 ng/ $\mu$ l) del plásmido pJRAtArv1<sub>214</sub> o pJRAtArv1<sub>214</sub>/TDNA (de ser necesaria una dilución, usar buffer TE 1X)

5  $\mu$ l de DNA de salmón sonicado (50  $\mu$ g)

50  $\mu$ l suspensión celular de levaduras competentes de la cepa YNJ1756 obtenida anteriormente. Se incluye también un tubo extra como control negativo que lleva en lugar de DNA, *buffer* TE 1 X (pH 7.5).

6. Incubar 5-10 min a temperatura ambiente. Añadir 300  $\mu$ l de la solución II e incubar 30 min a temperatura ambiente.
7. Calentar durante 5 min a 42°C. Centrifugar los tubos 2 min a 2000 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 300  $\mu$ l de TE pH 8.
9. Sembrar las levaduras transformadas en placas YNB ade/his/leu/trp e incubar a 23°C. Las colonias capaces de crecer, son aquellas que han incorporado el plásmido pJRAtArv1<sub>214</sub>-HA o pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA-HA.

### 5.3 Ensayo de complementación funcional

Una vez aisladas colonias Ura<sup>+</sup>, se procedió a realizar el ensayo de complementación funcional con el fin de comprobar si la proteína codificada por la construcción que contiene la secuencia que codifica para AtArv1<sub>214</sub>, o bien la proteína quimérica AtArv1<sub>214</sub>/T-DNA eran capaces de complementar la mutación de la cepa YNJ1756 (Swain *et al.*, 2002).

Las colonias aisladas pJRAtArv1, pJRAtArv1<sub>214</sub> o pJRAtArv1<sub>214</sub>/T-DNA han sido estriadas en placas que contienen un medio completo, YPG junto a los controles correspondientes pJRAtARV1-HA (Forés *et al.*, 2006) y pJR1133 y se incuban a 27°C y 37°C. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente de incubación (aproximadamente 48 h), si se observa crecimiento de las construcciones de interés en ambas condiciones de temperatura, significa que estas complementan la cepa.

## 6. Construcciones utilizadas para la generación de plantas transgénicas

### 6.1 Construcción del plásmido pRedArv1 para el silenciamiento inducible del gen *AtARV1*

La obtención de la construcción que contiene los elementos necesarios para el silenciamiento del gen *AtARV1*, se llevó a cabo a través de la tecnología Gateway® (Invitrogen). Este procedimiento se realizó en el laboratorio del Dr E. Cahoon, en el Donald Danforth Plant Science Center- St. Louis USA. En primer lugar, se procedió a la amplificación de un fragmento de 305pb del cDNA del gen *AtARV1* (desde las bases +81 a +386 a partir del codón ATG de inicio de la traducción), utilizando como molde cDNA proveniente de una "library" de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó para ello la polimerasa de alta fidelidad *Phusion*® (*Finnzymes*). Una vez amplificado, se procedió al clonaje del mismo en un plásmido pENTR-D-TOPO® (*Invitrogen*; figura 88).

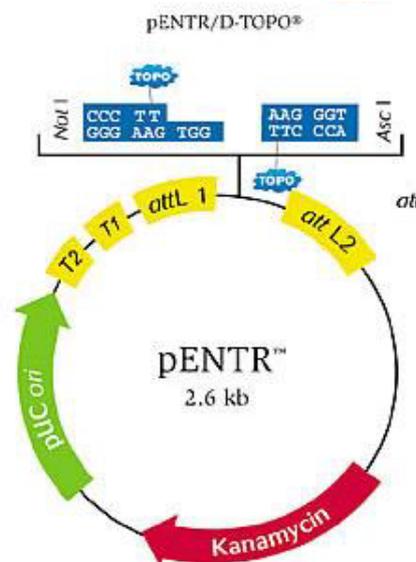


Figure 88. Esquema del plásmido de subclonaje pENTR-D-TOPO (Gateway®-Invitrogen)

Este plásmido permite el clonaje dirigido de fragmentos de extremos romos, debido a la presencia de cuatro bases extras en el extremo 5', añadidas a través de uno de los *primers* utilizados durante la amplificación. Una vez confirmada la presencia del fragmento en el vector, se linealizó el plásmido mediante digestión con la enzima PvuI, con el fin de facilitar el clonaje posterior por recombinación. El subclonaje de este fragmento en el plásmido pBinRed2800B (Figura 85) se hizo por recombinación homóloga. Obteniéndose así, la construcción pRedArv1, que contiene dos copias del mismo fragmento de 305pb de cDNA

del gen *AtARV1*, el primero en orientación 5'-3' entre los sitios *aatR1* y *aatR2*, y el segundo en posición invertida (3'-5') entre los sitios *attR1* y *attR2*, ambas copias separadas por la secuencia nucleotídica del vector perteneciente al intrón *FAD2*.

- ARV1-Fcah: 5'-**CACCGTCTCATGAAATGCGGAAATTG**-3'

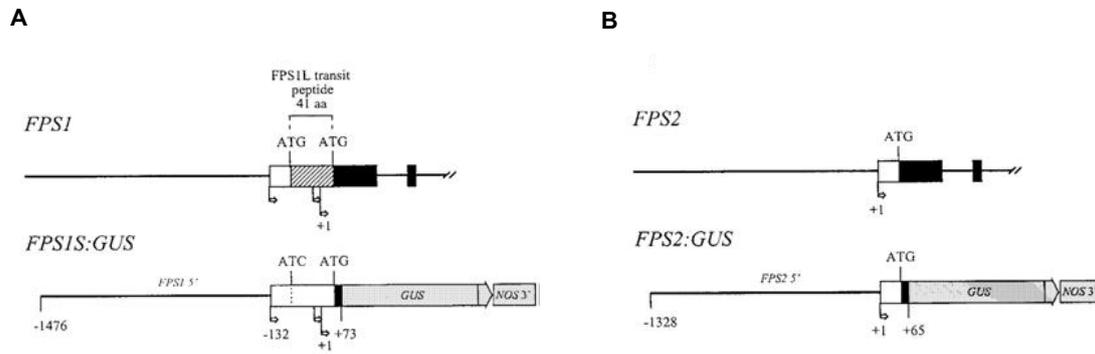
*Primer* sentido desde la base +81 hasta la +104, a partir del codón ATG de inicio de la traducción de la secuencia del cDNA *AtARV1*. Se añadieron 4 bases en el extremo 5' por recomendación del protocolo para el clonaje dirigido del fragmento en el vector TOPO (negrita).

- ARV1-Rcah: 5'-GCAGCGTTTGCAGATAAGACAC-3'

*Primer* antisentido del cDNA *AtARV1* entre las posiciones +365 y +386 (a partir del codón ATG de inicio de la traducción).

## 6.2 Construcciones *FPS::GUS* utilizadas en el análisis de la expresión de los genes *FPS1* y *FPS2*

Para llevar a cabo el estudio de los patrones de expresión de los genes *FPS1* y *FPS2* de *A. thaliana*, se utilizaron dos construcciones obtenidas previamente en nuestro laboratorio (Cunillera *et al.*, 2000) que portan los genes quiméricos *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* clonados en el vector pBI121 (Clontech) y que constan de los promotores de los genes *FPS1* y *FPS2*, respectivamente, fusionados al gen marcador *uidA*, el cual codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E. coli*. El gen quimérico *FPS1S::GUS* contiene 1549pb de la región flanqueante 5' - del gen *FPS1* (1344pb del promotor, 185pb del leader 5' - y 20pb de la región codificante), en donde se ha mutado el codón ATG de inicio de la traducción, que da origen a la isoforma FPS1L, por ATC de tal manera que el transgén codifica solamente FPS1S (Figura 89A). Por otro lado, el transgén *FPS2::GUS* contiene 1393pb de la región 5' - flanqueante del gen *FPS2*, que incluye 1328pb del promotor, 46pb de la región 5' - no transcrita y 19pb de la región codificante (Figura 89B).



**Figura 89. Esquema de los genes quiméricos *FPS1S::GUS* (A) y *FPS2::GUS* (B).** Las cajas negras, indican las secuencias codificantes de los exones 1 y 2 de los genes *FPS1* y *FPS2* de *Arabidopsis*. Las cajas blancas representan secuencias transcritas no traducidas. Las líneas indican los intrones y las regiones 5'-flanqueantes. La caja con líneas oblicuas representa la secuencia que codifica el péptido de tránsito de la isoforma larga, FPS1L, cuya traducción comienza en el primer ATG (mutado en la tercera base, ATC, en *FPS1S::GUS*). Las cajas grises representan el gen *GUS* y el terminador del gen de la nopalina sintasa. Las flechas indican los inicios de transcripción (Cunillera *et al.*, 2000).

### 6.3 Obtención de la construcción *FPS2p::FPS1S-mutdis* para la reversión del fenotipo del mutante *fps2-1*.

Con el fin de revertir los fenotipos observados en nuestro laboratorio en trabajos anteriores, en el mutante *fps2-1* (Closa *et al.*, 2010), se obtuvieron líneas transgénicas de este mutante a partir de cuatro construcciones distintas. Dos de ellos contienen un gen quimérico constituido por la secuencia del promotor del gen *FPS2* fusionada o bien, a la secuencia estructural del gen *FPS1L*, donde se ha mutado la tercera base del codón distal ATG de inicio de la traducción (*FPS2p::FPS1S-mutdis*) o fusionada a la secuencia del gen *FPS1S* a partir del segundo codón ATG (*FPS2p::FPS1S*). Las otras dos construcciones (denominadas *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2*) están formadas por una fusión entre el promotor del gen *FPS1*, que incluye la secuencia *leader*, y se extiende hasta el segundo codón ATG, fusionada a la secuencia codificante del gen *FPS2*. La diferencia entre ambas es que *FPS1mutdisp::FPS2* posee una mutación en la tercera base del primer codón ATG de inicio de la traducción (ATC), mientras que en la construcción *FPS1p::FPS2*, ambos ATG son funcionales.

Los genes quiméricos, *FPS2p::FPS1S*, *FPS1mutdisp::FPS2* y *FPS1p::FPS2* habían sido obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Closa M., tesis doctoral 2007).

Para generar la construcción *FPS2p::FPS1S-mutdis*, se procedió a la amplificación de un fragmento de 1329pb que corresponde a la secuencia del promotor y 46pb del *leader* del gen *FPS2*. Para ello se utilizó como molde el plásmido pBGEN2 (vector pBluescript KS<sup>+</sup>) con

los *primers* Salmutprom2F y Hindprom2R. Por otro lado, se amplificó un fragmento de 3838pb, correspondiente al gen *FPS1* a partir del plásmido pBGen1 (vector pBluescript KS+, el cual posee el gen completo) con los *primers* Ecomutgen1F y SacFPS1. En este caso se introdujo una mutación en el tercer nucleótido del primer codón de inicio (sustituyendo la G por una C) con el fin de expresar únicamente la isoforma FPS1S. Para realizar la amplificación se utilizó la enzima Taq polimerasa de alta fidelidad Pfu (*Stratagene*).

- Salmutprom2 F: 5'-GCGTCGACAGCTTGGAGCATAAG-3'

*Primer* sentido, que corresponde a la secuencia de los primeros 15 nucleótidos del promotor del gen *FPS2* (L46350). Las letras en gris indican la secuencia para la enzima Sall.

- Hindprom2 R: 5'-CCCAAGCTTGATAGGATCAAGGAAGGTGT-3'

*Primer* antisentido desde las posiciones +1347 a +1375 de la secuencia genómica de *FPS2* (L46350). Las letras en gris indican la secuencia para la diana HindIII.

- Ecomutgen1F: 5'-GGGATATCAGTGTGAGTTGTTGTTGT-3'

*Primer* sentido desde la posición +1407 desde el codón ATG de inicio de la traducción (la tercera base G, está cambiada por una C para introducir la mutación e invalidar el primer codón de inicio, negrita) hasta la posición +1427 de la secuencia genómica de *FPS1* (L46367).

- SacFPS1: 5'-TTGGAGCTCTTTGGAATGGAATGTAGG-3'

*Primer* antisentido entre las posiciones +3848 y +3880 de la secuencia genómica *FPS1* (L46367). Las letras en gris indican la secuencia para SacI.

Las secuencias amplificadas del promotor de *FPS2* y el gen *FPS1* fueron purificadas y en el caso del promotor de *FPS2* fue clonada en el vector pGEM-Teasy<sup>®</sup>, dando lugar a la construcción: pGEMTpFPS2; mientras que la secuencia amplificada del gen *FPS1* fue clonada en el vector pBluescript KS<sup>+</sup>, obteniendo así la construcción pBgFPS1. Ambas fueron secuenciadas para confirmar la ausencia de mutaciones.

Posteriormente, se realizó la digestión del plásmido pGEMTpFPS2 con la enzima HindIII y seguidamente se trató en condiciones controladas con 1 U/μl de nucleasa S1 (*Fermentas*), con 20 μl de buffer 5 x en un volumen final de reacción de 100 μl, durante 30 min a 37°C, la cual fue inactivada mediante la adición de 5 μl de EDTA 0,5 M e incubando a 70°C durante 10 min. Con este procedimiento, se obtuvo un extremo plano y ajustado exclusivamente a la

secuencia exacta del promotor FPS2, logrando una fusión sin nucleótidos extra entre el promotor de FPS2 y el gen FPS1S. A continuación se realizó la segunda digestión con la enzima Sall.

En paralelo, se digirió el vector pBgFPS1 con la enzima Sall y EcoRV, obteniéndose el fragmento correspondiente al gen FPS1, para ser subclonado dentro del vector pGEMTpFPS2 digerido previamente como se ha comentado en el párrafo anterior, obteniendo de esta manera, el vector pGEMTpF2-gF1. Por último, se realizó la digestión de este vector pGEMTpF2-gF1 con las enzimas de restricción Sall y SacI y se procedió al subclonaje del gen quimérico promotor de FPS2 y FPS1S-mutdis dentro del vector pCANOS, obteniéndose la construcción final FPS2p::FPS1S-mutdis.

## 7. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

La generación de plantas de *A. thaliana* transgénicas se ha llevado a cabo, utilizando la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 como vehículo para transferir a la planta los genes quiméricos de interés para su integración de forma estable. El procedimiento consiste en obtener las construcciones correspondientes que expresen las proteínas de interés, introducir las en la cepa de *Agrobacterium* y finalmente, infectar la línea de la planta correspondiente con la suspensión de las bacterias transformadas. Para llevar a cabo la infección, se ha utilizado una versión simplificada de la técnica de infiltración al vacío descrita por Bechtold *et al.* (1993) denominada *floral dip* (Clough y Bent, 1998).

### 7.1 Condiciones y preparación de plantas para la agroinfiltración

1. Esterilizar y sembrar las semillas de la línea de *Arabidopsis thaliana* que se desean transformar en placas con medio MS (suplementadas con antibiótico de selección si poseen resistencia a alguno).
2. Aproximadamente a los 12 días se traspasan a tierra y se mantienen bajo condiciones de día corto unas 2-3 semanas.
3. Transcurrido este tiempo, donde desarrollan al máximo la roseta basal, se colocan en un fotoperíodo de día largo. En estas condiciones comienzan a desarrollar el tallo principal con el brote floral (día 20-30). En este momento, debe cortarse el tallo desde la base, con el objeto de eliminar la dominancia apical y favorecer el desarrollo de tallos laterales y obteniendo, así, un mayor número de inflorescencias.

4. A los 10 días posteriores al corte del tallo principal, la planta habrá producido varios tallos laterales. En este momento está en condiciones para proceder a la infiltración. Es conveniente que las flores estén todavía cerradas y que las plantas estén lo más sanas posible, ya que de esta manera resistirán mejor el estrés provocado por el proceso de infección.

## 7.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de la cepa de *A. tumefaciens* se ha llevado a cabo utilizando una variante del método de transformación de células de *E. coli* por choque térmico descrito por An (1987). A continuación se detalla el proceso usado para la cepa GV3101 de *Agrobacterium*.

### 7.2.1 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

1. Inocular una colonia de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* en 10 ml de medio de cultivo YEB que contenga 150 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de gentamicina (ambos antibióticos permiten la selección específica de esta cepa) e incubar a una temperatura de 28°C en agitación constante (160 rpm) durante 20 h.
2. Inocular 40 µl del precultivo anterior en 50 ml de medio YEB-rifampicina-gentamicina. Incubar a 28°C en agitación constante hasta llegar a una  $DO_{595}=0,5$  (aproximadamente 12-18 h).
3. Pasar el contenido del cultivo anterior a un tubo falcon y centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. A partir de aquí es importante mantener las células siempre en frío.
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 10 ml de una solución de NaCl 0,15 M fría. Centrifugar nuevamente las células en las mismas condiciones y resuspender el sedimento en 2 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> 20 mM fría.
5. Distribuir las células en alícuotas de 200 µl y conservar al menos 24 h a -80°C antes de usarlas.

### 7.2.2 Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101

Una vez obtenidas las células competentes, el proceso de transformación de los plásmidos es el siguiente:

1. Descongelar una alícuota de 200  $\mu$ l células competentes obtenidas anteriormente y añadir 1-2  $\mu$ g de DNA del plásmido correspondiente (contenido en un volumen máximo de 20  $\mu$ l), mezclar e incubar en hielo durante 30 min.
2. Incubar las muestras durante 1 min en nitrógeno líquido y posteriormente atemperarlas en un baño a 37°C durante 5 min.
3. Añadir 1 ml de medio de cultivo YEB, e incubar las células a 28°C durante 2-4 h en agitación (120 rpm). Centrifugar el cultivo a 2000 rpm durante 5 min y resuspender las células en 200  $\mu$ l de medio YEB.
4. Sembrar repartiendo el total del volumen en dos placas de Petri que contengan medio YEB con los antibióticos de selección de esta cepa, gentamicina (50  $\mu$ g/ml), rifampicina (150  $\mu$ g/ml) y el antibiótico de selección que posea el plásmido transformado.
5. Incubar a 28°C. Las colonias comienzan a ser visibles a partir de las 36 h de incubación.

### 7.2.3 Genotipado de la cepa de *Agrobacterium* transformada

Una vez concluido este procedimiento, es necesario comprobar que las células transformadas hayan incorporado el plásmido de interés mediante la técnica de PCR.

Para ello, se prepara el subcultivo de una colonia crecida de cada construcción en 3 ml de YEB en presencia de los antibióticos correspondientes, y se incuba durante 12-16 h. Posteriormente, para preparar el molde para la PCR, se añade 1  $\mu$ l del subcultivo a 9  $\mu$ l de agua en un tubo (volumen total de 10  $\mu$ l). Luego se incuba la muestra a 100°C durante 3 min en el termociclador y se mantiene la temperatura a 85°C mientras se prepara la mezcla de reacción de PCR:

dNTP's (10 mM)	1 $\mu$ l
Buffer 10 x	2,5 $\mu$ l
Primer Sentido (10 $\mu$ M)	1,5 $\mu$ l
Primer Antisentido (10 $\mu$ M)	1,5 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
Agua miliQ	9,25 $\mu$ l

Se añade esta mezcla al tubo con la muestra y se mezcla suavemente. Por último se lleva a cabo una amplificación de 35 ciclos en condiciones estándar y se analizan los productos mediante gel de agarosa.

Una vez comprobada la presencia del plásmido de interés, puede almacenarse la cepa transformada de forma permanente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para ello, se realiza un nuevo subcultivo proveniente del cultivo analizado de *Agrobacterium* transformado en 3 ml de medio YEB en presencia de los tres antibióticos y se incuba durante 12-16 h. Transcurrido este tiempo, se prepara un resguardo de la misma, añadiendo 600  $\mu\text{l}$  del cultivo a un tubo que contiene 600  $\mu\text{l}$  de glicerol, quedando a una concentración 50% (v/v).

### 7.3 Condiciones de crecimiento de *A. tumefaciens* transformada

2. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* en un tubo con 3 ml de LB, suplementado con rifampicina (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y el antibiótico correspondiente a la resistencia de cada plásmido. Incubar en agitación constante (180 rpm) a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 16-18 h.
3. Inocular 200  $\mu\text{l}$  del cultivo anterior en 250 ml de LB (preparado en un erlenmeyer de 1 l) con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de resistencia del plásmido. Incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta obtener una  $\text{DO}_{595} = 0,5-1$  (aproximadamente 16-18 h).
4. Pasar el volumen total a un recipiente de 250 ml y centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
5. Durante la centrifugación, preparar 150 ml de una solución de sacarosa (7,5 g de sacarosa y agua estéril).
6. Una vez centrifugadas las bacterias de *A. tumefaciens*, eliminar la mayor cantidad de sobrenadante posible y resuspenderlas con 2,5 ml de la solución de sacarosa.
7. Agregar al volumen restante de solución de sacarosa 45  $\mu\text{l}$  de Silwet-77 (tensioactivo que facilita el proceso de infección) y dejar en agitación suave.
8. Añadir el volumen restante de la solución de sacarosa con Silwet-77 a las células resuspendidas. Agitar suavemente para homogeneizar las células de *Agrobacterium*.

### 7.4 Infiltración de plantas con *A. tumefaciens* GV3101 transformada

El método empleado para conseguir plantas transgénicas es el llamado *floral dip*, descrito por Clough y Bent (1998), introduciendo algunas modificaciones. El objetivo de dicho método es que el *A. tumefaciens* transformado consiga infectar las células germinales de la planta, para que estas, posteriormente originen semillas que portarán el transgén de

interés. Para ello, basta con introducir sólo las inflorescencias de *A. thaliana* dentro del recipiente que contiene la solución de sacarosa con Silwet-77 y la suspensión *A. tumefaciens* transformados y mantenerlas sumergidas entre 20 y 60 seg. Luego se deja reposar las plantas en posición horizontal sobre un papel de filtro en una bandeja y se cubren con film plástico. Se mantienen en esta posición hasta que las inflorescencias comiencen a curvarse hacia arriba, debido al fototropismo (aproximadamente 12-20 h). Una vez transcurrido este tiempo, se quita el film plástico y se colocan las macetas en posición vertical. Es conveniente mantener en condiciones de luz a día largo para favorecer la producción de semillas.

### 7.5 Selección de plantas transgénicas

Una vez realizado el proceso de infiltración de las flores o transformación, y transcurrido el tiempo necesario para que estas plantas produzcan semillas (aproximadamente un mes después de la infiltración), éstas se recogen y se procede a la selección o *screening* de aquellas semillas que portan el transgén. Dependiendo la eficiencia de la transformación y de las condiciones durante el desarrollo de las plantas, habrá un porcentaje de semillas producidas por estas plantas que no habrán incorporado el transgén, de manera que hay que detectar aquellas que si lo han hecho. Cada plásmido Ti transfiere al cromosoma de *Arabidopsis* un gen que otorga resistencia a higromicina o fluorescencia roja (en el caso de las líneas RedArv1) en la planta que lo expresa, de manera que, el proceso de selección consiste en germinar las semillas en medio MS en presencia de dicho antibiótico. Aquellas que sean capaces de crecer evidenciarán la incorporación del transgén, o bien buscar las semillas que presentan fluorescencia roja bajo una luz verde.

El procedimiento de selección por antibiótico es el siguiente:

1. Esterilizar las semillas (apartado 1.1) que provienen de las plantas infectadas (correspondientes a la generación  $T_0$ ).
2. Sembrar las semillas en medio MS suplementado con el antibiótico de selección en plantas. Estratificar y colocar las semillas a crecer en condiciones de luz de día largo.
3. Aproximadamente a los 10-15 días se observa la diferencia en el crecimiento entre las plantas transgénicas de aquellas que no lo son, ya que las primeras desarrollan hojas verdaderas con normalidad, mientras que las no transgénicas presentan el efecto al antibiótico.
4. Confirmada la resistencia de las plantas al antibiótico, se transfieren a tierra para completar su ciclo biológico, obteniéndose así la generación  $T_1$ .

## 7.6 Selección de líneas homocigotas para el transgén

Mientras tiene lugar el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*, la planta incorpora el transgén en una de las dos dotaciones cromosómicas y por lo tanto, la generación  $T_1$  es heterocigota para el transgén. En la generación posterior, por autofecundación de la generación  $T_1$ , se obtiene una descendencia heterogénea, que corresponde a la generación  $T_2$  en la que se pueden hallar plantas homocigotas y heterocigotas para el transgén, así como plantas *wild type* que no han insertado ninguna copia. En el caso de que haya habido una sola integración del T-DNA, estos tres genotipos se encuentran representados en una proporción de  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , y  $\frac{1}{4}$ , respectivamente. Para llevar a cabo los estudios realizados, es de interés contar con líneas homocigotas. Por lo tanto se seleccionaron aquellas plantas de la generación  $T_2$  homocigotas para el transgén, respecto de aquellas que no lo eran. Para ello, se observó la segregación del carácter de resistencia al antibiótico, y por lo tanto del transgén, en la descendencia de la generación  $T_2$ , obtenida por autofecundación y que constituye la generación  $T_3$ . Las plantas homocigotas para el transgén dieron lugar a una descendencia 100% resistente al antibiótico y por lo tanto fueron escogidas para los trabajos experimentales. Por otro lado, las plantas heterocigotas de la generación  $T_2$  generarán una descendencia  $\frac{3}{4}$  resistente al antibiótico y  $\frac{1}{4}$  sensible mientras que las plantas *wild type* producirán una descendencia 100% sensible al antibiótico.

El estudio de la segregación del carácter de resistencia al antibiótico permite, además de la selección de líneas homocigotas, tener una idea del número de integraciones del T-DNA en la planta, ya que las proporciones anteriores son sólo válidas en el caso de una única integración en el genoma. En el caso de haber más de una integración en la generación  $T_1$ , el número de plantas sensibles al antibiótico en la generación  $T_2$  disminuye enormemente (en el caso de haber dos integraciones, esta proporción bajaría de  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{16}$ ).

## 8. Generación de plantas doble mutantes *arv1-1:arv2* y *arv1-2:arv2* por polinización cruzada

La polinización cruzada en plantas de *A. thaliana* permite la incorporación de cambios en el genoma, obteniéndose nuevas líneas que heredan la mitad de la dotación cromosómica de las plantas progenitoras. Una condición que debe tenerse en cuenta es que ambas líneas aporten resistencias de selección diferentes, para poder llevar a cabo la selección de aquellas semillas donde la polinización cruzada ha sido exitosa. La línea mutante *arv1-1* (Salk\_090151) es un mutante *knock down*, que contiene una inserción de T-DNA en la

posición -11, respecto del codón de inicio de traducción del gen *AtARV1*, el mutante *arv1-2* (Salk\_123517) se trata también de un mutante *knock down* y posee la inserción de T-DNA en la posición +1656 respecto del inicio de la traducción en el gen *AtARV1* y la línea mutante *arv2* (ET8675) es *knock out*, y posee una inserción de un elemento Ds en la posición +2 (2pb después del codón de inicio de traducción) del gen *AtARV2*. Las líneas mutantes *arv1-1* y *arv1-2* están en fondo Col 0 y no poseen resistencia a ningún antibiótico, mientras que la línea mutante *arv2*, en fondo Ler, es resistente al antibiótico kanamicina. En este trabajo se llevaron a cabo polinizaciones cruzadas entre los mutantes *arv1-1* y *arv2* por un lado, y por otro entre el mutante *arv1-2* y *arv2*.

El procedimiento consiste en sembrar los dos grupos de plantas que se desea cruzar, un grupo de plantas actúa como receptora del polen (femeninas) y la del otro grupo como donadoras de polen (masculinas). Las plantas que actúan como “femeninas” deben sembrarse 5-7 días después que las “masculinas”, debido a que la diferencia de estadios, permite que las plantas masculinas desarrollen abundancia de flores abiertas, para que posean granos de polen maduros, mientras que las plantas receptoras del polen, deben tener las yemas florales cerradas o con apertura incipiente, ya que de manera contraria, existe el riesgo que haya sido autofecundada. En este caso las plantas *arv1-1* y *arv1-2* han sido seleccionadas como femeninas al no poseer ninguna resistencia, mientras que las plantas del mutante *arv2* fueron utilizadas como masculinas ya que poseen resistencia al antibiótico kanamicina, lo cual permitiría la posterior selección de las semillas procedentes de los cruces. Una vez alcanzadas las condiciones de desarrollo necesarias de las plantas *arv1-1* y *arv1-2*, se seleccionan entre una o tres flores poco desarrolladas, y con pinzas de puntas ultrafinas de disección y cuidadosamente se extraen los pétalos y los estambres en su totalidad, dejando solamente el pistilo íntegro. Este proceso se denomina emasculación. Es importante también eliminar el resto de flores y silicuas presentes en el tallo, para evitar confusiones. Seguidamente, se toma una flor de las plantas donantes (*arv2*) y se esparce el polen de los estambres sobre el pistilo receptor de las flores de *arv1-1* y *arv1-2* emasculadas. Por último, se marca el tallo que posee el pistilo polinizado (añadiendo una pequeña etiqueta), indicando número de flores polinizadas y fecha. Este proceso se repite en varios pistilos de una misma planta. Se dejan las plantas polinizadas en una cámara de cultivo en condiciones de día largo y se repite este mismo proceso tanto en los pistilos polinizados como con nuevas flores durante tres días consecutivos. Es importante mantener un seguimiento del desarrollo de las silicuas provenientes de la polinización y recoger individualmente las semillas de cada silicua una vez terminado el proceso de maduración de las semillas. El paso posterior es sembrar las semillas obtenidas en placas con MS suplementadas con los antibióticos/herbicida a los cuales cada progenitor es resistente. Sólo podrán crecer aquellas donde se haya producido correctamente el cruzamiento.

## 9. Obtención de los plásmidos pGEXFPS1 y pGEXFPS2 utilizados en la expresión en *E. coli* de las isoenzimas FPS1S y FPS2.

En las construcciones de FPS1S y FPS2 fusionadas a la GST se ha usado el plásmido pGEX-3XNotI (apartado 3.2). Los cDNAs que codifican para las isoenzimas FPS1S y FPS2 se amplificaron mediante PCR usando la polimerasa *Pfu* (que deja extremos romos) y los *primers* FPS1Met y FP2Met, y un *primer* común FPSStop y los plásmidos pcNC3 (Cunillera *et al.*, 1997) y pcNC2 (Cunillera *et al.*, 1996) como moldes, respectivamente. Los productos de PCR se digirieron con BamHI, luego fosforilados con la enzima T4 polinucleótido kinasa (Promega) y clonados en el vector PGEX-3XNotI entre las dianas BamHI y NotI, la cual previamente se había convertido en extremo romo, mediante el tratamiento en condiciones controladas con la nucleasa S1, dando lugar a los plásmidos pGEXFPS1 y pGEXFPS2. Estos plásmidos de expresión fueron transformados en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, que había sido previamente transformada con el plásmido pUBS520 que codifica para un tRNA<sup>Arg</sup> poco abundante AGA/AGG (Brinkmann *et al.*, 1989). Las células transformadas se crecieron durante 16 h en placas con medio LB en presencia de 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina (resistencia del plásmido pUBS520). Finalmente se aislaron los plásmidos y se secuenciaron para descartar la presencia de alguna mutación.

FPS1SMet: 5'-**ATG**GAGACCGATCTCAAGTCAACC-3'

*Primer* sentido. En negrita se destaca el codón ATG de inicio de traducción.

FPS2Met: 5'-**ATG**GCGGATCTGAAATCAAACC-3'

*Primer* sentido. En negrita se destaca el codón ATG de inicio de traducción.

FPSStop: 5'-CGCGGATCCCTACTTCTGCCTCTTGTAG-3'

*Primer* antisentido. En gris se destaca la posición de la diana BamHI y subrayado, el codón de *stop*.

### Tratamiento con nucleasa S1

La nucleasa S1 presenta actividad exonucleasa 5' → 3', útil para obtener el extremo NotI romo, eliminando así la secuencia introducida al modificar el vector, que codificaría aminoácidos extra. Posee una gran especificidad para las cadenas sencillas de DNA. El pH óptimo del enzima es de 4-4,3, pero las reacciones se realizan normalmente a pH 4,6 para evitar la depurinación de DNA.

- Adicionar 1 U de la enzima S1 (Promega) por cada 1-4 µg de DNA y 20 µl del buffer del enzima de pH 4,5-4,6 para un volumen final de reacción de 100µl.
- Incubar 30 minutos a 37°C.
- Añadir 3 µl de EDTA 0,5 M para detener la reacción.
- Eliminar la nucleasa S1 mediante el kit *clean up PCR products*.

## 10. Localización subcelular de las isoenzimas FPS1S y FPS2 fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP)

Con el fin de determinar la localización subcelular de las isoformas FPS1S y FPS2, se construyeron genes quiméricos que contenían la secuencia correspondiente al cDNA de FPS1S y FPS2 fusionados a la secuencia nucleotídica que codifica la proteína GFP (Green Fluorescent Protein), tanto en el extremo C-terminal de la GFP (*GFP::FPS1S* y *GFP::FPS2*) como en el N-terminal (*FPS1S::GFP* y *FPS2::GFP*) (Figura 89). Posteriormente, cada una de estas construcciones fueron transformadas transitoriamente en células epidérmicas de cebolla mediante el uso de la técnica de microbombardeo y visualización en microscopio confocal.

### 10.1 Construcciones de los genes recombinantes *FPS1S::GFP*, *GFP::FPS1S*, *FPS2::GFP* y *GFP::FPS2*

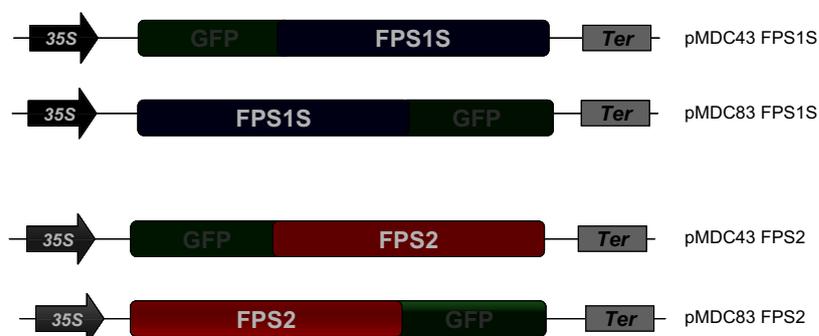
Para realizar el estudio de localización subcelular de las enzimas citosólicas de FPS, se procedió a la expresión de dichas proteínas, fusionadas previamente a GFP. Para la obtención de las construcciones quiméricas correspondientes, se llevó a cabo la inserción de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs de las isoenzimas FPS1S y FPS2 en vectores de expresión pMDC (Gateway®-Invitrogen). En primer lugar, se amplificaron mediante PCR y utilizando una enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Pfu®, *Stratagene*), las secuencias nucleotídicas de cDNA correspondientes a FPS1S y FPS2 de *Arabidopsis thaliana* a partir de los plásmidos pDD7 (que contiene el cDNA de FPS1S) y pCFPSA (que posee el cDNA correspondiente a FPS2).

- FPS1SCDNA-F: 5'-ACGCGTCGACAATGGAGACCGATCTCAAGTCAACC-3'. *Primer* sentido desde el codón ATG de inicio de traducción hasta la posición +24 de la secuencia del cDNA del gen *FPS1S*. En gris se destaca la secuencia de la diana Sall.

- FPS1SEcoRV-R: 5'-CTGTG**GATATCCCTT**CTGCCTCTTGTAGATCTTAGC-3'. *Primer* antisentido ente las bases 1067 a 1090 del cDNA del gen *FPS1*. En gris se destaca la secuencia para la diana EcoRV. Este *primer* no lleva codón de *stop* y se utilizó para las dos construcciones, ya que en *GFP::FPS1S* el codón de *stop* lo proporciona el plásmido pMDC43.
- FPS2CDNA-F: 5'-ACGCG**TGACA**ATGGCGGATCTGAAATCAACCTTC-3'. *Primer* sentido desde el codón ATG de inicio de traducción hasta la base 24 de la secuencia del cDNA del gen *FPS2*. En gris se destaca la secuencia para la diana Sall.
- FPS2 EcoRV-R: 5'-GAGTAT**GATATCCCTT**CTGCCTCTTGTAGATCTTAGC-3'. *Primer* antisentido desde las bases 1049 a 1072 del cDNA del gen *FPS2*. En gris se destaca la secuencia para la diana EcoRV. Al igual que en el caso anterior, este *primer* no lleva codón de *stop* y se utilizó en las dos construcciones.

Una vez amplificados los cDNA de FPS1S (1029pb) y de FPS2 (1039pb), previa purificación mediante gel de agarosa y digestión con las enzimas correspondientes (Sall y EcoRV), se clonaron dentro del vector pENTR3C (Gateway®Technology-Invitrogen), dando lugar a las construcciones pENTR-FPS1S y pENTR-FPS2. El vector pENTR3C posee dos secuencias flanqueantes al fragmento clonado (attL1 y attL2), que permiten pasar en un paso la secuencia introducida en el pENTR3C a los vectores finales de expresión pMDC mediante recombinación homóloga. Ambos cDNAs fueron transferidos tanto al vector pMDC43 como a pMDC83, originándose así las construcciones finales: pMDC43FPS1S, pMDC83FPS1S, pMDC43FPS2 y pMDC83FPS2 (Figura 90).

Cada una de las construcciones, fueron completamente secuenciadas para descartar mutaciones durante la amplificación, comprobar el correcto marco de lectura y fusión con GFP.



**Figura 90. Genes quiméricos *FPS1S* y *FPS2* fusionados a la *GFP* utilizados para el estudio de la localización subcelular de las proteínas *FPS*. 35S: Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Ter: Terminador de la nopalina sintasa.**

## 10.2 Expresión transitoria mediante microbombardeo de los genes quiméricos *GFP::FPS1S*, *FPS1S::GFP*, *GFP::FPS2* y *FPS2::GFP* en células epidérmicas de cebolla

Para lograr la expresión transitoria de los genes quiméricos *GFP::FPS1S*, *FPS1S::GFP*, *GFP::FPS2* y *FPS2::GFP* se obtuvo el DNA plasmídico correspondiente a los plásmidos pMDC43-FPS1S, pMDC83-FPS1S, pMDC43-FPS2 y pMDC83-FPS2, que fue adherido sobre micropartículas de tungsteno e introducidas en células de cebolla utilizando el sistema de microbombardeo *BioRad Biolistic PDS-1000/He* con discos de ruptura de 900 psi (*pound per square inch*) (*BioRad*).

### 10.2.1 Preparación de las micropartículas de tungsteno

1. Pesar 60 mg de micropartículas (tungsteno M10, de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro medio) en un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
2. Lavar las micropartículas añadiendo 1 ml de etanol al 70% y agitar 5 min en vórtex. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 5 seg y descartar el sobrenadante con una pipeta. Añadir 1 ml de agua estéril y agitar en vórtex 1 min.
4. Dejar sedimentar las partículas durante 1 min y centrifugar 5 seg y descartar el sobrenadante con una pipeta.
5. Repetir dos veces más los pasos 3 a 5.
6. Añadir 1 ml de glicerol al 50% estéril y agitar en vórtex 1 min.
7. La suspensión de micropartículas se conserva en glicerol, a la concentración de 60 mg de micropartículas/ml a 4°C y pueden ser utilizadas durante las 2 semanas siguientes.

### 10.2.2 Adsorción del DNA a la superficie de las micropartículas de tungsteno

1. Agitar en vórtex la suspensión de micropartículas preparada anteriormente durante 5 min, para resuspender y romper los posibles aglomerados de micropartículas.
2. Pasar 10  $\mu\text{l}$  de micropartículas (que corresponden a 600  $\mu\text{g}$  aproximadamente) a un nuevo tubo *ependorf* de 1,5 ml. Durante la agitación del tubo en el vórtex, añadir:

1-2 µg de DNA plasmídico correspondiente al gen quimérico de interés

10 µl de solución de cloruro de calcio<sup>7</sup> 2,5 M

4 µl espermidina<sup>8</sup> (*Sigma*) 0,1 M

3. Continuar agitando en vórtex durante 10 min.
4. Dejar sedimentar las partículas durante 1 min. Centrifugar durante 5 seg y descartar el sobrenadante con una pipeta.
5. Añadir 100 µl de etanol al 70% sin resuspender las micropartículas y eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 12 µl de etanol absoluto y resuspender.

### 10.2.3 Microbombardeo sobre los cortes de cebolla

Una vez adherido el DNA a las partículas de tungsteno, se procede a la fase de microbombardeo con el fin de introducir las dentro de las células epidérmicas de cebolla.

En este caso se ha utilizado el sistema *PDS-1000/He* de *Bio-Rad*. Este, utiliza la presión de helio para acelerar las micropartículas de tungsteno recubiertas de DNA que impactarán sobre el tejido vegetal. El procedimiento que se detalla está optimizado para cortes de cebolla frescas (variedad Figueres). Estas se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se colocaron, procurando que la parte interna de la capa cortada quedara hacia arriba, sobre medio MS solidificado con agar al 0,8% (p/v) en placas de Petri, con el fin de mantener la turgencia del material y proporcionar un soporte durante el procedimiento de microbombardeo.

El proceso de montaje y esterilización de los diferentes componentes utilizados durante el microbombardeo se realiza en una cabina de flujo laminar.

1. Abrir la bombona de helio y ajustar la presión a 1100 psi. Esta presión es 200 psi mayor que la resistencia de los discos de ruptura de 900 psi que se utilizarán.
2. Encender la bomba de vacío y el aparato de microbombardeo.
3. Cerrar la cámara y disparar varias veces para eliminar el aire que pueda encontrarse en el conducto desde la bombona de helio.
4. Esterilizar con etanol la superficie de la cabina, el interior de la cámara de bombardeo y cada una de las piezas del interior de la cámara (piezas metálicas, soportes y plataforma). En la cabina, esterilizar las membranas donde se depositan

las partículas de tungsteno recubiertas y las rejillas de parada sumergiéndolas brevemente en etanol absoluto. Los discos de ruptura, se esterilizan sumergiéndolos en metanol. Dejar las piezas esterilizadas sobre un papel secante.

5. Repartir el total del volumen de las micropartículas recubiertas de DNA (12  $\mu$ l) en dos membranas portadoras secas. Dejar unos minutos hasta que se evapore el etanol. Colocar la membrana portadora en el soporte metálico con las micropartículas hacia arriba. Ajustar empleando el tapón rojo diseñado para esa función.
6. Poner una rejilla de parada en el soporte disparador. A continuación, colocar el soporte con la membrana en el disparador, con las micropartículas que contienen el DNA orientadas hacia la rejilla. Cerrar el disparador enroscando el cierre metálico.
7. Colocar el disco de ruptura en su soporte y enroscarlo en el cilindro de gas de la parte superior de la cámara. La distancia entre el disco de ruptura y la membrana portadora debe ser de 4,5 cm.
8. Situar la plataforma con el disparador en el nivel 5 (considerando como nivel 1 el más cercano a la parte inferior).
9. Ubicar la placa de Petri sobre la plataforma plástica y situarla en el nivel 3. De esta forma la distancia entre la membrana portadora y la muestra a bombardear será de 9 cm.
10. Cerrar la cámara y poner en marcha la bomba de vacío.
11. Conectar la cámara de bombardeo y accionar el interruptor del vacío hacia la posición superior. Cuando la presión de vacío llegue a 27 mm (0,06 atm), cerrar el interruptor del vacío hacia la posición inferior, con lo que se mantendrá la presión de vacío. Inmediatamente, pulsar el interruptor de disparo hasta oír la ruptura del disco. En este disparo, el manómetro que mide la presión de helio situado en la parte superior de la cámara mostrará la caída de presión desde 900 a 0 psi.
12. Abrir el vacío llevando la llave a la posición intermedia, hasta que la presión alcance el nivel normal de la presión atmosférica. Nota: los pasos 8 a 10 deben realizarse lo más rápidamente posible para evitar que el vacío pueda dañar el tejido vegetal.
13. Después de cada microbombardeo, descartar el disco de ruptura usado, la membrana portadora y la rejilla.
14. Repetir el procedimiento con la segunda membrana que contiene la otra mitad de las partículas de tungsteno recubiertas y se gira 90° la placa de Petri con el fin de distribuir lo mejor posible el material.
15. Recuperar la muestra vegetal, sellar la placa con Leukopor® e incubarla en una cámara de cultivo en condiciones de oscuridad a 22°C durante 24 h. Donde se producirá la expresión del gen quimérico introducido.

16. Para realizar un nuevo bombardeo volver al paso 5, esterilizando previamente la zona de bombardeo para evitar contaminaciones de diferentes muestras.
17. Una vez acabada la sesión de microbombardeo, limpiar las piezas utilizadas y las partes metálicas del interior de la cámara con etanol al 70%. Cerrar la bombona de helio y hacer el vacío en la cámara hasta que se encienda el botón disparador. Disparar varias veces hasta liberar el helio de los conductos, de manera que la presión vaya disminuyendo con cada disparo hasta llegar a 0. Finalmente romper el vacío y abrir la cámara.

**Solución de CaCl<sub>2</sub><sup>7</sup> - 2,5 M**

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36,75 g
Agua c.s.p	100 ml
Autoclavar 20 min a 120°C	

**Espermidina<sup>8</sup> - 0,1 M**

Solución stock (6,33 M)	15 µl
Agua miliQ estéril c.s.p	1 ml
Se alícuota y almacena a -20°C.	

### 10.3 Observación al microscopio confocal de las células de cebolla transfectadas

Una vez transcurridas 16 h de incubación en oscuridad a 22°C, las muestras se analizaron en la *Unidad de Microscopia Confocal* de la Facultat de Biología (*Serveis Cientificotécnicos de la Universitat de Barcelona*). Las células transfectadas se observaron en primer lugar con una lupa *Leica MZFLIII* para seleccionar las zonas donde se observaba un mayor número de células fluorescentes. Posteriormente, se visualizaron con un microscopio láser de escáner confocal modelo *Leica SP1I*. La fluorescencia verde de las células transformadas correspondiente a la proteína fusionada a GFP, se detectó usando un filtro BP515-525, tras la excitación con láser a 488 nm, mientras que la detección de la RFP, se llevó a cabo utilizando un filtro LP590, previa excitación con láser a 635 nm. En este caso, no hubo solapamiento con la autofluorescencia (roja) proveniente de los cloroplastos, ya que este tejido de cebolla no posee dichos orgánulos. Para llevar a cabo el proceso de obtención de las imágenes y su posterior edición se utilizaron, como soporte informático, los programas Image-J y Adobe Photoshop Elements, respectivamente.

## 11. Análisis de la expresión de los genes quiméricos *FPS1::GUS* y *FPS2::GUS* en semillas de *Arabidopsis thaliana*

Este análisis fue llevado a cabo con el fin de determinar los patrones de expresión, tanto espacial como temporal, de los genes *FPS1S* y *FPS2* en semillas de *A. thaliana* en diferentes estadios de desarrollo. Para ello, se utilizaron semillas transgénicas provenientes de las plantas que portan el gen quimérico *FPS1S::GUS* y *FPS2::GUS* (Cunillera *et al.*, 2000). Este estudio está basado en la actividad  $\beta$ -glucuronidasa codificada por el gen *uidA*. Dicha actividad se ha analizado a través de un ensayo colorimétrico *in situ*. Para esto, las muestras fueron incubadas con una solución que contiene el reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc). Este sustrato, al ser modificado por la actividad enzimática  $\beta$ -glucuronidasa, da lugar a una aglicona que al dimerizar adquiere una coloración azul fácilmente visible (Jefferson *et al.*, 1987).

En lo que respecta a los ensayos realizados, se trabajó con plantas adultas de 30 días de edad aproximadamente, de *A. thaliana*, de la línea de *FPS1S::GUS* (pT2FPS1) y de la línea de *FPS2::GUS* (pTAFPS2) (Cunillera *et al.*, 2000), las cuales poseían silicuas en diferentes estadios de desarrollo. El procedimiento del ensayo se detalla a continuación:

1. Preparar la solución del ensayo GUS<sup>9</sup> y distribuir en alícuotas de 300-350  $\mu$ l en tubos *ependorf*, para la incubación de las semillas en las silicuas abiertas.
2. Seleccionar silicuas de diferentes estadios, desde las menos desarrolladas ubicadas en la parte superior del tallo, hasta las correspondientes a un estadio avanzado, en una posición inferior.
3. Seccionar las silicuas longitudinalmente siguiendo como guía la línea intermedia de la silicua, cuidadosamente, evitando dañar las semillas. Este procedimiento fue realizado mediante la ayuda de microscopio estéreo a 20X y el canto de una aguja hipodérmica superfina. Las silicuas abiertas de esta forma, con las semillas unidas, se depositan en un tubo *ependorf* que contenga la solución de ensayo de actividad GUS.
4. Someter las muestras a vacío durante 10 min. Este procedimiento asegura que la solución de ensayo que contiene el sustrato de la enzima GUS penetre en el material vegetal uniformemente.
5. Incubar a 37°C durante 22-24 h. Luego se procede a la etapa de pre-clarificación de las semillas teñidas, que consiste en incubar las muestras con una solución de etanol al 96% y ácido acético<sup>10</sup> (1:1), durante 4 h, si se trata de silicuas jóvenes (estadios embrionarios globulares o de corazón), u 8 h, si se trata de semillas maduras

(estadios de torpedo o cotiledón). Se ha demostrado que, el añadir tratamiento con etanol y acético previo a la clarificación con la solución de Hoyer's<sup>11</sup>, favorece la clarificación de las semillas, sobre todo en aquellas que son más resistentes a la penetración de la solución de clarificación, ya que se encuentran en estadios de desarrollo más avanzados (Salehian y Stangeland, 2002). La solución etanol-acético se cambia 2-3 veces, si se observa que se torna amarillenta.

6. Posteriormente se procede al proceso de clarificación. En primer lugar se retira la solución de pre-clarificación y se reemplaza por solución Hoyer's (Liu y Meinke, 1998). Esta solución completa el proceso de clarificado de las semillas. Incubar 3-4 días en oscuridad.
7. Transferir las semillas de cada silicua a un portaobjetos. Para ello se debe colocar una gota de solución Hoyer's sobre el portaobjeto, extender la silicua que contiene aún las semillas unidas a la vaina junto a la gota y con cuidado, deslizar la aguja hipodérmica longitudinalmente por la silicua, desplazando con cuidado las semillas hacia la gota de solución. Es posible colocar las semillas procedentes de 2-3 silicuas por portaobjetos. A continuación, cubrir con un cubreobjeto (sin presionar demasiado, excepto que se desee obtener embriones aislados, en cuyo caso, se debe realizar un pequeño movimiento oscilante del cubreobjeto sobre las semillas). Rellenar vacíos con solución Hoyer's en caso que falte cubrir material. Incubar 24 h en oscuridad y visualizar en microscopio.

Para la obtención de las imágenes se ha utilizado un microscopio Zeiss Axiophot, equipado con óptica Nomarski. La cámara acoplada al microscopio es DP70 color de Olympus. Las muestras ya preparadas en portaobjetos se colocan directamente bajo el microscopio y se utilizan los objetivos de 20x (NEOFLUAR 20x/0,50 Ph2), 40x (Plan-NEOFLUAR 40x/1,30oil) o 63x (Plan-NEOFLUAR 63x/1,25oil). Este último sólo fue usado en el caso de estadios pre-globulares.

#### **Solución GUS<sup>9</sup> – 5 ml**

	<b>Stock</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Añadir</b>
Fosfato sódico pH7	0,5 M	50 mM	500 µl
Tritón X-100	10%	0,20 %	100 µl
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]*	6,58 mg/ml	2 mM	500 µl
X-Gluc*	1 mg/10µl DMF	20 mM	50 µl
Agua miliQ			3,85 ml

\* Tanto el X-Gluc como el ferricianuro potásico deben prepararse en el momento

**Solución Pre-clarificación**<sup>10</sup> - 10 ml

Etanol 96%	5 ml
Ácido acético glacial	5 ml

**Solución Hoyer's**<sup>11</sup>

Cloral hidrato	100 g
Agua miliQ	30 ml

## 12. Técnicas con DNA

### 12.1 Extracción de DNA genómico de tejidos de *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de obtener DNA genómico, se han utilizado dos métodos, un kit comercial y el método del CTAB.

#### 12.1.1 *Extracción de DNA mediante kit comercial*

En este caso se utilizó el kit *DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)*. La elección de este método en ciertos experimentos, se debe a que permite obtener un buen rendimiento de DNA, y de buena calidad inclusive partiendo de bajas cantidades de muestra (a partir de 25 mg). Básicamente el método consiste en columnas de silica gel donde se adsorbe el DNA al pasar a través de ellas y luego es eluído. El procedimiento a seguir se encuentra detallado en el protocolo adjunto en el kit.

#### 12.1.2 *Extracción de DNA por el método del CTAB*

Este método fue descrito originalmente por Murray y Thompson (1980) para obtener DNA genómico para ser utilizado en técnicas de *Southern Blot*. El procedimiento es el siguiente:

1. Precalear la solución de CTAB<sup>11</sup> a 65°C.
2. Triturar la muestra (aproximadamente 100 mg) en mortero y nitrógeno líquido o bien, si es un gran número de muestras, usando un sistema mecánico en tubo *ependorf* en el Bullet Blender<sup>®</sup> (Next Advance) el cual permite procesar hasta 24 muestras al

mismo tiempo. Para usar el Bullet Blender® es necesario preparar las muestras, colocando pequeños trozos cortados de la misma en tubos de 2 ml de buena calidad, y agregar dos cucharadas (espátula pequeña) de partículas de silicato de zirconio de 1-2 mm de diámetro. Sumergir brevemente los tubos en nitrógeno líquido, para congelar el tejido, colocarlos en el Bullet Blender® y triturar durante 4 min a velocidad máxima. Una vez terminado el proceso, confirmar que las muestras han sido trituradas, en caso contrario, volver a procesar aquellas que lo necesiten.

3. Preparar la solución de extracción añadiendo 0,8 µl de β-mercaptoetanol por cada 400 µl de solución de CTAB precalentada (proporción de solución de extracción para una muestra).
4. Añadir 400 µl de solución de extracción a cada muestra triturada, agitar con vórtex e incubar a 65°C durante 30 min.
5. Retirar del baño y añadir 400 µl de cloroformo (bajo campana de extracción de gases). Agitar con vórtex durante 1 min. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 min y transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo *ependorf*.
6. Añadir 1 volumen de RNase A (Qiagen) de 100 mg/ml por cada 10 volúmenes de DNA e incubar 30 min a 37°C.
7. Añadir 1 volumen de una mezcla 25:24:1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Agitar con vórtex durante 1 min. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 min y transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo *ependorf*. Repetir este paso una vez más.
8. Precipitar el DNA genómico añadiendo 1/10 volúmenes de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C. Mezclar y centrifugar 20 min a 4°C a máxima velocidad.
9. Extraer el sobrenadante y lavar con 1 volumen de etanol al 70%. Centrifugar 15 min a 4°C a máxima velocidad. Extraer el etanol y dejar secar el contenido en campana hasta que el etanol se haya evaporado.
10. Resuspender el DNA con 100 µl de agua miliQ estéril (el volumen puede variar en función de la concentración esperada).

#### **Solución de CTAB**<sup>11</sup> - 100 ml

CTAB	2 g	
NaCl	8,2 g	
EDTA (0,5 M)	4 ml	
Tris-ClH pH 8 (2 M)	5 ml	
Agua c.s.p	100 ml	
β-mercaptoetanol*	200 µl	*Añadir en el momento

## 12.2 Cuantificación de las muestras de DNA

En ambos casos la concentración de DNA fue medida mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 2000<sup>®</sup>. Este instrumento permite conocer la concentración del DNA de la muestra y además permite determinar la calidad del mismo a través de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (teniendo en cuenta que la relación  $DO_{260/280}$  mientras más cercana a 2, indica mayor pureza de DNA).

## 12.3 Genotipado de los mutantes *arv1* y *arv2*

A continuación se detallan las secuencias de *primers*,  $T_m$  y número de ciclos utilizados en las amplificaciones por PCR en genotipados de los mutantes *arv*.

### Genotipado doble mutante *arv1-1:arv2* (Figura 33)

#### **Alelo endógeno *AtARV1* (431pb)**

genARV1-F: 5'- CCGGCTTAGAGCAAAGTGG-3'

GENARV1 R: 5'- GTGATTA AACAGACCATGCG-3'

$T_m$ : 54°C – 37 ciclos

#### **Alelo mutante *arv1-1* (484pb)**

LB2: 5'- TGCCGATTT CGGAACCACCATC-3'

GENARV1 R: 5'- GTGATTA AACAGACCATGCG-3'

$T_m$ : 54°C – 37 ciclos

#### **Alelo endógeno *AtARV2* (1075pb)**

4ARV1: 5'- CAGACACCATCATCACTAAACGT-3'

GENARV2 R: 5'- GCTGCCAAATTGTAAACCCTC-3'

$T_m$ : 54°C – 37 ciclos

#### **Alelo mutante *arv2* (750pb)**

4ARV1: 5'- CAGACACCATCATCACTAAACGT-3'

Ds 5.1: 5'-GAAACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC-3'

$T_m$ : 54°C – 37 ciclos

### Genotipado mutante simple *arv1-2* (Figura 39)

#### **Alelo endógeno *AtARV1* (418pb)**

Salk1new F: 5'-CTGCTTGCGATGTTGGTATG -3'

Salk517 R: 5'-GTCGGCTCAAAAATCTGACCC -3'

$T_m$ : 60°C – 35 ciclos

**Alelo mutante *arv1-2* (484pb)**

Salk1new F: 5'-CTGCTTGCGATGTTGGTATG -3'

LBa1: 5'- TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG -3'

Tm: 60°C – 35 ciclos

**13. Técnicas con RNA****13.1 Extracción de RNA de *Arabidopsis thaliana***

En el transcurso de este trabajo se han utilizado dos procedimientos para la extracción de RNA, a través del kit comercial *Rneasy Plant Mini Kit* (Qiagen) y el método del reactivo de TRIzol® (Invitrogen). En ambos casos, los tejidos fueron recogidos y triturados individualmente en mortero y nitrógeno líquido. Una vez procesados, pueden guardarse a –80°C hasta el momento de la extracción del RNA. El máximo de muestra a procesar no debe ser superior a 100 mg.

Durante el proceso de obtención y/o manipulación de RNA se exige tomar las medidas necesarias para evitar cualquier contaminación posible con RNAsas, enzimas particularmente abundantes, estables y activas que podrían degradar el RNA. Para evitarlo, todo el material utilizado se esterilizó por autoclave dos veces. El agua usada en la preparación de las soluciones y/o en la solubilización del RNA, fue tratada previamente con DEPC (dietilpirocarbonato, 1ml por litro de agua), un reactivo que modifica los residuos de histidina y tirosina de las proteínas, inactivándolas inespecíficamente. Asimismo, es esencial el uso de guantes en todas las manipulaciones que se realicen.

**13.1.1 Extracción de RNA por el reactivo de TRIzol®**

Este método ofrece la posibilidad de aislar tanto RNA como DNA genómico de un mismo tejido en la misma extracción.

1. Se recoge 100 mg de tejido. Se coloca dentro de un mortero, enfriado previamente con nitrógeno líquido y evitando que se descongele la muestra, triturar la muestra hasta conseguir un polvo fino y homogéneo (de esto depende en gran medida el rendimiento de la extracción).
2. Transferir el tejido pulverizado a un tubo de 2 ml. (en este paso puede almacenarse el tejido triturado a -80°C)
3. Añadir 1 ml del reactivo de TRIzol® por cada 100 mg de tejido.

4. Incubar 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas.
5. Añadir 200 µl de cloroformo, agitar durante 15 seg e incubar a temperatura ambiente 2-3 min.
6. Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4°C. Después de centrifugar se pueden observar 2 fases en el tubo, la fase orgánica inferior (color rojiza) contiene el DNA y las proteínas mientras que en la fase acuosa superior es donde se halla el RNA (este volumen corresponde al 60% del total).
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 500 µl de alcohol isopropílico. Incubar 10 min a temperatura ambiente, para precipitar el RNA.
8. Centrifugar a 4°C durante 10 min a 12000 g.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de RNA con 1 ml de etanol al 75%. Agitar en vórtex y centrifugar a 4°C durante 5 min a 7500 g.
10. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet en campana de flujo laminar 5-10 min. Es importante no secarlo demasiado, ya que disminuiría su solubilidad. Disolver el RNA con 50 µl de agua RNase-free (miliQ tratada con DEPC y autoclavada dos veces). Almacenar a -80°C.

#### 13.1.2 Extracción de RNA mediante un kit comercial

Este método de obtención de RNA se basa en el uso de uno de los múltiples *kits* disponibles en el mercado que permiten la extracción rápida (aproximadamente 1 h) y relativamente sencilla de pequeñas cantidades de RNA de elevada pureza, y por ello, está indicado para la manipulación de un número elevado de muestras. Para llevar a cabo la extracción de RNA en algunos estudios realizados en esta tesis, se optó por el uso del *RNeasy Plant Mini Kit* de *Qiagen*. Este método se basa en la adherencia del RNA a columnas de sílica gel. El procedimiento se encuentra detallado en el protocolo adjunto del mismo kit.

#### 13.2 Cuantificación de las muestras de RNA

Una vez obtenido el RNA, se procede a la comprobación de la calidad y a su cuantificación mediante análisis espectrofotométrico en NanoDrop 2000™.

Existe una variación en el nivel de rendimiento en función del tejido de origen y del sistema de extracción utilizado. En ambos sistemas utilizados, los valores de rendimiento

obtenido oscilan entre los 500 y 2000 ng/ $\mu$ l. La integridad del RNA debe comprobarse asimismo por electroforesis de 0,5-1  $\mu$ g de RNA en un gel de agarosa al 1% en presencia de BrEt.

### 13.3 Tratamiento para eliminar la posible presencia remanente de DNA

Finalizada la extracción de RNA, se alícuota una cantidad del mismo (aproximadamente 5-10  $\mu$ g) y se procede al tratamiento con *DNase*. En este procedimiento se elimina la posible contaminación presente de DNA genómico que hubiera co-purificado. Para este procedimiento se utilizó el kit *DNA-free*<sup>®</sup>, *DNase Treatment and Removal (Ambion)*, donde simplemente se incuba el RNA durante 30 min a 37°C, con 5  $\mu$ l de buffer de *DNase*, 1  $\mu$ l de enzima *DNase free* y se completa el volumen a 50  $\mu$ l con agua *Nuclease free*. Luego se añade 5  $\mu$ l de la resina de inactivación, se incuba 5 min a temperatura ambiente, se centrifuga a máxima velocidad durante 5 min y se traspasa el sobrenadante a un nuevo tubo.

### 13.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA total mediante reacción de retrotranscripción

Una vez obtenido el RNA, se procede a la síntesis de cDNA. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó la enzima *Superscript*<sup>®</sup> *III Reverse Transcriptase (Invitrogen)*. El procedimiento se detalla a continuación.

1. Preparar las mezclas 1 y 2. Tener en cuenta que estos volúmenes son para una muestra y también que el volumen de RNA añadido a la mezcla 1 no debe superar los 13  $\mu$ l.

Mezcla 1		Mezcla 2	
Oligo dT 50 $\mu$ M		<i>Buffer</i> 5 x	6 $\mu$ l
5'-(T) <sub>31</sub> -3'	0,75 $\mu$ l	DTT 0,1 M	3 $\mu$ l
<i>Random Primer</i> 1/60	0,75 $\mu$ l	RNAsin 40 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
dNTP's 10 mM	0,5 $\mu$ l	<i>Superscript III</i>	1 $\mu$ l
Agua c.s.p	15 $\mu$ l	Agua miliQ	4 $\mu$ l
(Recordar incluir el RNA)			

2. Colocar el volumen de la mezcla 1 en los tubos de reacción y añadir el RNA.

3. Colocar en el termociclador (5 min a 65°C, 2 min a 8°C, 10 min a 25°C, 2 h a 50°C y 15 min a 85°C) y esperar al paso 2 del programa donde la temperatura baja a 8°C. En ese momento, añadir los 15 µl de la mezcla 2.
4. Una vez terminado el programa de síntesis de cDNA, las muestras pueden almacenarse a -20°C.

### 13.5 Amplificación del cDNA mediante PCR

Una de las aplicaciones del cDNA obtenido en el paso anterior es determinar la cantidad de mRNA que se está expresando en una muestra determinada, en este caso a través de una amplificación por PCR semicuantitativa.

El programa de PCR es estándar y sólo se ha variado la  $T_m$ , dependiendo de la pareja de *primers* utilizada y la cantidad de ciclos totales.

Mezcla estándar de reacción

CDNA (dilución 1:10)	7,5 µl
dNTP's 10 mM	0,75 µl
Buffer 10 x	5 µl
Primer S 10 µM	1 µl
Primer AS 10 µM	1 µl
Taq pol. 5 U/µl	0,25 µl
Agua miliQ c.s.p	50 µl

Condiciones estándar del programa de amplificación:

95°C - 2 min, 95°C – 45 seg, 95°C – 1 min, repetición de los pasos 2 a 4 – X ciclos,  
**T<sub>m</sub>** – 1 min, 72°C – 10 min, 8°C

A continuación se detallan las condiciones específicas de  $T_m$ , ciclos y *primers* utilizados para las diferentes amplificaciones:

RT-PCR semicuantitativa del mutante *arv1-2* (Figura 40)

**Alelo mutante *arv1-2* (324pb)**

ARV1-S: 5´- GACACGTCCTCTACAATGCA -3´

ARV1-Real R: 5´- CATCGCAAGCAGAAATATC -3´

$T_m$ : 50°C – 28 ciclos

**Actina 2** (828pb)

Act2 F: 5'- GAT CTGGCATCACACTTTCTAC -3'

Act2 R: 5'- GCCTTGGAGATCCACATCTGCTG-3'

Tm: 54°C – 21 ciclos

Amplificaciones en el ensayo de UPR (Figura 53 y 54)**AtARV1** (388pb)

A1RT-S: 5'-GGTGTCTTATCTGCAAACGCTG -3'

A1RT3-AS: 5'-GAAGCTGATGGGATCATAC -3'

Tm: 51°C – 26 ciclos

**PP2A** (307pb)

PP2A For: 5'-TAACGTGGCCAAAATGATGC -3'

PP2A Rev: 5'-GAAGCCAACATTAACATTAGTAGC -3'

Tm: 52°C – 25 ciclos

**BiP** (614pb)

AtBiP F: 5'-TGATCCCAAGAAACACGGTT -3'

AtBiP R: 5'-TCCGCCTGATCTCTGGTAAA -3'

Tm: 55°C – 25 ciclos

**PDI6** (945pb)

AtPDI6 F: 5'-TCACCGAAACCATCTCCAAGCACG -3'

AtPDI6 R: 5'-TCCGTCCTGGAAGTCCTTGAACC -3'

Tm: 55°C – 28 ciclos

RT-PCR del análisis de la expresión del mRNA quimérico *arv1-2/T-DNA* (Figura 44)**Alelo mutante *arv1-2/T-DNA*** (324pb)

ARV1-S: 5'- GACACGTCCTCTACAATGCA -3'

ARV1-Real R: 5'- CATCGCAAGCAGAAATATC -3'

Tm: 60°C – 32 ciclos

RT-PCR en el estudio de reversión del fenotipo del mutante *fps2-1* (Figura 69 y 76)***FPS2p::FPS1S-mutdis*** (548pb) y ***FPS2p::FPS1S*** (425pb)

FPS2Fwd: 5'-GGCTTTGCACACCTTCCTTG -3'

FPS 5: 5'-CCTGTGGATGTGATTGCGAAG -3'

Tm: 50°C – 35 ciclos

***FPS1mutdisp::FPS2 y FPS1p::FPS2*** (1088pb)

FPS1 Fwd: 5'-GGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCGTATCCAA -3'

FPS2 Rev: 5'-CGGAGAGAGGCCCGAGTATG -3'

Tm: 60°C – 34 ciclos

13.6 Amplificación del cDNA mediante *PCR en tiempo real*

La técnica de PCR en tiempo real, presenta una serie de ventajas respecto a la semicuantitativa, ya que permite una evaluación del proceso completo. En esta técnica, las reacciones se caracterizan por el ciclo en el cual la amplificación comienza a detectarse, en lugar de la cantidad de amplicón acumulado al final del proceso total de amplificación. Esto indica, que mientras mayor sea el número de moléculas iniciales de la secuencia que se analiza, más rápidamente se observará un incremento significativo del agente reportero utilizado en esta técnica, llamado SYBR<sup>®</sup> Green (Applied Biosystem). Este reactivo, posee la capacidad de unirse al surco menor del DNA de doble cadena y emitir fluorescencia. Esta característica, permite detectar cualquier DNA de doble cadena y no se necesita ningún tipo de sonda específica, hecho que lo convierte en un sistema más económico que otros.

Respecto al diseño de los *primers*, se deben tener en cuenta una serie de requisitos:

- Tm comprendida entre 58-60°C
- Máximo de 2 G+C en las últimas 5 posiciones del extremo 3'
- Que la longitud del fragmento a amplificar sea entre 80-120pb (y de ser posible, separada por un intrón)

Para detectar la abundancia de los mensajeros *AtARV1*, se diseñó una pareja de *primers* que amplifica un fragmento de 131pb desde la posición +601 a la +732 a partir del codón ATG de inicio de la traducción del cDNA del gen *AtARV1* (AY758070).

1ARV1 3Real-S: 5'- ATGCTTAATCGCGCACTTG -3'

ARV1 3Real As: 5'- GGAAGCTGATGGGATCATACGATT -3'

La abundancia de los transcritos de *AtARV1*, se normalizó en relación de los niveles de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, At3g26650). El tamaño del fragmento amplificado en este caso fue de 101pb desde la posición +433 a la posición +534 respecto al codón ATG de inicio de la traducción del cDNA.

GAPDH F: 5´- CTCCCTTGGAAGGAGCTAGG -3´

GAPDH R: 5´- TTCTTGGCACCAGCTTCAAT -3´

El molde utilizado para esta reacción es cDNA, el cual se diluyó en una proporción 1:5 previamente. El proceso se realiza de manera similar a una PCR convencional, pero se utilizan unos tubos especiales que permiten la lectura de la fluorescencia emitida (*Optical tubes*, Applied Biosystem) y el compuesto SYBR<sup>®</sup> Green Mix que contiene MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, DNA polimerasa AmpliTaq, SYBR<sup>®</sup> Green y ROX (este último es una referencia interna cuya función es corregir fluctuaciones en la fluorescencia, causadas por cambios en la concentración o volumen de las muestras).

Contenido de reacción por cada tubo:

cDNA (de la reacción de RT)	1,6 µl
Primer sentido (10 µM)	0,8 µl
Primer antisentido (10 µM)	0,8 µl
SYBR Green Mix	10 µl
H <sub>2</sub> O	6,8 µl

Las reacciones se llevaron a cabo en una PCR ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

50°C 2 min

95°C 10 min (Activación de la AmpliTaq)

40 ciclos: 95°C 15 seg (desnaturalización)

60°C 1 min (*anealing* y extensión)

La cuantificación se puede realizar de dos maneras: usando el método del  $\Delta\Delta C_t$  o ecuación de Pfaffl. El primero, utiliza la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para determinar la cantidad de transcrito de un gen determinado, normalizado por la expresión de un control interno referido a una muestra control (o no tratada).  $C_t$ , se define como el ciclo en el cual la fluorescencia generada supera un valor umbral. En esta fórmula, se asume que la eficiencia de los *primers* utilizados es del 100%.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gen problema}} - Ct_{\text{Control interno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{Muestra control}}$$

$$\text{Cuantificación relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En el segundo método, es necesario calcular en primer lugar la eficiencia de los *primers* utilizados, valor que se incluye posteriormente en la ecuación final. Para ello, es necesario realizar una prueba con diferentes diluciones de la muestra (5 o 6). Para los *primers* para *AtARV1*, se realizaron las siguientes diluciones: 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80.

$$\text{Eficiencia} = [10^{(1/\text{pendiente})} - 1] * 100$$

Una vez calculada la eficiencia tanto de los *primers* de amplificación del gen *AtARV1* (1,976), como los de la *GAPDH* (2,019), se procede al cálculo del incremento relativo de la expresión del gen de *AtARV1*, respecto al gen control *GAPDH* en cada caso.

$$\text{Incremento} = (\text{Valor de eficiencia})^{Ct_{\text{gen AtARV1}} - Ct_{\text{gen GAPDH}}}$$

Por último, se normaliza los datos obtenidos mediante el ratio del incremento obtenido del gen de interés (*AtARV1*), respecto al del gen normalizador (*GAPDH*).

$$\text{Incremento relativo} = \text{Incremento AtARV1} / \text{Incremento GAPDH}$$

## 14. Técnicas con proteínas

### 14.1. Purificación de las enzimas FPS1S y FPS2 fusionadas a la glutatión-S-transferasa expresadas en *E. coli*

Las proteínas fusionadas a la glutatión-S-transferasa (GST) pueden fácilmente purificarse a partir de un extracto celular mediante cromatografía de afinidad de Glutatión-sefarosa 4B, debido a la afinidad que presenta la glutatión-S-transferasa por el glutatión. Las proteínas se eluyen en condiciones no desnaturizantes para preservar su función y pueden separarse de la GST mediante la proteasa, el Factor Xa.

1. Crecer la cepa BL21 transformada con los plásmidos pGEXFPS1 y pGEXFPS2 en una placa de LB en presencia de 100 µg/ml de ampicilina (resistencia del plásmido pGEX) y 50 µg/ml de kanamicina (resistencia del plásmido pUBS520).
2. Inocular un precultivo de 3 ml de LB en presencia de los mismos antibióticos, dejar unas 5 h en agitación a 37°C. A continuación, inocular 0,5 ml de este precultivo en 30 ml de medio LB en presencia de los dos antibióticos, e incubar en agitación a 37°C durante aproximadamente unas 2,5 h, hasta que la DO=600 nm se encuentre a 0,6 - 0,7. En este momento se induce con IPTG 0,4 M (12 µl de IPTG 1 M en 30 ml de cultivo) y se deja a 20°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche.
3. Centrifugar las células procedentes de cada cultivo repartidas en 2 tubos Corex 30 a 10.000 rpm y a 4°C durante 15 min. Resuspender en 3 ml de PBS el *pellet* de células de cada cultivo.
4. Sonicar las células mediante 4 pulsos de 30 seg y una amplitud de 12, con intervalos de descanso de 1 min a 4°C en un baño de hielo y sal.
5. Centrifugar en tubos Corex 15 a 13.000 rpm durante 30 min a 4°C. Guardar el sobrenadante y resuspender también el *pellet* en 3 ml de PBS<sup>12</sup> con la finalidad de comprobar si las células se han roto y por consiguiente, si la mayoría de la proteína se encuentra en el sobrenadante. Para ello se realiza una electroforesis de una alícuota de 5 µl de *pellet* y de sobrenadante en un gel de SDS-PAGE al 10%.
6. Preparar 2 columnas de Glutión Sepharose™4B (GE Healthcare) de aproximadamente 1,5 ml de lecho (aproximadamente 3 ml de la resina). Equilibrar las columnas a temperatura ambiente con 10 volúmenes de PBS frío.
7. Una vez comprobado que la mayor parte de la proteína se ha solubilizado a temperatura ambiente aplicar a la columna el sobrenadante procedente de la centrifugación de 13.000 rpm. A continuación y en una cámara de 4°C se realiza un lavado con 10 volúmenes de PBS, y se re-equilibra la columna con 10 volúmenes del *cleavage buffer*<sup>13</sup>.
8. Preparar la mezcla de reacción del Factor Xa para separar la proteína FPS del GST que se ha unido a la glutión sefarosa 4B. En un *eppendorf* colocar 50 µl de Factor Xa (50 U) y 950 µl de *cleavage buffer* para cada columna. Dejar actuar a 22°C durante unas 16 h.
9. Eluir en frío con el mismo buffer de la reacción, el *cleavage buffer* y obtener unas 10 alícuotas de 300 µl.
10. Comprobar 10 µl de las distintas fracciones en un gel de poliacrilamida al 10%. Reunir las fracciones que presenten mayor cantidad de proteína, normalmente entre las fracciones 2 a 8.

El paso siguiente consiste en eliminar el factor Xa de las preparaciones de las proteínas purificadas FPS1S y FPS2. Para ello se ha utilizado el “*Xa Removal Resin*” (Qiagen).

1. Utilizar 50 µl de resina por cada 4 U de Factor Xa.
2. Pipetear 800 µl de resina para 50 U de Factor Xa y centrifugar a 1000 x g y a 4°C durante 5 min.
3. Equilibrar la resina, resuspendiéndola en 14 ml de *cleavage buffer* en un tubo falcon 15 y centrifugar a 1000 x g a 4°C durante 5 min. Eliminar el sobrenadante con una punta fina para no perder resina. Repetir este paso.
4. Una vez equilibradas las resinas añadir las fracciones 2 a 6 de FPS1S y las fracciones 3-6 de FPS2, respectivamente, dejar incubando en agitación circular durante 10 min a 4°C.
5. Centrifugar a 1000 x g durante 5 min a 4°C. Recoger el sobrenadante. Volver a centrifugar el sobrenadante 2 veces más para eliminar completamente las partículas de resina que se hayan podido arrastrar, ya que podrían inhibir la actividad de las enzimas.

A las enzimas purificadas libres del Factor Xa se les añade 15% de glicerol para preservar su actividad durante su almacenamiento a -80°C. Comprobar la pureza de las preparaciones de FPS1S y FPS2 en un gel de poliacrilamida al 10%.

Volumen de FPS1S de 1270 µl + 224 µl de glicerol.

Volumen de FPS2 de 885 µl + 156 µl de glicerol.

#### **Solución de PBS**<sup>12</sup> 1 x pH 7,5 - 250 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 80 mM 3,55 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 20 mM 0,78 g

NaCl 100 mM 1,461 g

Llevar a pH 7,4 con NaOH 2 M

#### **Solución de *Cleavage buffer***<sup>13</sup> pH 7,5 - 250 ml

Tris-CIH pH 7,5 50 mM 1,514 g

ClNa 50 mM 0,730 g

Cl<sub>2</sub>Ca.2H<sub>2</sub>O 1 mM 0,036 g

Llevar a pH 7,5 con CIH 2 M

## **Factor Xa**

Resuspender el Factor Xa (Amersham) liofilizado (400 U) con 400  $\mu$ l de agua miliQ autoclavada, y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 50  $\mu$ l (50 U).

### 14.2 Preparación de extractos proteicos de *A. thaliana*

A continuación se detalla el procedimiento usado para la extracción de proteínas de *A. thaliana*, utilizadas en la determinación de la actividad y *Western blot* de las enzimas HMGR y FPS.

#### 14.2.1 *Obtención de extractos proteicos a partir de semillas de Arabidopsis para determinar la actividad y los niveles de proteína HMGR*

1. Pesar 50 mg de semillas secas.
2. Preparar el *buffer* de homogeneización HMGR<sup>14</sup> en presencia de Triton X-100, DTT e inhibidores de proteasas, calculando previamente la proporción necesaria según el número de muestras. En este caso, la proporción es de 8  $\mu$ l de *buffer* por cada 1 mg de semillas.
3. Enfriar el mortero en nitrógeno líquido, colocar las semillas y triturarlas en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Luego, añadir 400  $\mu$ l de *buffer* de homogeneización, y seguir triturando hasta obtener un polvo homogéneo, y a continuación pasar el homogenado a un tubo *ependorf* de 2 ml con la ayuda de una espátula.
4. Dejar los tubos en rotación durante 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , para favorecer la extracción de las proteínas. Centrifugar a 200 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo *ependorf* de 1,5 ml. Puede almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Este sobrenadante, es el que se ha usado, para determinar tanto la actividad HMGR, como los niveles de proteína HMGR por *Western blot*.

#### 14.2.2 *Obtención de extractos proteicos a partir de semillas de Arabidopsis para determinar la actividad y los niveles de proteína FPS*

1. Pesar 25 mg de semillas secas.
2. Preparar el *buffer* de homogeneización FPS<sup>15</sup> en presencia de DTT e inhibidores de proteasas, calculando previamente la proporción necesaria según el número de

muestras. En este caso la proporción es de 20  $\mu$ l de *buffer* por cada 1 mg de semillas.

3. Enfriar el mortero en hielo, colocar semillas, añadir 500  $\mu$ l de *buffer* de homogeneización y triturarlas cuidadosamente en frío, hasta que la muestra se vuelva totalmente homogénea (adquiere un aspecto oleoso). Luego, pasar el homogenado a un tubo *ependorf* de 2 ml con la ayuda de una pipeta e incubar en rotación durante 30 min a 4°C.
4. Realizar dos centrifugaciones seguidas a 4°C, la primera a 200 g durante 10 min y sin separar el sobrenadante, realizar la segunda a 16.000 g durante 20 min. Al final de la centrifugación a 16.000 g obtenemos un pellet y un sobrenadante que contiene una capa gruesa de lípidos acumulados en la parte superior.
5. Transferir a un nuevo tubo *ependorf* el sobrenadante, evitando arrastrar los lípidos de la capa superior. Este sobrenadante, es el que se ha usado, para determinar tanto la actividad FPS, como los niveles de proteína FPS por *Western blot*.

<b>Buffer de homogeneización HMGR<sup>14</sup></b>	<b>Conc.Final (mM)</b>	<b>P/100 ml</b>	<b>Buffer de homogeneización FPS<sup>15</sup></b>	<b>Conc. Final (mM)</b>	<b>P/100 ml</b>
KCl	50	0,37 g	Tris-ClH pH 7,5	50	0,81 g
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O pH7,2	40	0,91 g	Cl <sub>2</sub> Mg	5	5 ml
EDTA pH 8	30	1,13 g	ClNa	10	30 mg
Sacarosa	100	3,42 g	Sacarosa	250	4,28 g
Inhibidores de proteasas*			Inhibidores de proteasas*		
Agua c.s.p		100 ml	Agua c.s.p		100 ml

#### Inhibidores de proteasas\*

Inhibidor	Solución stock	Conc. Final	Volumen cada 1 ml de buffer	
			HMGR	FPS
Tritón X-100	10%	0,05%	50 $\mu$ l	-----
Aprotinina	(3 mg/ml en agua)	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ l	5 $\mu$ l
E64	(3 mg/ml en agua)	1 $\mu$ g/ml	12 $\mu$ l	4 $\mu$ l
DTT	(1 M en agua)	0,5 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ l	5 $\mu$ l
PepstatinA	(3 mg/ml en metanol)	1 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ l	1 $\mu$ l
PMSF	(100 mM en isopropanol)	0,1 mM	15 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Las soluciones stock de los inhibidores se almacenan a -20°C, a excepción del PMSF, a 4°C.

### 14.3 Preparación de extractos proteicos de *S. cerevisiae*

1. Inocular una colonia de cada construcción a ensayar (YNJ1756-pJR1133, YNJ1756-pJRARV1<sub>214</sub>, YNJ1756-pJRARV1 e YNJ1756-pJRARV1<sub>214</sub>/TDNA) crecidas en placa de medio YNB-Ura (auxotrofia para uracilo, utilizada en la selección de la cepa YNJ1756) en 3 ml de YNB-Ura. Dejar crecer las cepas en agitación a 30°C durante 12-16 h.
2. Transferir 500-1000 µl del cultivo anterior a 25 ml de YNB-Ura e incubar en agitación a 30°C entre 12-16 h, hasta alcanzar una  $DO_{595} = 0,8-1$ .
3. Centrifugar 20 ml del cultivo anterior en un tubo falcon 50 a 3000 rpm durante 5 min a 4°C, eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 10 ml de agua miliQ. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con el mismo líquido remanente.
5. Transferir el pellet resuspendido de levaduras a un mortero, previamente enfriado con nitrógeno líquido y triturarlas hasta obtener un polvo fino. Transferir el polvo homogéneo obtenido a un tubo *ependorf*, dejar atemperar y añadir 250 µl del *buffer* de homogeneización.
6. Dejar los tubos en agitación en un agitador orbital a 4°C durante 30-60 min.
7. Centrifugar a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y determinar la concentración de proteína.

### 14.4 Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína de los extractos proteicos de *Arabidopsis* y de levadura, se han utilizado dos métodos colorimétricos.

#### 14.4.1 Método de Bradford

Utiliza como colorante el reactivo comercial *BioRad Protein Assay (BioRad)* y como proteína patrón la albúmina sérica bovina (BSA). Los valores de concentración de proteína se obtuvieron por extrapolación de aquellos procedentes de la recta patrón de albúmina sérica bovina, elaborada dentro de un rango de concentraciones de 0 a 8 µg/ml. Cada muestra se ha medido por duplicado y se ha realizado previamente una dilución 1/10 en extractos proteicos de *Arabidopsis* con el fin de incluir los valores de absorbancia de las muestras dentro del rango de la recta patrón de BSA.

## 14.4.2 Método de Lowry

1. Realizar diferentes diluciones del patrón de albúmina sérica bovina comprendidas entre 0,02 y 0,16 mg/ml, y de las muestras, una dilución 1/10 en caso de extractos proteicos de hojas de *Arabidopsis* y de 1/30 en el caso de semillas secas. El blanco se realiza con solución salina. En el caso de los extractos proteicos en nuestro caso se ha realizado una dilución que se ajusta a este rango de concentraciones de la recta patrón, 1/10, en el caso de extractos proteicos de semillas de *Arabidopsis* en los que se ha medido actividad FPS y de 1/100 en los que se ha medido actividad HMGR.

<b>Patrones BSA (mg/ml)</b>	<b>Volumen BSA 0,4 mg/mL (µl)</b>	<b>Volumen Sol. Salina (µl)</b>
0,02	25	475
0,04	50	450
0,08	100	400
0,12	150	350
0,16	200	300
Blanco	-	500

2. La determinación se realiza por duplicado, sobre 200 µl de los patrones de BSA y de los extractos proteicos diluidos convenientemente.
3. Añadir 200 µl de reactivo alcalino<sup>16</sup> (preparado en el momento a partir de las soluciones stock) cada 20 seg. Agitar en vórtex.
4. Incubar durante 10 min.
5. Añadir 800 µl de reactivo Folin Ciocalteau<sup>17</sup> 0,1 N, cada 20 seg y agitar en vórtex. Incubar durante 5 min a 55°C y enfriar 1 min en hielo.
6. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
7. medir la absorbancia en espectrofotómetro a 650 nm.

**Reactivo alcalino**<sup>16</sup>

Reactivo	gr/100 ml	Soluciones stock	Conc. final	Preparación de 5 ml
Tartrato de K <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> .4H <sub>2</sub> O	13	10%	0,10%	50 µl
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	78	5%	0,05%	50 µl
NaOH	10	2,5 M	10%	1 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	75	12,50%	10%	3,9 ml

**Reactivo de Folin Ciocalteu**<sup>17</sup>

La concentración del reactivo es 2 N, se debe almacenar en frasco de vidrio color topacio (protegido de la luz) y nunca pipetear directamente de ella. Se usa diluido a 0,1 N, (1 ml de reactivo 2 N con 17 ml de agua).

**15. Western blot**

Esta técnica permite detectar y comparar entre diferentes extractos proteicos los niveles de una proteína determinada. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra según su masa molecular, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), en condiciones desnaturizantes. El SDS es un detergente que confiere a las proteínas una densidad de carga negativa proporcional a su masa de forma tal que aplicando un voltaje al gel, se obtiene una migración de todas las proteínas hacia el polo positivo.

En la electroforesis las proteínas desnaturizadas por efecto del SDS migran hacia el polo positivo atravesando el gel apilador (que posee menor concentración de acrilamida) y se acumulan en la interfase de los dos geles. Seguidamente, se separan según su masa molecular al migrar a través del gel separador (contiene mayor concentración de acrilamida).

Posteriormente, se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF y sobre ella se lleva a cabo la hibridación con el anticuerpo primario. Una vez que el anticuerpo ha reconocido la proteína de interés, la membrana se incuba con el anticuerpo secundario, que reconoce las regiones constantes del anticuerpo primario y que está conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (RHP). La unión del anticuerpo a la proteína de interés es finalmente detectada mediante el uso del reactivo *ECL Advanced*<sup>®</sup> Western Blotting Detection Kit (*Amersham*). Este reactivo es transformado por la actividad catalítica de la peroxidasa de

rábano, emitiendo luz suficiente para impresionar una película autorradiográfica. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido y por tanto a la cantidad de proteína de interés presente en la membrana.

### 15.1 Electroforesis de poliacrilamida-SDS (PAGE)

En esta tesis, se han utilizado geles de poliacrilamida-SDS a la concentración del 10% en el caso del Anti-FPS y del 12,5% en el Anti-HA. Tanto la preparación de los geles como la electroforesis se han llevado a cabo mediante el equipo de electroforesis *Mini-Protean 3* (BioRad).

#### Procedimiento:

Antes de preparar el gel, es recomendable preparar el montaje del sistema y llenarlo de agua para comprobar que es hermético. Si es completamente estanco, se elimina el agua y se seca.

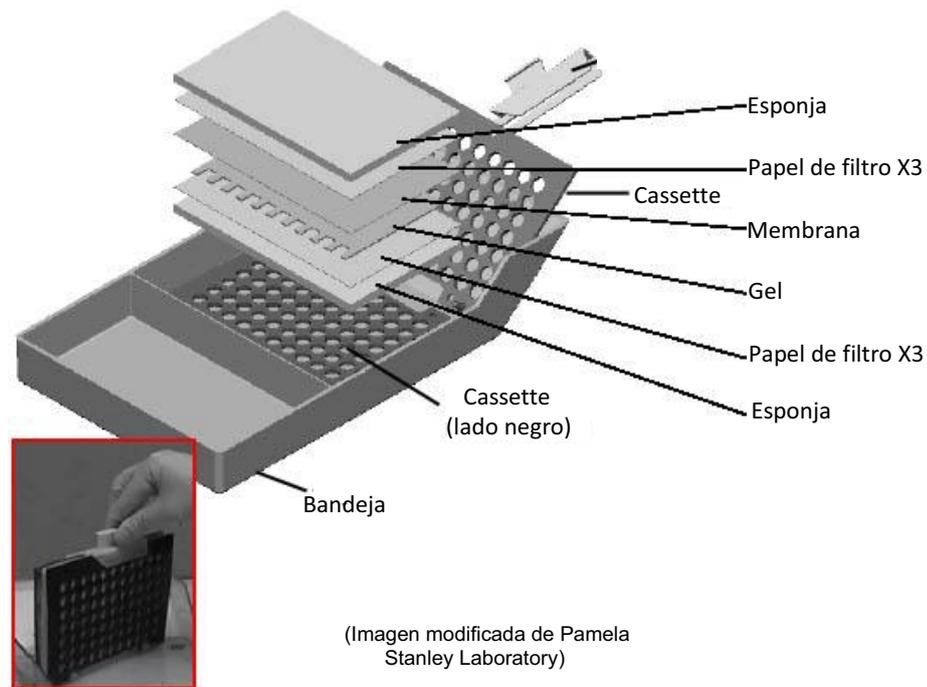
1. Preparación del gel separador: Para ello se prepara la mezcla de la solución del gel separador<sup>18</sup> y se añade en último lugar los catalizadores de la polimerización, el persulfato amónico y TEMED. Rellenar aproximadamente 5 cm de altura, con ayuda de pipeta el compartimento destinado al gel. Añadir a continuación isopropanol de manera que forme una fina capa de unos 5 mm encima del gel separador, para conseguir que la superficie del gel separador sea completamente plana y uniforme. Dejar polimerizar la acrilamida (aproximadamente 30 min). No se debe prolongar este paso más de una hora ya que el alcohol provocaría la deshidratación del gel.
2. Eliminar el isopropanol y limpiar el exceso absorbiéndolo con un papel de filtro. Acabar de rellenar con la solución preparada del gel apilador<sup>19</sup> (previa adición del persulfato amónico y el TEMED extemporáneamente) hasta el extremo superior de los vidrios. Introducir a continuación el peine correspondiente con el número de pocillos adecuado al número y volumen de extractos a sembrar. La homogeneidad del tamaño del poro del gel está asegurada al cabo de unas 2 h.
3. Ubicar el gel preparado en el soporte correspondiente y éste a su vez en la cubeta de electroforesis. Añadir el buffer de electroforesis<sup>20</sup> 1 x hasta cubrir completamente los pocillos.
4. Preparar los extractos añadiendo igual volumen de *sample buffer*<sup>21</sup> e incubándolas a 100°C durante 5 min. Sembrar los extractos y un marcador de tamaño de proteínas (para este proceso se utilizan puntas especiales de 0,57 mm de OD (*Multiflex Round Tips, Sorenson Bioscience, Inc*). Se utilizaron 5 µl del marcador *Prestained Protein*

de *Fermentas* (rango de 20 a 120 kDa). Aplicar un amperaje constante de 20 o 40 mA, según se trabaje con uno o dos geles, respectivamente, hasta que el azul de bromofenol del frente de migración llegue al final del gel.

## 15.2 Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas en función de su masa molecular en la electroforesis, se procede a transferirlas a una membrana de PVDF (*Hybond-P Amersham Biosciences*), la cual será el soporte sobre la que se harán las distintas hibridaciones con los anticuerpos (primario y secundario) y la posterior detección quimioluminiscente. El procedimiento de transferencia es el siguiente:

1. Preparar una membrana de PVDF de la misma medida que el gel (10x5 cm) y sumergirla 10 min en metanol, lavar abundantemente con agua y equilibrarla con el *buffer* de transferencia hasta el momento del montaje del *cassette* de transferencia.
2. Montar el *cassette* de transferencia. Se ha utilizado el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)*. Se coloca en una bandeja el *cassette* del *Trans-blot* con el lado negro hacia abajo. Luego se añade en otra bandeja *buffer* de transferencia<sup>22</sup> y se sumerge en él las dos esponjas y los 6 papeles de papel Whatman 3 MM.
3. Separar los dos vidrios que contienen el gel y con ayuda de un bisturí, retirar la parte correspondiente al gel apilador.
4. Iniciar el montaje se debe respetar el siguiente orden: una esponja, 3 papeles *Whatman* 3 MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa (en caso de detectar alguna burbuja entre el gel y la membrana, eliminarla ayudándose de una pipeta Pasteur), 3 papeles *Whatman* 3 MM y la segunda esponja (Figura 91). Se cierra el *cassette* quedando el gel orientado hacia el polo negativo (negro) y la membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo (blanco).



**Figura 91. Esquema del montaje para la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF.**

5. Insertar el *cassette* en la cubeta de transferencia y llenarla con el resto de *buffer* de transferencia.
6. Aplicar una intensidad de corriente eléctrica constante de 125 mA durante 2-3 h a 4°C, con hielo en la cubeta accesoria, para evitar el incremento de la temperatura durante el proceso.
7. Una vez realizada la transferencia desmontar el *cassette* y recuperar la membrana. Realizar un corte en una esquina para identificar los carriles correspondientes a los extractos, el sentido de la electroforesis y la orientación de la cara dónde se encuentran las proteínas. La membrana puede guardarse seca a temperatura ambiente hasta el momento de su uso o bien continuar inmediatamente con el *Western blot*.

### 15.3 Inmunodetección quimioluminiscente

La detección de la proteína de interés se lleva a cabo sobre la membrana de PVDF mediante la incubación con un anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés. Este anticuerpo primario, es reconocido posteriormente mediante un anticuerpo secundario

anti-IgG conjugado a la peroxidasa de rábano (RHP). La adición del substrato *Lumigen PS-3* del kit comercial *ECLAdvanced® Western Blotting Detection (Amersham)* es procesado por la peroxidasa provocando emisión de luz que permite la detección quimioluminiscente de la proteína marcada en una placa autorradiográfica.

El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Lavar la membrana con PBS<sup>23</sup> 1 X a temperatura ambiente durante 10 min.
2. Incubar la membrana en solución PBS-T-Milk<sup>24</sup> durante 16 h a 4°C. Este proceso de bloqueo de la membrana tiene como objetivo evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario.
3. Realizar dos lavados de PBS-T<sup>25</sup> de 2 min y dos de 10 min, a temperatura ambiente.
4. Incubar con el anticuerpo primario diluido, 1/8000 en el caso del Anti-FPS 9768 y 1/200 en el Anti-HA (Y-11) sc-805 (Santa Cruz), en agitación suave durante 2 h a temperatura ambiente. Repetir el paso 3.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario diluido, anti-IgG de conejo, durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó anti-suero de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano de *Amersham* a la dilución de 1/10.000 para el anticuerpo antiHA y 1/60.000 en el caso del anti-FPS. Repetir el paso 3.
6. Lavar dos veces la membrana con PBS durante 4 min a temperatura ambiente.
7. A continuación se lleva a cabo el proceso de detección. Para el cual se ha usado el sistema *ECL Advanced® Western Blotting Detection Kit* de *Amersham*. Preparar 600 µl (300 µl de cada uno de los reactivos A y B) y añadirlo a la superficie de la membrana que se encuentra sobre una funda plástico transparente, cubrirla con otro plástico flexible transparente para esparcir uniformemente el reactivo. Incubar durante 1-2 min. Eliminar el exceso de reactivo con la ayuda de un papel secante, recolocar la funda de plástico evitando la formación de burbujas de aire entre ella y la membrana.
8. Colocar la membrana protegida por la funda de plástico transparente en un *cassette* de revelado y exponerla a la película autorradiográfica en una cámara oscura. El tiempo de exposición óptimo varía según el anticuerpo utilizado y el experimento, desde pocos segundos a 10 min. Revelar la placa autorradiográfica.

#### 15.4 Tinción de las proteínas de la membrana de nitrocelulosa

La tinción de la membrana de nitrocelulosa después de realizar el *Western blot*, resulta de gran ayuda para confirmar la integridad de las proteínas presentes en la misma, así como

para evaluar la normalización de la cantidad de proteína presente en los diferentes carriles. El procedimiento de tinción se realiza mediante azul de Coomassie de manera irreversible. Para ello, sólo basta colocar la membrana en la solución de tinción<sup>26</sup> con agitación suave durante 5-10 min a temperatura ambiente. A continuación se destiñe la membrana con la Solución de destinción<sup>27</sup> (es necesario reemplazar la solución varias veces hasta que la relación entre la intensidad de las proteínas marcadas y el de fondo resulte óptima).

#### Preparación de 2 geles de acrilamida al 10% de 0,75 mm

(Para detección de proteínas FPS)

##### **Gel separador**<sup>18</sup>

<i>Buffer</i> de gel separador <sup>18.1</sup>	2,5 ml
Sol. Acri/bisacrilamida	3,33 ml
SDS 10%	100 µl
PSA 10% (p/v)	50 µl
TEMED	5 µl
Agua miliQ c.s.p	4 ml

##### **Gel apilador**<sup>19</sup>

<i>Buffer</i> de gel apilador <sup>19.1</sup>	1,25 ml
Sol. Acri/bisacrilamida	670 µl
SDS 10%	50 µl
PSA 10% (p/v)	37,5 µl
TEMED	3,8 µl
Agua miliQ c.s.p	3 ml

#### Preparación de 2 geles de acrilamida al 12,5% de 0,75 mm

(Para detección de proteínas HA)

##### **Gel separador**<sup>18</sup>

<i>Buffer</i> de gel separador <sup>18.1</sup>	2,5 ml
Sol. Acri/bisacrilamida	4 ml
SDS 10%	100 µl
PSA 10% (p/v)	75 µl
TEMED	5 µl
Agua miliQ c.s.p	4 ml

##### **Gel apilador**<sup>19</sup>

<i>Buffer</i> de gel apilador <sup>19.1</sup>	1,25 ml
Sol. Acri/bisacrilamida	670 µl
SDS 10%	50 µl
PSA 10% (p/v)	37,5 µl
TEMED	3,8 µl
Agua miliQ c.s.p	3 ml

**Buffer de gel apilador**<sup>18.1</sup>

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
Pesar 3,0275 g de Tris y llevar a 50 ml con agua. Ajustar el pH con ClH y filtrar.	

**Buffer de gel separador**<sup>19.1</sup>

TRIS-HCl pH 8,8 (1,5 M)	9,08 g
Agua miliQ c.s.p	50 ml
Ajustar el pH con ClH y filtrar.	

**Buffer de electroforesis**<sup>20</sup> - 10 X

Tris HCl pH 8,3	0,025 M	30,025 g
Glicina	0,192 M	144,13 g
SDS	0,1% (p/v)	10 g
Agua miliQ c.s.p.		1 l

**Buffer de transferencia**<sup>22</sup> - 10 X

Tris HCl pH 8,3	0,025 M	30,025 g
Glicina	0,192 M	144,13 g
Agua c.s.p		1 l

**Sample buffer**<sup>21</sup> - 2 X

Tris-ClH 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
Mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Agua miliQ c.s.p	10 ml

**PBS**<sup>23</sup> - 10 X

NaCl	100 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
KCl	2,5 g
Agua miliQ c.s.p	1 l
Ajustar pH a 7,5 con NaOH	

**PBS-T-Milk**<sup>24</sup>

Blotto	1,5 g
PBS-T 1 X	30 ml

**PBS-Tween 20**<sup>25</sup> - 10 X

PBS 10 X	100 ml
Tween 20	500 µl
Agua miliQ c.s.p	1 l

**Solución de Coomasie**<sup>26</sup>

Azul brillante de Coomasie	0,125 g
Metanol	200 ml
Ácido acético glacial	35 ml
Agua miliQ c.s.p	500 ml

**Solución de destinción**<sup>27</sup>

Metanol	400 ml
Ácido acético glacial	70 ml
Agua miliQ	530 ml

## 16. Ensayos de actividad enzimática

Con el fin de medir la actividad de las enzimas FPS y HMGR, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática *in vitro*, en extractos proteicos de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Estos son incubados con una mezcla que contiene el sustrato de la enzima marcada radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ . A continuación se detiene la reacción enzimática y se purifica el producto de la misma para separarlo del sustrato marcado. Finalmente, la actividad enzimática se cuantifica midiendo la radiactividad presente en el producto de la reacción mediante un contador de centelleo.

### 16.1 Determinación de la actividad HMGR

El ensayo de actividad enzimática HMGR se basa en el método descrito por Bach *et al.* (1986). Se han utilizado extractos proteicos de la fracción del sobrenadante a 200 g de semillas obtenidos como se ha descrito en el apartado 14.2.1.

#### 16.1.1 Reacción enzimática

1. Colocar en un tubo *ependorf*, 26,5  $\mu\text{l}$  de extracto proteico del sobrenadante de 200 g de semillas y añadir 33,5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción<sup>28</sup> (volumen final, 60  $\mu\text{l}$ ). Mezclar suavemente con el vórtex.
2. Preparar un blanco de la reacción mezclando 26,5  $\mu\text{l}$  de *buffer* de homogeneización HMGR y 33,5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción, y procesarla en paralelo junto a las muestras.
3. Incubar durante 2 h a 37°C (este tiempo se utiliza en el caso de semillas, pero puede reducirse en función del tejido ensayado).
4. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de HCl al 25%<sup>29</sup>, para cambiar el pH del medio de reacción e inactivar las enzimas e incubar durante 15 min a 50°C. El objetivo es lactonizar el mevalonato producido por la enzima. El proceso de formación de lactonas es necesario para la separación del [ $^{14}\text{C}$ ] mevalonato producido por la enzima del [ $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA que no ha sido transformado mediante cromatografía en capa fina.
5. Enfriar las muestras durante 4 min a -20°C y centrifugar los tubos durante 2 min a 10.000 rpm.

<b><u>Mezcla de reacción</u></b> <sup>28</sup>	<b>Stock</b>	<b>Conc. final</b>	<b>P/33,5 µl</b>
HMG-CoA frío <sup>28.2</sup>	0,8 mM	33,3 µM	2,5 µl
HMG-CoA ( <sup>14</sup> C) <sup>28.3</sup>	0,338 mM	14,11 µM	2,5 µl
DTT	170 mM	4,25 µM	1,5 µl
G-6-PdH <sup>28.4</sup>	0,25 U/ µl	0,0083 U/µl	2 µl
Solución cocktail <sup>28.1</sup>			25 µl

<b><u>Solución cocktail</u></b> <sup>28.1</sup>	<b>Stock</b>	<b>Conc. final</b>	<b>P/100ml</b>
Tris-HCl pH 7,2	500 mM	208,3 mM	50 ml
EDTA	120 mM	50 mM	12 ml
Glucosa-6-fosfato	120 mM	50 mM	3,65 g
NADP <sup>+</sup>	6 mM	2,5 mM	0,47 g
BSA	1,2 mg/ml	0,5 mg/ml	0,12 g
Agua miliQ c.s.p			100 ml

### **Sustrato HMG-CoA frío**<sup>28.2</sup>

Preparar una solución stock 4 mM disolviendo 5 mg de HMG-CoA (DL-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, *Sigma*) en 1,371 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 4,5 y una vez disuelto, distribuir en alícuotas de 100 µl que se conservan a -80°C. En el momento de usarla diluirla a 0,8 mM con buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 4,5 (dilución 1:5).

### **Sustrato marcado (<sup>14</sup>C-HMG-CoA)**<sup>28.3</sup>

Se utiliza 3-hydroxy-3-methyl [3-<sup>14</sup>C] glutaryl coenzyme A (Code CFA732, *Amersham-Pharmacia Biotech*) 20 µCi/ml, 59 mCi/mmol. El peso molecular del HMG-CoA no marcado es 912 y el del marcado con esta actividad específica es de 914.

### **Gliceraldeído-6-deshidrogenasa**<sup>28.4</sup> - 0,25 U/µl

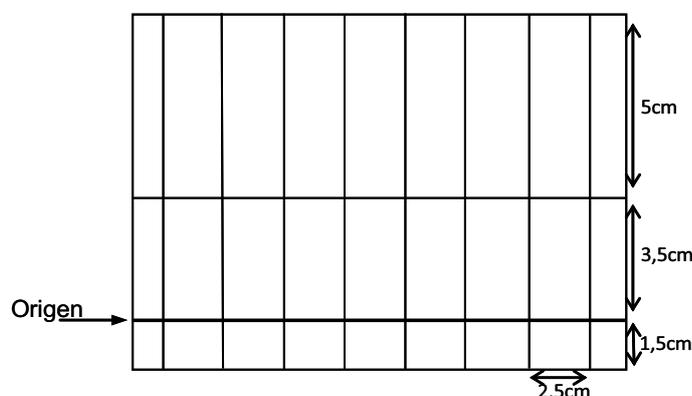
Disolver 1000 U de la enzima Glucosa-6-P-deshidrogenasa liofilizada (*Boheringer*) en 4 ml de citrato sódico 5 mM pH 7,4. Conservar en alícuotas a -20°C.

### **Solución de HCl**<sup>29</sup> 25%

Diluir 10,13 ml de ácido clorhídrico (al 37%) con 4,87 ml de agua.

### 16.1.2 Cromatografía en capa fina

La purificación del mevalonato producido en la reacción enzimática de la HMGR se realiza mediante una cromatografía en capa fina (TLC) en un soporte de Silicagel 60 (*Merck*). La placa, de 20 x 20 cm, se corta en dos fragmentos de 20 x 10 cm. En cada fragmento, se marcan 7 carriles de 2,5 cm cada uno en sentido vertical, eliminando la sílica en la separación de cada carril con la punta de una pipeta, para evitar la mezcla de las muestras de dos carriles diferentes. El origen de la cromatografía se sitúa a 1,5 cm de la parte inferior de la placa y se marca con lápiz. Asimismo, se identifica también una línea a 3,5 cm del origen (ambas en sentido horizontal) por encima de la cual se situará el producto (la mevalonolactona), una vez se haya efectuado la cromatografía (Figura 92).



**Figura 92. Representación esquemática de las divisiones realizadas sobre una placa de silicagel 60 utilizada en la cromatografía de capa fina para la separación de los productos de reacción del ensayo de actividad enzimática HMGR.**

Se siembran 35  $\mu\text{l}$  (de los 70  $\mu\text{l}$  totales), dosificándolos lentamente en pequeñas gotas sobre la línea marcada a 1,5 cm de la parte inferior, y se acelera el secado por acción de un secador convencional. Es importante evitar el contacto de la punta de la pipeta con la sílica de la placa cromatográfica ya que ésta podría deformar la superficie o eliminar la sílica y alterar así el resultado final de la cromatografía.

Una vez sembradas las muestras y completamente seca la placa, se coloca en una cubeta de vidrio que contiene una mezcla de acetona:benceno (1:1), preparada con anterioridad con el fin de saturar la cubeta con los vapores de la fase móvil. Se deja progresar esta fase hasta el límite superior de la placa (10 cm) durante 20 min. Una vez alcanzado este punto, se retira la placa y se deja secar completamente. Este proceso se realiza íntegramente en campana de extracción de gases, debido a la manipulación de disolventes orgánicos.

### 16.1.3 Cuantificación de la mevalonolactona marcada con [ $^{14}\text{C}$ ]

Una vez evaporado totalmente el disolvente de la placa TLC, se humedece la placa con agua destilada mediante un pulverizador y se recupera la mevalonolactona, rascando (con ayuda de un bisturí) los 5 cm de sílica de la parte superior de la placa. La sílica obtenida se deposita dentro de un vial de centelleo y se añade 10 ml de líquido de centelleo *Cytostint<sup>TM</sup> ES (ICN)*. Paralelamente, en otro vial, se mezclan 33,5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción con 10 ml de líquido de centelleo, que servirá para cuantificar la actividad específica de la mezcla de reacción usada. Finalmente se cuantifica la radiactividad en un contador de centelleo (Hewlett Packard).

### 16.1.4 Cálculo de la actividad específica

La actividad específica de una enzima se expresa en U/mg proteína. Cada unidad de actividad de la enzima HMGR se define como pmoles de sustrato transformado en producto por minuto a 37°C. A continuación se detalla el cálculo utilizado para obtener el valor de la actividad específica.

<b>Actividad específica (pmol HMG-CoA/min.mg)=</b>												
cpm	x	$\frac{\text{pmol HMG-CoA en mezcla}}{\text{cpm mezcla reacción}}$	x	$\frac{1}{\text{min de reacción}}$	x	$\frac{1}{\text{vol. extracto (26,5 } \mu\text{l})}}$	x	$\frac{\text{vol. Total (70 } \mu\text{l})}{\text{vol. en TLC(35}\mu\text{l)}}$	x	$\frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}}$	x	$\frac{\text{mg proteína}}{\text{ml de extracto}}$

**pmol de HMG-CoA en mezcla de reacción**= 2000 pmoles HMG-CoA frío (2,5  $\mu\text{l}$  0,8 mM) + 847 pmoles de [ $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA (2,5  $\mu\text{l}$  0,338 mM)= 2847 pmoles.

### 16.2 Determinación de la actividad FPS

La técnica utilizada para realizar la medición de la actividad de las enzimas FPS es la descrita por Chambon *et al.* (1990) con algunas modificaciones.

Los extractos proteicos de semillas de *Arabidopsis* utilizados han sido obtenidos como se ha descrito en el apartado 14.2.2, se ha usado la fracción correspondiente al sobrenadante de la centrifugación a 16.000 g.

El procedimiento consiste en incubar el extracto proteico con la mezcla de reacción que contiene el sustrato radiactivo ( $^{14}\text{C}$ -IPP). La reacción se detiene por cambio de pH. El

medio ácido facilita la hidrólisis de los grupos fosfato tanto del sustrato IPP como del producto FPP, ambos marcados radioactivamente. El producto marcado de la reacción, el  $^{14}\text{C}$ -FPP, desfosforilado es más hidrofóbico por lo que se purifica mediante extracción con hexano y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada al producto mediante un contador de centelleo. Este procedimiento se utilizó para los ensayos bioquímicos en la determinación de la concentración óptima de  $\text{MgCl}_2$  (Figura 59), inhibición por FPP (Figura 62), análisis de los efectos a alta temperatura (Figura 63) y al  $\text{NaCl}$  (Figura 61), a partir de aproximadamente las mismas unidades de enzima purificada.

### 16.2.1 Reacción enzimática

1. Colocar en un tubo *ependorf* de 2 ml la cantidad del extracto proteico a ensayar, normalmente 30  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de 16.000 g procedente de 25 mg de semillas secas y se completa el volumen final hasta 68  $\mu\text{l}$  con *buffer* de homogeneización FPS.
2. Añadir 12  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  25 mM e iniciar la reacción añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción<sup>30</sup> a cada tubo, cada 15 segundos e incubar durante 30 min a 37°C.
3. Detener la reacción añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de agua y 86  $\mu\text{l}$  de HCl 2 M enfriados previamente a 0°C. Incubar en hielo durante 1 min y luego 30 min a 37°C para hidrolizar los grupos fosfato. El HCl proporciona el pH necesario para lograr una desfosforilación en medio ácido.
4. Añadir NaCl a saturación (aproximadamente una punta de espátula).
5. Añadir 900  $\mu\text{l}$  de hexano y agitar en vórtex durante 1 min. El FPP sintetizado, una vez desfosforilado será extraído por el hexano, pero no se extraerá el  $^{14}\text{C}$ -IPP, a pesar de estar también desfosforilado, menos hidrofóbico que el FPP.
6. Centrifugar los tubos en una microcentrifuga a 8000 rpm, durante 10 min a 4°C para forzar la separación de las dos fases y recoger 500  $\mu\text{l}$  de la fase hexánica. Colocarla en un vial que contiene previamente 10 ml de líquido de centelleo *ECOSCYNT H* (*National Diagnostics*).
7. Cuantificar la radioactividad (c.p.m) en un contador de centelleo (*Hewlett Packard*).

Mezcla de reacción <sup>30</sup> - 5 X	Stock	Conc. Final	Volumen 20 µl
GPP	4 mM	100 µM	2,5 µl
[ <sup>14</sup> C]IPP*	20 mCi/mmol 0,357 mM	13,39 µM	3,75 µl
IPP	4 mM	92 µM	2,3 µl
50 mM TRIS-CH pH 7,5 NaCl 10 mM - MgCl <sub>2</sub> 5 mM Sacarosa 250 mM - Con inhibidores			11,375 µl

\*Sustrato marcado (<sup>14</sup>C-IPP): Se utiliza [1-<sup>14</sup>C] Isopentenyl pyrophosphate, ammonium salt (3-methyl-[1-<sup>14</sup>C]but-3-enylpyrophosphate). Code CFA476, (Amersham-Pharmacia Biotech) 20 µCi/ml, 56 mCi/mmol. Pm 299,1.

### 16.2.2 Cálculo de la actividad específica

La actividad específica se expresa en U/mg de proteína. La unidad de la enzima FPS se define como el número de nmoles de IPP incorporados en productos ácido-lábiles por minuto a 37°C. Para calcular la actividad específica, en primer lugar se obtiene el valor de la actividad en U/ml y después la actividad específica, que relaciona la actividad con la cantidad de proteína de la muestra.

Actividad específica (nmol FPP/min.mg)							
cpm x	$\frac{\text{nmol IPP en la mezcla}}{\text{cpm mezcla de reacción}}$	x	$\frac{1}{\text{min. reacción}}$	x	$\frac{1}{\mu\text{l extracto}}$	x	$\frac{\text{volumen hexano (900}\mu\text{l)}}{\mu\text{l hexano contado (500}\mu\text{l)}} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{ml de extracto}}$

**nmol de IPP en la mezcla de reacción** = 9,2 nmoles IPP frío (2,375 µl 4 mM) + 1,339 nmoles [<sup>14</sup>C]IPP\* (3,75 µl 0,357 mM) = 10,53 nmoles

### 16.3 Aproximación al cálculo de $K_m$

Con el fin de comparar el comportamiento cinético de las dos isoenzimas FPS1S y FPS2 de *A. thaliana*, se ha determinado su actividad a partir de las proteínas purificadas a concentraciones crecientes de sustrato, para calcular la  $K_m$  para los sustratos IPP, DAMPP y GPP. Para ello, se han usado aproximadamente las mismas unidades de FPS1S (10 µl de enzima en dilución 1/80 en presencia de BSA con el *buffer*: 50 mM Tris-ClH pH 7,5, 250 mM

sacarosa, 10 mM NaCl, 0,5 mg/mL BSA, DTT 5 mM, PMSF 1,5 mM, e inhibidores Sigma) y de FPS2 (10  $\mu$ l de enzima diluida 1/300 en el mismo *buffer*) y diferentes mezclas de reacción con concentraciones crecientes del sustrato del cual se determina la  $K_m$ .

Los valores de  $K_m$  para el DAMPP y el GPP se determinaron en el rango de concentraciones comprendido entre 6,25 y 200  $\mu$ M con una concentración fija de IPP 100  $\mu$ M. Para el IPP se determinó en el rango de 1 a 100  $\mu$ M con una concentración fija de 200  $\mu$ M de GPP.

La composición de las diferentes mezclas de reacción se detalla a continuación:

<b>Mezcla de reacción <math>K_m</math> GPP</b>	<b>Conc. en el ensayo</b>
<i>Buffer</i> Tris-ClH pH 7.5 (250 mM)	50 mM
[1- $^{14}$ C]IPP (56 mCi/mmol)	13,39 $\mu$ M
IPP (4 mM)	92 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 mM
GPP (4 mM)	6,25 - 12,5 - 25 - 50 – 100 - 200 $\mu$ M

<b>Mezcla de reacción <math>K_m</math>DMAPP</b>	<b>Conc. en el ensayo</b>
<i>Buffer</i> Tris-ClH (250 mM)	50 mM
[1- $^{14}$ C]IPP (56 mCi/mmol)	26,78 $\mu$ M
IPP (4 mM)	92,8 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 mM
DMAPP (2 mM)	6,25 - 7,5 - 15 - 30 - 60 -120 - 200 $\mu$ M

En el caso del IPP, dado que se trata del sustrato marcado con  $^{14}$ C, la cantidad total de IPP incorporada en el ensayo consiste en una mezcla de sustratos caliente (marcado con  $^{14}$ C) y sustrato frío (sin marcar). Motivo por el que, al variar la relación de concentraciones de IPP no marcado y marcado con  $^{14}$ C, se ha calculado la actividad específica correspondiente a cada concentración.

<b>Mezcla de reacción <math>K_m</math> IPP</b>	<b>Conc. en el ensayo</b>
<i>Buffer</i> Tris-ClH pH 7,5 (250 mM)	50 mM
GPP (4 mM)	200 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 mM

Conc. total de IPP en el ensayo ( $\mu\text{M}$ )	[1- $^{14}\text{C}$ ]IPP (60 mCi/mmol) ( $\mu\text{M}$ )	IPP (4 mM) ( $\mu\text{M}$ )
1	1	0
2,5	2,5	0
5	5	0
10	10	0
30	13,39	16,61
60	13,39	46,61
100	13,39	86,61

En todos los casos, el valor aparente de  $K_m$  se ha obtenido por extrapolación a partir del efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción según la representación de Lineweaver-Burk ( $1/V$  vs  $1/S$ ).

#### 16.4 Determinación del pH óptimo de las enzimas purificadas FPS1S y FPS2

Para determinar el pH óptimo de FPS1S y FPS2 se ha usado las mismas unidades de enzima purificada que en el apartado anterior, y los siguientes *buffers* a diferentes pH, MES-NaOH pH 5.5, PIPES-NaOH pH 6.5, fosfato sódico pH 7.0 y PIPES-NaOH pH 7.0, y Tris-ClH en los pH entre 7.5 y 9.0. En todos los casos, la concentración de *buffer* utilizada fue de 50 mM, 5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 10 mM NaCl, 250 mM sacarosa y 0,5 mg/ml de BSA.

## 17. Análisis de productos metabólicos

### 17.1 Extracción y análisis de esteroides

El proceso de análisis de esteroides en muestras provenientes de plántulas y semillas de *Arabidopsis* estudiadas en este trabajo, se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Fraser *et al.* (2000) con algunas modificaciones.

Se trituró homogéneamente el material vegetal en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Se sometieron a un proceso de liofilizado durante 14-16 h, para extraer el agua contenida en las mismas y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de usarlas, siguiendo el siguiente procedimiento.

1. Pesar en tubos de centrifuga de vidrio *pyrex* entre 15-30 mg de tejido liofilizado. Agregar 10  $\mu$ l de 5 $\alpha$ -colestano (1,2 mg/ml disuelto en hexano) sobre el tejido liofilizado y pesado, el cual cumple la función de patrón interno.
2. Añadir 5 ml de diclorometano:metanol (2:1, v/v), sonicar en un baño de agua durante 10 min. Centrifugar durante 5 min. A 5000 x g. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo y volver a extraer el *pellet* dos veces más. Los extractos reunidos se llevaron a sequedad con la ayuda de un rotavapor (Mivac Duo Concentrator, Genevac Ltd., UK).
3. La fracción correspondiente a los esteres de esteroles del residuo seco fue saponificado añadiendo 1,5 ml de KOH al 7,5% en 95% de metanol durante una noche a temperatura ambiente. Incubar 1 h a 80°C.
4. Detener la saponificación, incubando 5 min en hielo. Añadir 1,5 ml de agua destilada para diluir el KOH.
5. Extraer los esteroles libres añadiendo 5 ml de hexano y agitar en vórtex. Centrifugar 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Recuperar la fase orgánica.
6. Realizar dos re-extracciones de la fase acuosa con 5 ml de hexano, juntar las fases hexánicas en un balón de vidrio topacio y rota-evaporar a 30°C (Mivac Duo Concentrator, Genevac Ltd., UK). En este punto pueden conservarse a -20°C hasta el siguiente paso.
7. A continuación, las muestras son silenizadas. Este paso consiste en la derivatización de los compuestos extraídos, añadiendo un grupo trimetilsilil a todas las moléculas con grupos -OH. Para silenizar, es necesario disolver el residuo seco en 150  $\mu$ l de Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (Merck) e incubar durante 60 min a 150°C. A continuación se secan bajo una corriente de N<sub>2</sub> y resuspendidos en 200  $\mu$ l de iso-octano.
8. Analizar 1  $\mu$ l del extracto silenizado mediante cromatografía de gases acoplado a masas GC-MS, en un cromatógrafo Perkin Elmer GC Autosystem<sup>®</sup> acoplado a un espectrómetro de masas ITQ900. El cromatógrafo se halla equipado con una columna capilar DB-5MS (95% metilpolisiloxano y 5% de fenilpolisiloxano) de 30 m x 0,25  $\mu$ m de diámetro interno; 0,25  $\mu$ m de tamaño de partícula (AWScientific), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y que utiliza helio como gas portador a una velocidad de 2 ml/min. El sistema de inyección es manual con *splits* de 12,5:1.

Las condiciones de la cromatografía son:

Temperatura del inyector: 280°C

Temperatura del detector: 300°C

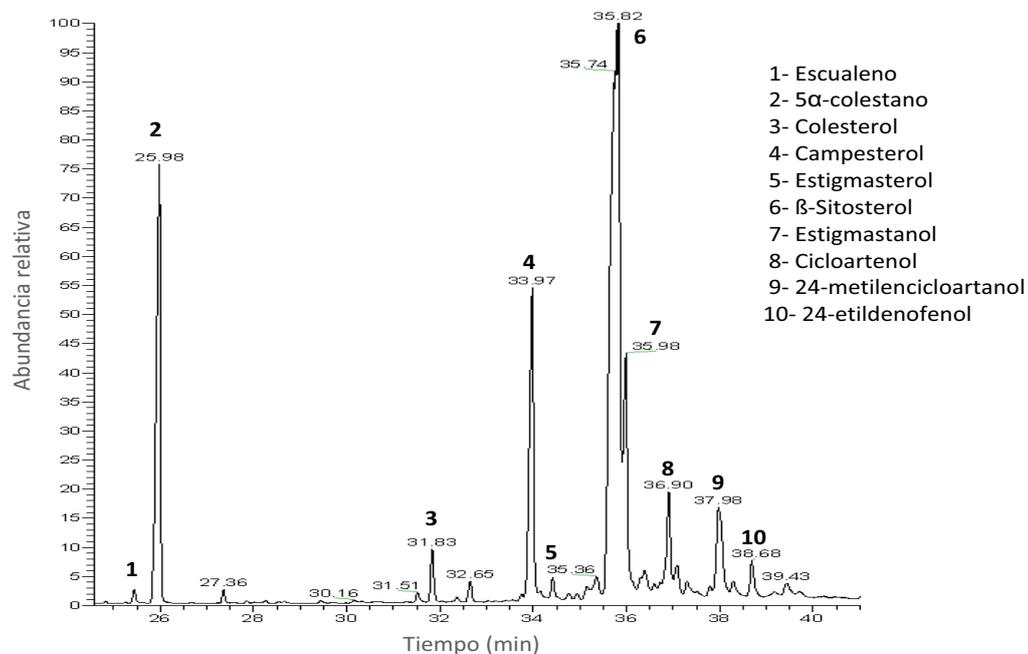
Temperatura del horno: 30 seg a 245°C y luego hasta 265°C, a 2°C/min.

Finalmente hasta 290°C, a razón de 3,5°C/min.

La identificación de los perfiles obtenidos en el GC-MS se realiza en base a los tiempos de retención relativos y respecto a un cromatograma realizado con patrones estándar y la identificación de cada pico por el perfil de masas respecto al del correspondiente estándar.

La integración de las áreas de los picos se realiza mediante un programa Xcalibur (Thermo Scientific) y la cuantificación se calcula a partir de las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma, por normalización interna, basado en el área relativa del pico del esteroles en cuestión respecto al área del 5 $\alpha$ -colestano:

$$\frac{\text{ÁREA DE ESTEROL}}{\text{ÁREA 5}\alpha\text{-COLESTANO}} = \frac{\text{CONCENTRACIÓN DE ESTEROL}}{\text{CONCENTRACIÓN 5}\alpha\text{-COLESTANO}}$$



## 17.2 Análisis del perfil de esfingolípidos

El proceso de análisis del perfil de esfingolípidos de *A. thaliana* estudiados en este trabajo, se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento estandarizado por el grupo del Dr. Cahoon, en el Donald Danforth Plant Science Center, en St. Louis, Missouri, USA.

En este caso, se midieron esfingolípidos procedentes de plántulas de 15 días y diferentes tejidos de plantas adultas de *A. thaliana*, los cuales fueron recolectados, congelados en N<sub>2</sub> líquido y liofilizados durante 24 h, para extraer el agua contenida en las mismas. Se pueden conservar en este estado a temperatura ambiente hasta el momento de usarlos, siguiendo el siguiente procedimiento.

Este método está basado en el descrito por Morrison y Hay, con algunas modificaciones realizadas por el grupo del Dr. Cahoon. La primera parte del procedimiento que se detalla a continuación, tiene lugar en una cabina de flujo laminar.

1. Preparar una solución de BaOH.8H<sub>2</sub>O al 10%<sup>31</sup>.
2. Lavar un homogeneizador (de 5 ml de capacidad) y su émbolo de vidrio con cloroformo y dejar secar.
3. Pesar 10 mg de tejido liofilizado y depositarlo en el fondo del homogeneizador.
4. Añadir 25 µl del patrón usado como estándar interno (en este caso, usamos un stock de 0,2 mM de D-erythro-C16:0 Sphingosine, disuelta en etanol) y 600 µl de 1,4 dioxano.
5. Triturar cuidadosamente la muestra con el émbolo. Una vez homogeneizado, transferir el contenido a un tubo de ensayo de vidrio con tapa a rosca.
6. Añadir 600 µl más de 1,4 dioxano al homogeneizador, para extraer la mayor cantidad de lípidos y transferirla al mismo tubo anterior. Lavar el homogeneizador con metanol (para eliminar los restos sólidos) y luego con cloroformo. Dejar secar y repetir los pasos 3 a 7 con la siguiente, hasta completar el total de muestras.
7. Una vez obtenidas las muestras, agregar a cada una, 1,5 ml de la solución de BaOH al 10% y agitar para homogeneizar la solución e incubar en un baño seco a 110°C durante 16 h para conseguir la hidrólisis de las BECL de los esfingolípidos.
8. Transcurrido el tiempo de incubación, retirar las muestras y atemperarlas unos minutos. Añadir 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, mezclar y centrifugar 5 min a máxima velocidad.
9. Transferir la fase orgánica (inferior) a un nuevo tubo de vidrio y secarlas bajo una corriente de nitrógeno.
10. Resuspender en 100 µl de metanol. En este punto es posible almacenar los extractos a -20°C durante 24 h.

11. Preparar la solución OPA<sup>32</sup> para el paso de derivatización.
12. Agregar 50 µl de solución OPA a cada muestra y sonicar 15 seg en baño de agua. Incubar durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente.
13. Añadir 350 µl de metanol, mezclar y transferir a viales de HPLC plásticos con filtro (es posible realizar un centrifugado previo, para eliminar posibles residuos sólidos que interfieran con la columna).

Los instrumentos para el análisis por HPLC fueron:

- HPLC Perkin Elmer Serie 200 + 980 Programmable Fluorescence Detector (*Applied Biosystems*)

- Zorbax Columna Eclipse XDB-C18, 4.6 x 250, 5 µ Analytical (*Agilent*)

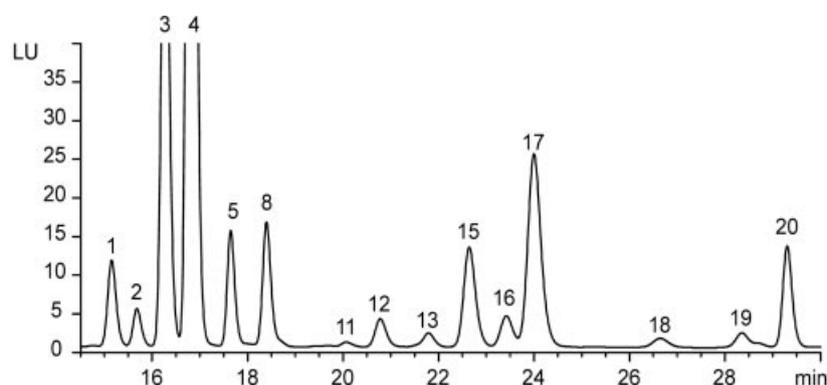
- Guard Column Eclipse XDB-C18, 4.6 x 12.5, 5 µ (*Agilent*)

Antes de comenzar con el análisis, se debe constatar que hay suficiente cantidad de los buffers A<sup>33</sup> (fosfato de potasio) y B (metanol 100%) y que no están contaminados.

El gradiente utilizado en este caso fue el siguiente:

Paso	Tiempo (min)	Flujo ml/min	Buffer A%	Buffer B%
0	0	1,5	20	80
1	6	1,5	20	80
2	8	1,5	10	90
3	10	1,5	10	90
4	5	1,5	0	100
5	3	1,5	0	100
6	2	1,5	20	80
7	1	1,5	20	80

La identificación de las BECL, se realizó por el perfil obtenido por Markham *et al.* (2006).



- 1- t18:1 (8Z)-Glc
- 2- t18:1 (8E)-Glc
- 3- t18:1 (8Z)
- 4- t18:1 (8E)
- 5- d16:1 (Estandar interno)
- 8- t18:0
- 11- d18:1 (8Z)-Glc
- 12- d18:1 (8E)-Glc
- 13- d18:1 (8Z)
- 15- d18:1 (8E)
- 16- 1,4 anhidro-t18:1 (8Z)
- 17- 1,4 anhidro-t18:1 (8E)
- 18- d18:0
- 19- 1,4 anhidro-t18:0
- 20- d20:1 (Estandar interno)

Los reactivos y agua utilizados para este ensayo son calidad HPLC.

**Solución OPA**<sup>32</sup> – 10 ml

o-phthalaldehyde	5 mg
Etanol	100 µl
β-mercaptoetanol	5 µl
<i>Buffer</i> borato 1% <sup>32.1</sup>	9,9 ml

Al añadir el etanol, mezclar suavemente. Conservar en oscuridad a 4°C

**Buffer borato 1%**<sup>32.1</sup> - 200 ml

Ácido bórico	2 g
Agua miliQ c.s.p	200ml

**Solución de BaOH.8H<sub>2</sub>O**<sup>31</sup> – 10 ml

BaOH.8H <sub>2</sub> O	1 g
Agua (tibia) c.s.p	10 ml

**BufferA**<sup>33</sup> (fosfato de potasio 0,1 M) – 1 l

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	500 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	500 ml

## BIBLIOGRAFÍA



- ❖ **Abbas HK, Paul RN, Riley RT, Tanaka T, Shier WT.** (1998). Ultrastructural effects of AAL-toxin TA from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon*. **36(12)**:1821-32.
- ❖ **Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH Jr, Riley RT.** (1994). Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol*. **106(3)**:1085-1093.
- ❖ **Adeli K.** (2011). Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **301(6)**:E1051-64
- ❖ **Adiwilaga K, Kush A.** (1996). Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol*. **30(5)**:935-46.
- ❖ **Alden KP, Dhondt-Cordelier S, McDonald KL, Reape TJ, Ng CK, McCabe PF, Leaver CJ.** (2011). Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. *Biochem Biophys Res Commun*. **410(3)**:574-80.
- ❖ **Alvarez-Vasquez F, Riezman H, Hannun YA, Voit EO.** (2011). Mathematical modeling and validation of the ergosterol pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. **6(12)**:e28344.
- ❖ **Alvim FC, Carolino SM, Cascardo JC, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EP.** (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol*. **126(3)**:1042-54.
- ❖ **Anderson MS, Yarger JG, Burck CL, Poulter CD.** (1989). Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **264(32)**:19176-84.
- ❖ **Antolín Llovera M.** (2005). Papel de las proteínas AtKLC-1 y AtB" en la regulación de la HMG-CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular- Biología, Universidad de Barcelona.
- ❖ **Antolín-Llovera M, Leivar P, Arró M, Ferrer A, Boronat A, Campos N.** (2011). Modulation of plant HMG-CoA reductase by protein phosphatase 2A: Positive and negative control at a key node of metabolism. *Plant Signal Behav*. **6(8)**.
- ❖ **Apfel CM, Takács B, Fountoulakis M, Stieger M, Keck W.** (1999). Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential uppS gene. *J Bacteriol*. **181(2)**:483-92.

- ❖ **Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J.** (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* **48(1)**:1-13
- ❖ **Attucci S, Aitken SM, Gulick PJ, Ibrahim RK.** (1995<sup>1</sup>). Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys.* **321(2)**:493-500.
- ❖ **Attucci S, Aitken SM, Ibrahim RK, Gulick PJ.** (1995<sup>2</sup>). A cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase in white lupin. *Plant Physiol.* **108(2)**:835-6.
- ❖ **Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA., Struhl K.** (1989). *Current Protocols in Molecular Biology.* (New York:John Wiley and Sons).
- ❖ **Bach TJ, Lichtenthaler HK.** (1982). Mevinolin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants. *Z Naturforsch C.* **37(1-2)**:46-50.
- ❖ **Bach TJ, Lichtenthaler HK.** (1983). Mechanisms of inhibition by mevinolin (MK 803) of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34). *Z Naturforsch C.* **38(3-4)**:212-9.
- ❖ **Bach TJ.** (1986). Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? *Lipids.* **21**:82–8.
- ❖ **Barnard GF, Popják G.** (1981). Human liver prenyltransferase and its characterization. *Biochim Biophys Acta.* **661(1)**:87-99.
- ❖ **Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ.** (2007). Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* **21(8)**:1714-23.
- ❖ **Bektas M, Allende ML, Lee BG, Chen W, Amar MJ, Remaley AT, Saba JD, Proia RL.** (2010). Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem.* **285(14)**:10880-9.
- ❖ **Benveniste P.** (2004). Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu Rev Plant Biol.* **55**:429-57.
- ❖ **Berglund AH, Quartacci MF, Calucci L, Navari-Izzo F, Pinzino C, Liljenberg C.** (2002). Alterations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta.* **1564(2)**:466-72.
- ❖ **Bick JA, Lange BM.** (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys.* **415(2)**:146-54.
- ❖ **Blaszczyk L, Ciesiolka J.** (2011). Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* **50**: 7080-7092.

- ❖ **Bloch KE.** (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem.* **14(1)**:47-92.
- ❖ **Bohlmann J.** (2011). Terpenoid synthases from chemical ecology and forest fires to biofuels and bioproducts. *Structure.* **19(12)**:1730-1.
- ❖ **Borner GH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P.** (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol.* **129(2)**:486-99.
- ❖ **Boutté Y, Grebe M.** (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **12(6)**:705-13.
- ❖ **Bouvier F, Rahier A, Camara B.** (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res.* **44(6)**:357-429.
- ❖ **Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P.** (1989). High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene.* **85(1)**:109-14.
- ❖ **Bromley PE, Li YO, Murphy SM, Sumner CM, Lynch DV.** (2003). Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch Biochem Biophys.* **417(2)**:219-26.
- ❖ **Budziszewski GJ, Lewis SP, Glover LW, Reineke J, Jones G, Ziemnik LS, Lonowski J, Nyfeler B, Aux G, Zhou Q, McElver J, Patton DA, Martienssen R, Grossniklaus U, Ma H, Law M, Levin JZ.** (2001). Arabidopsis genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics.* **159(4)**:1765-78.
- ❖ **Burg JS, Espenshade PJ.** (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res.* **50(4)**:403-410.
- ❖ **Burke JJ, O'Mahony PJ, Oliver MJ.** (2000). Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. *Plant Physiol.* **123**: 575-587.
- ❖ **Busquets A, Keim V, Closa M, del Arco A, Boronat A, Arró M, Ferrer A.** (2008). Arabidopsis thaliana contains a single gene encoding squalene synthase. *Plant Mol Biol.* **67(1-2)**:25-36.
- ❖ **Busquets T.** (2008). Biosíntesis de terpenoides en Arabidopsis thaliana: estudio de la escualeno sintasa y la farnesildifosfato sintasa mitocondrial. Tesis doctoral de la Facultat de Farmacia- Universidad de Barcelona.
- ❖ **Cabello-Hurtado F, Taton M, Forthoffer N, Kahn R, Bak S, Rahier A, Werck-Reichhart D.** (1999). Optimized expression and catalytic properties of a wheat obtusifolios 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) expressed in yeast. Complementation of erg11 $\Delta$  yeast mutants by plant CYP51. *Eur J Biochem.* **262(2)**:435-46.

- ❖ **Campos N, Boronat A.** (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell*. **7(12)**:2163-74.
- ❖ **Cervantes-Cervantes M, Gallagher CE, Zhu C, Wurtzel ET.** (2006). Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity. *Plant Physiol*. **141(1)**:220-31.
- ❖ **Chambon C, Ladeveze V, Oulmouden A, Servouse M, Karst F.** (1990). Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Curr Genet*. **18(1)**:41-6.
- ❖ **Chappell J.** (1995<sup>1</sup>). Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **46**:521-47.
- ❖ **Chappell J.** (1995<sup>2</sup>). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol*. **107(1)**:1-6.
- ❖ **Chen A, Kroon PA, Poulter CD.** (1994). Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein Sci*. **3(4)**:600-7.
- ❖ **Chen D, Ye H, Li G.** (2000). Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*. **155(2)**:179-185.
- ❖ **Choi D, Bostock RM.** (1994). Involvement of de novo protein synthesis, protein kinase, extracellular Ca<sup>2+</sup>, and lipoxygenase in arachidonic acid induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes and isoprenoid accumulation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol*. **104**:1237-44.
- ❖ **Chuang CF, Meyerowitz EM.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97(9)**:4985-90.
- ❖ **Clarke CF, Tanaka RD, Svenson K, Wamsley M, Fogelman AM, Edwards PA.** (1987). Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to prenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway. *Mol Cell Biol*. **7(9)**:3138-46.
- ❖ **Closa M, Vranová E, Bortolotti C, Bigler L, Arró M, Ferrer A, Grisse W.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* FPP synthase isozymes have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J*. **63**:512-525.
- ❖ **Closa M.** (2007). Tesis doctoral. Estudio de la especialización funcional de las isoenzimas citosólicas de la farnesildifosfato sintasa de *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Barcelona.
- ❖ **Clouse SD.** (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*. **14(9)**:1995-2000.

- ❖ **Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM.** (2003). Sphingolipid Signalling in Arabidopsis Guard Cells Involves Heterotrimeric G Proteins. *Nature*. **423(6940)**:651-4.
- ❖ **Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S.** (2005). Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol*. **137(2)**:724-37.
- ❖ **Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN.** (1997). Metabolic Control of Avocado Fruit Growth (Isoprenoid Growth Regulators and the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase). *Plant Physiol*. **114(2)**:511-518.
- ❖ **Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Biologists. Rockeville, MD. 1250-1268.
- ❖ **Cunillera N, Arró M, Delourme D, Karst F, Boronat A, Ferrer A.** (1996). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem*. **271(13)**:7774-80.
- ❖ **Cunillera N, Boronat A, Ferrer A.** (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem*. **272(24)**:15381-8.
- ❖ **Cunillera N, Boronat A, Ferrer A.** (2000). Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Mol Biol*. **44(6)**:747-58.
- ❖ **Dale S, Arro M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, Hardie DG.** (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*. **233**:506–13.
- ❖ **Day DA, Tuite MF.** (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*. **157(3)**:361-71.
- ❖ **Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J.** (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. **70(15-16)**:1621-37.
- ❖ **Delourme D, Lacroute F, Karst F.** (1994). Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast. *Plant Mol Biol*. **26(6)**:1867-73.
- ❖ **Demel RA, De Kruyff B.** (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta*. **457(2)**:109-32.

- ❖ **Denbow CJ, Lång S, Cramer CL.** (1996). The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem.* **271(16)**:9710-5.
- ❖ **Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB.** (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* **54(2)**:284-98.
- ❖ **Ding VD, Sheares BT, Bergstrom JD, Ponpipom MM, Perez LB, Poulter CD.** (1991). Purification and characterization of recombinant human farnesyl diphosphate synthase expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **275 (Pt1)**:61-5.
- ❖ **Dong Y, Somero GN.** (2009). Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions. *J Exp Biol.* **212**: 169-177.
- ❖ **Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Price RN.** (2010). Artemisinin combination therapy for vivax malaria. *Lancet Infect Dis.* **10(6)**:405-16.
- ❖ **Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J.** (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102(3)**:933-8.
- ❖ **Dudley MW, Dueber MT, West CA.** (1986). Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (*ricinus communis* L.) seedlings: changes in enzyme levels induced by fungal infection and intracellular localization of the pathway. *Plant Physiol.* **81(2)**:335-42.
- ❖ **Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV, Napier JA.** (2004). A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* **93(5)**:483-97.
- ❖ **Eberhardt NL, Rilling HC.** (1975). Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J Biol Chem.* **250(3)**:863-6.
- ❖ **Eisenkolb M, Zenzmaier C, Leitner E, Schreiber R.** (2002). A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol Biol Cell.* **13(12)**:4414-28.
- ❖ **Felle HH.** (2001). pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.* **3**: 577-591.
- ❖ **Ferella M, Li ZH, Andersson B, Docampo R.** (2008). Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Exp Parasitol.* **119(2)**:308-12.

- ❖ **Feron G, Clastre M, Ambid C.** (1990). Prenyltransferase compartmentation in cells of *Vitis vinifera* cultivated in vitro. *FEBS Lett.* **271(1-2)**:236-8.
- ❖ **Flügge UI, Gao W.** (2005). Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biol (Stuttg).* **7(1)**:91-7.
- ❖ **Forés O, Arró M, Pahissa A, Ferrero S, Germann M, Stuke J, McDonough V, Nickels JT Jr, Campos N, Ferrer A.** (2006). *Arabidopsis thaliana* expresses two functional isoforms of Arvp, a protein involved in the regulation of cellular lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* **1761(7)**:725-35.
- ❖ **Forés O.** (2007). Tesis doctoral. Facultat de Farmacia- Universitat de Barcelona
- ❖ **Gaffe J, Bru JP, Cause M, Vidal A, Stamitti-Bert L, Carde JP, Gallusci P.** (2000). *LeFPS1*, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development. *Plant Physiol.* **123(4)**:1351-62.
- ❖ **Genschik P, Criqui M-C, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J.** (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol.* **20**:337-41.
- ❖ **Gershenzon J y Dudareva N.** (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* **3(7)**:408-14.
- ❖ **Ginzburg L, Kacher Y, Futerman AH.** (2004). The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin Cell Dev Biol.* **15(4)**:417-31.
- ❖ **Goldstein JL, Brown MS.** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* **343(6257)**:425-30.
- ❖ **Gonzalez V.** (2002). Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas: Estudio molecular del control de la vía a nivel de la enzima HMG-CoA reductasa. Tesis doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular- Divisió III. Universitat de Barcelona.
- ❖ **Grebe M, Xu J, Möbius W, Ueda T, Nakano A, Geuze HJ, Rook MB, Scheres B.** (2003). *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol.* **13(16)**:1378-87.
- ❖ **Gruber CW, Cemazar M, Anderson MA, Craik DJ.** (2009). Enzyme mechanism and function of a novel plant PDI involved in the oxidative folding of cystine knot defense peptides. *Adv Exp Med Biol.* **611**:31-2.
- ❖ **Grumbach KH, Bach TJ.** (1979). The effect of PSII herbicides, amitrol and SAN 6706 on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase and the incorporation of [2-<sup>14</sup>C]acetate and [2-<sup>3</sup>H]mevalonate into chloroplast pigments of radish seedlings. *Z. Naturforsch.* **34c**:941-3.
- ❖ **Guan XL, Souza CM, Pichler H, Dewhurst G, Schaad O, Kajiwara K, Wakabayashi H, Ivanova T, Castillon GA, Piccolis M, Abe F, Loewith R, Funato**

- K, Wenk MR, Riezman H.** (2009). Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol Biol Cell.* **20(7)**:2083-95.
- ❖ **Guirimand G, Courdavault V, St-Pierre B, Burlat V.** (2010). Biosynthesis and regulation of alkaloids. In Pua EC, Davey M, editors. *Plant Developmental Biology. Biotechnological Perspectives.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. vol. **2**: 139-160
- ❖ **Gupta AK, Savopoulos CG, Ahuja J, Hatzitolios AI.** (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: current perspectives. *QJM.* **104(4)**:301-8. Epub 2011 Feb 15.
- ❖ **Gupta P, Akhtar N, Tewari SK, Sangwan RS and Trivedi PK.** (2011). Differential expression of farnesyl diphosphate synthase gene from *Withania somnifera* in different chemotypes and in response to elicitors. *Plant Growth Regul.* **65(1)**:93-100
- ❖ **Gutierrez-Nava M, Accorsi G, Masson P, Armaroli N, Nierengarten JF.** (2004). Polarity effects on the photophysics of dendrimers with an oligophenylenevinylene core and peripheral fullerene units. *Chemistry.* **10(20)**:5076-86.
- ❖ **Han, J.L., Liu, B.Y., Ye, H.C., Wang, H., Li, Z.Q., and Li, G.F.** (2006). Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. *J. Integrat. Plant Biol.* **48(4)**, 482-487.
- ❖ **Hartmann MA, Benveniste P.** (1987). Plant Membrane Sterols: Isolation, Identification and Biosynthesis. *Methods in Enzymology.* **148**:632-650.
- ❖ **Hartmann MA, Perret AM, Carde JP, Cassagne C, Moreau P.** (2002). Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols. *Biochim Biophys Acta.* **1583(3)**:285-96.
- ❖ **Hasegawa M, Mitsuhashi I, Seo S, Imai T, Koga J, Okada K, Yamane H, Ohashi Y.** (2010). Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. *Mol Plant Microbe Interact.* **23(8)**:1000-11.
- ❖ **Heiling S, Schuman MC, Schoettner M, Mukerjee P, Berger B, Schneider B, Jassbi AR, Baldwin IT.** (2010). Jasmonate and ppHsystemin regulate key Malonylation steps in the biosynthesis of 17-Hydroxygeranylinalool Diterpene Glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell.* **22(1)**:273-92.
- ❖ **Hemmerlin A, Bach TJ.** (2000). Farnesol induced cell death and stimulation of 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in tobacco cv Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* **123**:1257–68.
- ❖ **Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, Bach TJ.** (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and

- the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem.* **278(29)**:26666-76.
- ❖ **Hemmerlin A, Rivera SB, Erickson HK, Poulter CD.** (2003<sup>2</sup>). Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the Big Sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J Biol Chem.* **278(34)**:32132-40.
  - ❖ **Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zähringer U, Warnecke D, Heinz E.** (2003). Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **553(3)**:365-9.
  - ❖ **Holmberg N, Harker M, Gibbard CL, Wallace AD, Clayton JC, Rawlins S, Hellyer A, Safford R.** (2002). Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. *Plant Physiol.* **130(1)**:303-11.
  - ❖ **Hsieh K, Huang AH.** (2005). Lipid-rich tapetosomes in *Brassica* tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J.* **43(6)**:889-99.
  - ❖ **Huguene P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B.** (1996). Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* **111(2)**:619-26.
  - ❖ **Ingram GC.** (2010). **Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development.** *Protoplasma.* **247**: 195-214.
  - ❖ **Isa RB, Sipat AB.** (1982). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase of *Hevea* latex: The occurrence of a heat-stable activator in the C-serum. *Biochem Biophys Res Commun.* **108**:206-12.
  - ❖ **Iwata Y, Fedoroff NV, Koizumi N.** (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell.* **20(11)**:3107-21.
  - ❖ **Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6(13)**:3901-7.
  - ❖ **Jenny RJ, Mann KG, Lundblad RL.** (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr Purif.* **31(1)**:1-11.
  - ❖ **Ji W, Hatzios KK, Cramer CL.** (1992). Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in maize tissues. *Physiol Plant.* **84**:185-92.
  - ❖ **Joly A, Edwards PA.** (1993). Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem.* **268(36)**:26983-9.

- ❖ **Kajiwara K, Watanabe R, Pichler H, Ihara K, Murakami S, Riezman H, Funato K.** (2008). Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* **19(5)**:2069-82.
- ❖ **Karlsson KA, Larson G.** (1982). Aspects of the future for the analysis of glycosphingolipid mixtures. *Adv Exp Med Biol.* **152**:15-21.
- ❖ **Karten B, Peake KB, Vance JE.** (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* **1791(7)**:659-70.
- ❖ **Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S, Panstruga R.** (2010). PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem.* **285(50)**:39140-9.
- ❖ **Kessler A, Baldwin IT.** (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science.* **291(5511)**:2141-4.
- ❖ **Kim HB, Schaller H, Goh CH, Kwon M, Choe S, An CS, Durst F, Feldmann KA, Feyereisen R.** (2005). Arabidopsis cyp51 mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity. *Plant Physiol.* **138(4)**:2033-47.
- ❖ **Kim OT, Ahn JC, Hwang SJ, Hwang B.** (2005). Cloning and expression of a farnesyl diphosphate synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Mol Cells.* **19(2)**:294-9.
- ❖ **Kim OT, Lee JW, Bang KH, Kim YC, Hyun DY, Cha SW, Choi YE, Jin ML, Hwang B.** (2009). Characterization of a dammarenediol synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Physiol Biochem.* **47(11-12)**:998-1002.
- ❖ **Kondo K, Uritani I, Oba K.** (2003). Induction mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in potato tuber and sweet potato root tissues. *Biosc Biotech Biochem.* **67**:1007-17.
- ❖ **Koo JC, Asurmendi S, Bick J, Woodford-Thomas T, Beachy RN.** (2004). Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic Arabidopsis. *Plant J.* **37(3)**:439-48.
- ❖ **Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan X, Kasumov T, Kelleher JK, Brunengraber H, Krisans SK.** (2007) Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem Cell Biol.* **127**: 273-290.
- ❖ **Koyama T, Gotoh Y, Nishino T.** (2000). Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: Reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants. *Biochemistry.* **39**: 463-469.

- ❖ **Koyama T, Obata S, Osabe M, Takeshita A, Yokoyama K, Uchida M, Nishino T, Ogura K.** (1993). Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J Biochem.* **113(3)**:355-63.
- ❖ **Koyama T.** (1999). Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63(10)**:1671-6.
- ❖ **Kozak M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* **44**:283–292.
- ❖ **Kozak M.** (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* **266**: 19867–19870.
- ❖ **Kumar MB, Fujimoto T, Potter DW, Deng Q, Palli SR.** (2002). A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(23)**:14710-5.
- ❖ **Kumar S, Tsai C.** (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* **13**: 179-191.
- ❖ **Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E.** (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis thaliana* mutants implicate multiple signalling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* **138**: 882-897.
- ❖ **Laule O, Fürholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grussem W, Lange M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100(11)**:6866-71.
- ❖ **Learned RM, Connolly EL.** (1997). Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **11(3)**:499-511.
- ❖ **Leivar P, González VM, Castel S, Trelease RN, López-Iglesias C, Arró M, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Fernández-Busquets X.** (2005). Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol.* **137(1)**:57-69.
- ❖ **Li CP, Larkins BA.** (1996). Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *Gene.* **171(2)**:193-6.
- ❖ **Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT.** (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17(21)**:2636-41.
- ❖ **Liang PH, Ko TP, Wang AH.** (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem.* **269(14)**:3339-54.
- ❖ **Ling Y, Li ZH, Miranda K, Oldfield E, Moreno SN.** (2007). The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a

- bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. *J Biol Chem.* **282(42)**:30804-16.
- ❖ **Liu CJ, Heinstejn P, Chen XY.** (1999). Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors. *Mol Plant Microbe Interact.* **12(12)**:1095-104.
  - ❖ **Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH.** (2007). An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell.* **19(12)**:4111-9.
  - ❖ **Liu S-L, Baute GJ, Adams K.** (2011). Organ and cell type-specific complementary expression patterns and regulatory neofunctionalization between duplicated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol Evol.* **3**: 1419-1436.
  - ❖ **Liu Y.** (2004). Human ARV1: a new modulator of lipid homeostasis. *Columbia University.*
  - ❖ **Lynch DV, Dunn TM.** (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist.* **161(3)**:677–702.
  - ❖ **Mackintosh RW, Davies SP, Clarke PR, Weekes J, Gillespie JG, Gibb BJ.** (1992). Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. 3-Hydroxy-3- methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem.* **209**:923–31.
  - ❖ **Madern D, Ebel C, Zaccai G.** (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles.* **4**: 91-98.
  - ❖ **Madern D, Pfister C, Zaccai G.** (1995). Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem.* **230**: 1088-1095.
  - ❖ **Maldonado-Mendoza IE, Burnett RJ, Lopez-Meyer M, Nessler CL.** (1994). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by wounding and methyl jasmonate. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **38**:351–6.
  - ❖ **Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P.** (1996). CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9(5)**:649-58.
  - ❖ **Mansouri H, Asrar Z, Mehrabani M.** (2009). Effects of gibberellic acid on primary terpenoids and D9-tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* at flowering stage. *J Integ Plant Biol.* **51(6)**:553-61.
  - ❖ **Manzano D, Busquets A, Closa M, Hoyerová K, Schaller H, Kamínek M, Arró M, Ferrer A.** (2006). Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in Arabidopsis

mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis. *Plant Mol Biol.* **61(1-2)**:195-213.

- ❖ **Manzano D, Fernández-Busquets X, Schaller H, González V, Boronat A, Arró M, Ferrer A.** (2004). The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta.* **219(6)**:982-92.
- ❖ **Manzano, D.** (2003). Estudio de la función reguladora de las enzimas farnesildifosfato sintasa y HMG-CoA reductasa en la vía del mevalonato en *Arabidopsis thaliana*. *Tesis doctoral*. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmacia. Universitat de Barcelona.
- ❖ **Markham JE, Jaworski JG.** (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **21(7)**:1304-14.
- ❖ **Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG.** (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem.* **281(32)**:22684-94.
- ❖ **Marrero PF, Poulter CD, Edwards PA.** (1992). Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem.* **267(30)**:21873-8.
- ❖ **Martín D, Piulachs MD, Cunillera N, Ferrer A, Bellés X.** (2007). Mitochondrial targeting of farnesyl diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* **1773(3)**:419-26.
- ❖ **Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández-Busquets X, Moncaleán P, Fernández B, Cunillera N, Boronat A, Ferrer A.** (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J.* **30(2)**:123-32.
- ❖ **Matsushita Y, Kang W, Charlwood BV.** (1996). Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua*. *Gene.* **172(2)**:207-9.
- ❖ **McGarvey DJ, Croteau R,** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant cell.* **7**:1015-1026.
- ❖ **Mekkriengkrai D, Sando T, Hirooka K, Sakdapipanich J, Tanaka Y, Fukusaki E-I, Kobayashi A.** (2004). Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom *Lactarius chrysorrhoeus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**: 2360-2368.

- ❖ **Men S, Boutté Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M.** (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol.* **10(2)**:237-44.
- ❖ **Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, Noble WS, Fields S.** (2005). Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(34)**:12123-8.
- ❖ **Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M.** (2009). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* **50(2)**:341-59.
- ❖ **Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* **37**: 128-138.
- ❖ **Miziorko H.** (2010). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Of Biochem. and Biophys.* **505**:131-143.
- ❖ **Montella C, Bellolell L, Pérez-Luque R, Badía J, Baldoma L, Coll M, Aguilar J.** (2005). Crystal structure of an iron-dependent group III dehydrogenase that interconverts L-lactaldehyde and L-1,2-propanediol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **187(14)**:4957-66.
- ❖ **Moreno AA, Orellana A.** (2011). The physiological role of the unfolded protein response in plants. *Biol Res.* **44(1)**:75-80.
- ❖ **Mori K.** (2009). Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem.* **146(6)**:743-50.
- ❖ **Muench DG, Wu Y, Zhang Y, Li X, Boston RS, Okita TW.** (1997). Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue. *Plant Cell Physiol.* **38(4)**:404-12.
- ❖ **Nakagawa N, Kato M, Takahashi Y, Shimazaki K, Tamura K, Tokuji Y, Kihara A, Imai H.** (2012). Degradation of long-chain base 1-phosphate (LCBP) in *Arabidopsis*: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. *J Plant Res.* **125(3)**:439-49.
- ❖ **Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM.** (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature.* **411(6834)**:219.
- ❖ **Nguyen H, Brown R, Lemmon B.** (2000). The specialized chalazal endosperm in *A. thaliana* and *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Protoplasma.* **212**: 99-110.

- ❖ **Niesen FH, Berglund H, Vedadi M.** (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc.* **2(9)**:2212-21.
- ❖ **Nieto B, Forés O, Arró M, Ferrer A.** (2009). Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry.* **70(1)**:53-9.
- ❖ **Ogura K, Koyama T.** (1998). Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem Rev.* **98(4)**:1263-1276.
- ❖ **Oh SK, Han KH, Ryu SB, Kang H.** (2000). Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Implications in rubber biosynthesis. *J BiolChem.* **275(24)**:18482-8.
- ❖ **Ohnuma S, Koyama T, Ogura K.** (1991). Purification of solanesyl-diphosphate synthase from *Micrococcus luteus*. A new class of prenyltransferase. *J Biol Chem.* **266(35)**:23706-13.
- ❖ **Olivier LM, Krisans SK.** (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* **1529(1-3)**:89-102.
- ❖ **Ortiz-Gómez A, Jiménez C, Estévez AM, Carrero-Lérida J, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D.** (2006). Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryot Cell.* **5(7)**:1057-64.
- ❖ **Padidam M, Gore M, Lu DL, Smirnova O.** (2003). Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgenic Res.* **12(1)**:101-9.
- ❖ **Page JE, Hause G, Raschke M, Gao W, Schmidt J, Zenk MH, Kutchan TM.** (2004). Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol.* **134(4)**:1401-13.
- ❖ **Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE.** (2003). Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem.* **270(6)**:1308-15.
- ❖ **Pan Z, Herickhoff L, Backhaus RA.** (1996). Cloning, characterization, and heterologous expression of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles. *Arch Biochem Biophys.* **332(1)**:196-204.
- ❖ **Parsons AB, Brost R, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown W, Kane M, Hughes T, Boone C.** (2003). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol.* **22**:62-9.

- ❖ **Pata MO, Hannun YA, Ng CK.** (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185(3)**:611-30.
- ❖ **Peskan T, Westermann M, Oelmüller R.** (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem.* **267(24)**:6989-95.
- ❖ **Phillips MA, León P, Boronat A, Rodríguez-Concepción M.** (2008). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* **13(12)**:619-23.
- ❖ **Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM.** (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **80(7)**: 939–966.
- ❖ **Pittet M, Conzelmann A.** (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1771(3)**:405-20.
- ❖ **Posé D, Botella MA.** (2009). Analysis of the arabidopsis *dry2/sqe1-5* mutant suggests a role for sterols in signaling. *Plant Signal Behav.* **4(9)**:873-4.
- ❖ **Poulter CD, Rilling HC.** (1976). Prenyltransferase: the mechanism of the reaction. *Biochemistry.* **15(5)**:1079-83.
- ❖ **Pu GB, Ma DM, Chen JL, Ma LQ, Wang H, Li GF.** (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Rep.* **28**:1127–35.
- ❖ **Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S.** (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell.* **21(5)**:1541-55.
- ❖ **Ranzer LK, Brück TB, Brück WM, López JV, Kerr RG.** (2009). A new prokaryotic farnesyl diphosphate synthase from the octocoral *Eunicea fusca*: differential display, inverse PCR, cloning, and characterization. *Mar Biotechnol.* **11**: 62-73.
- ❖ **Rasbery JM, Shan H, LeClair RJ, Norman M, Matsuda SPT, Bartel B.** (2007). *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem.* **282**: 17002-17013.
- ❖ **Reape TJ, McCabe PF.** (2008). Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* **180(1)**:13-26.
- ❖ **Reineke LC, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC.** (2008). A small stem-loop element directs internal initiation of the URE2 internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **283**: 19011-19025.
- ❖ **Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, Rasche N, Lüder F, Weckwerth W, Jahn O.** (2007). Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf

- peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell*. **19(10)**:3170-93.
- ❖ **Reumann S.** (2011). Toward a definition of the complete proteome of plant peroxisomes: Where experimental proteomics must be complemented by bioinformatics. *Proteomics*. **11(9)**:1764-79.
  - ❖ **Rodríguez-Concepción M, Boronat A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*. **130(3)**:1079-89.
  - ❖ **Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S, Zik M, Fromm H, Gruissem W.** (1999). The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J*. **18(7)**:1996-2007.
  - ❖ **Rodríguez-Concepción M.** (2006). Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochemistry Reviews*. **5(1)**:1-15.
  - ❖ **Rodríguez-Concepción M.** (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys*. **504(1)**:118-22.
  - ❖ **Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W.** (2004). Perspectives in anti-infective drug design. The late steps in the biosynthesis of the universal terpenoid precursors, isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Bioorg Chem*. **32(5)**:292-308.
  - ❖ **Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H.** (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*. **295 (Pt 2)**:517-24.
  - ❖ **Rondeau JM, Bitsch F, Bourgier E, Geiser M, Hemmig R, Kroemer M, Lehmann S, Ramage P, Rieffel S, Strauss A, Green JR, Jahnke W.** (2006). Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *Chem Med Chem*. **1(2)**:267-73.
  - ❖ **Rowinsky EK.** (1994). Update on the antitumor activity of paclitaxel in clinical trials. *Ann. Pharmacother*. **28**:S18-22.
  - ❖ **Rowling PJ, Freedman RB.** (1993). Folding, assembly, and posttranslational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem*. **21**:41-80.
  - ❖ **Runquist M, Ericsson J, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G.** (1994). Isoprenoid biosynthesis in rat liver mitochondria. Studies on farnesyl pyrophosphate synthase and trans-prenyltransferase. *J Biol Chem*. **269(8)**:5804-9.
  - ❖ **Rupasinghe PVH, Almquist CK, Paliyath G, Murr PD.** (2001). Cloning of hmg1 and hmg2 cDNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and their

- expression and activity in relation to a-farnesene synthesis in apple. *Plant Physiol Biochem.* **39**:933–47.
- ❖ **Russell DW, Davidson H.** (1982). Regulation of cytosolic HMG-CoA reductase activity in pea seedlings: contrasting responses to different hormones, and hormone-product interaction, suggest hormonal modulation of activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **104(4)**:1537-43.
  - ❖ **Russell DW, Davidson H.** (1982). Regulation of cytosolic HMG-CoA reductase activity in pea seedlings: contrasting responses to different hormones, and hormone product interaction, suggest hormonal modulation of activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **104**:1537–43.
  - ❖ **Sabde S, Bodiwala HS, Karmase A, Deshpande PJ, Kaur A, Ahmed N, Chauthe SK, Brahmhatt KG, Phadke RU, Mitra D, Bhutani KK, Singh IP.** (2011). Anti-HIV activity of Indian medicinal plants. *J Nat Med.* **65(3-4)**:662-9.
  - ❖ **Sakakibara H.** (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 431-449.
  - ❖ **Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabès F, Duffé P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N, Causse M, Tissier A.** (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell.* **21(1)**:301-17.
  - ❖ **Sanmiya K, Iwasaki T, Matsuoka M, Miyao M, Yamamoto N.** (1997). Cloning of a cDNA that encodes farnesyl diphosphate synthase and the blue-light-induced expression of the corresponding gene in the leaves of rice plants. *Biochim Biophys Acta.* **1350(3)**:240-6.
  - ❖ **Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N.** (1999). Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **40(3)**:348-54.
  - ❖ **Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D, Eyal Y.** (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* **148(3)**:1219-28.
  - ❖ **Sato M, Sato K, Nishikawa S, Hirata A, Kato J, Nakano A.** (1999). The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol.* **19(1)**:471-83.
  - ❖ **Schaller H, Grausem B, Benveniste P, Chye ML, Tan CT, Song YH, Chua NH.** (1995). Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in Sterol Overproduction. *Plant Physiol.* **109(3)**:761-770.

- ❖ **Schaller H.** (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res.* **42(3)**:163-75.
- ❖ **Scheek, S., Brown, M. S., and Goldstein, J. L.** (1997). Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 11179–11183.
- ❖ **Schmidt A, Gershenzon J.** (2007). Cloning and characterization of two different types of geranyl diphosphate synthases from Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry.* **69(1)**:49-57.
- ❖ **Schulbach MC, Brennan PJ, Crick DC.** (2000). Identification of a short (C15) chain Z-isoprenyl diphosphate synthase and a homologous long (C50) chain isoprenyl diphosphate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* **275(30)**:2276-81.
- ❖ **Sen SE, Trobaugh C, Béliveau C, Richard T, Cusson M.** (2007). Cloning, expression and characterization of a dipteran farnesyl diphosphate synthase. *Insect Biochem Mol Biol.* **37**: 1198-1206.
- ❖ **Shechtman CF, Henneberry AL, Seimon TA, Tinkelenberg AH, Wilcox LJ, Lee E, Fazlollahi M, Munkacsı AB, Bussemaker HJ, Tabas I, Sturley SL.** (2011). Loss of subcellular lipid transport due to ARV1 deficiency disrupts organelle homeostasis and activates the unfolded protein response. *J Biol Chem.* **286(14)**:11951-9.
- ❖ **Shimizu N, Koyama T, Ogura K.** (1998). Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases. *J Biol Chem.* **273(31)**:19476-81.
- ❖ **Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, Ginis O, Bouzid S, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M.** (2011). Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta.* **234(5)**:903-14.
- ❖ **Simon-Plas F, Perraki A, Bayer E, Gerbeau-Pissot P, Mongrand S.** (2011). An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol.* **14**:1-8.
- ❖ **Singh AK, Tavva VS, Collins GB, Palli SR.** (2010). Improvement of ecdysone receptor gene switch for applications in plants: *Locusta migratoria* retinoid X receptor (LmRXR) mutagenesis and optimization of translation start site. *FEBS J.* **277(22)**:4640-50.
- ❖ **Song L, Poulter CD.** (1994). Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(8)**:3044-8.
- ❖ **Souret FF, Kim Y, Wyslouzil BE, Wobbe KK, Weathers PJ.** (2003). Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnol Bioeng.* **83(6)**:653-67.

- ❖ **Spassieva S, Hille J.** (2003). Plant Sphingolipids Today - Are They Still Enigmatic?. *Plant Biology*. **5(2)**:125–136.
- ❖ **Spassieva SD, Markham JE, Hille J.** (2002). The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J*. **32(4)**:561-72.
- ❖ **Stermer BA, Bianchini GM, Korth KL.** (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res*. **35(7)**:1133-40.
- ❖ **Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, Seki H, Ohyama K, Kato H, Masuda K, Sato S, Kato T, Tabata S, Yoshida S, Muranaka T.** (2004). Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant J*. **37(5)**:750-61.
- ❖ **Suzuki M, Muranaka T.** (2007). Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids*. **42(1)**:47-54.
- ❖ **Swain E, Baudry K, Stukey J, McDonough V, Germann M.** (2002b). Sterol dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **277**: 26177–26184.
- ❖ **Swain E, Stukey J, McDonough V, Germann M, Liu Y, Sturley SL, Nickels JT Jr.** (2002). Yeast cells lacking the ARV1 gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human ARV1. *J Biol Chem*. **277(39)**:36152-60.
- ❖ **Szkopińska A, Plochocka D.** (2005). Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Polon*. **52**: 45-55.
- ❖ **Szkopińska A.** (2000). Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim Pol*. **47(2)**:469-80.
- ❖ **Taban AH, Tittiger C, Blomquist GJ, Welch WH.** (2009). Isolation and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Arch Insect Biochem Physiol*. **71(2)**:88-104.
- ❖ **Takahashi S, Koyama T.** (2006). Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Chem Rec*. **6(4)**:194-205.
- ❖ **Tarshis LC, Yan M, Poulter CD, Sacchettini JC.** (1994). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry*. **33(36)**:10871-7.
- ❖ **Tarshis LC, Proteau PJ, Kellogg BA, Sacchettini JC, Poulter CD.** (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci*. **93**: 15018.
- ❖ **Tavva VS, Dinkins RD, Palli SR, Collins GB.** (2006). Development of a methoxyfenozide-responsive gene switch for applications in plants. *Plant J*. **45(3)**:457-69.

- ❖ **Thabet I, Guirimand G, Courdavault V, Papon N, Godet S, Dutilleul C, Bouzid S, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Simkin AJ.** (2011). The subcellular localization of periwinkle farnesyl diphosphate synthase provides insight into the role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis. *J Plant Physiol.* **168(17)**:2110-6.
- ❖ **Tharayil N.** (2009). To survive or to slay: Resource-foraging role of metabolites implicated in allelopathy. *Plant Signal Behav.* **4(7)**:580-3.
- ❖ **Tholl D, Croteau R, Gershenzon J.** (2001). Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch Biochem Biophys.* **386(2)**:233-42.
- ❖ **Tholl D, Lee S.** (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* **9:e0143**.
- ❖ **Thompson GA Jr, Okuyama H.** (2000). Lipid-linked proteins of plants. *Prog Lipid Res.* **39(1)**:19-39.
- ❖ **Tinkelenberg AH, Liu Y, Alcantara F, Khan S, Guo Z, Bard M, Sturley SL.** (2000). Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *J Biol Chem.* **275(52)**:40667-70.
- ❖ **Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA, Murphy AS.** (2009). ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57(1)**:27-44.
- ❖ **Tong F, Billheimer J, Shechtman CF, Liu Y, Crooke R, Graham M, Cohen DE, Sturley SL, Rader DJ.** (2010). Decreased expression of ARV1 results in cholesterol retention in the endoplasmic reticulum and abnormal bile acid metabolism. *J Biol Chem.* **285(44)**:33632-41.
- ❖ **Toroser D, Huber SC.** (1998). 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase kinase and sucrose-phosphate synthase kinase activities in cauliflower florets: Ca<sup>2+</sup> dependence and substrate specificities. *Arch Biochem Biophys.* **355**:291–300.
- ❖ **Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P.** (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* **101(3)**:249-58.
- ❖ **Valachovic M, Wilcox LI, Sturley SL, Bard M.** (2004). A mutation in sphingolipid synthesis suppresses defects in yeast ergosterol metabolism. *Lipids.* **39(8)**:747-52.
- ❖ **Valitova JN, Minibayeva FV, Kotlova ER, Novikov AV, Shavarda AL, Murtazina LI, Ryzhkina IS.** (2011). Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: the changes in membrane permeability, sterols and glycosceramides. *Phytochemistry.* **72(14-15)**:1751-9.

- ❖ **Vandermoten S, Haubruge E, Cusson M.** (2009). New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cell Mol Life Sci.* **66**: 3685-3695.
- ❖ **Veen M, Lang C.** (2005). Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem Soc Trans.* **33(Pt 5)**:1178-81.
- ❖ **Vesper H, Schmelz EM, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill AH Jr.** (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J Nutr.* **129(7)**:1239-50.
- ❖ **Villasmil ML, Ansbach A, Nickels JT Jr.** (2011). The putative lipid transporter, Arv1, is required for activating pheromone-induced MAP kinase signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **187(2)**:455-65.
- ❖ **Villasmil ML, Nickels JT Jr.** (2011). Determination of the membrane topology of Arv1 and the requirement of the ER luminal region for Arv1 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **11(6)**:524-7. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00737.
- ❖ **Voinnet O.** (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell.* **136(4)**:669-87.
- ❖ **Wang KC, Ohnuma S.** (2000). Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta.* **1529(1-3)**:33-48.
- ❖ **Wang P, Liao Z, Guo L, Li W, Chen M, Pi Y, Gong Y, Sun X, Tang K.** (2004). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding *Ginkgo biloba* farnesyl diphosphate synthase. *Mol Cells.* **18(2)**:150-6.
- ❖ **Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S.** (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **20(11)**:3163-79.
- ❖ **Warnecke D, Heinz E.** (2003). Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci.* **60(5)**:919-41.
- ❖ **Watanabe R, Funato K, Venkataraman K, Futerman AH, Riezman H.** (2002). Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J Biol Chem.* **277**:49538-44.
- ❖ **Weir TL, Park SW, Vivanco JM.** (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr Opin Plant Biol.* **7(4)**:472-9.
- ❖ **Wentzinger LF, Bach TJ, Hartmann MA.** (2002). Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Plant Physiol.* **130(1)**:334-46.

- ❖ **Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27(6)**:581-90.
- ❖ **Wilkin DJ, Kutsunai SY, Edwards PA.** (1990). Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester. *J Biol Chem.* **265(8)**:4607-14.
- ❖ **Wille A, Zimmermann P, Vranová E, Fürholz A, Laule O, Bleuler S, Hennig L, Prelic A, von Rohr P, Thiele L, Zitzler E, Gruissem W, Bühlmann P.** (2004). Sparse graphical Gaussian modeling of the isoprenoid gene network in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* **5(11)**:R92.
- ❖ **Wong RJ, Mc Cormack DK, Russell DW.** (1982). Plastid 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase has distinct kinetic and regulatory features: properties of the enzyme and positive phytochrome control of activity in pea seedlings. *Arch Biochem Biophys.* **216**:631–8.
- ❖ **Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopoulos M, Gray JE, Hetherington AM.** (2008). Involvement of Sphingosine Kinase in Plant Cell Signalling. *Plant J.* **56(1)**:64-72.
- ❖ **Wright BS, Snow JW, O'Brien TC, Lynch DV.** (2003). Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Arch Biochem Biophys.* **415(2)**:184-92.
- ❖ **Yang Z, Park H, Lacy GH, Cramer CL.** (1991). Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell.* **3**:397–405.
- ❖ **Yeh LS, Rilling HC.** (1977). Purification and properties of pig liver prenyltransferase: interconvertible forms of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.* **183(2)**:718-25.
- ❖ **Zäuner S, Ternes P, Warnecke D.** (2010). Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol.* **688**:249-63.
- ❖ **Zeldovich BZ, Berezovsky IN, Shakhnovich EI.** (2007). Protein and DNS sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol.* **3**: e5.
- ❖ **Zhang G, Slaski JJ, Archambault DJ, Taylor GJ.** (1997). Alternation of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiologia Plantarum.* **99(2)**:302–308.



## PUBLICACIONES

