

## Paper de les proteïnes AtKLC-1 i AtB” en la regulació de l’HMG-CoA reductasa d’ *“Arabidopsis thaliana”*

Merixell Antolín Llovera

**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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) 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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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.

**Paper de les proteïnes AtKLC-1 i  
AtB'' en la regulació de l'HMG-CoA  
reductasa d'*Arabidopsis thaliana***

**Meritxell Antolín Llovera  
2005**

Tesi Doctoral

**Paper de les proteïnes AtKLC-1 i AtB” en la  
regulació de l’HMG-CoA reductasa  
d’*Arabidopsis thaliana***

Memòria presentada per  
**Meritxell Antolín Llovera**

per optar al grau de  
**Doctora**

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Narciso Campos Martínez i  
el Dr. Santiago Imperial Ródenas  
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la  
Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat de Bioquímica i Biologia Molecular  
Bienni 2001-2003

Els directors,

L’autora,

Dr. Narciso Campos Martínez    Dr. Santiago Imperial Ródenas    Meritxell Antolín Llovera

## ABREVIATURES

<b>AACT</b>	Acetoacetil CoA tiolasa
<b>ABA</b>	Àcid abscíssic
<b>AD</b>	Domini d'activació de Gal 4 ( <i>activating domain</i> )
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-monofosfat
<b>AMPK</b>	Quinasa activades per AMP
<b>AMPKK</b>	Quinasa de l'AMPK
<b>ASBD1</b>	Domini d'unió número 1 a la subunitat PR65
<b>ASBD2</b>	Domini d'unió número 2 a la subunitat PR65
<b>3-AT</b>	3-amino-1,2,4-triazol
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfat
<b>BD</b>	Domini d'unió al DNA de Gal 4 ( <i>binding domain</i> )
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CA</b>	Cantaridina
<b>CD1</b>	Domini catalític de l'HMGR1
<b>CD2</b>	Domini catalític de l'HMGR2
<b>cDNA</b>	DNA còpia
<b>CoA</b>	Coenzim A
<b>Col.</b>	Columbia
<b>C-terminal</b>	Carboxi terminal
<b>Da, kDa</b>	Dalton, kilodalton
<b>DMAPP</b>	Dimetilal.lildifosfat
<b>DNA</b>	Àcid desoxirribonucleic
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DXR</b>	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat reductoisomerasa
<b>DXP</b>	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat
<b>DXS</b>	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat sintasa
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetracètic
<b>EGTA</b>	Àcid etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracètic
<b>EST</b>	<i>Expressed sequence tag</i>
<b>FPP</b>	Farnesil difosfat
<b>FPS</b>	Farnesil difosfat sintasa
<b>FTasa</b>	Farnesil transferasa
<b>G3P</b>	Gliceraldehid 3-fosfat
<b>GFP</b>	Proteïna verda fluorescent ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>GGPP</b>	Geranilgeranil difosfat
<b>GGPS</b>	Geranilgeranil difosfat sintasa
<b>GPP</b>	Geranil difosfat
<b>GST</b>	Glutatió-S-transferasa
<b>GGTasa</b>	Geranilgeranil transferasa
<b>HEAT</b>	Motiu proteic ( <i>Huntingtin, Elongation factor, A subunit i Tor kinase</i> )
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
<b>HMGR</b>	HMG-CoA reductasa
<b>HMGR1L</b>	Isoforma llarga de l'HMGR1
<b>HMGR1S</b>	Isoforma curta de l'HMGR1
<b>HMGs</b>	HMG-CoA sintasa
<b>HR</b>	Repeticions tipus <i>heptad</i> ( <i>heptad repeats</i> )

<b>HRK</b>	HMGR quinasa (HMGR <i>related kinase</i> )
<b>HSF-2</b>	<i>Heat Shock Factor 2</i>
<b>IPI</b>	Isopentenildifosfat isomerasa
<b>IPP</b>	Isopentenildifosfat
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosid
<b>KHC</b>	Cadena pesant de quinesina de tipus I
<b>KLC</b>	Cadena lleugera de quinesina de tipus I
<b>1L-extra</b>	50 aminoàcids extra de l'extrem N-terminal de la isoforma HMGR1L
<b>LB</b>	Brou de cultiu Laura Broth
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>MEP</b>	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat
<b>MVA</b>	Mevalonat o àcid mevalònic
<b>MVK</b>	Mevalonat quinasa
<b>mRNA</b>	RNA missatger
<b>NADP</b>	Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat, forma oxidada
<b>NADPH</b>	Nicotinamidoadenín dinucleòtid fosfat, forma reduïda
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>NT1L</b>	Regió N-terminal de la isoforma HMGR1L
<b>NT1S</b>	Regió N-terminal de la isoforma HMGR1S
<b>NT2</b>	Regió N-terminal de la isoforma HMGR2
<b>OA</b>	Àcid okadaic
<b>ORF</b>	Pauta de lectura oberta ( <i>open reading frame</i> )
<b>pb, kb</b>	Parells de bases, kilobases
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PMD</b>	Mevalonat 5-fosfat quinasa
<b>PMK</b>	Mevalonat 5-difosfodecarboxilasa
<b>PMSF</b>	Fluorur de fenilmetilsulfonil
<b>PP</b>	Fosfoproteïna fosfatasa
<b>PP1</b>	Proteïna fosfatasa 1
<b>PP2A</b>	Proteïna fosfatasa 2A
<b>PP5</b>	Proteïna fosfatasa 5
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>RE</b>	Reticle endoplasmàtic
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>rRNA</b>	RNA ribosomal
<b>RT-PCR</b>	Retrotranscripció acoblada a PCR
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
<b>SMT1</b>	C24-esterol metiltransferasa
<b>SMT2</b>	C28-esterol metiltransferasa
<b>SN</b>	Sobrenedant
<b>SNF1</b>	Quinasa <i>saccharose non fermenting 1</i>
<b>SnRK</b>	Quinasa relacionada amb SNF1 ( <i>SNF1 related kinase</i> )
<b>SQS</b>	Esqualè sintasa
<b>SRP</b>	<i>Signal recognition particle</i>
<b>TBY2</b>	Cèl·lules en cultiu de tabac ( <i>tobacco brilliant yellow-2</i> )
<b>TLC</b>	Capa prima, silicagel

<b>TPR</b>	Repeticions tipus tetratricopèptid
<b>5'-UTR</b>	Regió a 5' transcrita no traduïda
<b>WS-2</b>	Wassilewskija-2
<b>xg</b>	Gravetats
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranòsid



# ÍNDEX

## Introducció

<b>1.- INTRODUCCIÓ A L'HMGR.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- ELS ISOPRENOIDES.....</b>	<b>2</b>
2.1.- VARIETAT ESTRUCTURAL, FUNCIONAL I BIOSÍNTESI .....	2
2.2.- DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE LA BIOSÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN PLANTES SUPERIORS.....	4
2.2.1.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del mevalonat.....	6
2.2.2.- Relació entre les dues vies de síntesi de l'IPP .....	8
2.3.- FAMÍLIES MULTIGÈNIQUES IMPLICADES EN LA SÍNTESI D'ISOPRENOIDES EN <i>ARABIDOPSIS</i> . <i>THALIANA</i> .....	9
<b>3.- L'HMGR.....</b>	<b>12</b>
3.1.- CARACTERÍSTIQUES GENERALS .....	12
3.2.- L'HMGR CATALITZA UN PAS LIMITANT EN LA SÍNTESI D'ISOPRENOIDES.....	12
3.3.- LA FAMÍLIES MULTIGÈNICA <i>HMG</i> .....	13
3.3.1.- Isoformes en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
3.4.- ESTRUCTURA I TOPOLOGIA .....	18
3.5.- PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR.....	20
3.6.- REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT HMGR.....	24
3.6.1.- Per retroalimentació .....	25
3.6.2.- Efecte de l'estadi del desenvolupament.....	25
3.6.3.- Per factors endògens.....	26
3.6.4.- Per factors ambientals.....	26
3.6.5.- Mecanismes de modulació posttraduccional.....	27
<b>4.- LA PROTEÏNA FOSFATASA 2A .....</b>	<b>30</b>
4.1.- LA SUBUNITAT PR65.....	31
4.2.- LA SUBUNITAT DE TIPUS B.....	34
<b>5. LA QUINESINA DE TIPUS I.....</b>	<b>35</b>
<b>6.- ESTUDIS DE LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR.....</b>	<b>37</b>
6.1.- ORGANITZACIÓ DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN LES CÈL·LULES VEGETALS.....	37



# Objectius

<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>43</b>
------------------------	-----------

## Materials i mètodes

<b>1- EL MATERIAL BIOLÒGIC</b> .....	<b>47</b>
1.1.- <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	47
1.2.- <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	47
1.3.- <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	48
<b>2.- ELS PLASMIDIS</b> .....	<b>50</b>
2.1.- EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRID .....	50
2.2.- EXPRESSIÓ EN <i>E. COLI</i> .....	51
2.3.- SÍNTESI <i>IN VITRO</i> .....	52
2.4.- EXPRESSIÓ TRANSITÒRIA EN FULLES .....	52
<b>3.- ELS OLIGONUCLEÒTIDS</b> .....	<b>53</b>
<b>4.- ELS ANTICOSSOS</b> .....	<b>54</b>
<b>5.- MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC</b> .....	<b>54</b>
5.1.- MÈTODES DE TREBALL EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	54
5.2.- MÈTODES DE TREBALL EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	54
5.3.- MÈTODES DE TREBALL EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	54
5.3.1.- Esterilització de llavors d' <i>A. thaliana</i> .....	56
<b>6.- ANÀLISI MOLECULAR DE LES LÍNIES INSERCIONALS DE T-DNA</b> .....	<b>57</b>
6.1.- EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC.....	60
<b>7.- RT-PCR SEMIQUANTITATIVA</b> .....	<b>61</b>
7.1.- EXTRACCIÓ DE RNA.....	61
7.2.- ELIMINACIÓ DE LES RESTES DE DNA GENÒMIC.....	61
7.3.- RETROTRANSCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ DE RNA.....	61
7.4.- AMPLIFICACIÓ PER PCR SOBRE LA POBLACIÓ DE CDNA .....	62

7.5.- FONAMENTS DE LA QUANTIFICACIÓ RELATIVA MITJANÇANT RT-PCR.....	62
<b>8.- CRIVELLATGE D'UNA GENOTECA DE CDNA D'ARABIDOPSIS THALIANA PER LA TÈCNICA DE DOBLE HÍBRID EN LLEVAT .....</b>	<b>64</b>
8.1.- PREPARACIÓ DE LA LLIBRERIA DE $\lambda$ -ACT D'ARABIDOPSIS THALIANA .....	65
8.1.2.- Titulació de la llibreria .....	65
8.1.3.- Conversió de la llibreria $\lambda$ -ACT a pACT .....	66
8.2.- PREPARACIÓ DE DNA DE CADENA SENZILLA D'ALT PES MOLECULAR.....	67
<b>9.- ASSAIG D'ACTIVITAT HMGR.....</b>	<b>68</b>
9.1.- OBTENCIÓ DE LA MOSTRA.....	68
9.2.- ASSAIG D'ACTIVITAT .....	68
9.3.- QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE BRADFORD.....	71
<b>10.- ASSAIG GST PULL-DOWN IN VITRO .....</b>	<b>72</b>
10.1.- EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES FUSIONADES A GST A PARTIR D'E. COLI .....	72
10.2.- TRANSCRIPCIÓ-TRADUCCIÓ IN VITRO .....	73
10.3.- ASSAIG D'INTERACCIÓ DE TIPUS GST PULL-DOWN.....	73
10.3.1.- Preparació de la proteïna test.....	73
10.3.2.- Preparació de la proteïna esquer.....	73
10.3.3.- Assaig d'unió.....	73
10.4.- FLUOROGRAFIA.....	74
10.5.- PURIFICACIÓ DE LA PR65 MITJANÇANT UNA MATRIU D'AFINITAT DE GST:KLC-1 .....	74
10.5.1.- Preparació dels extractes d'Arabidopsis thaliana.....	74
10.5.2.- Assaig d'unió.....	74
10.6.- IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES PER WESTERN-BLOT .....	75
<b>11.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR.....</b>	<b>76</b>
11.1.- MICROBOMBARDEIG DE FULLES D'ARABIDOPSIS THALIANA .....	76
11.1.1.- Preparació de les micropartícules .....	76
11.1.2.- Precipitació del DNA sobre les micropartícules.....	76
11.1.3.- Bombardeig de les micropartícules.....	77
11.2.- PREPARACIÓ DE LA MOSTRA .....	77
11.3.- MICROSCOPIA LÀSER CONFOCAL .....	78
<b>12.- BIOINFORMÀTICA.....</b>	<b>79</b>

# Resultats

<b>1.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS GENS <i>HMG1</i> I <i>HMG2</i> D'ARABIDOPSIS THALIANA</b> .....	<b>83</b>
1.1.- ESTUDI DE MUTANTS.....	83
1.1.1.- Identificació.....	83
1.1.2.- Característiques fenotípiques.....	85
1.1.3.- Activitat HMGR i sensibilitat a inhibidors.....	88
1.2.- CERCA DE PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB L'HMGR .....	91
1.2.1.- El sistema del doble híbrid per a l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna .....	91
1.2.2.- Crivellatge amb el domini catalític de l'HMGR1 .....	92
1.2.3.- Crivellatge amb la regió N-terminal de l'HMGR2 .....	95
<b>2.- CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB L'HMGR1</b> 96	
2.1.- LA PROTEÏNA ATKLC-1.....	96
2.1.1. Interacció amb la PR65 .....	96
2.1.1.1.- Confirmació de la interacció per assaigs <i>in vitro</i> .....	100
2.1.1.2.- Acotament de la zona de la interacció.....	102
2.1.2.- INTERACCIÓ AMB LA PROTEÏNA ATKHC.....	103
2.2.- LA FAMÍLIA ATB” .....	107
2.2.1.- Caracterització, anàlisi filogenètic i patró d'expressió.....	107
2.2.1.- Unió de calci i el seu paper en les interaccions.....	112
<b>3.- CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE L'HMGR.....</b>	<b>115</b>
3.1.- EFECTE DEL CALCI .....	115
3.2.- PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL.....	117
3.3.- PAPER DE LA PP2A .....	119
3.3.1.- Efecte de mutants de la PP2A .....	119
3.3.2.- Efecte d'inhibidors de la PP2A.....	122
3.3.3.- Efecte sobre l'activitat HMGR mesurada <i>in vivo</i> .....	124
3.3.4.- Efecte sobre els nivells de transcrits <i>hmg1</i> i <i>hmg2</i> .....	126
<b>4- FUNCIÓ DE LA PP2A EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR .....</b>	<b>128</b>
4.1.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA QUIMERA 1S:GFP EN CÈL·LULES EPIDÈRMiques DE PLANTES D'ECOTIPS SILVESTRES.....	131
4.2.- PAPER DEL MOTIU CONSERVAT D'ARGININES.....	134

4.3- EFECTE DE LA CANTARIDINA EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA 1S:GFP .....	135
4.4- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA QUIMERA 1S:GFP EN MUTANTS DE LA PP2A .....	137
4.4.1.- Fons mutant <i>rcn1-1</i> .....	137
4.4.2.- Fons mutant $B''\alpha-1$ , $B''\alpha-2$ o $B''\alpha-3$ .....	139
4.5.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA QUIMERA 1L:GFP EN EL FONTS MUTANT <i>RCN1-1</i> .....	141
4.6.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA QUIMERA 2:GFP EN EL FONTS MUTANT <i>RCN1-1</i> .....	142

## Discussió

<b>1.- IDENTIFICACIÓ D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA PER LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID .....</b>	<b>147</b>
<b>2.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL GEN <i>HMG1</i> D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ..</b>	<b>149</b>
2.1.- ANÀLISI DEL FENOTIP EN EL MUTANT <i>HMG1-1</i> .....	149
2.2.- CONTRIBUTIÓ DEL GEN <i>HMG1</i> A L'ACTIVITAT HMGR .....	154
2.3.- PAPER DEL DOMINI CATALÍTIC EN L'OLIGOMERITZACIÓ DE L'HMGR .....	156
<b>3.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL GEN <i>HMG2</i> D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ..</b>	<b>157</b>
<b>4.- INTERACCIONS DE L'ATKLC-1 AMB ALTRES PROTEÏNES .....</b>	<b>159</b>
4.1.- AMB LA SUBUNITAT A DEL COMPLEX PP2A .....	159
4.2.- AMB L'ATKHC .....	162
<b>5.- PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL EN EL CONTROL DE L'HMGR .....</b>	<b>164</b>
<b>6.- PAPER DE LA PP2A EN EL CONTROL DE L'HMGR .....</b>	<b>166</b>
<b>7.- PAPER DEL CALCI EN EL CONTROL DE L'HMGR .....</b>	<b>170</b>
<b>8.- ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LES ISOFORMES DE L'HMGR .....</b>	<b>172</b>
8.1.- DESCRIPCIÓ DEL SISTEMA D'ESTUDI .....	172
8.2.- PARTICIPACIÓ DE LA PP2A .....	172
8.3.- FUNCIÓ DEL DOMINI N-TERMINAL DE L'HMGR EN LA BIOGÈNESI DE MEMBRANES .....	176
8.4.- PAPER DE LES VESÍCULES .....	179

## **Conclusions**

<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>183</b>
-------------------------	------------

## **Bibliografia**

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>189</b>
--------------------------	------------

**introducció**

---



## 1.- INTRODUCCIÓ A L'HMGR

La proteïna 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) d'*Arabidopsis thaliana* és l'objecte central d'estudi de la memòria presentada. El control de l'HMGR és un exemple paradigmàtic de regulació a tots els nivells que engloba tant mecanismes transcripcionals com posttraduccional. El treball dut a terme pels autors Goldstein i Brown sobre la regulació de l'HMGR en mamífers i el seu paper en el control del metabolisme del colesterol va merèixer el reconeixement del premi Nobel l'any 1985 (revisat a Goldstein and Brown, 1990). Un gran nombre d'estudis ha permès dilucidar el mecanisme de control de l'HMGR en llevats (revisat a Hampton et al., 1996).

L'enzim HMGR catalitza la reacció irreversible de reducció del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonat, primer intermediari específic de la via del mevalonat que aporta substrats per a la síntesi de compostos isoprenoides, com per exemple els esterols. En la majoria de les vies metabòliques el flux és controlat per unes poques etapes catalitzades normalment per reaccions irreversibles. Aquest és el cas de l'HMGR que controla el flux de la via del mevalonat fins a la formació de l'isopentenildifosfat (IPP) i el seu isòmer dimetilal·lildifosfat (DMAPP). L'IPP i el DMAPP, en general anomenats unitats d'isoprè són els blocs bàsics de la construcció dels isoprenoides. Diferents enzims participen en el control de la ruta de síntesi d'isoprenoides, permetent satisfer els diferents requeriments de la cèl·lula a cada moment.

S'han realitzat també molts estudis sobre la regulació de l'HMGR en plantes. Tot i això, persisteixen molts interrogants sobre com es duu a terme el seu control. S'ha descrit en aquests organismes, l'existència de diverses isoformes de l'HMGR codificades per una família multigènica. Cada isoforma podria tenir funcions específiques en la síntesi d'isoprenoides. A diferència de la resta d'organismes, en les plantes existeix una gran diversitat de compostos isoprenoides que tenen funcions especials particulars tant en l'àmbit del metabolisme primari com en el del metabolisme secundari. En les cèl·lules vegetals hi ha dues vies de biosíntesi de l'IPP i el DMAPP: la via del mevalonat de localització citosòlica i la via del metileritritolfosfat de localització plastídica.

S'ha escollit com a organisme model per als estudis presentats *Arabidopsis thaliana* perquè ofereix els avantatges propis d'un organisme model. És petita, pel què permet créixer molts individus en un espai relativament reduït. El seu període generacional és mínim, de sols cinc setmanes, quan les condicions de cultiu són òptimes. Conté el genoma vegetal conegut més petit ( $7 \cdot 10^7$ pb), ja completament seqüenciat des de l'any 2000 (Initiative\*, 2000), comparable en quan a mida al de *Saccharomyces cerevisiae* ( $2 \cdot 10^7$ pb) i al de *Drosophila melanogaster* ( $10 \cdot 10^7$ pb). Es disposen a més, de col·leccions de mutants insercionals de T-DNA en què molts dels llocs d'inserció ja han estat seqüenciats i estan disponibles en bases de dades públiques.



## 2.- ELS ISOPRENOIDES

### 2.1.- Varietat estructural, funcional i biosíntesi

Els isoprenoides o terpenoides són un grup de compostos sintetitzats en tots els organismes que mostren una gran diversitat d'estructures i de funcions (taula 1). És en les plantes, però, on aquests compostos assoleixen una complexitat funcional i estructural màxima (Chapman and Hill, 2000). S'han identificat fins a aproximadament uns 29.000 derivats isoprenoides diferents amb atribucions molt diverses necessàries per al funcionament bàsic de la cèl·lula, per a la formació i manteniment dels diferents teixits, i per a la resposta i adaptació de l'organisme al medi extern.

Pel que fa al metabolisme primari de la cèl·lula, es troben isoprenoides participant en cadenes de transport d'electrons (ubiquinona, plastoquinona, clorofil·la), com a reguladors del creixement i del desenvolupament (citoquinines, brassinoesteroides, esterols, àcid abscísic, giberel·lines), participant en cascades de senyalització i en la regulació del cicle cel·lular (proteïnes prenilades); implicats en l'arquitectura de les membranes (esterols), com a protectors de l'aparell fotosintètic (carotenoides)... (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey and Croteau, 1995; Bramley, 1997; McCaskill, 1998). Totes les plantes sintetitzen els isoprenoides essencials per al seu creixement i desenvolupament i a més s'han especialitzat en la síntesi de terpenoides particulars que realitzen funcions com a metabòlits secundaris. És en aquest darrer aspecte on radica la gran heterogeneïtat que mostren aquests compostos. Tenen un paper en la defensa a l'atac per patògens, en processos de senyalització entre plantes, o com a atraients de pol·linitzadors (monoterpens, sesquiterpens, diterpens). La indústria farmacèutica i agroalimentària ha aprofitat les propietats d'alguns d'aquests compostos per comercialitzar-los com a aromes, pigments, polímers, fibres i fàrmacs (revisat a Chappell, 2002). Altres exemples són els carotenoides a partir dels quals se sintetitza la vitamina A, o els fitoesterols incorporats en alguns productes alimentaris amb la finalitat de disminuir els nivells de colesterol en sang.

A pesar de l'heterogeneïtat estructural, tots els compostos isoprenoides deriven de dues molècules de cinc àtoms de carbonis, l'IPP i el seu isòmer el DMAPP, anomenades unitats d'isoprè (figura 1). La unitat d'isoprè és el bloc estructural a partir del qual se sintetitzen tots els isoprenoides (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey and Croteau, 1995; Bramley, 1997; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). En reaccions de condensació catalitzades per prenil-transferases les unitats d'isoprè s'afegeixen cap a cua per formar geranil difosfat (GPP, C<sub>10</sub>), farnesil difosfat (FPP, C<sub>15</sub>) i geranilgeranil difosfat (GGPP, C<sub>20</sub>). Té lloc el mateix mecanisme de catalisi enzimàtica on es duu a terme l'atac d'un carbocatió (àtom de carboni electròfil per la pèrdua del difosfat) sobre un àtom ric en electrons d'un doble enllaç de la molècula d'IPP. Dues molècules de FPP donen lloc a l'esqualè (C<sub>30</sub>), dues molècules de GGPP donen lloc al fitoè (C<sub>40</sub>) per acció de l'esqualè sintasa i la fitoè sintasa, respectivament, que catalitzen reaccions de condensació cap a cap. Altres reaccions de transferència de grups prenil donen lloc a prenil difosfats de cadena més llarga. A partir dels prenils difosfat, mitjançant altres reaccions, moltes d'elles de ciclació intramolecular, se sintetitzen els hemiterpens (derivats de l'isoprè), els monoterpens (derivats del GPP), els sesquiterpens (derivats del FPP), els diterpens (derivats del

GGPP), els triterpens (derivats de l'esqualè), els tetraterpens (derivats del fitoè), i a partir de prenildifosfats de cadena més llarga s'obtenen els politerpens. Els terpens finals són el resultat d'altres reaccions que inclouen processos d'hidroxilació, de metilació, d'isomerització, de demetilació o de reducció. Mitjançant reaccions de transferència, grups prenil són units covalentment a altres constituents cel·lulars. Com a exemples, la cadena fitol al grup hemo de la clorofil·la, o el FPP i el GPP que són substrats per a la prenilació de proteïnes.

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

	<b>Terpens</b>	<b>Exemples</b>	<b>Funcions</b>	<b>Distribució en organismes</b>
C <sub>5</sub>	Hemiterpens	isopentenil-tRNA citoquinines	traducció proteica hormona vegetal	tots els organismes plantes superiors
C <sub>10</sub>	Monoterpens	essències de flors/plantes (mentol)	comunicació entre plantes/activitat antimicrobiana aromes, perfums	plantes superiors i algues
C <sub>15</sub>	Sesquiterpens	fitoalexines (capsidiol)	antidigestius per insectes/micotoxines/activitat antimicrobiana	plantes superiors, hepàtiques, molses, fongs, algues
C <sub>20</sub>	Diterpens	fitol, grup lateral de clorofil·la grup lateral de tocoferol i filoquinones fitoalexines giberel·lines taxol	cadena de transport d'electrons activitat antimicrobiana hormona vegetal antitumoral	plantes superiors, algues plantes superiors, fongs
C <sub>30</sub>	Triterpens	esterols brassinosteroides altres triterpens (saponina)	fluïdesa de membranes hormona vegetal interacció amb l'entorn	tots els organismes plantes superiors
C <sub>40</sub>	Tetraterpens	carotenoids	protectors de l'aparell fotosintètic pigments, vitamina A	plantes superiors
C <sub>&gt;40</sub>	Politerpens	ubiquinona plastoquinona dolicol	cadena de transport d'electrons glicosilació de proteïnes	tots els organismes

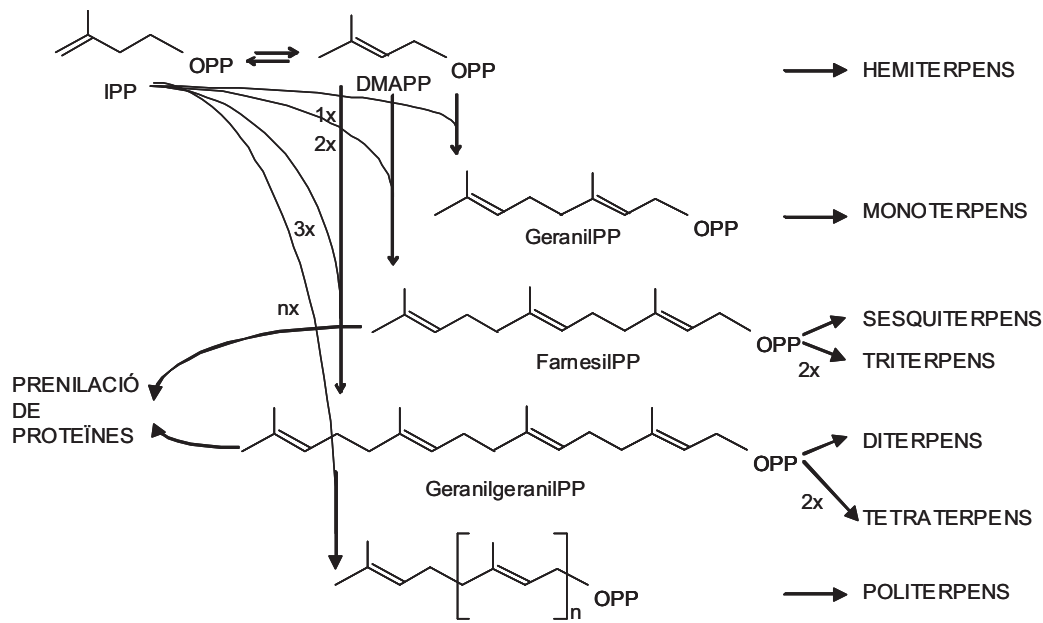


Fig. 1. Biosíntesi de l'esquelet terpenoide a partir de les unitats d'isoprè IPP i DMAPP

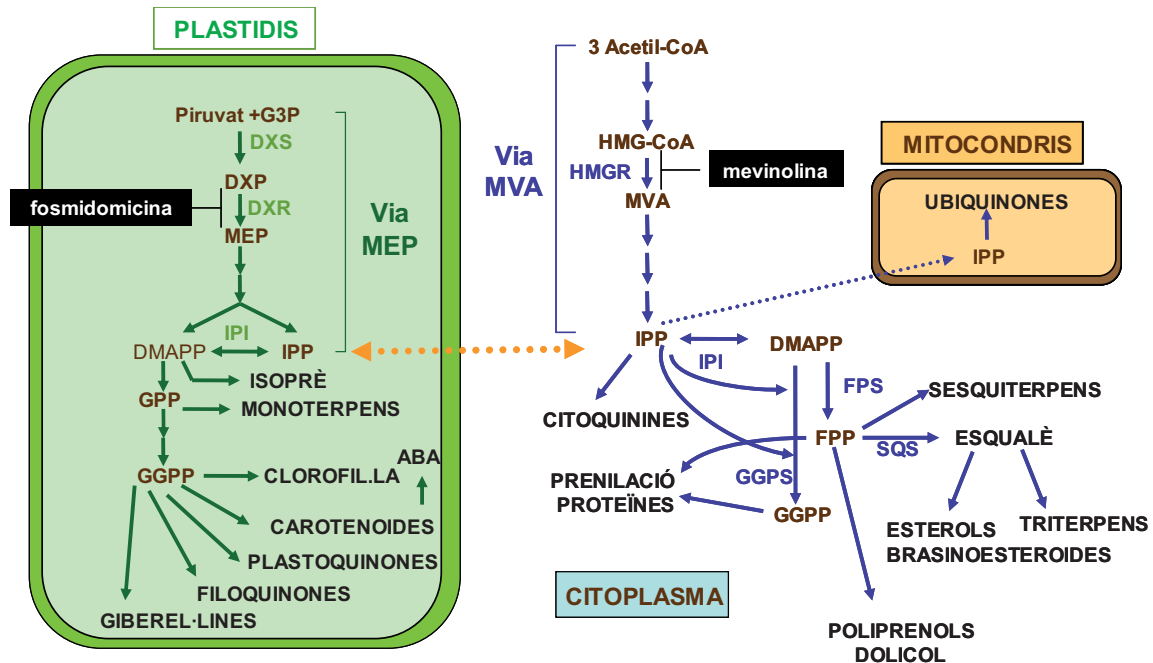
En un principi es va considerar que tots els isoprenoides derivaven de la via del mevalonat a partir del substrat acetil-CoA descoberta en llevats i en animals el 1950 (revisat a Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). En molts casos, però, no es va poder interpretar la síntesi de determinats isoprenoides tan sols per aquesta via (revisat a Lichtenthaler et al., 1997; McCaskill, 1998; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999; Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Recentment, a la dècada dels 90, experiments de marcatge en bacteris i plantes van permetre identificar una via alternativa per a la síntesi d'isoprenoides, que es va anomenar via del metileritritol 4-fosfat (MEP).

Els isoprenoides se sintetitzen en tots els organismes però la gran majoria utilitza tan sols una de les dues vies per a la síntesi de l'IPP i del DMAPP (revisat a Lichtenthaler et al., 1997; Lange et al., 2000; Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Sembla que la via del MEP és herència del precursor procariota que va donar lloc als cloroplasts, mentre que la cèl·lula eucariota hoste va adquirir la via del mevalonat, com els organismes heteròtrofs metazous i fongs. La via del MEP és present en la majoria d'eubacteris, en algues, en alguns protozous com el paràsit de la malària *Plasmodium falciparum*. Els animals, els fongs i els arqueobacteris sintetitzen exclusivament els isoprenoides a partir de la via del mevalonat. La coexistència de les dues rutes es dona en pocs organismes: en algunes algues, en molses, en algunes soques d'actinomicets i en plantes superiors.

## 2.2.- Distribució subcel·lular de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes superiors

En plantes, la síntesi d'isoprenoides es troba compartimentada (figura 2). Mentre que la via del MEP sintetitza l'IPP i el DMAPP en els plastidis, la via del mevalonat proporciona l'IPP en el citoplasma

(revisat a Lichtenhaler, 1997; McCaskill, 1998; Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). El mitocondri importa l'IPP del citosol per a la síntesi d'ubiquinona. Es produeix també cert bescanvi d'IPP, o algun intermediari posterior entre el citosol i el cloroplast.



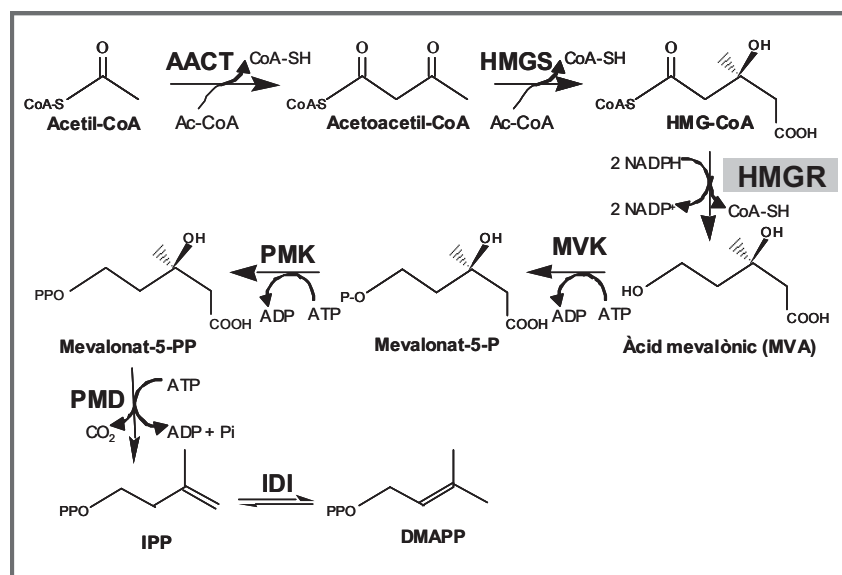
**Fig. 2.** Compartimentació de les vies de síntesi d'isoprenoides en cèl·lules vegetals (adaptat de Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). En la figura s'indiquen els substrats, intermediaris i productes finals sintetitzats a partir de les dues vies. La fosmidomicina és un inhibidor de l'enzim DXR, i en conseqüència de la via del MEP. La mevinolina és un inhibidor de l'HMGR, i en conseqüència de la via del mevalonat (MVA). *ABA*; àcid abscísic; *DXP*; 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfat; *DXR*; deoxixilulosa-5-fosfat reductoisomerasa *DXS*; deoxixilulosa-5-fosfat sintasa; *FPS*; farnesil difosfat sintasa; *G3P*; gliceraldehid 3-fosfat *GGPS*; geranilgeranil difosfat sintasa; *IPI*, isopentenil difosfat isomerasa; *SQS*; esqualè sintasa.

La integració de múltiples factors interns i externs en la planta determina la síntesi dels isoprenoides necessaris per a satisfer els seus requeriments. Per a assolir aquesta gran complexitat cal una regulació molt eficaç i acurada de les vies de síntesi dels isoprenoides.

En plantes, a partir de la via MEP es sintetitza el gas isoprè, determinats monoterpens, sesquiterpens, reguladors del creixement (giberel·lines i ABA), carotenoids, i la cadena lateral de tocoferols, filoquinona i clorofil·les (revisat a Bramley, 1997; Lange and Ghassemian, 2003). L'operativitat de la via del MEP va íntimament lligada a la fixació de CO<sub>2</sub> i per tant, a la fotosíntesi. La regulació d'aquesta via està repartida en diferents enzims, entre els quals destaquen la desoxixilulosa-5-fosfat sintasa (DXS) i la desoxixilulosa-5-fosfat reductoisomerasa (DXR) (revisat a Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). El fet que la via del MEP no sigui present en humans, però sí en bacteris patògens i en el paràsit causant de la malària la converteixen en una diana ideal per a la síntesi de nous antimalàrics i agents antibacterians. Les plantes són sistemes test prometedors pel desenvolupament d'aquests inhibidors, que també podrien ser utilitzats com a herbicides.

### 2.2.1.- Síntesi d'isoprenoides a partir de la via del mevalonat

Tots els enzims de la via del mevalonat són citosòlics exceptuant l'HMGR que es localitza al sistema endomembranós, encara que la catàlisi enzimàtica és citosòlica (revisat a Chappell, 1995a, b; McGarvey and Croteau, 1995; McCaskill, 1998). La via del mevalonat s'origina a partir de la condensació de tres molècules d'acetil-CoA en dues reaccions successives, catalitzades per l'acetoacetil CoA tiolasa (AACT) i la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (HMGS). El producte obtingut, el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, a continuació és reduït a mevalonat per l'enzim HMGR, que requereix NADPH com a poder reductor i que representa el pas limitant en la síntesi d'IPP citosòlic. El mevalonat, de 6 carbonis, és posteriorment fosforilat i decarboxilat per generar IPP mitjançant els enzims mevalonat quinasa (MVK), mevalonat 5-fosfat quinasa (PMK) i mevalonat 5-difosfodecarboxilasa (PMD). Finalment, l'enzim isopentenil difosfat isomerasa (IDI) catalitza la conversió d'IPP a DMAPP (figura 3).

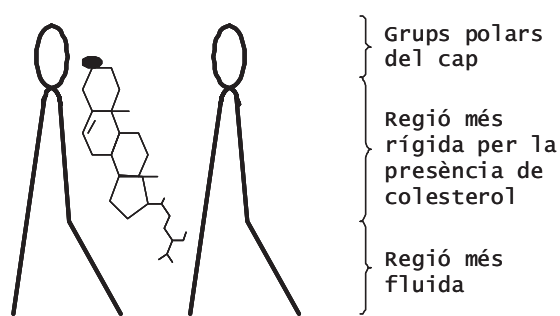


**Fig. 3.** La via del mevalonat. *AACT*, acetoacetil-CoA tiolasa; *HMGS*, HMG-CoA sintasa; *MVK*, mevalonat quinasa; *PMK*, fosfomevalonat quinasa; *PMD*, difosfomevalonat decarboxilasa; *IDI*, IPP isomerasa.

En plantes, els isoprenoides derivats de la via del mevalonat són esterols, determinats monoterpens, fitoalexines sesquiterpèniques, glicoalcoïdes esteroidals, brassinoesteroides, citoquinines, dolícols per a la glicosilació de proteïnes i ubiquinona. A més el FPP i el GGPP són substrats per a la prenilació de proteïnes (revisat a Chappell, 2002; Lange and Ghassemian, 2003). Un important intermediari derivat de la via del mevalonat és el FPP, que coincideix amb un punt de ramificació de la via per a la síntesi de diversos isoprenoides (figura 2). El FPP és un precursor per a la síntesi d'esqualè, a partir del qual es sintetitzen esterols, brassinoesteroides i altres triterpens, de poliprenols, de dolícol i de sesquiterpens. El FPP i GGPP són substrats per a la prenilació de proteïnes. Els productes derivats del

FPP es necessiten en diferents quantitats. Per exemple els requeriments per a la prenilació de proteïnes o per a la biosíntesi de dolicol és menor que la requerida per a la síntesi d'esterols. Per tant, la quantitat de FPP ha d'estar molt controlada.

A partir de la condensació de dues molècules de FPP es genera l'esqualè (pas catalitzat per l'esqualè sintasa), precursor dels esterols. Aquestes molècules estan implicades en el control de la fluïdesa de la membrana (figura 4), on hi augmenta l'estabilitat mecànica per la rigidesa que proporciona l'estructura planar dels anells esteroidals (Demel and de Kruffy, 1976). Els esterols més importants a les cèl·lules vegetals són el sitoesterol, l'estigmaesterol i el campesterol que representen d'un 60-80% del total (revisat a Chappell, 2002; Clouse, 2002; Schrick et al., 2002; Schaller 2004). En un principi es coneixia només la importància dels esterols pel seu paper estructural en les membranes cel·lulars. L'any 1996 es van trobar dos mutants d'*A. thaliana det2* i *cpd*, que mostren deetioliació i extrem enanisme. Aquest fenotip és causat per mutacions en gens els productes dels quals catalitzen etapes posteriors a la biosíntesi del campesterol. Més tard es va mostrar que aquests mutants no podien sintetitzar brassinòlid (forma activa de brassinoesteroides) a partir del campesterol, i que els defectes observats eren compensats per l'aplicació de brassinoesteroides a baixes concentracions. S'havia descobert un altre regulador del creixement en plantes. Altres mutants en la síntesi d'esterols com *smt1*, *fackel* o *hydra1* tenen defectes en la divisió i expansió cel·lular en estadis embrionaris i post-embrionaris, que condueixen a malformacions en plantes joves i en un fenotip d'enanisme en la planta adulta a més de mostrar un alt grau d'esterilitat en la planta. Aquests fenotips no són restablerts amb el tractament amb brassinoesteroides ja que les mutacions afecten a etapes primerenques en la síntesi d'esterols (passos previs a la formació de  $\Delta^7$  esterols). Això provoca que s'acumulin esterols atípics a les membranes cel·lulars que causarien anomalies en la senyalització hormonal (Lindsey et al., 2003). S'evidencia doncs, que els esterols també tenen un paper regulador important en l'embriogènesi i en el desenvolupament de la planta.



**Fig. 4.** Esquema de com una molècula tipus esterol interactua amb dues molècules de fosfolípid en el si d'una monocapa lipídica (Alberts et al., 1989).

L'esqualè és també precursor d'altres triterpens normalment conjugats a carbohidrats, a alcaloides i a altres macromolècules (Chappell, 2002). La seva estructura macromolecular difereix de la dels esterols en què en comptes de quatre, conté cinc anells esteroidals. Alguns exemples són el lupeol i l'amirina, precursors comuns a la síntesi de triterpens més complexos. Alguns d'ells, com les saponines, tenen

interès farmacològic per la seva capacitat en provocar la mort a cèl·lules tumorals. En plantes realitzen funcions de defensa a l'atac per patògens.

La prenilació de proteïnes implica la unió covalent de FPP o bé GGPP a residus prop de l'extrem C-terminal de proteïnes diana del citosol (revisat a Chappell, 1995b; Crowell, 2000). Aquestes modificacions poden canviar la localització de l'apoproteïna en ser ancorades en membrana per la cadena prenil hidrofòbica. Les reaccions de transferència estan catalitzades per farnesil-transferases (FTasa) o geranilgeranil-transferases (GGTasa) que juguen un paper important en vies de transducció de senyal amb implicacions en la regulació del cycle cel·lular i en l'organització del citoesquelet. Tant els animals, les plantes com el llevat tenen una FTasa i dues GGases (Crowell, 2000). La primera evidència de la importància de la prenilació va ser observada en cèl·lules d'animals, on la transició de les cèl·lules a través del cycle cel·lular va ser bloquejada per la mevinolina i la restauració del creixement necessitava l'addició no només d'esterols sinó també de mevalonat com a substrat per a la farnesilació de la proteïna ras (Glomset et al., 1990). En plantes, aquestes prenil-transferases participen en altres funcions com en la via de transducció de senyal generada per ABA (Yalovsky et al., 2000), o en l'elongació del tub pol·línic (Li et al., 1999).

### 2.2.2.- Relació entre les dues vies de síntesi de l'IPP

Tot i que la síntesi d'IPP està compartimentada de manera que al citoplasma se sintetitza per la via del mevalonat i als plastidis per la via del MEP, s'ha advertit que es dona cert bescanvi d'IPP o d'algun derivat posterior, entre els dos compartiments (figura 2). En els darrers anys hi ha hagut un gran esforç per estudiar aquest fenomen, tot i que no ha estat del tot dilucidat.

La majoria dels experiments que s'han realitzat per estudiar l'intercanvi de precursors d'isoprenoides entre les dues rutes, s'han dut a terme en sistemes vegetals on es bloqueja cadascuna de les vies (amb inhibidors o amb mutants genètics, en cas d'existir). En bloquejar la via del MEP amb fosmidomicina (inhibidor de l'enzim DXR) es bloqueja el creixement i les plantes mostren un fenotip albi. En el cas d'*A. thaliana*, s'ha descrit el mutant *cla1-1*, deficient en l'enzim DXS, el qual mostra també fenotip albi i es recupera amb el substrat de la via, la desoxixilulosa. Per bloquejar la via del mevalonat, s'utilitzen les estatines (com per exemple la mevinolina), inhibidors de l'HMGR. També en aquest cas es bloqueja el creixement de les plantes que mostren un color verd-fosc. No obstant, fins al moment no s'ha treballat amb mutants d'aquesta proteïna en plantes. S'han observat efectes sinèrgics en aplicar inhibidors de les dues vies, demostrant la importància que té cadascuna d'elles pel creixement de la planta.

En plantes d'*A. thaliana* que tenen una de les dues vies de biosíntesi d'IPP bloquejada, es restableix parcialment el seu creixement quan són suplementades amb el substrat de la via activa (Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002). També el mutant *cla1-1* es recupera parcialment en créixer en presència de mevalonat (Kasahara et al., 2002). Aquestes dades mostren que es dona cert bescanvi de precursors d'isoprenoides entre els dos compartiments. L'intercanvi d'IPP s'ha estudiat en altres sistemes, com en la línia cel·lular de tabac BY-2 (Hemmerlin et al., 2003). També en aquest cas, en bloquejar cadascuna

de les vies amb inhibidors, el creixement es recupera parcialment en afegir el substrat de la via no bloquejada. Es van suplementar aquestes cèl·lules amb substrats de les dues rutes marcats radiactivament i es va deduir a partir dels isotopòmers obtinguts, que per a la síntesi d'isoprenoides finals s'havia donat bescanvi d'IPP o d'algun derivat posterior.

Es va descriure un mutant d'*A. thaliana*, *rim-1* que tenia més resistència tant a mevinolina com a fosmidomicina (Rodríguez-Concepción et al., 2004). Es va comprovar que tenia major expressió del gen *hmg1* que es relacionava amb una activitat HMGR superior, però no s'hi observava més increment ni dels transcrits ni dels productes codificats per *dxs* i *dxr*. En creuar el mutant *rim-1* amb plantes de sobreexpressió del domini catalític, es conferia encara més resistència tant a mevinolina com a fosmidomicina. Això suggeria un augment del flux de derivats de la via del MVA als cloroplasts. El mutant *rim-1* és un mutant de fitocrom-B, defectiu en la percepció de llum i en la transducció del senyal generat. Altres mutants de fitocrom mostraren també una major resistència a fosmidomicina i/o a mevinolina. En foscor la via del MEP està reprimida, en canvi en aquestes condicions hi ha màxima activitat HMGR. A partir d'aquestes dades es proposà un model que suggeria que en plàntules crescudes en foscor, l'IPP o algun altre precursor dels isoprenoides seria transportat als etioplasts per a la síntesi de giberel·lines i carotenoides. En presència de llum es reprimiria l'activitat HMGR a través de la transducció de senyal generada pels fitocroms i es reprimiria l'entrada del precursor dels isoprenoides als plastidis. A més, també s'induiria la transcripció dels gens implicats en la via del MEP. Per tant aquests resultats indiquen que existeix una coordinació en la regulació de les dues vies.

Es desconeix però el transportador de l'IPP. En un treball recent s'intentà identificar el transportador i utilitzaren com a material de partida cloroplasts d'espínacs i com a substrat IPP (Bick and Lange, 2003). Els autors van treballar amb vesícules derivades de membranes internes i externes de cloroplasts. En el cas de la membrana externa, no hi havia impediment ni per a l'entrada ni per a la sortida de l'IPP. En el cas de la membrana interna l'intercanvi d'IPP depenia de l'orientació on la direcció del bescanvi era més eficient en el sentit de dins cap a fora del cloroplast. Comprovaren que el transport depenia del gradient electroquímico i van concloure que es donava per un mecanisme simport amb protons. A continuació compararen diferents possibles substrats del transport i observaren que el transportador era més afí per l'IPP. No obstant això, en cap sistema vegetal s'ha identificat la proteïna responsable d'aquest bescanvi.

### **2.3.- Famílies multigèniques implicades en la síntesi d'isoprenoides en *Arabidopsis thaliana***

Una duplicació del genoma d'*A. thaliana* seguida de pèrdua de gens però també d'una extensiva duplicació local d'aquests (Initiative\*, 2000) ha donat peu a què sovint les proteïnes de la planta són codificades per famílies multigèniques. Els productes dels gens poden conservar la seva funció, es poden especialitzar, o adoptar-ne una de nova. El fet que existeixi aquesta redundància dificulta l'estudi de la funció del producte d'un gen a partir de mutants, però també posa en evidència la complexa regulació que en pot derivar. En el cas de les vies de síntesi d'isoprenoides, molts dels gens



estan codificats per famílies multigèniques, la qual cosa que es pot correlacionar amb la gran diversitat d'isoprenoides finals a més dels diferents requeriments que en necessita la cèl·lula. La regulació de les vies per satisfer les necessitats de la cèl·lula pot aconseguir-se amb la utilització de diferents isoformes dels enzims en cada moment i/o teixit. Existeix la teoria on es proposa l'existència de canals metabòlics dedicats a la síntesi d'isoprenoides específics on determinades isoformes s'associarien entre elles per donar lloc als productes finals (Chappell, 1995a, b; McCaskill, 1998). En el cas d'*A. thaliana*, però, no s'ha demostrat la interacció directa entre enzims de la via del mevalonat per doble híbrid (Leivar, 2003).

El projecte genoma d'*A. thaliana* a part de contribuir a la identificació de famílies multigèniques també ha permès identificar-ne la seva localització cromosòmica i s'ha observat que tot sovint els gens que codifiquen per una mateixa funció proteica estan molt pròxims en el genoma formant *clusters* (Lange and Ghassemian, 2003). En aquest apartat es mostra una breu revisió de la presència de famílies multigèniques en el cas d'*A. thaliana*, implicades en la síntesi del precursors d'isoprenoides (taula 2). En alguns casos s'ha demostrat la funció de les isoformes, en altres però només s'ha pogut suggerir per homologia (Lange and Ghassemian, 2003).

Molts enzims de la via del mevalonat són codificats per famílies multigèniques. Encara que la síntesi de l'IPP és citosòlica, no tots ells es localitzen en aquest espai. La presència de diverses isoformes determina en alguns casos localitzacions subcel·lulars particulars que donen lloc a la síntesi d'isoprenoides en diferents compartiments. L'HMGR, que és un enzim integral de membrana, té com a primera ubicació el reticle endoplàsmic (RE), a partir d'aquí cada isoforma presenta diferents destinacions potencials (vegeu apartat 3.5 de la Introducció). Enzims integrals de membrana implicats en la síntesi d'isoprenoides citosòlics que localitzen al RE són FPS1S, FPS2 i GGPS3 i GGPS4. Les isoformes FPS1L i GGPS1, en canvi es troben al mitocondri per donar lloc a la síntesi d'ubiquinones.

Pel que fa a la via del MEP, només en el cas de la DXS existeixen diferents isoformes (Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Carretero-Paulet, 2003). No obstant, només s'ha demostrat la funció per a la DXS1. En *A. thaliana*, mutants defectius en DXS1 (*cla1*) mostren un fenotip albí i una aturada en el desenvolupament que pot ser recuperat amb desoxixilulosa. Tot i l'homologia que presenten DXS2 i DXS3 no se n'ha pogut demostrar la funció.

El fet que algunes d'aquestes isoformes tingui pèptids de trànsit a diferents orgànuls posa de manifest l'especialització que han sofert per a la síntesi d'isoprenoides particulars. En altres casos, però, no s'ha demostrat una especialització funcional depenent d'isoforma i el paper dut a terme podria ser redundant.

**Taula 2.** Famílies multigèniques que codifiquen per alguns dels enzims implicats en la biosíntesi d'isoprenoides en *A. thaliana* (adaptat de Marín, 2003).

Enzim	Gens	Isoformes	Característiques	Referències
Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT)	<i>AAT1</i>	AACT1	Citosòlica; expressió constitutiva	(Ahumada, 2001)
	<i>AAT2</i>	AACT2	Peroxisomal; expressió en inflorescències i en arrels	
HMG-CoA reductasa (HMGR)	<i>HMG1</i>	HMGR1L	Expressió en plàntules, arrels i inflorescències	(Enjuto <i>et al.</i> , 1994)
	<i>HMG2</i>	HMGR1S	Expressió constitutiva	(Lumbreras <i>et al.</i> , 1995)
		HMGR2	Expressió en teixits meristemàtics i florals	(Enjuto <i>et al.</i> , 1995)
Mevalonat 5-difosfat descarboxilasa (PMD)	<i>PMD1</i>	PMD1		(Cordier <i>et al.</i> , 1999)
	<i>PMD2</i>	PMD2		(Lange and Ghassemian, 2003)
Desoxixilulosa 5-fosfat sintasa (DXS)	<i>DXS1</i>	DXS1	Plastídica	(Carretero-Paulet, 2003)}.
	<i>DXS2</i>	DXS2	Hipotètica DXS proplastídica	
	<i>DXS3</i>	DXS3	Funció desconeguda	
Isopentenil difosfat isomerasa (IDI)	<i>IDI1</i>	IDI1	Localització plastídica i citosòlica	(Lange and Ghassemian, 2003)}.
	<i>IDI2</i>	IDI2	Localització plastídica i citosòlica	
Farnesildifosfat sintasa (FPS)	<i>FPS1</i>	FPS1L	Mitocondrial; expressió en inflorescències	(Cunillera <i>et al.</i> , 1997)
		FPS1S	Citosòlica; expressió constitutiva	(Cunillera <i>et al.</i> , 1996)
	<i>FPS2</i>	FPS2	Expressió en inflorescències	(Cunillera <i>et al.</i> , 2000)
Esqualè sintasa (SQS)	<i>SQS1</i>	SQS1	Citosòlica/RE	(Del Arco, 1999)
	<i>SQS2</i>	SQS2		
Geranilgeranil difosfat sintasa (GGPS)	<i>GGPS1</i>	GGPS1	Citosòlica	(Lange and Ghassemian, 2003)}.
	<i>GGPS2</i>	GGPS2	Plastídica	
	<i>GGPS3</i>	GGPS3	Citosòlica	
	<i>GGPS4</i>	GGPS4	Citosòlica	
	<i>GGPS12</i>	GGPS12	Plastídica	

### 3.- L'HMGR

#### 3.1.- Característiques generals

El mevalonat és el primer precursor específic dels isoprenoides en arqueobacteris, en *Streptomyces*, en llevat, en animals i en el citosol de les cèl·lules de plantes superiors. La seva concentració és controlada per l'activitat de l'enzim HMGR (EC 1.1.1.34) el qual catalitza la reacció irreversible a partir del substrat HMG-CoA i poder reductor en forma de NADPH. Alguns eubacteris, com per exemple *Pseudomonas mevalonii* poden utilitzar mevalonat com a única font de carboni i poder reductor catalitzant l'etapa inversa (Gill et al., 1985).

Les estatines (compactina, mevinolina, ...), anàlegs estructurals de l'HMG-CoA, són potents inhibidors competitius de l'HMGR, amb una constant d'inhibició menor que la Km aparent per HMG-CoA. En mamífers inhibeixen la biosíntesi d'esterols (Istvan and Deisenhofer, 2001). Aquest fet s'ha aprofitat en la indústria farmacèutica per a comercialitzar-los com a inhibidors de la síntesi d'esterols i consegüent disminució del colesterol en sang. Les estatines s'han revelat també com a potents anticancerígens pel seu efecte en el bloqueig de la divisió cel·lular de cèl·lules tumorals.

Les estatines inhibeixen també l'HMGR en plantes afectant dràsticament el seu creixement. En *A. thaliana*, concentracions reduïdes de mevinolina afecten l'elongació de l'arrel primària en plantes joves, i el desenvolupament de les arrels en general en plantes madures (Re, 1995). La presència de 75 nM, retarda l'aparició de les primeres fulles i les fulles de la roseta basal són menors i acumulen pigments antocianítics. A 100 nM el desenvolupament de les fulles està gairebé inhibit. En tots els casos es recupera el fenotip amb mevalonat 1mM. Un altre fet a considerar, però, és que altes concentracions de mevinolina (50 µM) no inhibeixen la germinació normal i el creixement de les plàntules durant els tres primers dies en *A. thaliana*, la qual cosa indica que una reserva d'isoprenoides en la llavor pot permetre el seu desenvolupament.

#### 3.2.- L'HMGR catalitza un pas limitant en la síntesi d'isoprenoides

Molt sovint el flux a través d'una ruta metabòlica és controlat per una o per poques etapes compreses per reaccions irreversibles. Els enzims que catalitzen aquestes etapes estan finament regulats per determinar el flux adequat a través de la ruta. Aquest és el cas de la proteïna HMGR. En cèl·lules de mamífer es van comparar les activitats de diferents enzims implicats en la biosíntesi d'isoprenoides amb la taxa d'acumulació d'esterols i es va demostrar que una de les etapes limitants era catalitzada per l'HMGR, que és regulada per retroalimentació (Goldstein and Brown, 1990). Tant la transcripció com la traducció del gen que codifica per l'HMGR incrementa quan les concentracions dels productes finals són baixes. I a la inversa, quan la concentració d'esterols és alta, decau la concentració intracel·lular de l'HMGR.

També en llevats l'HMGR catalitza una etapa limitant en la síntesi d'esterols, tot i que no és l'única. La sobreexpressió del domini catalític de la isoforma HMG1P de llevat condueix a una major acumulació

en la producció d'esqualè sota condicions aeròbiques, en canvi no augmenta la producció de productes finals com l'ergosterol (Donald et al., 1997; Hampton, 2002). Això implica la presència d'una altra etapa limitant entre la síntesi d'esqualè i la d'ergosterol en llevats.

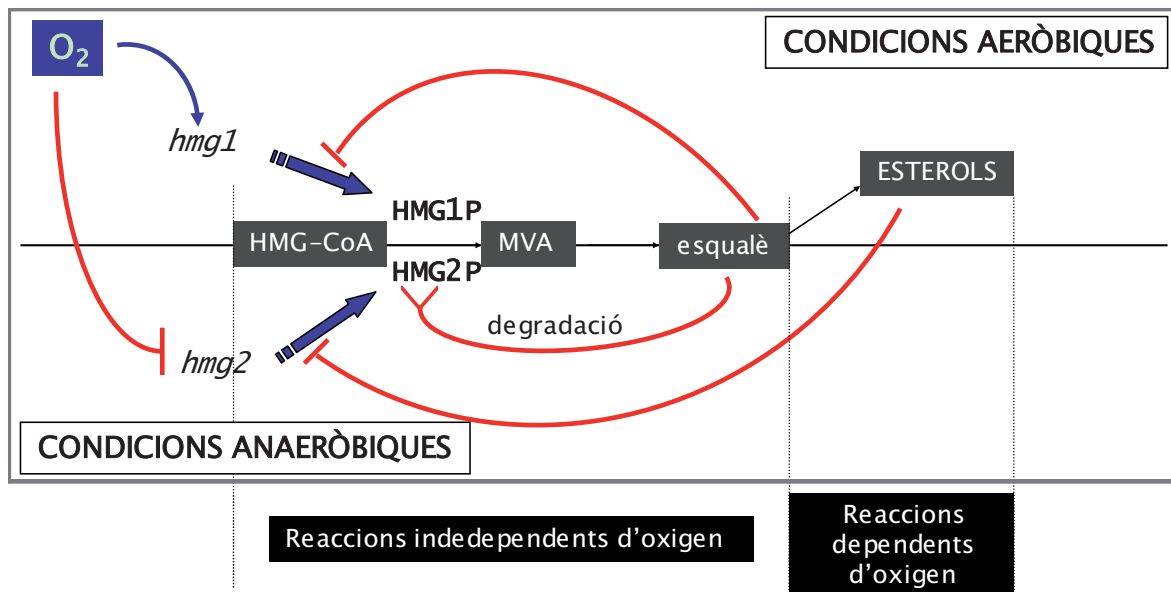
Pel que fa a les plantes superiors, també s'ha proposat que l'HMGR catalitza la primera etapa limitant en la síntesi d'isoprenoides derivats de la via del mevalonat (Stermer, 1994; Chappell, 1995c). No obstant, en plantes el sistema és més complex per la diversitat d'isoprenoides que deriven d'aquesta ruta. Per tant, no és desconcertant que el control de la via citosòlica de síntesi d'isoprenoides estigui repartit en etapes anteriors a la formació dels intermediaris comuns (IPP, FPP) i en etapes posteriors on la via ja s'ha ramificat per donar lloc als diferents isoprenoides. Nombrosos treballs han aportat dades sobre una correlació entre un increment en la biosíntesi d'isoprenoides (particularment sesquiterpenoides) i l'activitat HMGR. No obstant, altres enzims com la sesquiterpè ciclasa podrien controlar el flux per a la generació dels productes finals. En tabac, la sobreexpressió del gen de hamster que codifica pel domini catalític de l'HMGR donà lloc a un augment d'entre 3-6 vegades l'activitat HMGR total i com a conseqüència va augmentar la concentració d'esterols entre 3-10 vegades (Chappell et al., 1995). Tot i que l'augment en la concentració d'esterols finals sitoesterol, campesterol i estigmaesterol no varià, el nivell de l'intermediari cicloartenol augmentà unes 100 vegades. Per tant, al menys en tabac, el pas catalitzat per la C24-esterol metiltransferasa que catalitza la conversió de cicloartenol a 24-metilcicloartenol sembla ser limitant. En un treball posterior, es coexpressà el domini catalític de l'HMGR d'*Hevea brasiliensis* i la C24-esterol metiltransferasa de *Nicotiana tabacum* en tabac, sota control de promotor constitutiu, resultant en un increment d'esterols totals (Holmberg et al., 2002). Aquest increment era superior al mostrat quan se sobreexpressaven els enzims per separat. Per tant, es demostrà que en la biosíntesi d'esterols hi ha més d'un coll d'ampolla que limita el flux.

En un estudi realitzat en *A. thaliana*, la sobreexpressió del gen *hmg1* sota el promotor constitutiu 35S del virus del mosaic de la col-i-flor (CaMV35S) donà lloc a un augment de l'activitat enzimàtica, i una major resistència a mevinolina, encara que no s'observaren augments en esterols (Re, 1995). Aquestes dades es contradueixen amb les aportades en un altre treball que es demostrà que la sobreexpressió de la isoforma HMGR1S d'*A. thaliana* i del seu domini catalític van donar lloc a un increment en el contingut d'esterols entre 3 i 10 vegades, respectivament (González, 2002). Els esterols que s'acumulaven eren els productes finals de la via (campesterol, sitoesterol i estigmaesterol). Per tant en *A. thaliana* la isoforma HMGR1 catalitza una etapa limitant en la síntesi d'esterols.

### 3.3.- La famílies multigènica *hmg*

L'HMGR és codificada per un únic gen en mamífers, *Drosophila* i *Xenopus* i per dos gens en llevat: *hmg1* i *hmg2* (revisat a Hampton et al., 1996). Els dos gens codifiquen per les isoformes HMG1P i HMG2P, que comparteixen una identitat del domini catalític del 93% i presenten regulació diferencial (figura 5) (revisat a Hampton et al., 1996). La traducció d'*hmg1* és regulada per retroalimentació per productes primerencs (previs a esqualè) de la ruta de síntesi d'isoprenoides. La traducció del transcrit

*hmg2*, en canvi, és modulada per molècules sintetitzades en els darrers passos de la via (a partir d'esqualè). La proteïna HMG2P, és regulada posttraduccionalment on els productes primerencs promouen la degradació de l'enzim, a diferència de l'isoenzim HMG1P que és altament estable. L'expressió dels dos gens és regulada per oxigen. En condicions de creixement aeròbic augmenta la síntesi d'HMG1P, i en condicions anaeròbiques o semi-anaeròbiques s'incrementa la síntesi d'HMG2P.



**Fig. 5.** Esquema de la regulació de l'HMGGR de llevat. L'oxigen estimula l'expressió del gen *hmg1* i reprimeix l'expressió del gen *hmg2*. Les proteïnes codificades per aquests dos gens: l'HMG1P i l'HMG2P, respectivament, catalitzen la reducció de HMG-CoA a mevalonat. Les reaccions enzimàtiques fins la formació d'esqualè són independents d'oxigen. No obstant la síntesi d'esterols a partir d'aquest intermediari sí que depèn d'oxigen. L'acumulació de productes intermediaris en condicions anaeròbiques promou la degradació de la proteïna HMG2P. HMG1P, és en canvi, estable. A més, productes primerencs inhibeixen la síntesi de HMG1P, mentre que productes tardans inhibeixen la síntesi de HMG2P.

L'abast d'oxigen és crític per determinar el flux de la via. Quan la disponibilitat d'oxigen és alta, els productes intermediaris estan en baixa concentració i la conversió d'esqualè a esterols, reaccions dependents d'oxigen, és eficient. En aquestes circumstàncies, els esterols reprimeixen la síntesi de l'HMG2P i permeten la producció de l'HMG1P. Quan la disponibilitat d'oxigen és baixa, la conversió d'esqualè a productes finals no és eficient, el flux a través de la via és lent i s'acumulen productes intermedis que inhibeixen l'expressió del gen *hmg1* i que permeten la producció de l'HMG2P. D'aquesta manera, en condicions aeròbiques, se sintetitza l'HMG1P que és molt estable, per l'alt requeriment d'esterols (ergosterol). En condicions anaeròbiques, el flux de la via s'atura al nivell de l'esqualè, però en aquest cas no hi ha tants requeriments d'esterols, a més, l'acumulació d'esqualè i de FPP són citotòxics. En aquestes circumstàncies se sintetitzen altres tipus d'isoprenoides que podrien tenir un efecte en el creixement cel·lular. A més, en aquest moment, on no es tolera l'acumulació

d'intermediaris citotòxics, aquests promouen la degradació i per tant, una ràpida taxa de renovació de l'enzim majoritari en aquestes condicions, HMG2P.

En totes les plantes estudiades existeix una família multigènica *hmg* que codifica per diferents isoformes de l'HMGR. Cada gen *hmg* pot tenir un patró d'expressió particular en funció del teixit, de l'estadi del desenvolupament o de factors externs. A més, a partir d'un gen poden sintetitzar-se més d'una isoforma per la utilització de promotors alternatius. Les isoformes podrien ser regulades d'una forma específica o tenir localitzacions subcel·lulars particulars. S'han descrit models que suggereixen una especialització funcional de les isoformes on cadascuna seria responsable de la síntesi específica d'isoprenoides en determinats moments del desenvolupament, en determinats teixits, o com a resposta a estímuls externs (Chappell, 1995b). Aquest model no s'ha pogut comprovar experimentalment, encara que en alguns casos s'ha demostrat una correlació entre l'expressió d'un gen *hmg* particular i la síntesi de determinats isoprenoides (taula 3).

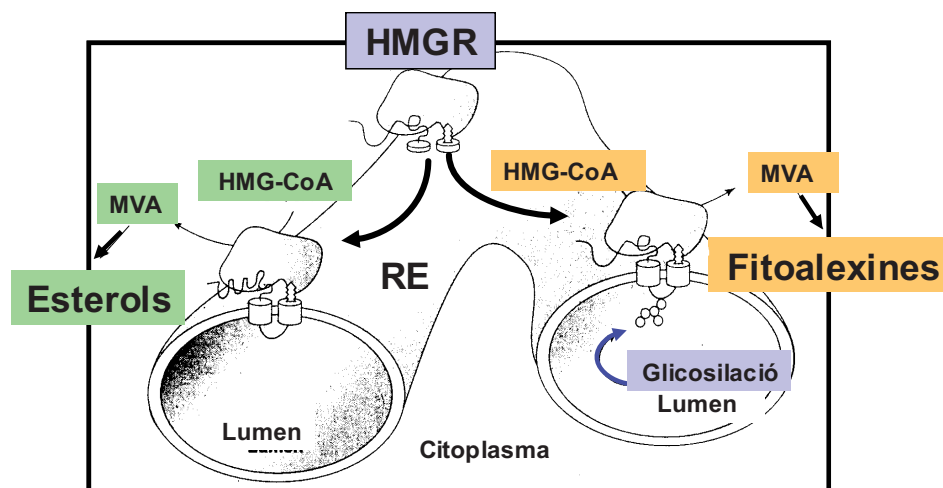
**Taula 3.** Família multigènica *hmg* en plantes. Exemples de síntesi específica de gens *hmg* en determinats teixits, sota condicions concretes, i si s'ha observat una correlació en l'acumulació d'algun isoprenoide particular en diferents espècies vegetals.

Espècie	Gens <i>hmg</i>	Condicions i teixits on s'expressa	Isoprenoides acumulats	Referències
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>hmg1</i>	Fruits immadurs	Esterols	(Narita and Gruissem, 1989)
	<i>hmg2</i>	Inducció per dany, elicitors fúngics i patògens		(Cramer et al., 1993).
	<i>hmg3</i>			
	<i>hmg4</i>			
<i>Solanum tuberosum</i> (tubercles)	Classe <i>hmg1</i>	Dany tissular	Esterols Esterols glicoalcaloides	(Choi, 1992)
	Classes <i>hmg2</i> i <i>hmg3</i>	Inducció per àcid araquidònic i per <i>Phytophthora infestans</i>	Fitoalexines sesquiterpèniques	(Choi, 1992)
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>hmg1</i>	Inducció per etilè, expressió en laticífers		(Chye et al., 1992)
	<i>hmg2</i>			
	<i>hmg3</i>	Constitutiva i ubiqua		(Chye et al., 1992)

Per exemple, en patata (*Solanum tuberosum*) s'han identificat al menys 12 gens classificats en tres classes: *hmg1* (conté set o més gens diferents), *hmg2* i *hmg3* (contenen un o dos gens). Els gens *hmg1* són induïts en tubercles per ferida, on els nivells d'*hmg2* i d'*hmg3* s'esmoreeixen (Choi et al., 1992). En aquest cas s'acumulen esterols i esterols glicoalcaloides. En canvi, el tractament dels tubercles amb l'elicitor àcid araquidònic o amb el fong patògen *Phytophthora infestans*, provoca una repressió de l'expressió d'*hmg1* i s'activa la transcripció d'*hmg2* i d'*hmg3*, alhora que se sintetitzen fitoalexines sesquiterpèniques (taula 3). La inducció d'*hmg2* i la repressió d'*hmg1* per àcid araquidònic es dona per una determinada via de transducció de senyal diferent a la que condueix a la inducció d'*hmg2* per ferida (Choi and Bostock, 1994).

Famílies de més de dos gens s'han identificat en *Raphanus sativus* (Ferrer et al., 1990), en *Pisum sativum*, *Nicotiana sylvestris* (Genschik et al., 1992), *Triticum aestivum* (Aoyagi et al., 1993), *Catharanthus roseus* o *Catharanthus acuminata* (Maldonado-Mendoza et al., 1992; Maldonado-Mendoza et al., 1997) que s'expressen de forma diferencial durant el desenvolupament o en resposta a alguna mena d'estress.

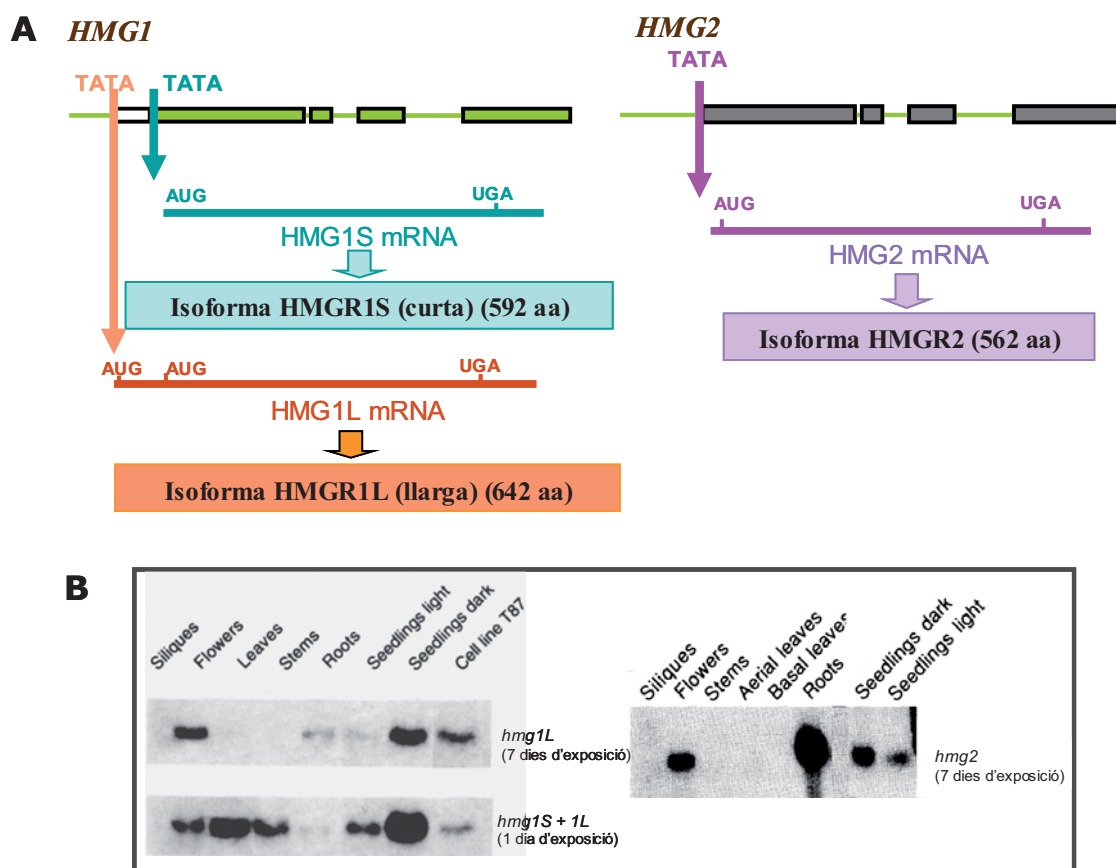
Algunes de les isoformes de l'HMGR contenen en la regió encarada al lumen del RE (vegeu la topologia a l'apartat 3.4 de la Introducció) un lloc de N-glicosilació. El lloc de N-glicosilació és present a les isoformes associades a la producció de metabòlits secundaris com fitoalexines, mentre que és absent a les isoformes de l'HMGR associades a la síntesi d'esterols a teixits meristemàtics (figura 6) (Denbow et al., 1996; McCaskill, 1998). Es proposa un model d'organització on cada HMGR localitzaria en diferents subdominis del RE i s'especialitzaria en la síntesi d'isoprenoides particulars (McCaskill, 1998).



**Fig. 6.** Model d'organització de les diferents isoformes de l'HMGR en subdominis del reticle endoplasmàtic que participen amb la síntesi d'isoprenoides específics. La isoforma de l'HMGR N-glicosilada estaria implicada en la síntesi de fitoalexines. La no glicosilada, en canvi, seria la implicada en la síntesi d'esterols.

### 3.3.1.- Isoformes en *Arabidopsis thaliana*

La família multigènica *hmg* d'*A. thaliana* està formada per només dos gens, *hmg1* i *hmg2*. A partir del gen *hmg1* se sintetitzen dos transcrits. El de menor longitud, *hmg1s*, s'expressa a nivells molt elevats en tots els teixits de la planta i és responsable de la síntesi de la isoforma HMGR1S (figura 7A i B) (Enjuto, 1994; Lumbreras et al., 1995). Un altre inici de transcripció dona lloc a un RNAm de més longitud, *hmg1l*, que s'expressa principalment en plantes joves, inflorescències i arrels (figura 7A i B). Aquest transcrit és responsable de la síntesi de la isoforma HMGR1L, que és idèntica a l'HMGR1S exceptuant la presència de 50 aminoàcids a l'extrem N-terminal (Lumbreras et al., 1995). El transcrit *hmg2* es detecta en teixits meristemàtics, arrels i teixits florals (Enjuto, 1994). Mostra un patró d'expressió similar a l'mRNA de la histona H4, expressada en cèl·lules que es divideixen de forma activa (figura 7B). El gen *hmg2* codifica per una única isoforma, l'HMGR2. Mentre que l'àmplia expressió d'*hmg1* suggereix la codificació d'una forma *housekeeping* de l'enzim, el patró restringit d'*hmg2* suggereix la realització de funcions específiques en cèl·lules particulars o en determinats processos metabòlics (Enjuto, 1994, 1995). Cal destacar que l'expressió de les tres isoformes és alta en plàntules etiolades, o sigui, crescudes en foscor (Enjuto, 1994; Lumbreras, 1995).



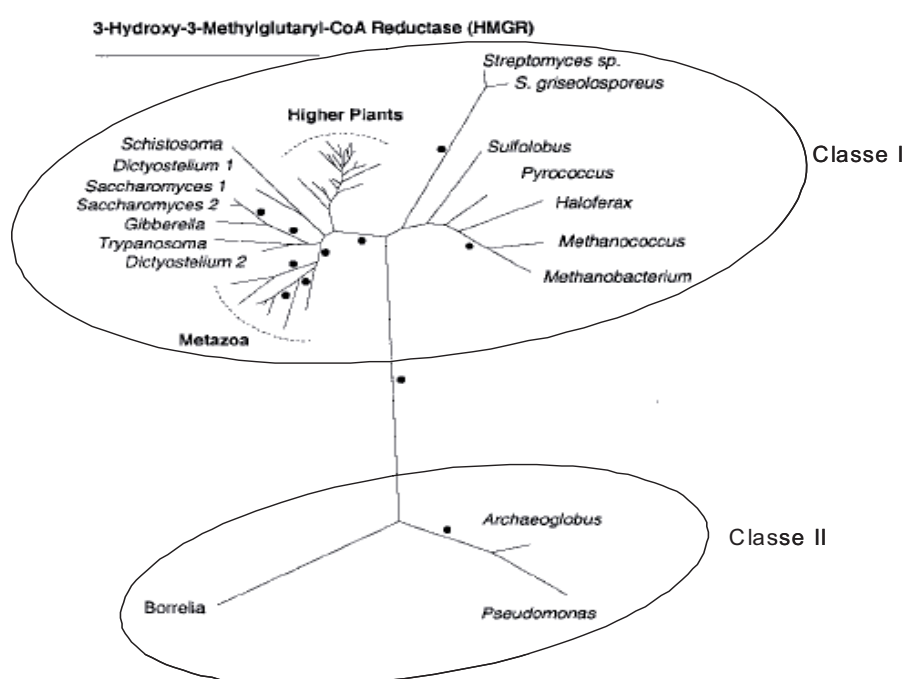
**Fig. 7.** Esquema i expressió dels gens *hmg1* i *hmg2* d'*A. thaliana*. (A) Organització estructural dels gens *hmg1* i *hmg2* i de les proteïnes que codifiquen. (B) Experiments de *northern blot* mostren el patró d'expressió dels transcrits *hmg1S*, *hmg1L* i *hmg2*. Entre parèntesi s'ha indicat els temps de contacte de cadascun dels films revelats, que és indicatiu dels nivells d'expressió dels gens (Enjuto, 1994; Lumbreras, 1995).



Les proteïnes HMGR1 i HMGR2 presenten un 71,2% d'identitat en aminoàcids. La màxima similitud entre l'HMGR1 i l'HMGR2 es troba en la regió de membrana (64% d'identitat) i en el domini catalític (78,1% d'identitat). En canvi, la regió N-terminal citosòlica és força divergent. Es desconeix si en *A. thaliana* existeix una especialització funcional de les tres isoformes de l'HMGR. Al nostre laboratori (González, 2002) es van generar plantes d'*A. thaliana* transgèniques de sobreexpressió de les isoformes HMGR1S, HMGR1L, HMGR2. Es va analitzar el contingut d'esterols de les línies de sobreexpressió i es va observar que només en el cas de plantes de sobreexpressió de l'HMGR1S (on l'activitat HMGR s'incrementa tres vegades) es dona un augment de tres vegades el contingut final d'esterols, que a més, coincidiren amb els productes finals de la via (campesterol, sitoesterol i estigmaesterol). Per tant, els resultats suggereixen que l'HMGR1S és la isoforma d'*A. thaliana* que més contribueix a la síntesi d'esterols.

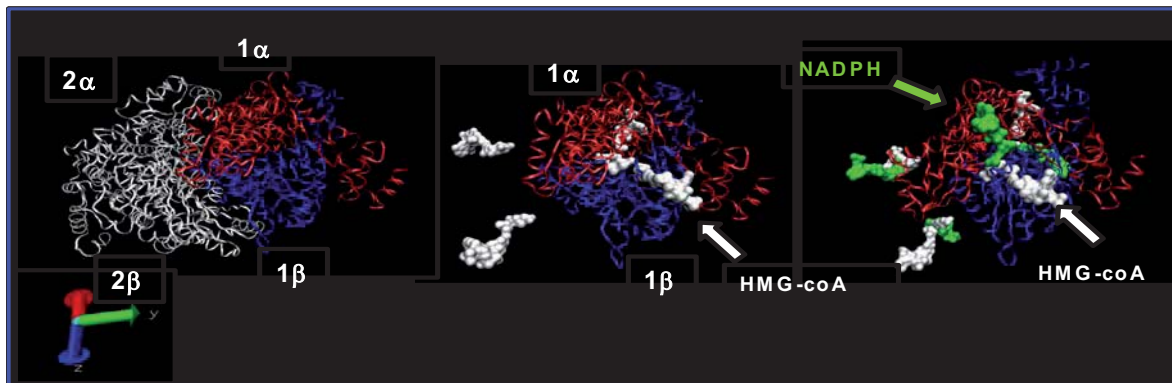
### 3.4.- Estructura i topologia

La comparació de les seqüències del domini catalític de les HMGR de diferents organismes permet la classificació en dues classes: l'HMGR eucariota (classe I) i l'HMGR procariota (classe II) (Lange, 2000). La majoria de les HMGR d'arqueobacteris pertanyen a la classe I, excepte la de *Archaeoglobus fulgidus*. Tots els membres de la classe I, amb l'excepció de l'HMGR d'arqueobacteris i d'algunes soques d'actinomicets com *Trypanosoma cruzi* i *Leishmania major* (Pena-Diaz, 1997), tenen un domini de membrana a l'extrem N-terminal. Les de classe II, en canvi, no tenen el domini de membrana i són solubles. El domini catalític mostra una gran similitud en cadascuna de les classes i entre les dues classes conserva del 14-20% d'identitat (figura 8) (Lange et al., 2000). Els residus clau implicats en el reconeixement de substrat i en la catàlisi estan conservats en les HMGR dels diferents organismes.



**Fig. 8.** Anàlisi filogenètic del domini catalític de l'HMGR. La barra indica 100 substitucions aminoacídiques (Lange, 2000).

Actualment s'ha cristal·litzat l'HMGR de *Pseudomonas mevalonii* i la humana (Lawrence et al., 1995; Istvan et al., 2000). Estudis estructurals de l'HMGR de *Pseudomonas mevalonii* revelaren que es requereix dimerització de dues molècules de l'HMGR per formar el lloc d'unió del substrat i el centre actiu (Lawrence et al., 1995). Les anàlisis cristal·logràfiques de l'HMGR humana (figura 9) mostraren que els dominis catalítics interaccionen entre ells formant un tetràmer. El tetràmer està estructurat per dos dímers, cadascun amb dos centres actius. Per la formació de cada centre actiu participen residus dels dos monòmers, com es pot observar en la figura 9. Pel que fa a l'HMGR de plantes, s'han realitzat estudis bioquímics amb la proteïna de rave que indiquen que l'enzim tetrameritza (Bach et al., 1986).

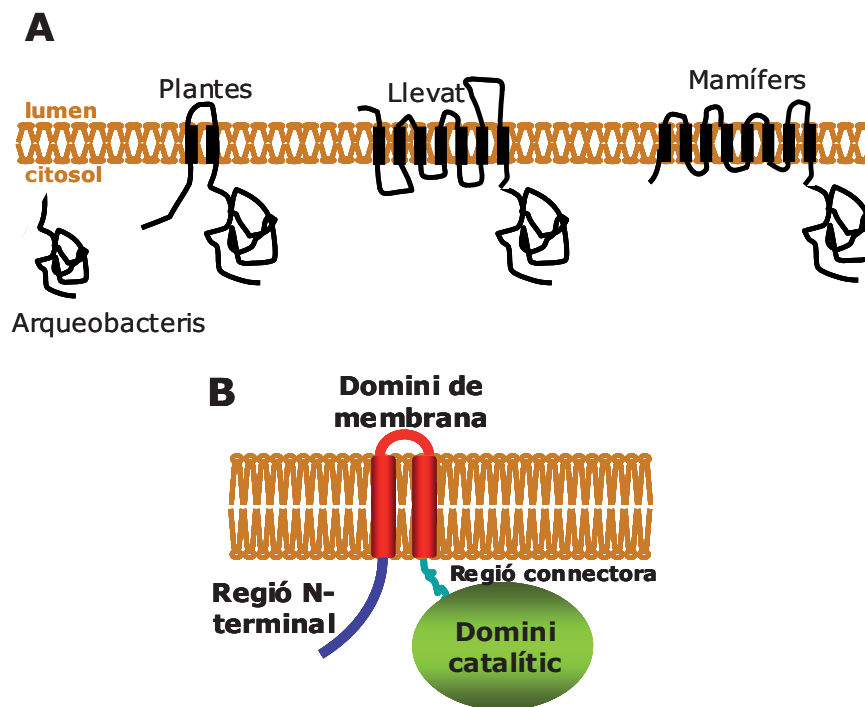


**Fig. 9.** Esquema de l'estructura molecular de l'HMGR. Es va cristal·litzar l'HMGR en forma tetramèrica, els monòmers són anomenats 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ . Es mostra en blanc el substrat HMG-CoA on la seva unió a la proteïna requereix residus dels dos monòmers. També el lloc d'unió del cosubstrat NADPH requereix residus dels dos monòmers (adaptat d'Istvan et al., 2000).

L'estructura de l'HMGR de classe I en plantes, animals i fongs està formada per dos dominis: el domini N-terminal i el domini catalític a l'extrem C-terminal. El domini N-terminal no està conservat i conté seqüències transmembrana que l'ancoren al reticle endoplasmàtic (RE). L'HMGR de mamífers conté vuit segments transmembrana (Brown and Simoni, 1984), les de llevat en contenen set i les de plantes en contenen dos (revisat a Hampton et al., 1996) (figura 10A). En mamífers i llevat s'ha demostrat que el domini N-terminal té la informació necessària per l'ancoratge i retenció al RE i per establir la topologia de la proteïna (Basson et al., 1988; Olender and Simoni, 1992).

Una característica comú en les HMGR de plantes és la presència de dues seqüències hidrofòbiques al domini N-terminal. Mitjançant experiments de síntesi *in vitro* amb la isoforma HMGR1S d'*A. thaliana* es demostrà que aquestes seqüències són reconegudes per la *Signal Recognition Particle* (SRP) i com a conseqüència la proteïna s'insereix de forma cotraduccional a microsomes derivats del RE. Les dues seqüències hidrofòbiques acaben formant dos segments transmembrana que dirigeixen l'orientació de les altres regions de l'enzim. D'aquesta manera s'estableix un model topològic on tant l'extrem N-terminal com el domini catalític a l'extrem C-terminal són citosòlics i una petita regió entre els dos segments transmembrana queda encarada al lumen (Campos, 1995) (figura 10B). El model d'inserció a microsomes de forma cotraduccional i la mateixa topologia s'ha confirmat per les tres isoformes de

l'HMGR d'*A. thaliana* i per les dues isoformes de l'HMGR de tomàquet (Campos, 1995; Denbow et al., 1996). Estudis comparatius de seqüència de les HMGR de plantes mostren que tenen una organització estructural similar formada per quatre regions: una regió N-terminal citosòlica molt divergent entre les espècies, la regió de membrana molt conservada en plantes, una regió connectora molt divergent i el domini catalític que és altament conservat en tots els organismes.



**Fig. 10.** Topologia de l'HMGR. **(A)** Esquema de la topologia de les diferents HMGR de classe I. Els arqueobacteris presenten una HMGR soluble, la resta d'organismes presenten una HMGR integral de membrana amb diferent nombre de fragments transmembrana: dos en plantes, set en llevat i vuit en mamífers. **(B)** Topologia de l'HMGR de plantes. El domini N-terminal inclou una regió N-terminal citosòlica molt divergent, una regió de membrana amb dos segments transmembrana molt conservada en plantes i una regió connectora molt divergent. El domini catalític citosòlic és altament conservat en arqueobacteris, animals, llevat i plantes.

### 3.5.- Paper del domini N-terminal de l'HMGR

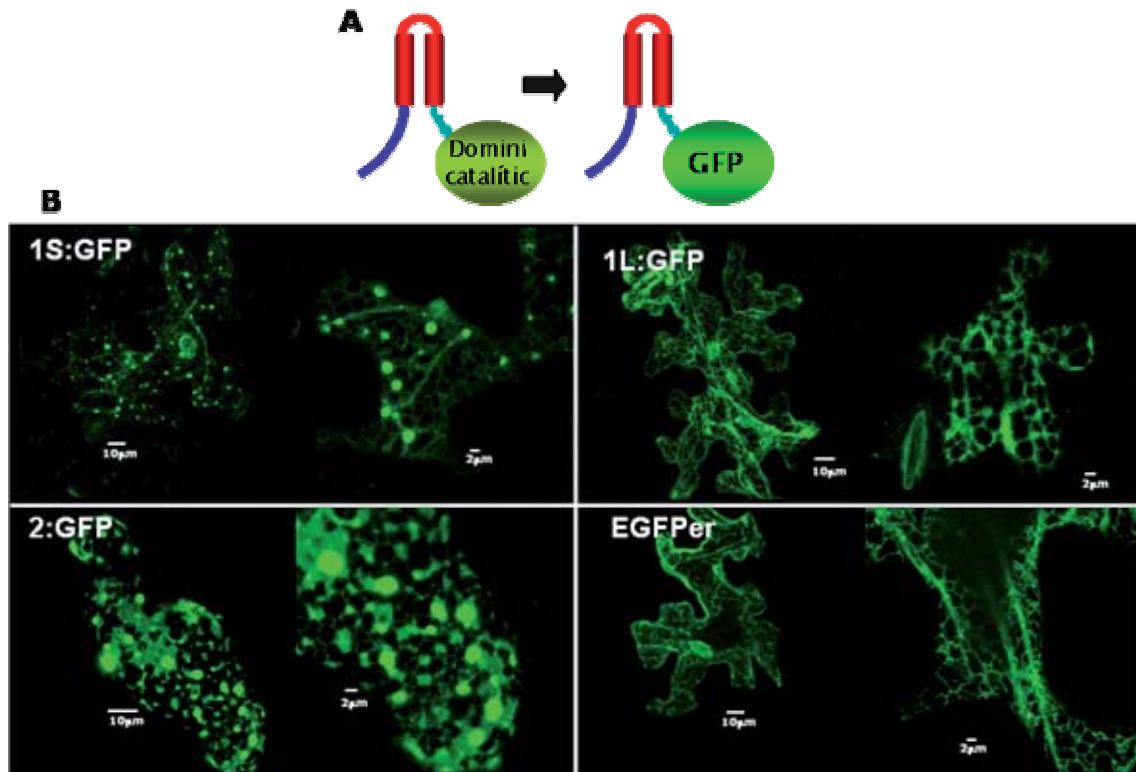
El domini catalític de l'HMGR està orientat al citosol en les HMGR de tots els organismes i a més conserva l'activitat catalítica en ser alliberat de la membrana. En canvi, el domini N-terminal de l'HMGR és necessari per a la localització subcel·lular de la proteïna, per establir la correcta topologia i per l'estabilitat proteica tant en llevats com en mamífers (Gil et al., 1985; Basson et al., 1988; Olender and Simoni, 1992; Gardner and Hampton, 1999b). En l'apartat anterior, s'ha comentat que el domini N-terminal de l'HMGR de plantes és necessari per a la inserció al reticle endoplasmàtic (RE) i per a establir la correcta topologia a través de la membrana (Campos and Boronat, 1995). Alguns estudis de fraccionament subcel·lular d'extractes vegetals havien suggerit la presència d'activitat HMGR en les fraccions microsomals de RE, i també en els plastidis i els mitocondris (Bach, 1987). El fet que l'HMGR

segueixi la via de síntesi de secreció fa difícil suposar que la proteïna es pugui trobar en plastidis o mitocondris, ja que les proteïnes residents en aquests orgànuls codificades per gens nuclears segueixen la via citosòlica de síntesi proteica. L'activitat detectada en les fraccions pesades corresponents a aquests orgànuls pot derivar de contaminació d'altres estructures.

Es van seguir diferents aproximacions per esbrinar si també en cèl·lules vegetals el domini N-terminal de l'HMGR té un paper en la localització subcel·lular o en la regulació de l'enzim. La regió N-terminal citosòlica de l'HMGR de plantes és una de les menys conservades de l'enzim. No obstant, la comparació de seqüències d'aquesta regió ha posat de manifest que la majoria de les HMGR disposen d'un motiu conservat ric en arginines a l'extrem N-terminal. Tot i que hi ha certa variació en aquest motiu, es pot definir un consens: M[D,E][L,V,I]RRR, és a dir, una metionina inicial, un aminoàcid amb càrrega negativa, un aminoàcid hidrofòbic i tres arginines (Leivar, 2003). Aquest motiu mostra homologia amb la senyal de retenció a RE present en la regió N-terminal citosòlica de proteïnes de membrana de tipus II descrites en mamífers (Singer, 1990). El requeriment mínim d'aquest senyal de retenció és una metionina, un residu carregat negativament (aspàrtic o glutàmic), un d'hidrofòbic (generalment leucina) i dues arginines en posició a N-terminal (Schutze et al., 1994). En base a la comparació amb el motiu consens de retenció en RE definit en proteïnes de mamífers, es poden establir tres classes de motius en les HMGR de plantes: els motius consens (grup I) present en l'HMGR1S, els motius propers al consens (grup II) en l'HMGR2 i els motius variació del consens (grup III) en l'HMGR1L, que consta d'una metionina i de tres lisines (Leivar, 2003). Per estudiar el paper d'aquesta regió en la localització subcel·lular de la proteïna es van realitzar unes construccions que codificaven per quimeres on el domini catalític quedà substituït per la proteïna verda fluorescent o GFP en cadascuna de les isoformes de l'HMGR d'*A. thaliana* (Leivar, 2003). Aquestes proteïnes eren la 1S:GFP (derivada de la isoforma HMGR1S), la 1L:GFP (derivada de la isoforma HMGR1L) i la 2:GFP (derivada de la isoforma HMGR2) (figura 11A). La localització subcel·lular de les quimeres es va estudiar en cèl·lules epidèrmiques de fulla i en cèl·lules T87 d'*A. thaliana* per microscopia làser confocal (figura 11B). Mitjançant aquesta metodologia es va advertir que les quimeres 1S:GFP i 2:GFP localitzen al RE i a unes vesícules que connecten amb la trama reticular de mida entre 0,5 i 2 µm. En canvi, la quimera 1L:GFP localitza a la trama reticular.

Experiments d'immunocitoquímica en cotilèdons d'*A. thaliana* amb l'ús d'anticossos policlonals preparats contra la porció del domini catalític d'*A. thaliana* (anticossos  $\alpha$ -CD1), van demostrar que l'HMGR endògena localitza en unes vesícules esfèriques tant en plantes silvestres com en plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S (Leivar et al., 2005). Anàlisis més detallades van demostrar que aquestes vesícules no es trobaven en cloroplasts ni eren peroxisomes. La proximitat de les vesícules a la trama de RE indicaven que derivaven d'aquest últim. En canvi, quan els mateixos assaigs es van realitzar amb plantes que sobreexpressen el domini catalític l'anticòs reconeixia la proteïna al citosol de les cèl·lules. Aquests experiments demostraven que el domini N-terminal de la proteïna és necessari per la localització a l'espai endomembranós. A més, estudis amb les quimeres de GFP demostren una localització subcel·lular particular per cada isoforma (Leivar, 2003). D'aquestes anàlisis se'n desprèn que tot i que la localització subcel·lular primerenca pot ser el RE, la distribució cel·lular

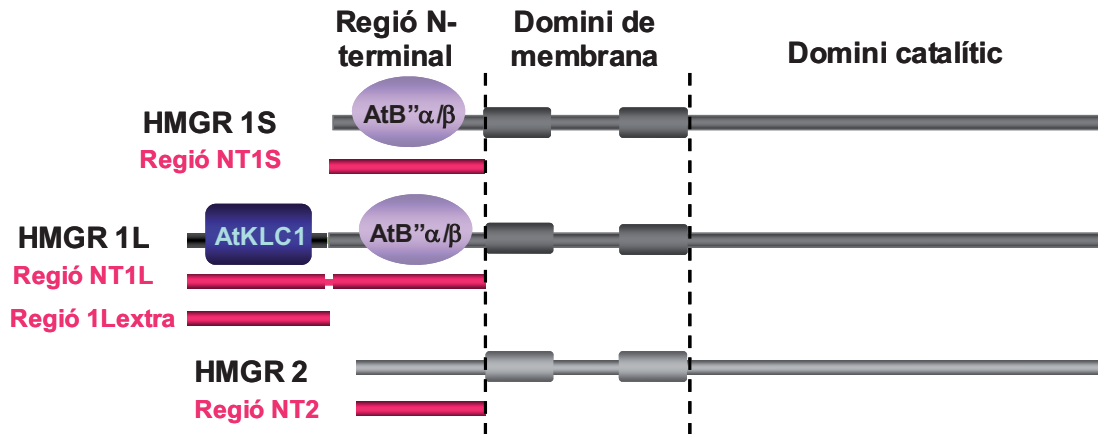
final ve determinada per altres elements presents al domini N-terminal. Per tant aquesta regió constitueix un element de trànsit subcel·lular o bé representa un factor inductor en la formació de vesícules.



**Fig. 11.** Estudi de la localització subcel·lular de les isoformes HMGR1S, HMGR1L i HMGR2 en *A. thaliana*. **(A)** Esquema de les construccions utilitzades en l'estudi per expressió transitòria en cèl·lules epidermiques de fulles d'*A. thaliana* on s'ha substituït el domini catalític per la GFP obtenint així 1S:GFP, 1L:GFP i 2:GFP. **(B)** Localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP, 1L:GFP, 2:GFP i EGFPper en cèl·lules epidermiques de fulla de plantes d'*A. thaliana*. Les fulles van ser microbombardejades amb les construccions indicades i posteriorment se'n va estudiar el patrons de localització per microscopia làser confocal. Les barres mostren l'escala de les imatges (Leivar, 2003). EGFPper és una proteïna marcador de RE (Danon et al., 2004).

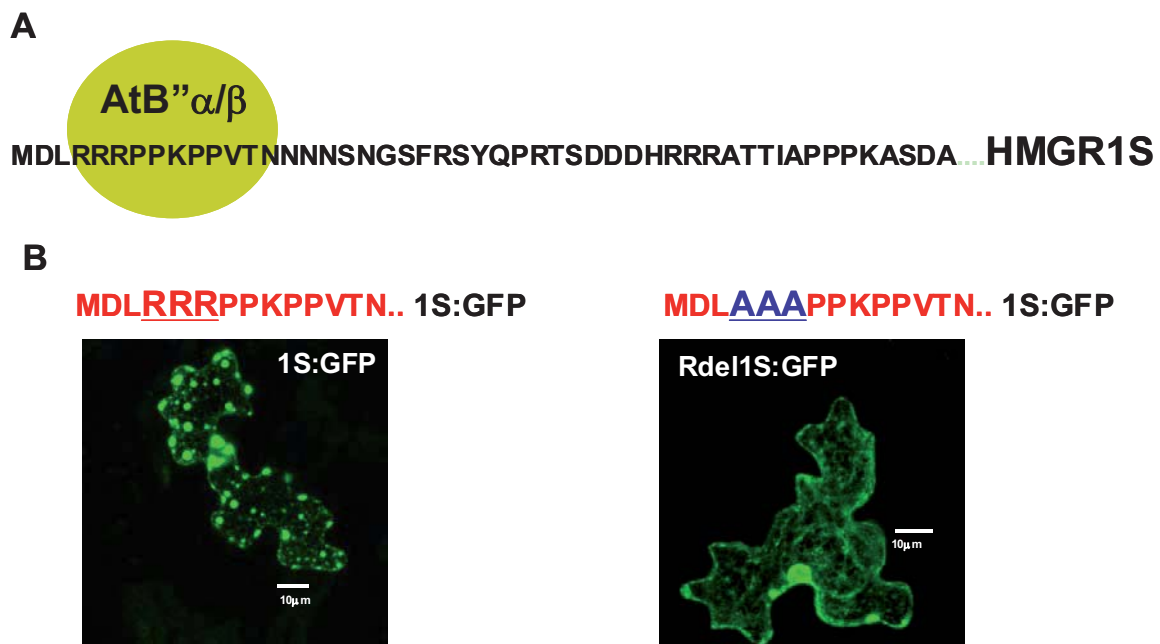
Per aprofundir en l'estudi de la funció de la regió N-terminal de l'HMGR d'*A. thaliana*, es va utilitzar la regió N-terminal de la isoforma HMGR1L (NT1L) com a esquer en un crivellatge per doble híbrid en llevat d'una llibreria de cDNA d'*A. thaliana* (Leivar, 2003). Es van identificar tres proteïnes (figura 12). Dues d'elles codifiquen per subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A), i es van anomenar AtB $\alpha$  i AtB $\beta$ . La tercera proteïna mostra similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I descrita en animals, a més de mostrar la mateixa organització modular i es va anomenar AtKLC-1. Les proteïnes AtB $\alpha$  i AtB $\beta$  interaccionen per la regió comú de les isoformes HMGR1, i no ho fan amb l'HMGR2. AtKLC-1, en canvi, per a que es doni l'associació necessita la presència de la regió extra de 50 aminoàcids a l'extrem N-terminal de la isoforma HMGR1L (1L-extra). En aquest cas, tampoc es dona la interacció amb la isoforma HMGR2. Es desconeix el paper *in vivo* que poden implicar aquestes interaccions. Es podria donar una modulació de l'activitat HMGR, o bé una

regulació de la localització subcel·lular de les diferents isoformes que es podria correlacionar amb les diferents destinacions subcel·lulars que mostren les HMGR d'*A. thaliana*.



**Fig. 12.** Identificació de proteïnes que interaccionen amb la regió N-terminal de l'HMGR. En un crivellatge per doble híbrid d'una llibreria d'expressió de cDNA d'*A. thaliana* utilitzant la regió N-terminal de la isoforma HMGR1L (NT1L) com a esquer es van identificar AtB''α, AtB''β i AtKLC1. També es mostren les regions necessàries de l'HMGR1 per a la interacció les proteïnes (Leivar, 2003). *NT1S*, regió N-terminal de l'HMGR1S; *1Lextra*, regió de 50 aminoàcids a l'extrem N-terminal de l'HMGR1L; *NT2*, regió N-terminal de l'HMGR2.

Com s'ha comentat a l'inici d'aquest apartat, la isoforma HMGR1S d'*A. thaliana* conté en la regió N-terminal citosòlica un motiu que inclou tres arginines similar a la senyal de retenció a RE de proteïnes de membrana descrites en cèl·lules animals (Schutze et al., 1994; Leivar, 2003). A més, aquesta regió i un motiu adjacent ric en prolines és la zona implicada en la interacció amb AtB''α i AtB''β (Leivar, 2003)(figura 13A). Es van dur a terme estudis preliminars de localització subcel·lular d'una variant de la 1S:GFP en la què els residus s'arginina estan substituïts per residus d'alanina. En les anàlisis per microscopia làser confocal de cèl·lules que expressaven aquesta quimera es va observar que es localitzava al RE (figura 13B). Per tant, aquestes dades suggereixen que aquest motiu d'arginines, comú a la majoria de les HMGR de plantes, participa en la interacció amb hipotètiques molècules reguladores de l'enzim i amb la seva localització subcel·lular. Per tant els mecanismes que actuen a través d'aquesta regió podrien representar un model de regulació general en les HMGR de plantes.



**Fig. 13.** El motiu d'arginines de la regió N-terminal de l'HMGR1S és important per a la interacció amb AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  i per a la localització subcel·lular de la 1S:GFP (Leivar, 2003). **(A)** Esquema de la regió necessària i suficient per a la interacció amb les isoformes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$ . **(B)** Localització subcel·lular de les quimeres 1S:GFP i Rdel1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla de plantes d'*A. thaliana*. Les fulles van ser microbombardejades amb les construccions indicades i els patrons de localització es van determinar per microscopia làser confocal. Les barres mostren l'escala de les imatges.

### 3.6.- Regulació de l'activitat HMGR

La regulació d'un enzim es pot donar a diferents nivells. A nivell transcripcional diferents factors directa o indirectament poden actuar augmentant o reprimint l'expressió d'un gen. A nivell posttranscripcional es pot regular l'estabilitat del mRNA o la taxa de traducció. Finalment hi pot haver regulació posttraduccional bé modulant l'activitat per modificació covalent (per exemple per fosforilació), bé al·lostèricament (per interacció amb algun factor), per canvis en la localització subcel·lular o bé per modificacions irreversibles que normalment controlen la vida mitja de l'enzim.

En les cèl·lules d'animals i de llevat la quantitat d'HMGR està regulada per esterols i altres isoprenoides derivats de la via del mevalonat que actuen a nivell de transcripció, traducció i estabilitat enzimàtica (revisat a Goldstein and Brown, 1990; Hampton et al., 1996; Gardner and Hampton, 1999a). A més, l'activitat HMGR és modulada per fosforilació reversible en un residu del domini catalític (revisat a Halford and Hardie, 1998). Aquesta regulació multivalent proporciona un mecanisme de control sensible que respon als nivells de colesterol en sang en mamífers i coordina el metabolisme d'isoprenoides per assegurar la disponibilitat d'esterols i altres productes no-esterols (Goldstein and Brown, 1990).

En plantes, la regulació de l'activitat HMGR respon a estímuls externs com la llum, ferida o atac per patògens i a estímuls interns com reguladors vegetals del creixement i productes de la via com els

esterols. L'activitat també varia en funció del moment del desenvolupament i del teixit (revisat a Stermer, 1994).

S'han dut a terme molts estudis sobre la modulació de l'activitat HMGR en diferents sistemes i organismes. Moltes vegades, però, no s'han identificat a quin nivell estan actuant aquests factors reguladors. Aquest apartat, doncs, ha estat estructurat en factors implicats en el control de l'activitat de l'HMGR i els mecanismes coneguts de modulació posttraduccional.

### 3.6.1.- Per retroalimentació

És important mantenir uns nivells adequats de l'HMGR per tal de poder satisfer els requeriments d'esterols i altres isoprenoides en les cèl·lules de mamífers (revisat a Goldstein and Brown, 1990). L'*steady-state* de l'enzim és mantingut en funció del flux a través de la via. Quan el flux és baix, s'incrementa la transcripció i la traducció del gen i disminueix la taxa de degradació de la proteïna. I a la inversa, la presència d'esterols en forma de LDL i 25-hidroxicolesterol en plasma suprimeix l'activitat de l'HMGR fins un 95%. El 5% de l'activitat HMGR residual és controlada d'una forma independent per isoprenoides no-esterols i és necessària per garantir la presència d'altres isoprenoides (substrats per prenilació de proteïnes, per exemple). Quan estatines (compactina, mevastatina) s'afegeixen a cèl·lules en cultiu de mamífers, la síntesi de mevalonat es bloqueja, i en unes hores incrementen els nivells de proteïna unes 200 vegades, resultat d'un increment de 8 vegades la taxa de transcripció, de 5 vegades la taxa de traducció, i un decrement de 5 vegades en la taxa de degradació de la proteïna. Els efectes són revertits en afegir mevalonat al medi.

En plantes s'han descrit diferents casos on l'activitat HMGR és modulada *in vivo* per productes isoprenoides. Alguns esterols com estigmaesterol o colesterol en ser polvoritzats en plàntules de pèsol redueixen l'activitat HMGR en un 30-35%, per un mecanisme de regulació posttraduccional (Russell et al., 1985). En altres casos (tubercles de patata, en l'alga *Ochromonas malhamensis*) s'ha vist que el tractament amb mevastatina provoca un augment de l'activitat HMGR quan aquesta s'elimina del medi (Stermer, 1994). En cèl·lules BY-2 de tabac la presència de mevinolina inhibeix el creixement cel·lular i estimula l'activitat aparent de l'HMGR (Hemmerlin and Bach, 2000). Per tant la mevinolina afecta la síntesi d'algun producte isoprenoide derivat de la via del mevalonat essencial pel control per retroalimentació de l'HMGR. En fruits d'avocat el tractament amb esterols provoca una inhibició del creixement del fruit degut a què l'estigmaesterol incrementa la taxa de degradació de l'HMGR *in vivo* (Cowan et al., 1997).

### 3.6.2.- Efecte de l'estadi del desenvolupament

Alts nivells d'activitat HMGR estan associats als teixits que presenten una molt activa divisió cel·lular, com per exemple, en els brots de l'àpex i de l'arrel i, en els teixits meristemàtics en general. Aquest efecte ha estat observat en plàntules de pèsol (Stermer, 1994), també en patata on ocorre d'una manera posttraduccional (Korth et al., 2000) i en tomàquets, els quals presenten una activitat HMGR més elevada en els estadis primerencs de la maduració del fruit (Rodríguez-Concepción and Gruißem,



1999). En llavors de blat de moro s'ha observat una activitat màxima després de la pol·linització que disminueix en madurar la llavor (Moore and Oishi, 1993). En el cas d'*A. thaliana*, tant l'expressió dels gens que codifiquen per l'HMGR, com la mateixa activitat és menor en els teixits madurs de la planta (Enjuto, 1994; Lumbreras et al., 1995; Manzano et al., 2004).

### 3.6.3.- Per factors endògens

En diferents sistemes s'ha observat una correlació inversa entre nivells d'àcid l'abscísic (ABA) i l'activitat HMGR. En fruits d'avocat, per exemple, la mevastatina inhibeix el creixement dels fruits, per inhibició de la divisió cel·lular i provoca un augment en els nivells d'ABA, efecte revertit per mevalonat (Cowan et al., 1997). A més, en aquestes cèl·lules l'aplicació exògena d'ABA inhibeix el creixement cel·lular i l'activitat HMGR. En experiments realitzats en endosperma de blat de moro amb línies mutants que sintetitzen baixes quantitats d'ABA durant el desenvolupament de la llavor, es va observar un augment en l'activitat HMGR en comparació amb les respectives plantes silvestres. A més, alts nivells d'aquesta hormona suprimiren l'activitat HMGR *in vivo* (Moore and Oishi, 1994). Experiments *in vivo* en brots de l'àpex de pèsol etiolats indiquen una inhibició del 40% de l'activitat HMGR provocada per l'ABA que s'aconsegueix als 10 minuts de tractament indicant que es deu a un mecanisme de regulació posttraduccional (Russell et al., 1985). Els mateixos autors observen un increment de l'activitat HMGR amb la citoquinina zeatina i amb giberel·lines.

Diferents treballs indiquen el calci participa en la regulació de l'activitat HMGR, tot i que els efectes varien en funció del sistema i de les condicions experimentals. La proteïna calmodulina purificada d'*Hevea latex* promovia un increment de més del doble de l'activitat HMGR en presència de calci (Stermer, 1994). En canvi, en les plàntules de pèsol, concentracions nanomolars de calci inhibeixen l'activitat HMGR a través d'algun factor diferent a la calmodulina i a més, d'una forma reversible (Russell et al., 1985).

### 3.6.4.- Per factors ambientals

Les plantes sintetitzen fitoalexines amb activitat antimicrobiana com a resposta a l'atac per patògens de naturalesa isoprenoide, alhora que augmenta l'activitat HMGR. Tot sovint, com ja s'ha descrit anteriorment (comentat en l'apartat 3.3 de la Introducció), aquest increment va acompanyat per l'expressió específica d'alguna isoforma de l'HMGR.

En la major part de sistemes analitzats s'ha observat una inhibició de l'HMGR en resposta a llum. Aquest fet és consistent amb un augment del flux per la via del mevalonat en condicions de foscor i en un augment del flux per la via MEP en condicions de llum. S'ha observat que les plàntules crescudes en foscor de pèsol, d'*A. thaliana* i de blat de moro mostren una activitat HMGR superior a la que presenten quan es desenvolupen en presència de llum (Russell et al., 1985; Enjuto, 1994; Stermer, 1994; Lumbreras et al., 1995; Learned, 1996). En *A. thaliana* s'ha demostrat que la llum reprimeix l'expressió d'*hmg1* i que aquest fenomen depèn de la taxa d'irradiació, del temps d'il·luminació i de la qualitat espectral de la llum (Learned, 1996; Learned, 1997). S'ha observat que mutants que afecten els

fotoreceptors Cry1 (s'indueix per llum blava) i Phy B (s'indueix per llum vermella) mostren un increment en l'expressió d'*hmg1* i *hmg2*, que posa de manifest el paper dels fotoreceptors en la via de transducció de senyal generada per llum que condueix a una repressió d'aquests gens (Rodríguez-Concepción et al., 2004). Els nivells d'expressió es correlacionen amb els nivells d'activitat HMGR. També el fotoperíode afecta els nivells d'activitat HMGR en *A. thaliana*. Plantes d'*A. thaliana* crescudes a règim de dia curt tenen unes quatre vegades més d'activitat HMGR en comparació amb plantes crescudes a règim de dia llarg (Manzano et al., 2004). La llum pot reprimir d'una forma posttraduccional l'activitat HMGR. Aquest comportament s'ha advertit en plàntules de pèsol crescudes en foscor que en ser irradiades per llum vermella, l'activitat HMGR microsomal disminueix ràpidament al cap de pocs minuts (Russell et al., 1985).

Tot i que en la major part de sistemes vegetals estudiats la llum inhibeix l'activitat HMGR, s'han descrit casos que no ocorre d'aquesta manera. De forma oposada, en patata els nivells d'expressió dels gens *hmg2* decau dramàticament en foscor. Això és correspon amb una reducció en l'activitat enzimàtica en aquestes condicions (Korth et al., 2000).

### 3.6.5.- Mecanismes de modulació posttraduccional

L'HMGR de mamífers i de llevats és fosforilada i inactivada per serina/treonina quinases de la mateixa família anomenades SNF1 en llevat i quinases activades per AMP (AMPK) en mamífers (revisat a Halford and Hardie, 1998). La fosforilació en un residu conservat de serina impedeix la formació del centre actiu de l'enzim. Fins i tot en espècies que no contenen aquest residu, com per exemple en *Sulfolobus solfataricus*, quan per enginyeria genètica es bescanvia un residu d'una determinada posició per serina, en resulta una HMGR susceptible d'inactivació reversible per fosforilació (Kim et al., 2000). Tant la SNF1 en llevats com l'AMPK en mamífers són complexos heterotrimèric formats per una subunitat catalítica ( $\alpha$ ) i dues subunitats reguladores ( $\beta$  i  $\gamma$ ). La subunitat catalítica reconeix i fosforila un motiu conservat present en les proteïnes substrat (SAMS) (Halford and Hardie, 1998).

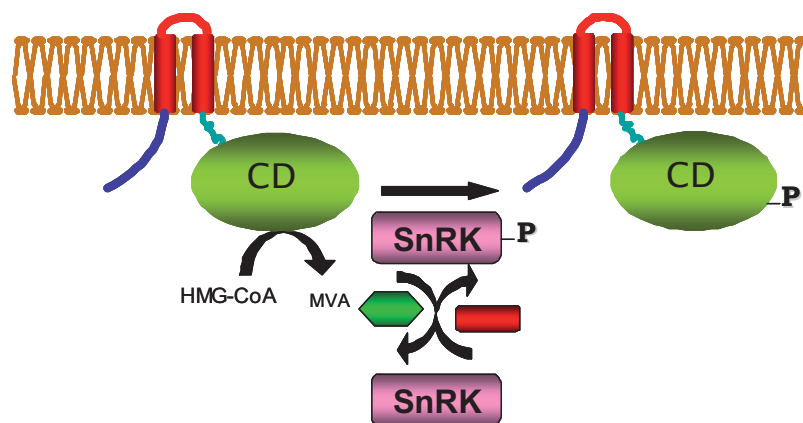
Els membres d'aquesta família de quinases regulen respostes cel·lulars sota condicions d'estrès ambiental i nutricional (Halford and Hardie, 1998). En *Saccharomyces cerevisiae* la SNF1 és essencial per a l'adaptació a la utilització de fonts de carboni alternatives quan creixen en absència de glucosa. En mamífers, l'AMPK es va purificar a partir de fraccions proteiques que causen inactivació de l'HMGR i altres enzims com l'acetil-CoA carboxilasa (implicat en la síntesi d'àcids grassos). L'enzim és estimulat per l'AMP i per la fosforilació duta a terme per la quinasa de l'AMPK (anomenada AMPKK). L'AMPK respon a diferents tipus d'estrès com la privació de nutrients, inhibint així els enzims clau de les vies biosintètiques que consumeixen ATP.

Els homòlegs d'aquestes quinases en plantes s'anomenen actualment SNF1-related quinasa (SnRKs) i conserven una gran similitud de seqüència amb la SNF1 i l'AMPK que pot arribar a ser d'una 48% d'identitat en aminoàcids (Halford and Hardie, 1998) (figura 14). Els homòlegs a *A. thaliana* són AKIN10, que s'expressa de forma constitutiva, i AKIN11. En diferents espècies de plantes (col-i-flor,

ordi o espinacs) s'han purificat fraccions proteiques capaces de fosforilar el motiu SAMS de pèptids sintètics i, que fosforilen i inactiven l'HMGR1S d'*A. thaliana* (Douglas et al., 1997; Halford and Hardie, 1998; Sugden et al., 1999; Lumberras et al., 2000). Per aquesta raó en un principi es van anomenar HRK (*HMGR related kinase*). Les SnRKs de plantes tenen una especificitat similar per proteïnes i pèptids substrat. No obstant no s'activen per l'AMP, a diferència de les quinases homòlogues de mamífers i de llevats. També són regulades per fosforilació de manera que la seva activitat s'inhibeixen per fosfatases. A més, en alguna de les fraccions proteiques purificades s'ha demostrat la reactivació per l'AMPKK de mamífers. També, anticossos preparats amb un pèptid de la SnRK de sègol, reconeixen proteïnes d'aquestes fraccions que mostren un pes similar a l'AMPK de mamífers (Sugden et al., 1999). Una SnRK de col-i-flor (HRK-A) fosforila i inactiva l'HMGR1S d'*A. thaliana* al residu de serina-577. L'HMGR es reactiva quan s'addiciona la subunitat catalítica de la PP2A bovina (Dale et al., 1995).

Tot i que no s'ha comprovat *in vivo* que l'HMGR s'inactivi per quinases de la família SnRK1, s'ha observat que la incubació de fraccions microsomals de plàntules de pèsol amb un sobrenedant proteic obtingut a partir d'un extracte de les mateixes plantes i en presència de magnesi i ATP, disminueix l'activitat HMGR (Russell et al., 1985). Per tant, això és consistent amb la hipòtesi d'inactivació per la SnRKs.

En plantes, hi ha altres enzims importants implicats en rutes biosintètiques que són fosforilats i inactivats per la SnRK1. Aquests enzims són la sacarosa fosfat sintasa i la nitrat reductasa implicats en la síntesi de sacarosa i de nitrat, respectivament. Això indica que també en plantes la SnRK1 podria dur a terme un paper en el control global del metabolisme del carboni (Halford and Hardie, 1998).



**Fig. 14.** Esquema de la regulació de l'HMGR de plantes per fosforilació. La forma activa de la SnRK és la fosforilada que inactiva, tot fosforilant, una serina conservada del domini catalític.

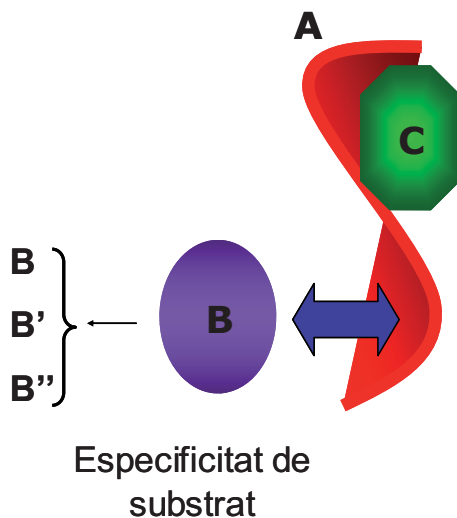
Altres mecanismes de regulació posttraduccional de l'HMGR són els implicats en la taxa de renovació de la proteïna. Estudis realitzats amb l'enzim de mamífers han demostrat que el domini N-terminal de membrana de l'HMGR és necessari i suficient per mitjançar la taxa de degradació proteica. La presència o l'excés de mevalonat i d'esterols promou la degradació ràpida i selectiva de l'HMGR per una susceptibilitat incrementada a proteases del RE on hi destaquen les cisteïna-proteases (Goldstein

and Brown, 1990; McGee et al., 1996; Moriyama et al., 1998). A més, també s'ha observat que l'estat d'oligomerització de l'HMGR és important per a l'estabilització i la preservació de la degradació, procés de regulació on també hi està implicat el domini N-terminal (Cheng et al., 1999). Una de les dues isoformes de l'HMGR de llevat, l'HMG2P, també és regulada per degradació mediada pel domini N-terminal (Gardner and Hampton, 1999a, b). La molècula inductora és probablement el farnesil difosfat, en tot cas és un precursor isoprenoide previ a l'esqualè (Gardner and Hampton, 1999a). En mamífers un derivat del FPP conjuntament amb un derivat d'esterols són una senyal positiva per la degradació de l'HMGR. En plantes, aquest sistema de regulació no ha estat descrit però s'ha observat un augment en l'activitat HMGR quan s'utilitzen inhibidors de cisteïna proteases tant en sistemes *in vivo* com *in vitro* (Stermer, 1994). Aquest fet indica que en sistemes vegetals la taxa de degradació podria estar mediada per proteases pròximes a l'entorn endomembranós de l'HMGR.

#### 4.- LA PROTEÏNA FOSFATASA 2A

Les fosfoproteïna fosfatases (PP) juguen un paper essencial en la regulació de molts processos cel·lulars en eucariotes (revisat a (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Hunter, 1995; Millward et al., 1999; Sontag, 2001; Luan, 2003). La reacció enzimàtica que catalitzen consta de la desfosforilació de residus de serina, treonina o de tirosina prèviament modificats covalentment per fosforilació. Concretament, la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) és una de les serina/treonina fosfatases majoritàries en les cèl·lules amb un ampli espectre de substrats i de funcions cel·lulars (revisat a Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Virshup, 2000; Janssens and Goris, 2001; Sontag, 2001). S'ha identificat en llevats, mamífers, insectes, algues i plantes superiors.

La PP2A és un heterotrímer format per una subunitat catalítica o C de 36 kDa, una subunitat A de 65 kDa, també coneguda com PR65, que formen el nucli de l'enzim i una subunitat reguladora o de tipus B que confereix propietats distintives al nucli (figura 15) (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Sontag, 2001; Strack et al., 2002). Tant la subunitat C com la subunitat A estan molt conservades evolutivament en tots els organismes estudiats. La delecció del gen que codifica per una subunitat catalítica és letal en fongs i ratolí, demostrant el caràcter essencial de la PP2A. En canvi les subunitats reguladores, o de tipus B, són les que mostren un major grau d'heterogeneïtat (revisat a Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994; Sontag, 2001; Luan, 2003). En els diferents organismes existeix una gran diversitat de complexos PP2A que s'aconsegueix en gran part per l'existència de múltiples variants de la subunitat reguladora.



**Fig. 15.** Esquema de l'heterotrímer PP2A. La PP2A està formada per la subunitat PR65 o A i la subunitat catalítica o C que formen el nucli de l'enzim. Tres famílies codifiquen per la subunitat de tipus B que dona especificitat de substrat al complex: B, B' i B''.

L'activitat PP2A és modulada per modificacions covalents com la fosforilació o la metilació a nivell en motius conservats del domini catalític (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994). Altres mecanismes de regulació actuen a nivell d'expressió gènica o de canvis en la localització subcel·lular. El principal mecanisme de regulació, però, ve donat per la interacció amb les subunitats reguladores que tenen com a principal funció apropar la subunitat C al seu substrat o transportar el complex a certs compartiments subcel·lulars.

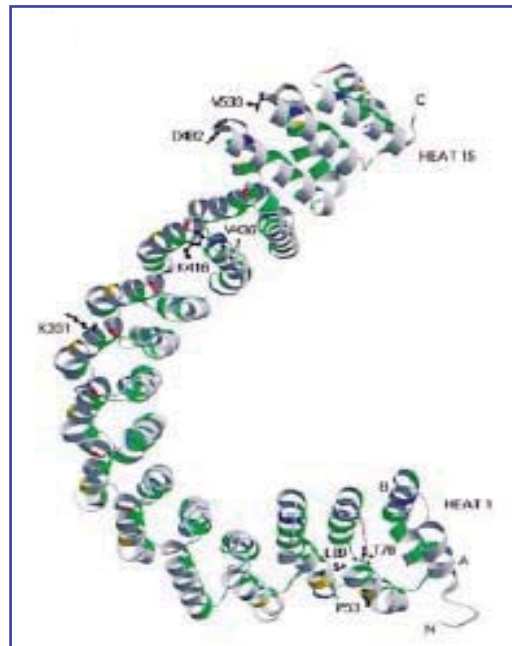
Estudis farmacològics i bioquímics posen de manifest que la PP2A és la principal fosfatasa en cèl·lules vegetals. S'ha quantificat en extractes de colza, de blat de moro i de pèsol i representa un 25% de l'activitat fosfatasa total (MacKintosh and Cohen, 1989). Es troba en la majoria dels teixits vegetals, i en moltes localitzacions subcel·lulars incloent el nucli, el citosol o les membranes (Luan, 2003) i també associades al citoesquelet on controlen la dinàmica dels microtúbuls i dels filaments d'actina en diferents tipus de cèl·lules i en les diverses fases del cicle cel·lular (Ayaydin et al., 2000; Foissner et al., 2002; Awotunde et al., 2003). El coneixement sobre la PP2A en plantes prové principalment d'estudis realitzats amb aproximacions farmacològiques amb inhibidors específics com l'àcid okadaic o la cantaridina. En aquests casos, però, és difícil diferenciar l'efecte sobre la PP1 o sobre la PP2A, degut a que els inhibidors utilitzats tot i tenir major afinitat per la PP2A també en tenen per la PP1. Per exemple, l'ús de l'àcid okadaic ha suggerit la participació de la PP1 o la PP2A en l'activació d'enzims metabòlics com la nitrat reductasa o la sacarosa fosfat sintasa (revisat a Luan, 2003). També estan implicats en la regulació del cicle cel·lular, en la regulació del creixement i del desenvolupament mediat per hormones, en la pol·linització, en la germinació de llavors, en vies de transducció de senyals induïdes per llum o elicitors, en la regulació de canals iònics o en l'expressió gènica. En l'aclimatació a fred en alfalfa, canvis mediat per l'influx de calci inclouen la inhibició de PP2A (Monroy et al., 1998).

La seqüenciació completa del genoma d'*A. thaliana* ha permès detectar 112 gens que codifiquen per proteïnes amb homologia a les subunitats catalítiques de fosfatasa (Kerk et al., 2002). Pel que fa a la PP2A, en *A. thaliana* tres gens codifiquen per la subunitat A (Slabas et al., 1994), cinc gens codifiquen per la subunitat C (Ariño et al., 1993; Casamayor et al., 1994; Pérez-Callejón et al., 1998), dos gens codifiquen per la subunitat B (Rundle et al., 1995), vuit per la subunitat B' (Haynes et al., 1999; Terol et al., 2002), cinc gens codifiquen per la subunitat B'' (Hendershot et al., 1999) i, finalment, el gen *tonneau2* codifica per una nova classe de subunitat B'' (Camilleri et al., 2002). Per tant la combinació de les múltiples isoformes podria generar fins a 255 heterotrímers de la PP2A diferents. En *A. thaliana*, s'han realitzat estudis utilitzant aproximacions genètiques amb mutants de subunitats de la PP2A. Fins aquest moment s'han publicat treballs de mutants en els gens que codifiquen per les isoformes de la subunitat A (revisat a l'apartat 4.1) i el mutant *tonneau2* (Camilleri et al., 2002).

#### 4.1.- La subunitat PR65

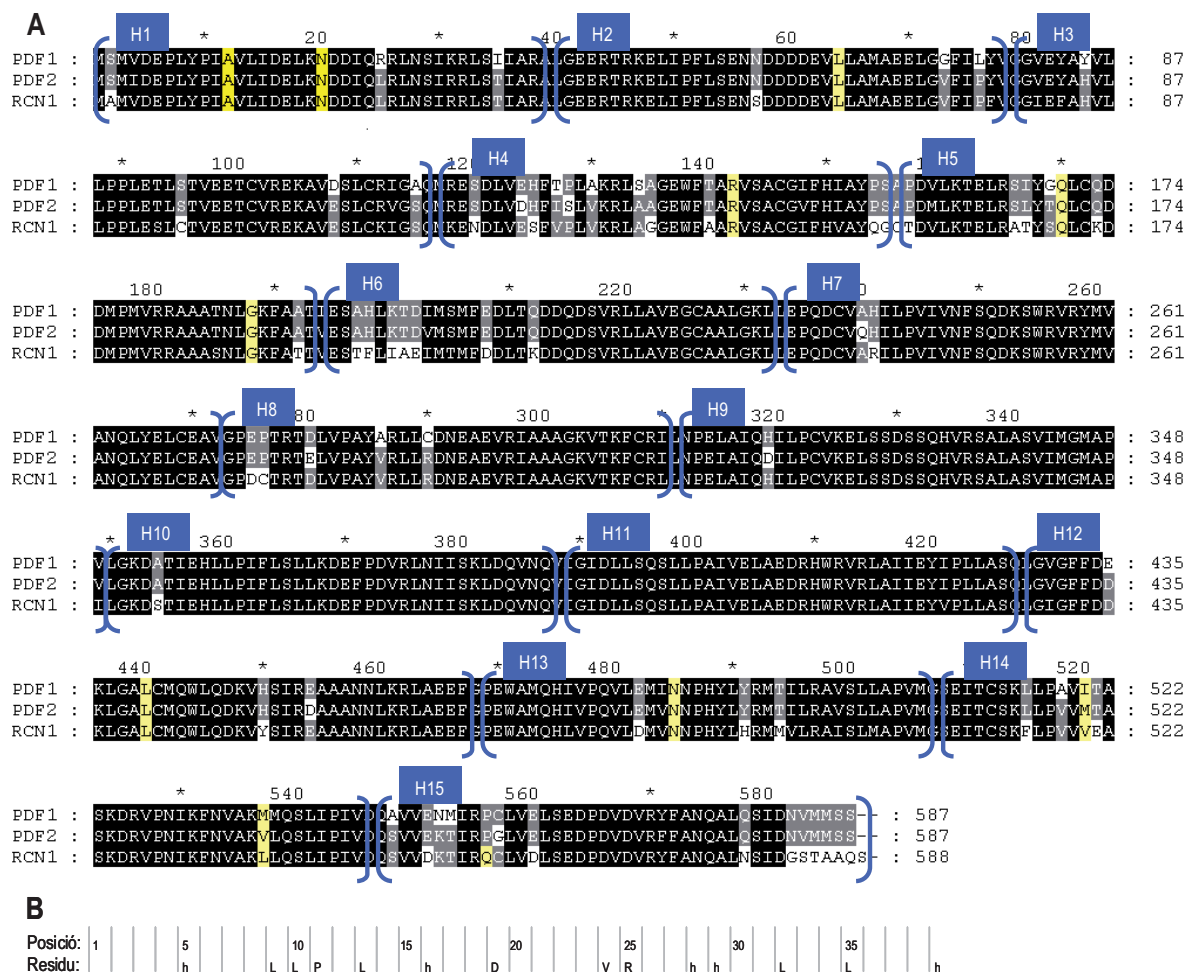
La subunitat A o PR65 realitza una funció estructural tot interaccionant amb la subunitat C i amb la subunitat de tipus B (Ruediger et al., 1992; Groves et al., 1999; Strack et al., 2002) per formar el complex heterotrimèric. A més també s'ha descrit que modula l'activitat enzimàtica de l'holoenzim (Turowski et al., 1997; Zhou et al., 2004). La PR65 humana ha estat cristal·litzada i s'ha demostrat que la seva estructura consta de 15 repeticions imperfectes en *tandem* anomenades HEAT, de 38 a 40 residus riques en leucina (figura 16) (Groves et al., 1999). A nivell d'estructura secundària el motiu HEAT està format per dues hèlix  $\alpha$  connectades per un *loop* d'uns 18 residus cadascuna. Les cinc repeticions a l'extrem C-terminal (HEAT 10-15) són importants per a la interacció amb la subunitat catalítica mentre que les 10 regions HEAT a l'extrem N-terminal (HEAT 1-10) són importants per la

interacció amb la subunitat de tipus B (Ruediger et al., 1992; Ruediger et al., 1994; Groves et al., 1999). El motiu HEAT present en altres proteïnes juga un paper important en les interaccions proteïna-proteïna, d'aquí el nom: *Huntingtin*, *Elongation factor*, *A subunit* i *Tor* quinasa (Strack et al., 2002). La subunitat A s'expressa de forma ubiqa en tots els teixits i en tots els estadis de desenvolupament (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994).



**Fig. 16.** Estructura terciària de la PR65 humana on es mostren els 15 motius HEAT (Groves et al., 1999).

En *A. thaliana* la PR65 està codificada per tres gens: el gen *pdf1* (*At3g25800*) que codifica per la isoforma PDF1, el gen *pdf2* (*At1g13320*) que codifica per la PDF2 i el gen *rcn1* (*At1g25490*) que codifica per la RCN1. Les tres isoformes mostren un 86% d'identitat aminoacídica i una massa molecular al voltant de 65,5 kDa (Zhou et al., 2004). Les tres isoformes s'estructuren en 15 repeticions HEAT que segueixen el consens amb poques modificacions (figura 17A). Alguns d'aquests canvis que no segueixen el consens són presents en altres PR65, com la PR65 humana (Groves et al., 1999). Altres modificacions no s'han conservat en la PR65 humana però sí que ho han fet en les isoformes d'*A. thaliana*. La major part de canvis s'acumulen en els cinc primers motius HEAT, zona d'unió amb la subunitat variable. La proteïna RCN1 mostra més diferències respecte les altres dues que s'acumulen en el HEAT 6 i en el HEAT 15 i que li podrien conferir propietats úniques.



**Fig. 17.** Estructura primària de les isoformes de la PR65 d'*A. thaliana*. **(A)** Alineament de seqüències de les tres isoformes PR65 d'*A. thaliana*. En fons negre s'indiquen els residus idèntics en les tres seqüències. En fons gris es mostren els residus idèntics en al menys dues de les tres seqüències. S'han assenyalat els 15 motius HEAT entre claudàtors (H1-H15). En groc s'indiquen els residus que divergeixen del consens. **(B)** Seqüència consens del motiu HEAT; *h*, residu aminoacídic hidrofòbic.

Bona part dels estudis sobre la PP2A en *A. thaliana* s'han realitzat en mutants en el gen *rcn1*. La línia mutant *rcn1-1* es va identificar en una cerca de mutants que mostraven major sensibilitat a l'inhibidor de transport d'auxines àcid naftiltalèmic (NPA), d'aquí el nom: *Roots Curl in NPA-1* (Garbers et al., 1996). El mutant *rcn1-1* mostra alteracions fenotípiques en zones de creixement que requereixen elongació diferencial com en el corbament de l'arrel i en la formació del ganxo apical de l'hipocòtil, però també té defectes en l'elongació normal de l'arrel i de l'hipocòtil a causa d'alteracions en el transport d'auxines (Garbers et al., 1996; Rashotte et al., 2001). A partir de l'estudi d'aquest mutant o de mutants al·lèlics s'han atribuït noves funcions a la PP2A, com la seva participació en la transducció de senyal d'ABA (Kwak et al., 2002) o en la transducció de senyal d'etilè (Larsen and Cancel, 2003).



Estudis fisiològics i bioquímics mostren que la subunitat A codificada per *rcn1* és un regulador positiu de la PP2A. L'estirp *rcn1-1* presenta una reducció d'un 40-60% en l'activitat PP2A així com una major sensibilitat als inhibidors de la PP2A, la cantaridina i l'àcid okadaic (Deruère et al., 1999). A més, plantes silvestres crescudes en la presència d'aquests inhibidors mostren el mateix fenotip observat en el mutant *rcn1-1*. Els mutants insercionals que afecten les isoformes PDF1 i PDF2 no manifesten ni alteracions fenotípiques ni sensibilitat incrementada als inhibidors farmacològics de la PP2A (Zhou et al., 2004). No obstant, dobles mutants que afecten qualsevol d'aquestes dues isoformes i la RCN1 exhibeixen fenotips molt severos com embriogènesi anormal, expansió radial cel·lular, enanisme i esterilitat. El doble mutant on estan afectades les dues isoformes PDF1 i PDF2 té en canvi un fenotip normal. Aquests estudis demostren que la PDF1 i la PDF2 tenen un efecte feble sobre la regulació de la PP2A i que la RCN1 juga un paper cardinal en la seva regulació en *A. thaliana*.

## 4.2.- La subunitat de tipus B

La subunitat de tipus B, és la subunitat reguladora o variable del complex PP2A al que li confereix propietats específiques en apropar el complex al seu substrat, a més de modular la seva activitat i/o localització subcel·lular (revisat a Sontag, 2001; Luan, 2003). En mamífers s'han identificat al menys 20 subunitats de tipus B que s'han dividit en tres famílies, B, B' i B'', les quals comparteixen els dos motius d'unió amb la subunitat A (Li and Virshup, 2002).

La majoria de subunitats B en *A. thaliana* s'han identificat per homologia però se'n desconeix la funció. Dues subunitats de la família B'' (AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$ ) interaccionen amb la regió N-terminal de les isoformes HMGR1S i HMGR1L suggerint doncs, un paper de la PP2A en la regulació d'aquest enzim (Leivar, 2003). Existeixen cinc gens en *A. thaliana* que codifiquen per isoformes de la mateixa família de subunitat B'' (Hendershot et al., 1999). En *A. thaliana* existeix una altra isoforma de subunitat B'', codificada pel gen *ton2*, que és comparativament més distant i representa una nova classe de subunitat B'' (Camilleri et al., 2002). Un mutant en el gen *ton2*, *tonneau 2*, presenta anormalitats en el citoesquelet microtubular cortical que afecta la morfologia cel·lular i que es tradueix en canvis globals en el fenotip de la planta com tiges més gruixudes i enanisme. Es demostrà que la proteïna TON2 s'associa al complex PP2A interaccionant amb la subunitat A. Per tant es suggereix la implicació de la PP2A en el control de l'organització del citoesquelet en *A. thaliana*.

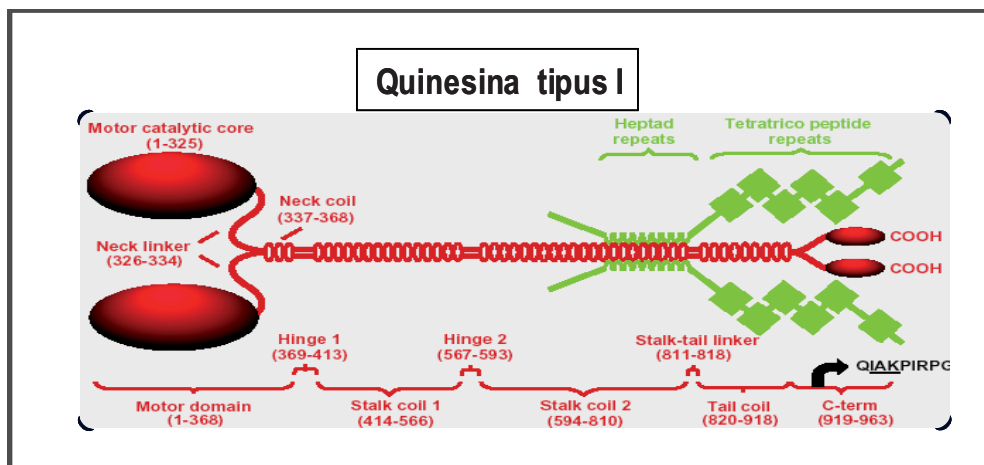
La subunitat B'' és poc coneguda. És present en mamífers, *Xenopus*, *C. Elegans*, en plantes superiors però no en llevat (revisat a Janssens and Goris, 2001). S'ha mostrat, recentment, que la subunitat B'' humana HsPR72 és una proteïna que uneix calci, i que la interacció amb calci és mediada per dos motius *EF-Hand*, EF-1 i EF-2, inclosos en les regions implicades amb la unió amb la subunitat estructural o A (ASBD1 i ASBD2) (Janssens et al., 2003). Per primera vegada, doncs, es demostrà la capacitat dels ions calci d'interaccionar amb la PP2A i regular la seva funció.

## 5. LA QUINESINA DE TIPUS I

Les quinesines formen una extensa superfamília de proteïnes motores associades als microtúbuls que estan implicades en molts processos essencials per a l'organització i el funcionament de la cèl·lula eucariota, com el transport de vesícules, el transport o posició d'òrgans, la formació i elongació del fus acromàtic, la segregació de cromosomes, la dinàmica de microtúbuls o la morfogènesi cel·lular (revisat a Manning and Snyder, 2000; Goldstein, 2001; Lawrence et al., 2002). Tots aquests processos requereixen el reconeixement específic de les molècules o estructures que han de ser transportades.

La quinesina de tipus I o convencional va ser identificada en l'axó gegant del calamar *Loligo pelai*, on participa en el transport de vesícules (Vale et al., 1985). Aquesta proteïna és un tetràmer format per dues cadenes pesants (subunitats KHC) i dues cadenes lleugeres (subunitats KLC) (figura 18). La KHC s'uneix a microtúbuls i duu a terme la funció motora, mentre que la KLC està implicada en el reconeixement de la proteïna que actua com a receptora per al transport (Vale and Fletterick, 1997).

L'estructura primària de la KLC pot estar dividida en quatre regions (figura 18, en verd). La regió a l'extrem N-terminal, una regió d'uns 200 residus que interaccionen amb la KHC mitjançant una estructura de *coiled-coil* normalment formada per repeticions de set aminoàcids (*heptad repeats* o HR) (Gauger and Goldstein, 1993). La regió central està formada per cinc o sis repeticions de 34 aminoàcids (*tetratricopeptid repeats* o TPR) implicada en la interacció amb el receptor per al transport. Finalment la regió a l'extrem C-terminal és la menys conservada en longitud i seqüència i podria estar implicada en la localització subcel·lular o el control de la quinesina.



**Fig. 18.** La quinesina de tipus I. (A) El tetràmer està format per dues cadenes pesants (KHC) en vermell, i dues cadenes lleugeres (KLC) en verd.

La major part de les quinesines conegudes han estat descrites en animals o fongs. En plantes hi ha diverses seqüències que codifiquen per proteïnes amb homologia amb la quinesina. Aquestes seqüències es poden agrupar en diferents famílies gèniques, algunes de les quals són exclusives de

plantes (Reddy and Day, 2001). De fet, la proporció relativa de proteïnes que presenten homologia amb el domini motor de quinesina és la més alta d'entre tots els organismes. També és així en el cas d'*A. thaliana*, que conté 61 seqüències amb homologia, algunes de les quals formen part de famílies úniques (Reddy and Day, 2001). Algunes d'elles, a part del domini motor, presenten un domini *coiled-coil*, probablement implicat en la dimerització. En plantes, tan sols s'han caracteritzat funcionalment una desena de quinesines (Lloyd and Hussey, 2001; Wasteneys, 2002; Lee and Liu, 2004), que participen en mitosis, en citoquinesis o en morfogènesi cel·lular. S'han identificat quinesines amb domini d'unió a l'actina, se'n desconeix la funció però es suggereix que són proteïnes pont entre els microtúbuls i els filaments d'actina (Lee and Liu, 2004). S'han identificat quinesines amb un domini d'unió a calmodulina que en les cèl·lules de tabac té la funció d'estabilitzar els microtúbuls durant la morfogènesi cel·lular (Preuss et al., 2004). S'ha atribuït aquest gran nombre de quinesines per les diferents funcions que té el citoesquelet de microtúbuls en les plantes com la relació amb la paret cel·lular, la morfologia cel·lular o el creixement polaritzat de cèl·lules com el gra de pol·len (Lloyd and Hussey, 2001; Wasteneys, 2002).

La subfamília de quinesines implicades en transport és poc representada en plantes i també en *A. thaliana*, i no se n'ha caracteritzat cap a nivell funcional. Dins d'aquest context, és de particular interès la recent identificació d'una proteïna homòloga a la cadena lleugera de quinesina que interacciona específicament amb la isoforma HMGR1L i que es va anomenar AtKLC-1 (Leivar, 2003). La proteïna AtKLC-1 presenta un 24,7% de similitud i un 14,1% d'identitat respecte la KLC humana (AAA16576) i la mateixa organització modular. A la regió N-terminal (aminoàcids 154-188) s'identificà una regió que podria contenir repeticions *coiled-coil* de tipus *Heptad* (HR). D'altra banda, presenta una extensió central  $\alpha$ -helicoidal (aminoàcids 200-612) amb deu repeticions TPR. El domini de repeticions TPR de AtKLC-1 és responsable de la interacció amb l'HMGR1L (Leivar, 2003). Aquest fet és consistent amb la participació dels dominis TPR de les KLC en el reconeixement de dianes cel·lulars que han de ser transportades per la quinesina. En *A. thaliana* la AtKLC-1 forma part d'una família multigènica de tres membres (Leivar, 2003).

## 6.- ESTUDIS DE LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR

Diferents aproximacions demostraren que les isoformes HMGR1S/1L i HMGR2 d'*A. thaliana* localitzen de forma primerenca al reticle endoplasmàtic (RE) (Campos and Boronat, 1995; Leivar et al., 2005). Estudis de localització subcel·lular amb quimeres on es va substituir el domini catalític per la proteïna verda fluorescent o GFP van indicar que les tres isoformes localitzen al RE, però que tant l'HMGR1S com l'HMGR2 també poden localitzar-se en unes vesícules probablement derivades d'aquest sistema endomembranós (Leivar, 2003). De fet la membrana del RE és molt versàtil i adaptable, i diferents estudis demostren la formació de vesícules que se'n deriven. Moltes aproximacions experimentals s'han basat en la utilització de quimeres amb GFP que duen un pèptid senyal de retenció al RE.

El 1994 es va descobrir la proteïna GFP de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie et al., 1994). Fins aquest moment l'estudi de marcatge requeria tècniques invasives com l'ús de colorants o immunocitoquímica. La proteïna GFP té moltes propietats que la converteixen en una proteïna ideal per al seu ús en estudis de localització subcel·lular. És una proteïna natural fluorescent que no requereix substrat, no és tòxica i és estable (Haseloff et al., 1999). El marcatge amb GFP es pot realitzar *in vivo*, i es pot fer un seguiment al llarg dels estadis de desenvolupament o en diferents teixits sense provocar dany durant la manipulació. Té mida petita de 27 kDa, és citosòlica però també es troba a nucli on hi entra de forma passiva degut a la seva mida. L'RNAm que codifica per la GFP original pateix *splicing* diferencial en sistemes vegetals i dona lloc a un producte inestable al qual li manquen 84 nucleòtids. Es va modificar la seqüència codificant de la GFP i es va eliminar l'intró críptic de manera que pogués ser utilitzada i processada correctament en *A. thaliana* i en altres plantes (Davis and Vierstra, 1998). També es modificaren alguns codons per optimitzar la traducció en sistemes vegetals. Les proteïnes es poden fusionar als extrems N o C-terminal de la GFP sense que s'atenuïn les propietats fluorescentes. No obstant, cal tenir en compte que la fusió podria modificar el plegament de la proteïna, o bé encobrir senyals de trànsit subcel·lulars. A partir de la GFP s'han obtingut altres proteïnes fluorescentes que s'exciten a diferents longituds d'ona i que han obert noves possibilitats en el camp de l'estudi de la biologia cel·lular, permetent així per exemple, veure dobles marcatges en estudis de co-localització. Per enginyeria genètica s'han fet construccions amb la GFP que permeten la visualització dels diferents orgànuls de la cèl·lula: nucli, membrana cel·lular, RE, mitocondri, plastidis (revisat a Haseloff et al., 1999; Hanson and Köhler, 2001). Això ha estat particularment important en plantes per la dificultat afegida en aquestes cèl·lules on la paret cel·lular és impermeable als colorants i als tints utilitzats habitualment en cèl·lules animals.

### 6.1.- Organització del reticle endoplasmàtic en les cèl·lules vegetals

Les principals funcions del RE inclouen síntesi, processament i trànsit subcel·lular de proteïnes, de glicoproteïnes i de molècules lipídiques així com també la regulació dels nivells cel·lulars de calci. El sistema endomembranós del RE és un del orgànuls més versàtils i adaptables de les cèl·lules eucariotes que permet compartimentar aquesta varietat de funcions en diferents subdominis. Així

mateix, aquesta flexibilitat permet disposar d'una gran àrea de superfície per albergar diferents grups de proteïnes integrals i perifèriques (Staehelin, 1997).

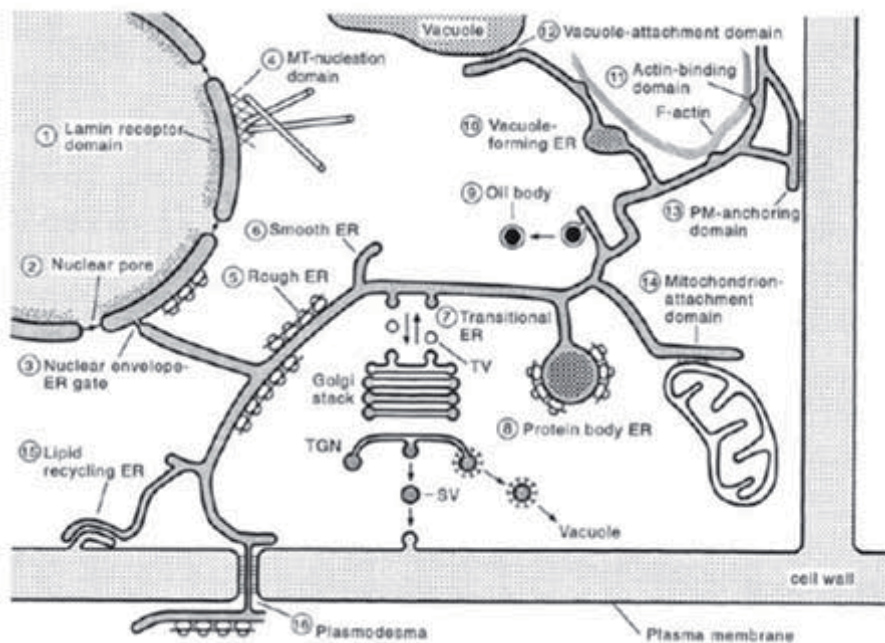
S'havien distingit clàssicament tres subcompartiments en el RE que són el RE rugós, el RE llis i l'embolcall nuclear. Staehelin (1997), a partir d'una revisió dels treballs publicats, descriu fins a 16 subdominis de RE diferents en les cèl·lules vegetals basats en la seva morfologia i les seves propietats funcionals (figura 19).

En microscopia òptica el RE apareix com una xarxa de cisternes lamel·lars o bé tubulars que s'estén al llarg de tot el citoplasma. Les cisternes lamel·lars corresponen al RE portador de ribosomes o RE rugós i és el port d'entrada de les proteïnes que segueixen la via de secreció la qual reparteix proteïnes de membrana sintetitzades *de novo* al RE, al Golgi, al vacúol i a la membrana plasmàtica, i proteïnes solubles al RE, al Golgi, al vacúol i a l'espai extracel·lular. La xarxa de cisternes tubulars coincideix amb el RE llis. Anàlisis cinètiques de les membranes del RE visualitzades amb el fluoròfor DiOC<sub>6</sub> mostren que les cisternes tubulars s'estenen cap a l'interior cel·lular i són força mòbils. Les cisternes tubulars del RE estan implicades en la formació dels plasmodesmes, conductes citosòlics que travessen la paret cel·lular. Tot i que es desconeix bastant la funció del RE llis en cèl·lules vegetals es suggereix que, anàlogament al sistema animal, s'hi sintetitzarien molècules lipídiques com glicerolípidis, flavonoides, isoprenoides i ceres. Alguns subdominis del RE es poden trobar íntimament units al mitocondri, als que se li atribueixen funcions d'intercanvi lipídic. Altres, poden estar embolcallant apèndixs membranosos derivats de vesícules d'exocitosi de la membrana plasmàtica. L'embolcall nuclear es pot subdividir també en quatre dominis funcionals.

El citoesquelet d'actina està implicat en la redistribució de certs dominis del ER que es troben units a la membrana plasmàtica, als vacúols o als filaments d'actina. De fet, hi ha una estreta relació entre el complex de Golgi i el RE amb el citoesquelet d'actina on la dinàmica d'aquests orgànuls depèn de la integritat de la xarxa de filaments d'actina (Brandizzi et al., 2002) a diferència de cèl·lules animals on l'organització del RE depèn dels microtúbuls (Lee and Chen, 1988).

La resta de subdominis descrits corresponen a estructures vesiculars. En les llavors, el RE forma els cossos oliosos que acumulen triacilglicèrids, la generació dels quals es duu a terme per les oleosines. A partir de dilatacions de certes regions del RE llis es poden formar nous vacúols (Staehelin, 1997). Alguns d'aquests subdominis estan íntimament relacionats amb el complex de Golgi i corresponen a l'acumulació de proteïnes de secreció. Recentment, en cèl·lules BY-2 de tabac, s'han identificat proteïnes peroxisomals de membrana que en el seu trànsit cap a peroxisomes utilitzen compartiments derivats de subdominis del RE, anomenats pER (Lisenbee, 2003). En diferents espècies vegetals s'han descrit vesícules que acumulen proteïnes directament relacionades amb el RE que tenen una mida entre 0,1 i 10 µm (revisat a Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Hara-Nishimura et al., 2004). En endosperma de llavors de cereals s'han descrit els "cossos proteics" que acumulen proteïnes d'emmagatzematge (Okita and Rogers, 1996; Herman and Larkins, 1999). En llavors d'arròs transgènic poden acumular-se proteïnes artificials que duen senyal de retenció al RE en aquests cossos proteics (Torres et al., 2001). En llavors en maduració de carabassa s'han identificat les "vesícules

acumuladores de precursors" (vesícules PAC) que juguen un paper central en el trànsit de proteïnes d'emmagatzematge del RE cap als vacúols (Hara-Nishimura et al., 1999). Aquestes vesícules poden induir-se quan s'expressen de forma ectòpica proteïnes d'emmagatzematge en cèl·lules vegetatives (Hayashi et al., 1999). Per tant les vesícules poden formar-se en els diferents tipus cel·lulars si s'hi expressen els elements inductors. En llavors germinades de *Vigna mungo* o de *Ricinus communis* s'han observat "vesícules KDEL" i "ricinosomes" que acumulen les cisteïna-proteases (Schmid et al., 1998; Toyooka et al., 2000). En *A. thaliana* s'han realitzat diversos estudis amb quimeres de GFP amb senyal de retenció al RE, la qual dibuixa la xarxa reticular en les cèl·lules on s'expressa (Gunning, 1998; Ridge et al., 1999; Hawes et al., 2001; Hara-Nishimura et al., 2004). En cèl·lules epidèrmiques de cotilèdons i en cèl·lules d'arrel d'*A. thaliana* i altres brassicàcies que expressen aquestes quimeres es van descriure unes estructures fusiformes derivades del RE que tenen una mida de 10  $\mu\text{m}$  de longitud per 0,5  $\mu\text{m}$  d'ample i es van anomenar *RE bodies* (Matsushima et al., 2003b) Els *RE bodies* també van ser observats en cèl·lules de fulles epidèrmiques sotmeses a estrès procedents de plantes atacades per organismes patògens o tractades amb l'hormona metiljasmonat (Matsushima et al., 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). En aquestes estructures s'hi acumula la proteïna implicada en defensa la  $\beta$ -glucosidasa que duu una senyal de retenció al RE i d'altres proteïnes que s'expressen en condicions d'estrès (Matsushima et al., 2003a). Per tant aquestes estructures, descobertes recentment, són unes vesícules derivades del RE implicades en la resposta a estrès i a ferida en *A. thaliana*, i probablement en la resta de brassicàcies (revisat a Hara-Nishimura and Matsushima, 2003).



**Fig. 19.** El reticle endoplasmàtic de plantes es pot diferenciar en diferents subdominis, la formació dels quals depèn del tipus cel·lular i de l'espècie (Staehelein, 1997).



**objectius**

---





## OBJECTIUS

L'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) catalitza la primera etapa limitant en la síntesi d'isoprenoides citosòlics. Molts factors actuen regulant els nivells de l'HMGR a nivell transcripcional o posttranscripcional, tot i que això últim ha estat menys caracteritzat. S'ha demostrat que l'HMGR de plantes és un enzim de membrana i que el seu primer destí de localització subcel·lular és el reticle endoplasmàtic. Estructuralment està formada per un domini N-terminal que inclou una regió N-terminal citosòlica poc conservada i dues seqüències de transmembrana molt conservades en plantes i, el domini catalític citosòlic altament conservat en tota l'escala evolutiva. A totes les espècies de plantes estudiades fins al moment, hi ha diferents isoformes d'HMGR codificades per una família multigènica. Concretament a *Arabidopsis thaliana* el gen *hmg1* codifica per les isoformes HMGR1S i HMGR1L, i el gen *hmg2* codifica per la isoforma HMGR2. A nivell d'estructura primària, l'única diferència entre HMGR1L i HMGR1S és que la primera conté una regió extra de 50 residus a l'extrem N-terminal. La regió N-terminal citosòlica de cadascuna de les tres isoformes confereix diferents destinacions de localització subcel·lular a la proteïna.

La regió N-terminal de la isoforma HMGR1L es va utilitzar com a esquer en un crivellatge per doble híbrid d'una llibreria de cDNA d'*A. thaliana* on es van identificar tres proteïnes. Dues d'elles, AtB $\alpha$  i AtB $\beta$ , mostren alta homologia amb la subunitat reguladora de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) i la tercera, AtKLC1, mostra similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I. La presència de motius d'unió a calci en AtB $\alpha$  i AtB $\beta$  suggereix que el catió podria ser important per la funció d'aquestes proteïnes. Es va confirmar que tant AtB $\alpha$  i com AtB $\beta$  interaccionen amb la regió comú de l'HMGR1S i l'HMGR1L però no amb l'HMGR2 i que AtKLC-1 s'associa a l'HMGR1L per la regió extra que conté a l'extrem N-terminal.

Front aquests antecedents es proposa:

- 1.- La caracterització funcional dels gens *hmg1* i *hmg2* a partir de mutants insercionals i de la cerca de proteïnes que interaccionin amb productes d'aquests gens.
- 2.- La caracterització de les proteïnes que interaccionen amb l'HMGR1S i l'HMGR1L. En concret, s'analitzarà la família de proteïnes AtB $\alpha$  i AtKLC-1.
- 3.- L'estudi del control de l'activitat HMGR per calci i per la PP2A.
- 4.- L'estudi del paper de la PP2A en la localització subcel·lular de l'HMGR.



## materials i mètodes

---



Les tècniques d'anàlisi i de manipulació de DNA, RNA i proteïnes d'ús més comú emprades en aquest treball van ser realitzades segons els manuals de protocols Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1989) i Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 1989). La resta de metodologies utilitzades així com el material biològic estan descrits a continuació.

## 1- EL MATERIAL BIOLÒGIC

### 1.1.- *Escherichia coli*

- Soques utilitzades per amplificar el DNA plasmídic:

**DH5 $\alpha$** : *endA1 hsdR17(r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub><sup>+</sup>) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 supE44  $\Delta$ (lacIZYA-argFV169) deoR ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)*

**XL-1 blue**: *supE44 hsdR17(r<sup>m+</sup>) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac F'[proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

- Soques utilitzades per a l'expressió de proteïnes:

**BL21**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lon*

**BL21DE3 pLysS**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm  $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]*

- Soques utilitzades en l'amplificació de la genoteca de cDNA d'*Arabidopsis thaliana*

**LE392**: *hsdR514(r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 supF58 lacY galK2 galT22 metB1 trp55 mcrA*

**BNN132**: *endA1 gyr96 hsdR17 supE44 relA1  $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>  $\Delta$ (lacZ) M15]  $\lambda$ KC (kan-cre)*

### 1.2.- *Saccharomyces cerevisiae*

Les soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en els experiments de doble híbrid van ser obtingudes de la casa comercial Clontech Laboratories, Inc. Degut a les característiques dels promotors que dirigeixen l'expressió dels gens de selecció *HIS3* i *lacZ*, l'expressió és diferent en les dues soques. Així doncs, la soca Y190 presenta una expressió basal elevada del gen *HIS3* que genera soroll de fons, mentre que l'expressió basal d'aquest gen de selecció en la soca CG1945 és inferior. Pel que fa al gen marcador *lacZ*, la soca Y190 presenta uns bons nivells d'expressió, mentre que la soca CG1945 presenta nivells d'expressió baixos que poden generar falsos negatius. És per això que, en molts casos, per determinar el creixement en absència d'histidina, es va utilitzar la soca CG1945, i, per tal de determinar l'activació del gen de *lacZ*, es va fer servir la soca Y190. Per inhibir l'expressió basal de *HIS3* s'utilitzà el 3-aminotriazol a una concentració de 5 mM per a la soca CG1945 i de 25 mM per a la soca Y190. A continuació, es presenten les característiques de les soques de llevat Y190 i CG1945, extretes del manual tècnic K1604-1 de Clontech.

Soca	Genotip	Gens marcadors	Marcadors de transformació
CG1945	MATa, <i>ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh2</i> , LYS2::GAL1 <sup>UAS</sup> -GAL1 <sup>TATA</sup> - <i>HIS3</i> URA3::GAL4 <sup>17-mers(x3)</sup> -CyC1 <sup>TATA</sup> - <i>lacZ</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	<i>trp1, leu2, cyh2</i>
Y190	MATa, <i>ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh2</i> , LYS2::GAL1 <sup>UAS</sup> - <i>HIS3</i> <sup>TATA</sup> - <i>HIS3</i> URA3::GAL1 <sup>UAS</sup> -GAL1 <sup>TATA</sup> - <i>lacZ</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	<i>trp1, leu2, cyh2</i>

### 1.3.- *Arabidopsis thaliana*

Els experiments descrits en aquesta memòria es realitzaren amb l'espècie *Arabidopsis thaliana* amb les línies descrites a continuació:

Línia silvestre	Obtinguda de:
Columbia (Col.): 0, 3, 7	Lehle Seeds, EEUU
Wassilewskija-2 (WS-2)	Lehle Seeds, EEUU
C24	Lehle Seeds, EEUU

Línia transgènica	Descripció	Fons genètic	Obtinguda de:
H1S/3	La seqüència codificant per l'HMGR1S va ser clonada sota el promotor CaMV35S	C24	(González, 2002)
H1CD/2	La seqüència codificant pel domini catalític d'HMGR1 va ser clonada sota el promotor CaMV35S	C24	(González, 2002)

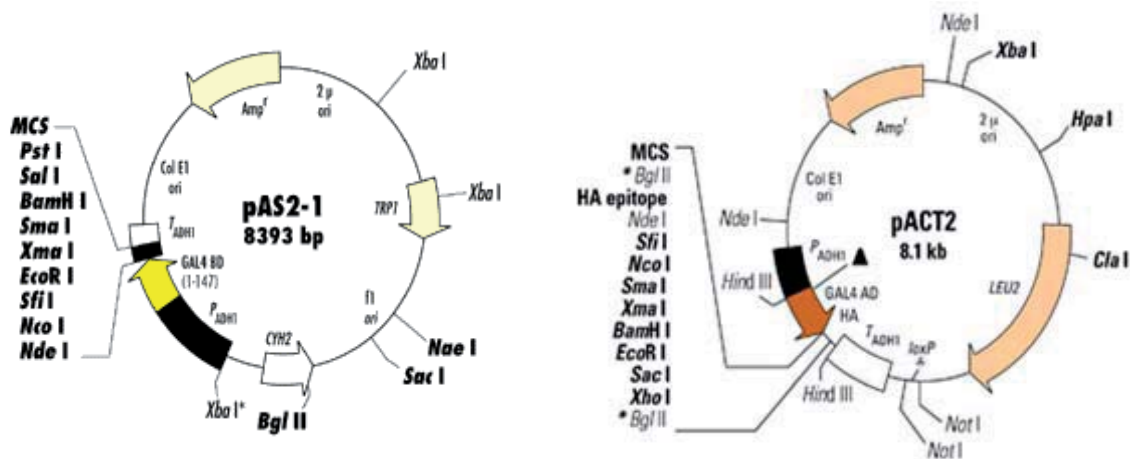
Línia mutant insercionals per T-DNA	Posició del T-DNA	Fons genètic	Nom original
<i>hmg1-1</i>	Exó I del gen <i>hmg1</i>	Col. 0	SALK_061790
<i>hmg2-1</i>	Zona 5' UTR del gen <i>hmg2</i>	Col. 7	GARLIC_1236
<i>hmg2-2</i>	Zona 5' UTR del gen <i>hmg2</i>	Col. 0	SALK_077006
<i>hmg2-3</i>	Exó III del gen <i>hmg2</i>	Col. 0	SALK_073557
<i>B''<math>\alpha</math>-1</i>	Intró XI del gen <i>AtB''<math>\alpha</math></i>	Col. 7	GARLIC139_A03
<i>B''<math>\alpha</math>-2</i>	Intró XI del gen <i>AtB''<math>\alpha</math></i>	Col. 7	GARLIC76_G08
<i>B''<math>\alpha</math>-3</i>	Exó X del gen <i>AtB''<math>\alpha</math></i>	Col. 0	SALK_081091



## 2.- ELS PLASMIDIS

### 2.1.- El sistema del doble híbrid

Els diferents subdominis de l'HMGR així com les construccions d'AtKLC-1 van ser subclonats en els plasmidis comercials pAS2-1 (Clontech), per a l'expressió en llevat de les proteïnes de fusió amb el domini d'unió al DNA del factor de transcripció GAL4 (BD).



- Construccions utilitzades:

CONSTRUCCIÓ	ESTRATÈGIA
BD:NT2 (residus 1-32 HMGR2)	(Leivar, 2003)
BD:CD1 (residus 166-592 HMGR1S)	(Leivar, 2003)
BD:(1-237)KLC-1 (residus 1-237 AtKLC-1)	Fragment que codifica per (1-237)KLC-1 digerit amb NcoI i BamHI obtingut de pACT2-KLC1(1-239) (Leivar, 2003) i lligat en pAS2-1 digerit amb NcoI i BamHI
BD:(1-200)KLC-1 (residus 1-200 AtKLC-1)	Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids T7 i 12-200R-BamHI sobre pSK-KLC1 (Leivar, 2003) digerit amb NcoI i BamHI i lligat en pAS2-1 digerit amb NcoI i BamHI
BD:(110-200)KLC-1 (residus 110-200 AtKLC-1)	Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids 12-110F-NcoI i 12-200R-BamHI sobre pSK-KLC1 (Leivar, 2003) digerit amb NcoI i BamHI i lligat en pAS2-1 digerit amb NcoI i BamHI

Com a plasmidis control del sistema de doble híbrid s'utilitzaren: pLAM5', pTD1.1 i pVA3.1 (Clontech).

## 2.2.- Expressió en *E. coli*

### • Fusions a GST:

CONSTRUCCIÓ	PLASMIDI	DIANES	OBTINGUT DE:
GST:AtB <sup>α</sup>	pGEX-5X-2	<i>Bam</i> HI	(Leivar, 2003)
GST:AtKLC1	pGEX-5X-2	<i>Bam</i> HI	(Leivar, 2003)
NT1L:GST	pGEX-4T-1	<i>Nco</i> I i <i>Sal</i> I	(Leivar, 2003)
GST:PDF2 (residus 19-588 de PDF2)	pGEX-4T-1	<i>Eco</i> RI i <i>Xho</i> I	Fragment de <i>pdf2</i> digerit amb <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I sobre pET28[ <i>pdf2</i> ]
GST:(H1-12)PDF2 (residus 19-435)	pGEX-4T-1	<i>Hind</i> III	Fragment de <i>pdf2</i> digerit amb <i>Hind</i> III sobre pGEX-4T-1[ <i>pdf2</i> ]
GST:(H14-15)PDF2 (residus 507-588)	pGEX-4T-3	<i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I	Fragment de <i>pdf2</i> digerit amb <i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I sobre pGEX-4T-1[ <i>pdf2</i> ]
GST:(H1-9)PDF2 (residus 19-332)	pGEX-4T-3	<i>Bam</i> HI	Fragment de <i>pdf2</i> digerit amb <i>Bam</i> HI i <i>Bgl</i> II sobre pET28-[ <i>pdf2</i> ]
GST:(H9-12)PDF2 (residus 332-435)	pET28-GST	<i>Bam</i> HI i <i>Hind</i> III	Fragment de <i>pdf2</i> digerit amb <i>Bgl</i> II i <i>Hind</i> III sobre pGEX-4T-1[ <i>pdf2</i> ]
GST:(H7-9)PDF2 (residus 233-348)	pGEX-4T-1	<i>Bam</i> HI i <i>Eco</i> RI	Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids <i>pdf2</i> H7 <i>Bam</i> HI i <i>pdf2</i> H9 <i>Eco</i> RI sobre pGEX-4T-1[ <i>pdf2</i> ] digerit amb <i>Bam</i> HI i <i>Eco</i> RI
(1-200)KLC1:GST (residus 1-200)	pET23d	<i>Nco</i> I i <i>Bam</i> HI	Fragment que codifica per a (1-200)KLC-1 digerit amb <i>Nco</i> I i <i>Sal</i> I de pAS2-1[(1-200)KLC-1] i fragment que codifica per a GST digerit amb <i>Sal</i> I i <i>Bam</i> HI de pET23d[NT2:GST]

### • Construccions pont:

CONSTRUCCIÓ	PLASMIDI	DIANES	OBTINGUT DE:
HisPDF2	pET-28a(+)	<i>Xho</i> I	Fragment de <i>pdf2</i> (clon 49) digerit amb <i>Xho</i> I de pACT[ <i>pdf2</i> ]
GST	pET-28a(+)	<i>Nco</i> I i <i>Nde</i> I	Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids GST-5 i GST-3 sobre pGEX-4T-1 digerit amb <i>Nde</i> I

### 2.3.- Síntesi *in vitro*

CONSTRUCCIÓ	PLASMIDI	DIANES	OBTINGUT DE:
HisAtKLC-1	pET-28a(+)	<i>NdeI</i> i <i>BamHI</i>	(Leivar, 2003)
HisAtB <sup>α</sup>	pET-28a(+)	<i>NheI</i> i <i>BamHI</i>	(Leivar, 2003)
HisAtB <sup>β</sup>	pET-28a(+)	<i>XhoI</i>	(Leivar, 2003)
(1-200)KLC-1	pET-23d	<i>NcoI</i> i <i>SaI</i>	Fragment de (1-200)KLC-1 digerit amb <i>NcoI</i> i <i>SaI</i> de pAS2-1[(1-200)KLC1]
AtKHC	pET-28a(+)	<i>NdeI</i> i <i>EcoRI</i>	Fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids K3 i K4 digerit amb <i>NdeI</i> i <i>EcoRI</i> del clon original RAFL21-44-L04 del Riken Institute (Tsukuba, Japó)
Luciferasa			Promega

### 2.4.- Expressió transitòria en fulles

Es van utilitzar les construccions clonades en el vector pGFPau (Leivar, 2003). Les construccions van ser clonades a 5' de la proteïna verda fluorescent (GFP), on es va substituir el domini catalític per GFP. Les quimeres utilitzades són:

**1S:GFP:** conté la seqüència aminoacídica 1-178 de l'HMGR1S.

**2:GFP:** conté la seqüència aminoacídica 1-153 de l'HMGR2.

**1S:GFP:** conté la seqüència aminoacídica 1-228 de l'HMGR1L.

**Rdel1S:GFP:** conté la seqüència aminoacídica 1-178 de l'HMGR1S on els residus d'arginina en posició 4, 5 i 6 han estat substituïts per alanines.

Com a proteïna marcador de reticle endoplasmàtic es va utilitzar la quimera **EGFPer** (Danon et al., 2004).

### 3.- ELS OLIGONUCLEÒTIDS

Els oligonucleòtids utilitzats han estat obtinguts de SIGMA-Genosys proveïts amb un grau de puresa de 0,025 µM i sense salts.

Nom	Seqüència 5'-3'	Longitud (nucleòtids)	Temperatura de fusió (°C)
<b>LBb1</b>	gcgtggaccgcttgctgcaact	22	72
<b>LB2</b>	tgccgatttcggaaccaccatc	22	73,7
<b>LB3</b>	ttcataaccaatctcgatacac	22	60,0
<b>H1.1F</b>	ccaacagacatgaggttcgtc	22	69,0
<b>H1.2F</b>	cagcctcgcacttccgatgac	21	71,4
<b>H1.3F</b>	gctagcaactaacagaggctgca	22	65,7
<b>H1.1R</b>	ccagcaatcccaacaggaatctg	23	70,5
<b>H1.2R</b>	gtcgctagcctcctttgcttc	22	69,9
<b>Hmg2NF</b>	cttcaactgatccatggttgac	21	62,0
<b>H2.3F</b>	ctataaacacttgctggtggtgc	22	61,0
<b>H2.4F</b>	ctgtatccgaggtttgctg	20	65,4
<b>H2.5F</b>	gtggtgaagactagcgttgagg	22	62,7
<b>Hmg2R</b>	aatcggaagaacctcagacaatc	24	60,0
<b>H2.3R</b>	gatcctttcacaccgagtag	20	58,7
<b>H2.4R</b>	catggtcatacagtgtgagctc	22	62,2
<b>α-AF</b>	ctcaatggtgcttgcgaggagtg	22	70,8
<b>2.2F</b>	ggaattcctgaggaatacacc	20	61,1
<b>PR2Aup</b>	ggataagtcactctgagcctagtc	22	59,8
<b>2genF2</b>	gctcatctatctcccatcgatg	22	66,0
<b>α-DR</b>	aggtgtattcctcaggaattcc	22	62,0
<b>PR2Adown</b>	cagatcctggagtgtgatgcag	22	67,1
<b>2.0R</b>	gagattcgagtgttcaccc	20	61,1
<b>2genR</b>	cactaggtggaaccgtggaatggactgg	28	88
<b>pACTF</b>	gatacccccaccaaacc	17	54
<b>GST-3</b>	atgcggcatatggagtcgaccgggaattcc	31	83
<b>GST-5</b>	acagtacatatgtcccctatactaggttattg	32	63,8
<b>GST-A</b>	cccaatgtgcctggatgcttc	22	74,4
<b>T7</b>	gtaatacgactcactataggg	21	60,0
<b>T7t</b>	gctagttattgctcagcg	18	56,2
<b>PDF2.1F</b>	cgcaagatgatcaagatcc	19	58,3
<b>PDF2.2F</b>	gatgagaagcttggtgc	17	56,6
<b>PDF2.2R</b>	gcaccaagcttctcacc	17	56,6
<b>PDF2H7BamHI</b>	cgcgatccgagcccaggactgtggttc	29	86,1
<b>PDF2H9EcoRI</b>	ccaaaattctcccattataactgatgccaatgca	34	78,6
<b>12F</b>	ggctcttgatttagcgttg	19	73,4
<b>12-110F</b>	ctgccatggagaagaaacctcttttogaatgg	31	92
<b>12-200R</b>	cgcgatcccacaaattcaaccgaatg	30	92
<b>K3</b>	gttccgataaggagagcatatg	31	71,7
<b>K4</b>	gtaaaacttaagaaatcctgcatttcttgctacg	34	71,9

## 4.- ELS ANTICOSSOS

Els anticossos primaris utilitzats han estat els següents:

-  $\alpha$ -CD1: anticossos policlonals obtinguts en conill i generats contra el domini catalític de l'HMGR1 (CD1) recombinant expressat a *E.coli* (Dale et al., 1995). Aquests anticossos van ser cedits per la Dra. Montse Arró i el Dr. Albert Ferrer (Dept. de Bioquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona). S'utilitza una dilució 1:5.000 per assaig per *western blot*.

- $\alpha$ -RCN: anticossos policlonals obtinguts en conill i generats contra la isoforma RCN1 de la subunitat A de la PP2A. Aquests anticossos van ser cedits per Alison DeLong (Brown University, Providence, EEUU). S'utilitza una dilució 1:5.000 per assaig per *western blot*.

L'anticòs secundari utilitzat ha estat el següent:

- $\alpha$ -rabbit peroxidase: anticossos antisèrum de conill units a la peroxidasa de rave (HRP) (Amersham Biosciences). S'utilitza una dilució 1:10.000 per assaig per *western blot*.

## 5.- MANTENIMENT I CULTIU DEL MATERIAL BIOLÒGIC

### 5.1.- Mètodes de treball en *Escherichia coli*

El manteniment i manipulació de les soques d'*Escherichia coli* es va fer segons els manuals de protocols Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1989) i Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 1989)

### 5.2.- Mètodes de treball en *Saccharomyces cerevisiae*

El manteniment i la manipulació de les soques de llevat es va fer seguint les instruccions proporcionades per Clontech, en el manual *Yeast Protocols Handbook* (PT3024-1).

### 5.3.- Mètodes de treball en *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* es van cultivar en medi MS (Murashige and Skoog, 1962) sòlid o en terra, en càmares de cultiu especials a una temperatura de 22-24°C i una intensitat de llum de 100  $\mu$ Einstein.

#### **Creixement en terra:**

Després de transferir plantes de medi MS a terra, es recobreixen amb Saran Wrap o similar per mantenir condicions d'humitat elevada durant tres o quatre dies. El substrat sòlid consta d'una mescla de perlita:vermiculita:turba a proporcions de 1:1:1 on s'hi afegeixen 2 g de  $K_2CO_3$ : $CaCO_3$ : $MgCO_3$  a

proporcions de (7:4:5:2) per esmortir l'acidesa de la terra. La solució nutritiva de rec consta de KNO<sub>3</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM pH 5,5, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2mM, EDTA fèrric 50 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 µM, 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, CoCl<sub>2</sub> 10 nM.

#### Creixement en condicions estèrils en medi sòlid:

Les llavors esterilitzades es sembren en medi MS en una cabina de flux laminar. La placa es segella amb un esparadrap transpirable (Leukopor). Les plaques es recobreixen amb paper d'alumini i es deixen dos dies a 4°C (estratificació) per tal de sincronitzar el moment de germinació de les llavors. Posteriorment, es duen a les condicions de creixement.

Medi MS sòlid: - Murashige & Skoog (MS)...4.41 g/l  
- Tampó MES.....0.5 g/l

S'ajusta a pH 5,7 amb KOH

S'afegeix agar (8 g/l) i s'esterilitza en autoclau 20 min a 121°C

Es reparteix en plaques de petri.

- Segons les condicions suplementat amb:

Cantaridina 10 µM

Mevalonat 1-2 mM

Mevinolina 2-5 µM

Fosmidomicina 20µM

Kanamicina 20µg/ml

BASTA 5 µg/ml

Preparació de les solucions mare per la suplementació en el medi MS:

- Cantaridina 100 mM. La quantitat requerida pesada es dissol en DMSO.
- Mevalonat 500 mM. Es prepara a partir de mevanolactona (Sigma) mitjançant un procés d'hidròlisi alcalina. S'incuba un volum de mevanolactona 1 M amb 1,05 volums de KOH 1 M a 37 °C durant 30 min. En resulta aproximadament un pH de 7,5.
- Mevinolina 6,5 mM. Es dissolen 25 mg en 0,760 ml d'etanol absolut escalfant fins a 50-55 °C. A continuació s'afegeixen 0,25 ml de NaOH 0,6 M i 7,6 ml de H<sub>2</sub>O desionitzada. S'incuba a temperatura ambient durant 30 min i s'ajusta el pH de la solució resultant a 7,8 amb HCl 2M. Finalment, es duu fins a 9,509 ml amb H<sub>2</sub>O desionitzada. Se'n fan alíquotes que es guarden a -20°C.
- Fosmidomicina (àcid 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)propilfosfònic, Molecular Probes, EEUU) 100 mM. Es dissol la quantitat requerida pesada en Tris-HCl 10 mM de pH 8,5. Posteriorment, s'esterilitza mitjançant filtres de 0,2 µM de diàmetre de porus.
- Kanamicina 100 mg/ml. Es dissol la quantitat requerida pesada en H<sub>2</sub>O desionitzada. Posteriorment, s'esterilitza mitjançant filtres de 0,2 µM de diàmetre de porus.
- BASTA 10 mg/ml. Es dissol la quantitat requerida pesada en H<sub>2</sub>O desionitzada. Posteriorment, s'esterilitza mitjançant filtres de 0,2 µM de diàmetre de porus.

Es segueixen, essencialment, tres programes de desenvolupament:

- Dia curt: fotoperíode de 8h de llum i 16 hores de foscor. La planta roman en fase vegetativa més temps i retarda la seva floració de manera que s'incrementa la biomassa vegetal corresponent a les fulles de la roseta basal.

- Dia llarg: fotoperíode de 16h de llum i 8 h de foscor. En aquestes condicions s'accelera l'entrada de la planta en la fase reproductiva.

- Foscor: creixement en absència de llum (foscor), on es fomenta el desenvolupament de plantes etiolades. En aquest cas, s'estimula l'entrada a germinació 1-2 h en llum i, posteriorment, es deixen en absoluta foscor.

### **5.3.1.- Esterilització de llavors d'*A. thaliana***

• Es submergeixen les llavors (50-100 mg en tubs de microcentrífuga) en solució d'esterilització durant 8 min en agitació orbital.

- Es renten durant 1-2 min amb etanol absolut; mantenint l'agitació orbital.
- Es repeteix aquest rentat.
- Es deixen eixugar de les restes d'etanol a la campana de flux laminar.
- Es guarden les llavors estèrils a 4°C.

Solució d'esterilització:

- Bayrol GmbH 1,5 g en 40 ml d'aigua desionitzada estèril
- Es dilueix al 10% en etanol absolut

## 6.- ANÀLISI MOLECULAR DE LES LÍNIES INSERCIONALS DE T-DNA

Tot i que l'homologia de seqüència pot ser útil per predir la funció dels gens, la genètica reversa és una estratègia per determinar-ne funcions particulars en el sistema d'anàlisi o bé per caracteritzar funcionalment gens sense homologia coneguda.

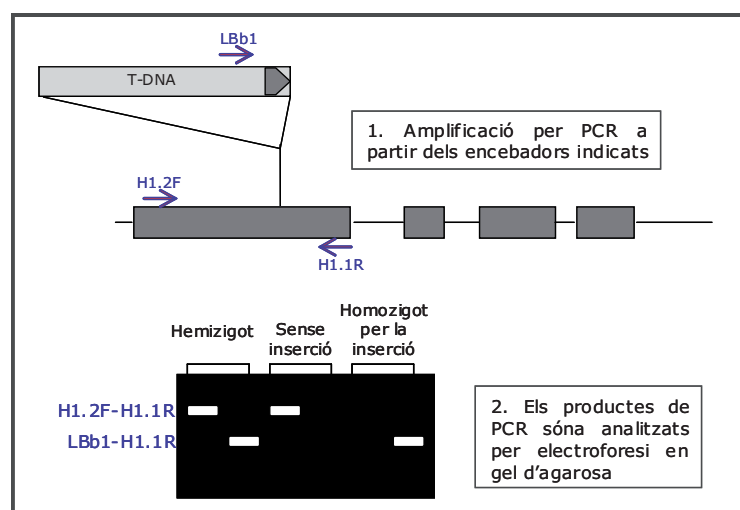
En *A. thaliana* existeixen diverses col·leccions de mutants per inserció de T-DNA on s'ha seqüenciat la regió flanquejant al T-DNA, les seqüències del lloc d'inserció s'han alineat amb el genoma d'*A. thaliana* per tal de conèixer-ne la posició. Les dades són accessibles des de bases de dades públiques (GeneBank) i des de la interfaz: The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>). Les llavors han estat propagades per l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) i distribuïdes per l'ABRC o bé pel Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC).

En el treball presentat s'han caracteritzat línies mutants per inserció del Salk Institute Genome Analysis Laboratory (SIGnAL) obtingudes a partir de la varietat Columbia 0 (<http://signal.salk.edu>) (línies Salk) i amb línies mutants per inserció del Torrey Mesa Research Institute de Syngenta (<http://tmri.org>) (línies GARLIC, actualment SAIL) obtingudes a partir de la varietat Columbia 7. Les llavors distribuïdes de les línies SALK corresponen a la F3 (tercera generació filial) segregants. Les distribuïdes de les GARLIC corresponen a la F2 segregants.

Es va fer una cerca des de la interfaz TAIR de mutants per inserció en els gens *hmg1*, *hmg2* i *AtB'' $\alpha$* . Es van demanar al centre NASC les línies per inserció al gen *hmg2* (SALK\_077006, SALK\_073557 i GARLIC\_1236), al gen *hmg1* (SALK\_061790) i al gen *AtB'' $\alpha$*  (GARLIC139\_A03, GARLIC76\_G08 i SALK\_081091).

Les llavors rebudes es van esterilitzar i es van sembrar en MS sòlid. Les plantes germinades es van passar a terra a les dues setmanes de creixement i es van genotipar a partir de DNA genòmic extret d'una mostra de fulles de cada individu. Es van realitzar dues anàlisis mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) de cada extracció (vegeu el disseny experimental a la figura 20). En la primera s'utilitzaven encebadors específics del gen que hibridaven a 5' i a 3' del lloc d'inserció de manera que només hi havia amplificació d'un producte si el T-DNA estava absent. En la segona s'utilitzava un encebador que hibridava a l'extrem esquerra (*left border*) del T-DNA i un encebador específic del gen, que amplificava un producte en cas que el gen contingués la inserció de T-DNA. A partir dels resultats era possible determinar si les plantes eren homozigotes per la inserció en el gen, hemizigotes o els mancava per complet la inserció.





**Fig. 20.** Anàlisi de la inserció de T-DNA per PCR. Tal com està esquematitzat, es realitzen dues anàlisis per PCR. Una d'elles amb encebadors específics del gen, i la segona amb un encebador del *left border* del T-DNA i amb un encebador específic del gen. Els productes de PCR es separen per electroforesi en gel d'agarosa.

En la taula següent es mostren els noms dels encebadors emprats en les dues amplificacions per PCR de les plantes de cada línia mutant, així com la mida del producte amplificat. En cada cas es seqüència el lloc de la inserció per comprovar la posició exacta del T-DNA.

Nom de la línia	Encebador específic del gen i encebador del <i>left border</i>	Fragment amplificat (pb)	Encebadors específics del gen	Fragment amplificat (pb)
<i>hmg1-1</i>	LB2/LBb1-H1.1R	540/593	H1.1F-H1.1R	869
<i>hmg2-2</i>	Hmg2NF-LB2/LBb1	565/618	Hmg2NF-Hmg2R	746
<i>hmg2-3</i>	H2.4F-LB2	720	H2.4F-H2.3R	740
			H2.5F-H2.3R	398
<i>hmg2-1</i>	LB3-HMG2R	540	Hmg2NF-Hmg2R	746
<i>B'α-3</i>	LB2-PR2A <sub>down</sub>	571	PR2A <sub>up</sub> -PR2A <sub>down</sub>	752
	LBb1-2genR	1229	2genF2-2genR	1097
<i>B'α-2</i>	LB3-2genR	516	2genF2-2genR	1097
<i>B'α-1</i>	LB3-2genR	685	2genF2-2genR	1097

El T-DNA de les línies SALK duu el gen de selecció *nptII* que confereix resistència a kanamicina. Per comprovar el nombre de T-DNA segregants de les línies mutants, es va créixer la subsegüent generació de plantes genotipades en un medi de selecció amb kanamicina. La generació d'un individu hemizigot mostraria un 75% de resistència a l'antibiòtic en cas de contenir només un T-DNA segregant (inserir en aquest cas al gen d'interès). En canvi, la generació d'un individu que li manca la inserció de T-DNA al gen d'interès hauria de mostrar sensibilitat total a l'antibiòtic.

Es va fer aquest estudi en plantes genotipades de les diferents línies. La generació d'individus homozigots per la inserció en el gen i hemizigots de les línies SALK\_073557 (mutant *hmg2-3*) i de la línia SALK\_081091 (mutant  $B''\alpha-3$ ) eren 100 % sensibles a kanamicina. Aquest comportament es pot explicar perquè hi ha hagut silenciament del gen *nptII* al llarg de diferents generacions. Aquest fenomen està descrit pel propi SIGnAL com quelcom força habitual (<http://signal.salk.edu/>).

En el cas de la línia SALK\_061790 (mutant *hmg1-1*), la generació de plantes que no contenen la inserció en el gen d'interès (en aquest cas en *hmg1*) eren 100% sensibles a kanamicina. En canvi, la generació d'individus hemizigots mostrava un 75% de resistència a kanamicina. Aquest comportament era indicatiu que la línia mutant contenia només un T-DNA. A més, la generació filial resultant del creuament d'una planta homozigota per a la inserció amb una planta de la línia silvestre mostrà un 75% de resistència a kanamicina, que confirmava aquesta hipòtesi.

El gen de selecció contingut al T-DNA de les línies GARLIC confereix resistència a l'herbicida BASTA. La generació filial d'individus hemizigots de les línies GARLIC76\_G08 (mutant  $B''\alpha-2$ ) i GARLIC\_1236 (mutant *hmg2-1*) mostraren un 75% de resistència a aquest herbicida.

En canvi les generacions d'individus hemizigots de la línia GARLIC139\_A03 presentaven percentatges variables de resistència a BASTA que anaven d'un 50% a un 97%. Els resultats semblaven indicar que en els individus de la línia mutant hi havia més d'un T-DNA segregant.

## 6.1.- Extracció de DNA genòmic

Es pren la massa d'una mostra de la planta a analitzar (2-50 mg) en un tub d'1,5 ml prèviament tarat i es congela en N<sub>2</sub> (l). En presència de N<sub>2</sub> (l) s'homogeneïtza la mostra fins obtenir una fina pols i s'afegeix NaOH 0,5 M a una proporció de 10 µl/mg teixit. Es neutralitza la solució afegint 490 µl de tampó d'elució (TE) per cada 10 µl de l'homogenat. Es guarda a -20 °C o es procedeix a l'anàlisi per la PCR en què s'utilitzen habitualment 2 µl de DNA motlle. El producte de PCR (15 µl) s'analitza per electroforesis en gel d'agarosa a l'1,5%.

<p><b>•Reacció de PCR</b></p> <p>DNA motlle.....2 µl  Tampó de PCR 10X.....2 µl  MgCl<sub>2</sub> 50 mM.....0,8 µl  Mescla de dNTPs (10 mM cadascun).....0,8 µl  Encebador antisentit 10 µM.....0,8 µl  Encebador sentit 10 µM .....0,8 µl  DNA polimerasa termostable.....0,4 µl  H<sub>2</sub>O lliure de nucleases .....fins a 20 µl</p>	<p><b>•Cicles de PCR</b></p> <p>Desnaturalització: 5 min, 95°C  5 min, 72°C  30 cicles: 1 min, 95°C  1 min, temperatura d'hibridació  2 min/kb * kb fragment, 72°C  Extensió final: 6 min, 72°C</p>
---	---

La temperatura d'hibridació que s'aplica és la temperatura de fusió de l'encebador que la té inferior menys 5 °C

Tampó TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM

## 7.- RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

La retrotranscripció (RT) acoblada a la PCR ha revolucionat l'estudi d'expressió gènica. En la reacció de RT-PCR, el motlle de RNA és copiat en el transcrit complementari de DNA utilitzant una transcriptasa reversa retroviral. A continuació el DNA còpia (cDNA) és amplificat exponencialment mitjançant PCR. El procediment seguit ha estat el següent:

### 7.1.- Extracció de RNA

S'homogeneïtza en presència de N<sub>2</sub> (l) mostres de plantes d'*A. thaliana* de fins a 15 dies per a obtenir una pols fina. A partir d'aquí es procedeix a l'extracció del RNA de la mostra utilitzant el *kit* comercial *Rneasy Plant Mini Kit* de la casa comercial Qiagen seguint les instruccions descrites pel fabricant. Es quantifica i s'analitza la integritat del RNA obtingut mitjançant la visualització del producte separat per electroforesi en gel d'agarosa en presència de bromur d'etidi.

### 7.2.- Eliminació de les restes de DNA genòmic

Previ a la retro-transcripció del RNA, es procedeix a un tractament amb DNAsa I (*RNasa free*) de la casa comercial Roche per tal d'eliminar restes de DNA genòmic contaminant que podrien interferir en l'amplificació posterior del cDNA per PCR.

Procediment:            RNA (5 µg aproximadament).....9 µl  
                              DNAsa I (*RNasa free*).....1 µl  
                              - S'incuba 20 min a 37 °C  
                              - S'inactiva l'enzim 15 min a 65 °C  
                              - Es deixa la reacció en gel o es guarda a -20 °C

### 7.3.- Retrotranscripció de la població de RNA

Per a l'obtenció dels cDNA de la mostra de RNA es va fer servir el *kit* d'Ambion i tot seguint les instruccions del fabricant.

Breument es precisa el procediment a seguir:

- Es mescla:

1,5 µg RNA

2 µl *random decamers*. Aquests oligonucleòtids permeten obtenir una representació en cDNA de tots els RNA de la mostra.

Es duu a un volum de 12 µl amb H<sub>2</sub>O desionitzada lliure de nucleases.

- S'escalfa 3 min a 80 °C per tal de desnaturalitzar les estructures secundàries que s'hagin pogut donar, i es deixa en gel.

• S'afegeix la resta de components de retrotranscripció del *kit*: tampó de reacció, mescla de dNTPs, inhibidor de RNAses, i la retrotranscriptasa (MMLV-RT), excepte en un dels tubs on no s'afegeix aquest enzim i que actuarà com a control negatiu de la RT-PCR. En cas d'haver producte d'amplificació en el control negatiu significaria que procedeix de restes de DNA genòmic. El volum final és de 20 µl.

- S'incuba 1h a 43°C.
- S'inactiva l'enzim 10 min a 92°C.
- Es deixa la reacció en gel per la seva anàlisi immediata o es guarda a -20°C.

#### 7.4.- Amplificació per PCR sobre la població de cDNA

- Reacció de PCR:

Estàndard	Semiquantitatiu
DNA motlle.....1-5 µl	DNA motlle.....1-5 µl
Tampó de PCR 10X .....5 µl	Tampó de PCR 10X .....5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM.....2 µl	MgCl <sub>2</sub> 50 mM.....2 µl
Mescla de dNTPs (10 mM cadascun).....2 µl	Mescla de dNTPs (10 mM cadascun).....2 µl
Encebador antisentit 10 µM.....1 µl	Encebador antisentit 10 µM.....1 µl
Encebador sentit 10 µM.....1 µl	Encebador sentit 10 µM.....1 µl
DNA polimerasa termostable.....1 µl	Encebadors 18SrRNA:competimers.....4 µl
H <sub>2</sub> O lliure de nucleases.....fins a 50 µl	DNA polimerasa termostable.....1 µl
	H <sub>2</sub> O lliure de nucleases.....fins a 50 µl

- Cicles de PCR:

Desnaturalització:	2-4 min, 94-95 °C
30 cicles:	30 s, 94 °C
	30 s, temperatura d'hibridació
	1 min/kb * kb del fragment, 72 °C
Extensió final:	5 min, 72 °C

#### 7.5.- Fonaments de la quantificació relativa mitjançant RT-PCR

El sistema de quantificació relativa per RT-PCR emprada està basada en el manual d'instruccions de *QuantumRNA™ 18S Internal Standards* de la casa comercial Ambion.

Per compensar variacions en la qualitat de RNA, errors de quantificació, variacions a l'atzar per manipulació en la preparació de les reaccions, es realitza una RT-PCR *multiplex*, que significa l'ús de dues parelles d'encebadors. Una d'elles amplifica el cDNA d'interès, i la segona amplifica un cDNA control on els nivells del producte del gen d'interès pot normalitzar-se en funció dels nivells del control. L'estàndard endogen s'hauria de triar de tal manera que la seva expressió no variés entre els diferents tipus cel·lulars, ni com a resposta a diferents tractaments experimentals ni durant el cicle

cel·lular. Els nivells de RNA ribosomal (rRNA) romanen constants entre totes les mostres. Per això, en principi, aquest seria l'estàndard ideal. No obstant, l'rRNA és molt abundant, i un control intern, hauria d'estar en el mateix rang lineal d'amplificació que l'RNA d'estudi, ja que durant la reacció de PCR s'estableix una competència pels mateixos recursos. Per això s'utilitza la tecnologia dels competimers per modular l'amplificació dels rRNA. Els competimers tenen la mateixa composició de bases que els encebadors del 18SrRNA, amb la diferència que tenen l'extrem 3' modificat i no pot ser utilitzat com a substrat de la DNA polimerasa. En mesclar quantitats creixents d'encebadors de 18S rRNA amb competimers es minimitza la seva amplificació fins a uns nivells similars a l'amplificació del cDNA d'interès. S'ha de determinar experimentalment la proporció d'encebadors del 18S rRNA:competimers òptims per a l'amplificació del cDNA d'interès que variarà en funció de l'abundància relativa del mRNA en la mostra inicial.

Ja que s'utilitza aquest mètode de quantificació relativa, es van fer servir els *random decamers* per obtenir una població de cDNA representativa de tots els RNA presents en la mostra, inclosos els 18SrRNA. Els encebadors específics que s'utilitzen han d'amplificar una fragment de cDNA d'una mida que es pugui diferenciar de l'amplificació del control intern (488 pb).

## 8.- CRIVELLATGE D'UNA GENOTECA DE cDNA D'ARABIDOPSIS THALIANA PER LA TÈCNICA DE DOBLE HÍBRID EN LLEVAT

La tècnica del doble híbrid permet detectar la interacció entre dues proteïnes conegudes i per extensió, també es pot utilitzar per crivar una llibreria de cDNA per tal de cercar proteïnes que interaccionin amb la d'interès o proteïna esger (vegeu fonaments a l'apartat 1.2.1 de Resultats).

Amb l'objectiu de cercar proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal de la isoforma HMGR2 (NT2), amb el domini catalític de l'HMGR1 (CD1) i amb la regió que inclou els motius *heptad* (HR) de l'AtKLC-1 es va procedir al crivellatge d'una llibreria de cDNA obtinguda a partir de plàntules etiolades d'*A. thaliana* de 3 dies utilitzant la tècnica de doble híbrid en llevat. A partir de la llibreria fagèmica  $\lambda$ ACT subministrada (Kim et al., 1997) es va obtenir la corresponent llibreria plasmídica pACT (apartat 8.1 de Materials i Mètodes). El crivellatge de la llibreria pACT es va realitzar per transformació seqüencial de la soca de llevat CG1945 amb el protocol a gran escala, especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual* (PT3061-1). Primerament, es van transformar els llevats amb els plasmidis derivats del pAS2-1 que codifiquen per les proteïnes de fusió amb el domini BD: BD:NT2, BD:CD1, BD:(110-200)KLC1 i, a continuació, aquests llevats pre-transformats es van transformar amb la llibreria de cDNA. En el cas de BD:CD1 l'eficiència de la transformació era molt baixa. Empíricament es va comprovar que per millorar l'eficiència era necessari treballar amb una proporció superior de cèl·lules competents/ $\mu$ g DNA de la llibreria pACT. Això implicava partir d'un major nombre de cèl·lules. No obstant, l'eficiència es veia perjudicada en augmentar l'escalat en els cultius. Per tant, es va procedir a realitzar sis crivellatges simultanis, cadascun dels quals partia d'un volum menor de cultiu. S'utilitzà una proporció de 1,5 ml cèl·lules competents/50  $\mu$ g DNA (l'habitual és 1,5 ml cèl·lules competents/100  $\mu$ g DNA). A més, es va augmentar l'agitació en el creixement dels cultius (superior a 240 rpm, quan normalment es treballa entre 210 i 230 rpm) i es va introduir un pas final de recuperació de les cèl·lules. En aquest pas es va resuspendre el sediment de cèl·lules transformades en 3 ml *YPD plus liquid medium* (Clontech). Les cèl·lules es van incubar en agitació (200 rpm), 2-3 hores a 30°C. Posteriorment es van centrifugar a 3000 xg, 5 min, a temperatura ambient, es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb 3 ml de tampó TE (de composició especificada a l'apartat 6.1). En el crivellatge amb la quimera BD:(110-200)KLC-1 també s'introduí el pas de recuperació, encara que es va reduir el temps d'incubació a 1 hora.

Es va calcular l'eficiència de la transformació, per comprovar si s'havien crivat un milió de clons independents de la llibreria de cDNA. Es van seleccionar els llevats que creixien en el medi de selecció sense histidina i se'n van fer diverses reestries seqüencials per tal de confirmar-ne el fenotip. Sobre aquestes estries es realitzà l'assaig  $\beta$ -galactosidasa (amb X-Gal com a substrat) en placa per verificar si aquestes soques també eren lacZ<sup>+</sup> (especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual* PT3061-1). A continuació, es van recuperar els plasmidis pACT[cDNA] de cadascun dels clons positius (seguint el protocol de *plasmid rescue* especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual* PT3061-1), i es van transformar en *E.coli* DH5 $\alpha$  per electroporació. Es van aïllar i es van analitzar per

digestió amb enzims de restricció i per seqüenciació. Per tal de confirmar els positius i rebutjar els possibles falsos positius, es va co-transformar la soca Y190 amb cadascun dels plasmidis aïllats juntament amb el plasmidis que codifiquen per les proteïnes esquer emprades en el crivellatge (confirmació de la interacció) i amb altres plasmidis de control negatiu (pAS2-1 i pLam5'-3). En aquesta soca es va analitzar l'activació dels gens de selecció *HIS3* (creixement en medi sense histidina) i *LacZ* (colònies blaves en l'assaig enzimàtic  $\beta$ -galactosidasa).

## 8.1.- Preparació de la llibreria DE $\lambda$ -ACT d'*Arabidopsis thaliana*

La llibreria d'expressió de  $\lambda$ -ACT[cDNA] d'*A. thaliana* per doble híbrid en llevat subministrada conté un nombre de recombinants independents de 36 milions (Kim et al., 1997). La llibreria de fags va ser amplificada en la soca d'*E. coli* LE392. Després de l'amplificació de la llibreria de cDNA original, el títol obtingut va ser de  $2 \cdot 10^{10}$  pfu/ml (unitats formadores de calves/ml).

### 8.1.2.- Titulació de la llibreria

La maltosa indueix l'expressió del receptor de maltosa de la soca d'*E. coli* LE392, a través del qual infecta el fag  $\lambda$ . La interacció entre el fag i el receptor requereix  $Mg^{2+}$ .

Procediment:

- S'inoculen 20 ml de LB-maltosa amb la soca LE392 i es deixa en agitació (200 rpm), 13 h i a 37 °C. (En aquest pas no convé deixar l'inòcul durant més hores per evitar acumulació de cèl·lules mortes que segrestarien fags que per tant no podrien entrar en el cicle lític de manera que el títol seria menor).

- Es centrifuga el cultiu a 560 xg, 10 min, a 4 °C.

- Infecció: es barregen 100  $\mu$ l de cèl·lules amb 100  $\mu$ l de cadascuna de les dilucions de fags. S'incuba 30 min a 37 °C.

- S'afegeixen als 200  $\mu$ l, 3,5 ml d'agar tou fos i atemperat a 50°C, es mescla, s'aboca a una placa de LB agar i es deixa reposar.

- S'incuba durant 8h a 37 °C.

- Es procedeix al comptatge de pfu.

- Dilucions del fag

Originalment es disposa de  $2 \cdot 10^{10}$  pfu/ml.

Per a la infecció s'utilitzen les dilucions  $2 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^4$ ,  $2 \cdot 10^3$ ,  $2 \cdot 10^2$ ,  $2 \cdot 10$ , 2

Material emprat:

- Soca LE392 d'*E. coli*

- 20 ml LB (estèril) - maltosa 0,2% (en flascó tipus erlenmeyer de 250 ml)

- Maltosa 20% esterilitzada mitjançant filtres de 0,2  $\mu$ m de diàmetre de porus

- Plaques LB-agar

- Agar tou: LB, agarosa 0,7%,  $MgSO_4$  10 mM



- Solució per dilucions del fag  $\lambda$ : Tris-HCl 10 mM pH 7,5 que conté  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

### 8.1.3.- Conversió de la llibreria $\lambda$ -ACT a pACT

Per a realitzar la conversió es va utilitzar la soca d'*E. coli* BNN132.

Procediment:

- S'inoculen 5 ml de LB que conté  $\text{MgCl}_2$  10 mM kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  amb la soca d'*E. coli* BNN132 i es deixa en agitació (200 rpm), durant la nit a 37°C.

- S'inoculen 2 tubs de 4 ml de LB que conté  $\text{MgCl}_2$  10 mM i kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  amb 7  $\mu\text{l}$  del cultiu crescut durant la nit.

- Es deixa créixer durant 3 hores fins a una  $A_{600}=0,4$  ( $4 \cdot 10^8$  cèl·lules/ml).

- S'afegeixen els fags: 40  $\mu\text{l}$  ( $8 \cdot 10^8$  fags).

- Infecció: s'incuba 30 min a 30 °C en un bany.

- S'afegeixen 4 ml de medi LB estèril i s'incuba en agitació suau (150 rpm), 1 h a 30°C.

- Es centrifuga a 1.600 xg, 10 min, 4 °C. S'eliminen 4 ml del sobrenedant i es sembra la resta en 12 plaques LB-glucosa-ampicil·lina de 140 mm de diàmetre. S'incuben les plaques durant la nit, a 37 °C fins a obtenir un creixement en gespa.

Paral·lelament es sembren dilucions del cultiu en plaques LB-glucosa-ampicil·lina per al càlcul de l'eficiència de conversió. En aquest cas fou de  $1,2 \cdot 10^8$  unitats formadores de colònies/ ml (ufc/ml) quan es necessita un mínim de  $1 \cdot 10^8$  ufc/ml

- S'afegeixen 10ml de LB que conté ampicil·lina 50  $\mu\text{g/ml}$  a cadascuna de les 12 plaques.

- Es deixa 15 min per que s'estovi la gespa de creixement confluent.

- Es recuperen els bacteris.

- S'inoculen 3L de LB que conté ampicil·lina 50  $\mu\text{g/ml}$  amb els 120 ml de LB-BNN132 pACT[cDNA].

- Es deixa créixer durant la nit en agitació (200 rpm) a 37 °C fins a saturació (unes 12h).

- Es procedeix a la purificació de DNA plasmídic mitjançant el kit de MegaPrep de Qiagen.

- S'obtenen entre 1,5-2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Material emprat:

- Soca BNN132 d'*E. coli*

- Tub 5ml amb LB  $\text{MgCl}_2$  10 mM kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$ .

- 2 tubs 50ml amb 4ml de LB  $\text{MgCl}_2$  10 mM kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$

- Flascó tipus erlenmeyer de 250 ml de capacitat amb 150 ml de LB ampicil·lina 50  $\mu\text{g/ml}$

Plaques de LB amb agar 1,5%, glucosa 0,2%, ampicil·lina 50  $\mu\text{g/ml}$

12 plaques de petri de 140 mm diàmetre (per la recuperació de la llibreria)

7 plaques de petri de 80 mm de diàmetre per realitzar el càlcul d'eficiència de la conversió

## 8.2.- Preparació de DNA de cadena senzilla d'alt pes molecular

Per a una bona eficiència en la transformació de llevat per acetat de liti és crític el fet d'obtenir una bona preparació de DNA de cadena senzilla i d'alt pes molecular. En aquest cas s'utilitza DNA d'esperma de salmó. L'objectiu és obtenir una preparació de DNA de cadena senzilla de 2 kb-15 kb (mida mitjana de 7 kb).

Procediment:

- Es dissol el DNA d'esperma de salmó en tampó TE a una concentració de 10 mg/ml. Es deixa durant la nit a 4°C.
- Es sonica a una I=2,5 fins que la solució deixi de ser viscosa (10 seg, 6-7 vegades)
- Extracció:
  - Extracció amb fenol: es mescla en una relació 1:1 el DNA (aq) amb el solvent orgànic. S'agita en vòrtex durant 10 s i es centrifuga a 14000 rpm en una microcentrífuga, 5 min, a temperatura ambient.
  - Extracció amb fenol-cloroform
  - Extracció amb cloroform
- Precipitació amb etanol:
  - S'afegeix 1/10 volums d'acetat de sodi 3 M de pH 5,2 i 2,5 volums etanol 100% fred
  - Es deixa 5 min a temperatura ambient i es centrifuga a 14000 rpm, 5 min, a temperatura ambient.
  - Es renta el sediments amb 1 ml d'etanol al 70% a temperatura ambient
  - S'eixuga el sediments a 37 °C
- Es ressuspèn el sediments en tampó TE a una concentració de 10 mg/ml. Es deixa durant la nit a 4°C.
- Es bull durant 2-3 min i es deixa en gel.
- S'aliquota i es guarda a -20°C
- En ser utilitzat cal bullir durant 20 min i deixar en gel.

Material emprat:

- DNA d'esperma de salmó (Sigma)
- TE, pH 8 (vegeu composició a l'apartat 6.1)
- Acetat de sodi 3M
- Fenol tamponat
- Cloroform
- Fenol-cloroform (1:1). Mescla de volums iguals de fenol tamponat i cloroform.
- Etanol 100% (fred) i etanol al 70%

## 9.- ASSAIG D'ACTIVITAT HMGR

L'assaig per la determinació de l'activitat HMGR està basat en el mètode descrit per Bach (1986). S'utilitza HMG-Co-A<sup>14</sup>C com a substrat i es quantifica <sup>14</sup>C-mevalonolactona formada. L'HMGR és una proteïna integral de membrana i susceptible a ser degradada per cisteïna-proteases, per això per la determinació *in vitro* de la seva activitat és necessari l'ús de detergents zwitterònics i d'inhibidors de cisteïna-proteases com l'E-64 i DTT per mantenir grups tiol lliures (Bach et al., 1986).

### 9.1.- Obtenció de la mostra

- Es parteix d'entre 0,2-1 g de teixit fresc que s'homogeneïtza en presència de N<sub>2</sub> (l) en morter o en l'aparell *Tissue Lyser* (Qiagen) fins a obtenir pols, a què s'hi afegeix també d'homogeneïtzació (1 ml/g de teixit fresc). La mostra de teixit es centrifuga a 200 g, 10 min a 4 °C i es recupera el sobrenedant. Aquesta operació es repeteix per tal d'obtenir un sobrenedant més net i lliure de les restes cel·lulars del sediment de 200 xg.

- Tampó d'homogeneïtzació:

- Hepes KOH 40 mM de pH 7,5

- KCl 50 mM

- CaCl<sub>2</sub> 5 mM o bé EGTA 5 mM

- Triton X-100 0,2% (v/v)

- Sacarosa 100 mM

- DTT 10 mM

- PMSF 100 µg/ml ( a partir de PMSF 20 mg/ml dissolt en isopropanol)

- Aprotinina 15 µg/ml (a partir d'aprotinina 3 mg/ml dissolta en H<sub>2</sub>O desionitzada)

- E-64 10 µg/ml (a partir d'E-64 3 mg/ml dissolt en H<sub>2</sub>O desionitzada)

- Pepstatina 1,5 µg/ml (a partir de pepstatina 3 mg/ml dissolta en metanol).

Els inhibidors aprotinina, E-64 i pepstatina van ser proveïts de la casa comercial Sigma.

### 9.2.- Assaig d'activitat

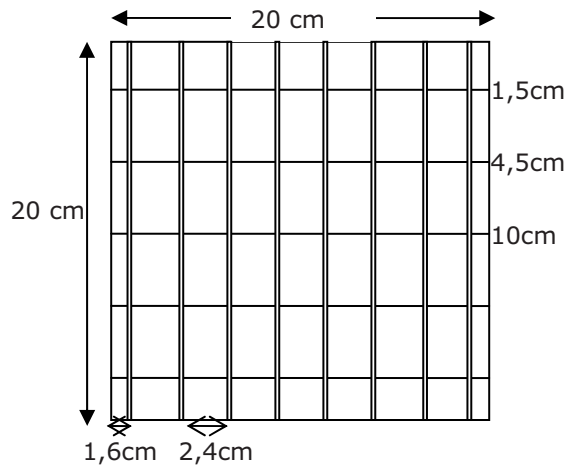
Per tal de determinar l'activitat HMGR es prepara la quantitat de la mescla de reacció necessària segons el nombre de mostres (tenint en compte que se'n mesura l'activitat HMGR per duplicat) més quatre (dos controls negatius que contenen també d'homogeneïtzació més dos per pal·liar possibles errors de pipeteig).

- En un bany a 37 °C s'afegeixen 33,5 µl de mescla de reacció sobre 26,5 µl de mostra. L'operació es realitza a intervals de 20 s sobre cadascuna de les mostres.

- S'incuba 2h, a 37 °C.

- S'atura la mescla afegint 10 µl de HCl 25% (a intervals de 20 s i seguint el mateix ordre que en iniciar la reacció).

- S'incuba la reacció 10 min a 50 °C per tal de lactonitzar el mevalonat format:  
 $\text{HMG-CoA} \longrightarrow \text{Mevalonat (hidrofílic)} \longrightarrow \text{Mevanolactona (hidrofòbic)}$
- Es refreda la mostra: 3-4 min a -20 °C.
- Es centrifuga 2 min 10.000 rpm a temperatura ambient en una microcentrífuga.
- S'apliquen 35 µl del sobrenedant en una placa de silicagel (figura 21), que posteriorment s'eixuga amb secador.



**Fig. 21.** Preparació de la placa TLC 20X20cm.

Es divideix i retalla la placa en 2 parts de 10X20 cm. Es dibuixa en llapis la línia d'aplicació (a 1,5cm de la base) i la part que es retallarà (a 4,5 cm del front). Amb una punta de pipeta es marquen els carrils (a 1,6 cm dels extrems i de 2,4 cm cadascun).

- Es desenvolupa la cromatografia en una cambra que conté 100 ml acetona-benzè com a eluent (1:1). Transcorreguts 20 min, quan l'eluent ja ha recorregut els 20 cm de la placa, es treu i es deixa evaporar.
- Es retallen els darrers 4,5 cm de la placa que s'introdueixen en un vial de centelleig. S'afegeixen 12 ml de líquid de centelleig CytoScint (que admet restes aquoses), es deixen els vials en foscor durant 24 h i es procedeix al comptatge en un comptador β.

#### Càlcul de l'activitat enzimàtica HMGR:

$$\text{Activitat específica 1 (AE 1)} \text{ (pmols HMG-CoA/min.ml)} = \text{cpm} \cdot \frac{1}{\text{eficiència de comptatge (dpm/cpm)}} \cdot \frac{1}{\text{Eficiència d'arrossegament (0,77)}} \cdot \frac{\text{quantitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (pmol)}}{\text{activitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (dpm)}} \cdot \frac{\text{quantitat total HMG-CoA (pmol)}}{\text{quantitat } [^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA (pmol)}} \cdot \frac{1}{\text{temps de reacció (min)}} \cdot \frac{\text{volum total assaig (}\mu\text{l)}}{\text{volum aplicat a TLC (}\mu\text{l)}} \cdot \frac{1}{\text{volum mostra assajada (}\mu\text{l)}} \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{Activitat específica 2 (AE 2)} \text{ (pmols HMG-CoA/min.mg)} = \frac{\text{AE 1 (pmols HMG-CoA/min.ml)}}{\text{concentració proteica (mg/ml)}}$$

## Material emprat:

- Tampó de fosfat potàssic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mM, pH 4,5
- Citrat de sodi 5 mM, pH 7,4
- Tris-HCl 0,658 M, pH 7,2
- EDTA 0,5 M
- HMG-CoA 4 mM: es dissolen 4 mg de DL-3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (Sigma) en 1096 µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM de pH 4,5. Es guarda a -80 °C. A partir d'aquesta, es prepara HMG-CoA 0,8 mM amb KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>O desionitzada.
- [<sup>14</sup>C]HMG-CoA: es proveït per Amersham Biosciences (3-hidroxi-3-metil[3-<sup>14</sup>C]glutaril coenzim A) en acetat de sodi 0,01 N, pH 5,7 a una concentració de 20 µCi/ml i 57 mCi/mmol.
- DTT 170 mM
- Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa de llevat (Roche) 1 U/µl: es dissolen 2500 U de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa en 2,5 ml de citrat de sodi 5 mM, pH 7,4. A partir d'aquesta, es preparen les alíquotes de treball a 0,25 U/µl (en citrat de sodi o H<sub>2</sub>O desionitzada).
- Tampó regeneració NADPH (10 ml):
  - Tris-HCl 0,658 M pH 7,2 .....7,6 ml
  - EDTA 0,5 M.....2,4 ml
  - Glucosa-6-fosfat (Roche).....0,365 g
  - NADP<sup>+</sup> (Roche) .....0,047 g
  - Seroalbúmina bovina (BSA).....12 mg
- Mescla de reacció (per cada tub):
  - Tampó de regeneració del NADPH.....25 µl
  - DTT 170 mM.....1,5 µl
  - HMG-CoA 0,8 mM.....2,5 µl
  - Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.....2 µl
  - [<sup>14</sup>C]HMG-CoA .....2,5 µl
- HCl 25% (v/v)
- Plaques Silicagel TLC (Merck)
- Líquid de centelleig (admet residus aquosos) (ICN CytoScint)
- Vials de centelleig de 20 ml

## Variants en l'assaig :

- Mesura amb EGTA :
  - Tampó de regeneració del NADPH (sense EDTA).....19µl
  - EGTA 0,5 M.....6µl
  - DTT 170 mM.....1,5µl
  - HMG-CoA 0,8 mM.....2,5µl
  - Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.....2µl
  - [<sup>14</sup>C]HMG-CoA .....2,5µl

- Mesura amb  $\text{Ca}^{2+}$ :
  - Tampó de regeneració del NADPH (sense EDTA).....19  $\mu\text{l}$
  - $\text{CaCl}_2$  100 mM.....6  $\mu\text{l}$
  - DTT 170 mM.....1,5  $\mu\text{l}$
  - HMG-CoA 0,8 mM.....2,5  $\mu\text{l}$
  - Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.....2  $\mu\text{l}$
  - $^{14}\text{C}$ HMG-CoA.....2,5  $\mu\text{l}$

### 9.3.- Quantificació de proteïnes pel mètode Bradford

- En placa de microtitulació:

10  $\mu\text{l}$  de mostra (diluïda 1/15) + 190  $\mu\text{l}$  de reactiu de Bradford (BioRad) diluït 1/5.

- En cubeta d'1,5ml

10  $\mu\text{l}$  de mostra (diluïda 1/7) + 790  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  desionitzada + 200  $\mu\text{l}$  reactiu de Bradford concentrat.

En els dos casos es deixa incubant de 15 a 30 min i es llegeix a una  $\lambda=595$  nm. Com a patró s'utilitza un banc de dilucions de BSA (de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fins a 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

## 10.- ASSAIG GST *PULL-DOWN IN VITRO*

Aquest assaig d'interacció *in vitro* requereix, en primer lloc, obtenir i purificar la proteïna de fusió a la glutatió-S-transferasa (GST), que actuarà com esquer. D'altra banda, la proteïna o pèptid que ha d'interaccionar amb la proteïna de fusió (proteïna test), es sintetitza *in vitro* utilitzant <sup>35</sup>S-Metionina com a precursor radiactiu. A continuació, es detallen cadascun dels protocols que es van seguir per tal de realitzar els experiments d'interacció de tipus GST *pull-down*. Bàsicament, s'ha utilitzat el protocol descrit per Ausubel i col·laboradors (1989).

### 10.1.- Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST a partir d'*E. coli*

Les construccions clonades en un vector de la sèrie pGEX es van expressar en la soca d'*E. coli* BL21. Les construccions clonades sota control del promotor T7 en altres vectors es van expressar en la soca d'*E. coli* BL21 DE3 pLysS. En aquest cas el creixement es dugué a terme afegint a més, cloramfenicol als cultius.

Procediment:

- S'inocula una colònia d'*E. coli* BL21 portadora del plasmidi d'interès en 50 ml de medi 2xTY amb ampicil·lina i es deixa créixer a 180 rpm d'agitació, durant la nit i a 37°C. Si es parteix d'una colònia d'*E. coli* BL21 pLysS, s'inocula en 25 ml de medi.
- Es fa una dilució del cultiu 1:11 (1:50) en 500 ml de medi 2xTY fresc suplementat amb els corresponents antibiòtics i s'incuba fins a una  $A_{600} = 0,4-0,6$ , que són aproximadament entre 1-2 h en les mateixes condicions d'agitació i temperatura
  - S'indueix l'expressió de la proteïna recombinant amb d'IPTG 0,4 mM en agitació, 4 h a 22 °C.
  - Es recullen les cèl·lules centrifugant-les a 3500 xg durant 10 min. A partir d'aquí es treballa en fred (en gel o a 4°C).
    - Es ressuspèn el sediment corresponent en 10 ml de PBS complet.
    - Es sonica durant 5 min en gel (espaiats de 1 min en 1 min perquè no s'escalfi la mostra). El ressuspèn ha de quedar clarificat.
    - S'afegeix en 1,1 ml de PBS suplementat amb 10% (v/v) de Triton X-100 (la concentració final ha de ser de l'1%).
      - Es centrifuga a 9500 rpm, 5 min i a 4 °C.
      - Es recupera el sobrenedant i s'afegeixen 500 µl de matriu de glutatió-agarosa (Sigma) ressuspesa al 50% (rentada i preparada segons les instruccions del proveïdor).
        - S'incuba en agitació orbital, 30 min a 4°C.
        - Es sedimenta la matriu i es renta 1 cop amb 15 ml de PBS que conté Triton X-100 a l'1%, i 3 cops més amb 1,25 ml d'aquesta mateixa solució
        - Es ressuspèn el sediment final en 250 µl de PBS complet, i se'n recull de 1 a 5 µl per a la seva quantificació mitjançant el mètode de Bradford i per a la separació per electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) i posterior tinció amb Blau de Comassie.

Solucions emprades:

PBS (*phosphate buffer saline*): fosfat sòdic 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4.

PBS complet: PBS suplementat amb els inhibidors de proteases PMSF, aprotinina, E-64 (concentracions a l'apartat 9.2) i *cocktail* d'inhibidors de proteases de Roche (1 pastilla/ 10 ml d'extracte).

## 10.2.- Transcripció-traducció *in vitro*

La síntesi *in vitro* de les proteïnes es va realitzar mitjançant el kit comercial TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System comercialitzat per Promega. Per realitzar aquesta tècnica es va seguir estrictament el protocol descrit pel fabricant, i es va utilitzar <sup>35</sup>S-metionina pel marcatge de les proteïnes produïdes.

## 10.3.- Assaig d'interacció de tipus GST *pull-down*

### 10.3.1.- Preparació de la proteïna test

- Es dilueixen 1-5 µl del producte de la síntesi *in vitro* en 200 µl de tampó d'unió a gel (BBB).
- Es manté durant 15 min en gel.
- Es centrifuga a 14.000 rpm en una microcentrífuga, 15 min a 4°C.
- Es recuperen els 200 µl de sobrenedant.

### 10.3.2.- Preparació de la proteïna esquer

- Es dilueix 2-5 µg de la proteïna de fusió a GST en un volum final de 20 µl de matriu de glutatió-agarosa, i s'equilibra amb BBB.
- Es barregen els 20 µl amb 200 µl de BBB.

### 10.3.3.- Assaig d'unió

- Es mesclen els 200 µl de proteïna test i els 220 µl de la proteïna esquer en un tub de 1.5 ml, en gel.
- S'incuba en agitació orbital, 1 h i a 4°C.
- Es centrifuga a 1.000 rpm en una microcentrífuga, 1 min.
- Es renta el sediment afegint 1 ml de BBB.
- Es repeteix aquest rentat dues vegades més.
- S'afegeixen 25 µl de tampó de càrrega 2x i es bull durant 5 min. Es separen les mostres per SDS-PAGE.



- Tampó d'unió a gel (BBB):
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5.....50 mM
  - KCl.....150 mM
  - $\text{MgCl}_2$  .....1 mM
  - glicerol.....10 % (v/v)
  - Triton X-100.....1 % (v/v)
  - inhibidors de proteases com en l'apartat 10.1

## 10.4.- Fluorografia

La detecció de les proteïnes marcades amb  $^{35}\text{S}$  a partir de gels de SDS-PAGE, es va realitzar mitjançant fluorografia.

Procediment:

- Es fixen les proteïnes per incubació a temperatura ambient en una solució al 25% (v/v) d'isopropanol i al 10% (v/v) d'àcid acètic, durant 30 min.
- S'incuben els gels 15-30 min en solució Amplify (Amersham Pharmacia).
- S'assequen els gels, i s'exposen amb un film fotogràfic en un cassette d'autoradiografia a  $-80^\circ\text{C}$  i es revelen.

## 10.5.- Purificació de la PR65 mitjançant una matriu d'afinitat de GST:KLC-1

### 10.5.1.- Preparació dels extractes d'*Arabidopsis thaliana*

- Es tritura el teixit congelat i conservat a  $-80^\circ\text{C}$  (plàntules silvestres de 14 dies) en presència de  $\text{N}_2$  (l) en un morter, fins a obtenir una pols fina.
- S'afegeix 1 ml de tampó d'extracció per cada gram de teixit. Es descongela en gel. S'agita en vórtex.
- Es deixa 15 min en gel.
- Es centrifuga a 200 xg, 10 min i a  $4^\circ\text{C}$ .
- Es recupera el sobrenedant i es repeteix la centrifugació en les mateixes condicions.
- Es congelen en alíquotes de treball en  $\text{N}_2$  (l) i es guarden a  $-80^\circ\text{C}$ . Es descongelen en gel per iniciar l'assaig d'unió.

### 10.5.2.- Assaig d'unió

- Es mescla en un tub d'1,5 ml:

10  $\mu\text{g}$  de la proteïna de fusió a GST diluïda en un volum final de 20  $\mu\text{l}$  amb la matriu de glutatió-agarosa.

200  $\mu\text{l}$  de l'extracte vegetal .

- S'incuba en agitació orbital, 4 h a 4°C.
- Es recupera la matriu per centrifugació i es realitzen 5 rentats d'1 ml cadascun amb tampó de rentat.
- Es ressuspèn el sediment final en 25 µl de tampó de càrrega 2x, es bull durant 5 min, i es procedeix a la seva anàlisi mitjançant *western-blot* on es detecta la presència de PR65 amb els anticossos  $\alpha$ -RCN.

Solucions emprades:

**Tampó d'extracció:**

- Tris HCl pH 7,5.....50 mM
  - sacarosa.....8,6% (p/v)
  - NaCl.....100 mM
  - Tween-20.....0,5% (v/v)
  - EDTA.....1 mM
- inhibidors de proteases com en l'apartat 9.1

**Tampó de rentat:**

- Tris HCl pH 7,5.....50 mM
  - NaCl.....100 mM
  - Tween-20.....0,5% (v/v)
  - EDTA.....1 mM
- inhibidors de proteases com en l'apartat 9.1

## 10.6.- Immunodetecció de proteïnes per *western-blot*

Les mostres d'un extracte proteic i diluïdes en tampó de càrrega es fan bullir durant 5 min i es sotmeten a SDS-PAGE (9%). A continuació, es transfereixen les proteïnes a una membrana de PVDF mitjançant electrotransferència i s'immunodetecta l'HMGR o la PR65 seguint el següent protocol.

Procediment:

- S'incuba la membrana durant 1 h a temperatura ambient (RT) en solució de bloqueig.
- S'incuba amb els anticossos  $\alpha$ -CD1 (dilució 1:5.000) o  $\alpha$ -RCN (dilució 1:5.000) en la mateixa solució de bloqueig tota la nit a 4°C.
- Es renta 3 vegades amb PBS-Tween en agitació, 5 min.
- S'incuba amb l'anticòs secundari *anti-rabbit HRP* (dilució 1:10.000) en solució de bloqueig, 30 min, a temperatura ambient.
- Es renta 4 vegades en PBS-Tween, en agitació, 5 min.
- Es renta amb PBS.
- Es realitza la reacció quimioluminiscent amb ECL plus (Amersham Pharmacia) seguint les instruccions del proveïdor.
- Es procedeix al revelat exposant la membrana a pel·lícules fotogràfiques durant determinats períodes de temps.

Solucions emprades:

- PBS (tal com s'ha descrit a l'apartat 10.1)
- PBS-Tween: es dissol Tween-20 a una concentració final del 0,05% en PBS.
- Solució de bloqueig: es dissol llet descremada en pols (Asturiana) a una concentració final del 5% en PBS-Tween.

## 11.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'HMGR

### 11.1.- Microbombardeig de fulles d'*Arabidopsis thaliana*

Mitjançant aquesta tècnica de biolística, es van transformar transitòriament fulles d'*A. thaliana* amb les diferents construccions d'expressió de les fusions a la proteïna verda fluorescent GFP. La visualització de la localització subcel·lular es va realitzar per microscopia làser confocal.

#### 11.1.1.- Preparació de les micropartícules

En aquest cas es van utilitzar partícules de tungstè (M17, d'1 µm de diàmetre).

Procediment:

- Es pesen 60 mg de micropartícules de tungstè en un microtub d'1.5 ml i s'afegeix 1 ml d'etanol al 70%. S'agita amb vòrtex durant 5 min.
- Es deixen sedimentar les partícules durant 15 min a temperatura ambient.
- Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.
- S'addiciona 1 ml d'aigua estèril i s'agita amb vòrtex durant 5 min.
- Es deixen sedimentar les partícules 1 min.
- Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.
- Es repeteixen dos cops més els passos 4, 5 i 6.
- S'afegeix 1 ml de glicerol al 50% estèril i s'agita amb vòrtex durant 1 min. La suspensió de micropartícules (60 mg/ml) es pot guardar a -20 °C.

#### 11.1.2.- Precipitació del DNA sobre les micropartícules

Es preparen les micropartícules per dos bombardeigs, que són els realitzats habitualment sobre cada mostra:

- Es manté la suspensió de micropartícules en agitació durant 5 min per tal que es ressuspenduin.
- Es transfereixen 20 µl de micropartícules (1200 µg) a un microtub d'1.5 ml.
- Mantenint l'agitació del microtub, s'afegeix:
  - 2 µg de DNA plasmídic
  - 28 µl de solució de precipitació (20 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M i 8 µl d'espermidina 0.1 M)
- Es segueix agitant durant 5 min més.
- Es deixen sedimentar les partícules durant 1 min.
- Es centrifuga 5 s en una microcentrífuga i es descarta el sobrenedant.
- Es renta el sediment amb 200 µl d'etanol al 70%, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. Es retira el sobrenedant.
- Es renta el sediment amb 200 µl d'etanol absolut, procurant que el sediment no es desenganxi de les parets del tub. S'elimina el sobrenedant.

- Es ressuspèn amb 16 µl d'etanol absolut amb l'ajut d'una micropipeta.

### 11.1.3.- Bombardeig de les micropartícules

Es va utilitzar el sistema "PDS-1000/He" de BioRad per dur a terme el microbombardeig. Aquest sistema utilitza la pressió d'He per accelerar les micropartícules recobertes de DNA que han d'incidir sobre el teixit vegetal. El teixit vegetal utilitzat van ser fulles d'*A. thaliana* de 3-6 setmanes crescudes en condicions de dia curt.

Procediment:

- S'esterilitzen les membranes portadores, els discs de ruptura i les reixetes d'aturada amb etanol absolut, i es deixen eixugar.
- Es dipositen els 16 µl de micropartícules recobertes de la mostra de DNA que es vol transformar sobre una membrana portadora esterilitzada.
- Mentre s'evapora l'etanol de la mostra, s'ajusta el regulador de la bombona d'He a una pressió 1100 psi.
- Es situa la reixeta d'aturada en el seu suport.
- S'ajusta la membrana portadora (amb el DNA orientat cap a la reixeta d'aturada) en el suport metàl·lic.
- S'ajusta el disc de ruptura de 900 psi, prèviament esterilitzat amb isopropanol, a la finalització del tub d'acceleració d'He.
- Es situa el muntatge que inclou la membrana portadora i la reixeta d'aturada en el nivell 5 (el més proper al disc de ruptura).
- Es situa la mostra a bombardejar en el nivell 2. Les fulles d'*A. thaliana* es dipositen al damunt d'una placa d'agar al 0.8%. El revers de les fulles, que rebrà l'impacte de les micropartícules, ha de quedar de cara cap amunt.
- Es tanca la cambra de bombardeig i activeu el buit fins que la pressió arribi a 0,06 atm (27-29 mm Hg)
- Mantenint les condicions de buit, s'accionen el disparador fins que el disc de ruptura es trenqui (900 psi)
- Es desactiva el buit, es retira la mostra i s'incuba 18 h sota llum contínua a una temperatura de 22-23 °C

### 11.2.- Preparació de la mostra

Es col·loca la fulla damunt el portaobjectes amb la cara del revers cap amunt i s'eliminen els nervis més gruixuts de la fulla a examinar amb una fulla de bisturí. S'hi afegeixen unes gotes d'aigua i es posa el cubreobjectes de manera que la fulla ha de quedar coberta amb l'aigua sense que quedin bombolles. Es segella el cubreobjectes amb parafina líquida. Inmediatament es procedeix a l'observació per microscopia làser confocal.

### **11.3.- Microscopia làser confocal**

La localització subcel·lular de les proteïnes de fusió a GFP es va examinar en un microscopi làser confocal (*Leica TCS 4D Confocal Laser Scanning Microscope, CSLM*), al Servei de Microscopia Confocal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La fluorescència verda corresponent a la GFP es va detectar utilitzant un filtre BP515-525 després d'excitar la mostra amb llum blava de  $\lambda=488$  nm mitjançant làser d'ArKr de 75mW. Les imatges es van observar amb l'objectiu de 40X d'immersió. El control del sistema es fa per un processador Motorola TCD on està instal·lat el software Scanware que permet el control, la captura i la digitalització de les imatges. La metodologia habitual de treball és la captura d'una pila de 10 seccions òptiques (sèries z) de la mostra, a partir de les quals se'n fa la reconstrucció en tres dimensions.

## 12.- BIOINFORMÀTICA

Per tal de determinar la identitat de cadascun dels clons aïllats per doble híbrid es van realitzar cerques d'homologia amb l'algoritme BLAST en les bases de dades accessibles des de la interfàç TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) i NCBI (<http://www.nlm.nih.ncbi.gov>). Els alineaments de seqüència s'han realitzat amb l'algoritme CLUSTALW amb el programa informàtic VectorNTi.

Per analitzar l'expressió de gens s'han utilitzat les bases de dades i les aplicacions d'anàlisi generades per la interfàç Genevestigator (Zimmerman et al., 2004), accessible des de <http://www.genevestigator.ethz.ch>. Les bases de dades s'han generat a partir d'experiments en els microxips ATH1 desenvolupat per Affymetrix i The Institute for Genomic Research (TIGR), que representa 23.750 gens d'*A. thaliana* (Redman et al., 2004). La informació disponible és proporcionada per usuaris o bancs de dades públics a partir d'experiments duts a terme pel Grüssler Laboratory, el Functional Genomics Center de Zurich, etc. Les aplicacions de *software* disponibles permet l'anàlisi del patró d'expressió d'un gen individual, o d'un grup de gens en unes condicions ambientals determinades, en determinats estadis de creixements o en els diferents òrgans de la planta. També permet l'anàlisi dels gens que s'estan expressant sota unes condicions determinades, en un determinat moment del desenvolupament o un determinat teixit. Les eines disponibles són el GeneAtlas que proporciona el valor d'intensitat de senyal mig d'un gen d'interès en tots els òrgans i teixits; el Gene Chronologer que permet l'anàlisi de l'expressió d'un gen d'interès segons diferents moments del desenvolupament de la planta, representat per 10 seccions del cicle de vida d'*A. thaliana*. Amb l'eina Response Viewer es pot estudiar la resposta a diferents tipus d'estressos químics o ambientals d'un gen. Finalment la utilitat Meta-Analyzer ha estat dissenyada per estudiar els perfils d'expressió de grups de gens simultàniament en el context d'estressos ambientals, òrgans i estadis de creixement. Resulta una eina molt útil per comparar l'expressió de gens de la mateixa família.



**resultats**

---





## 1.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS GENS *HMG1* I *HMG2* D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

### 1.1.- Estudi de mutants

#### 1.1.1.- Identificació

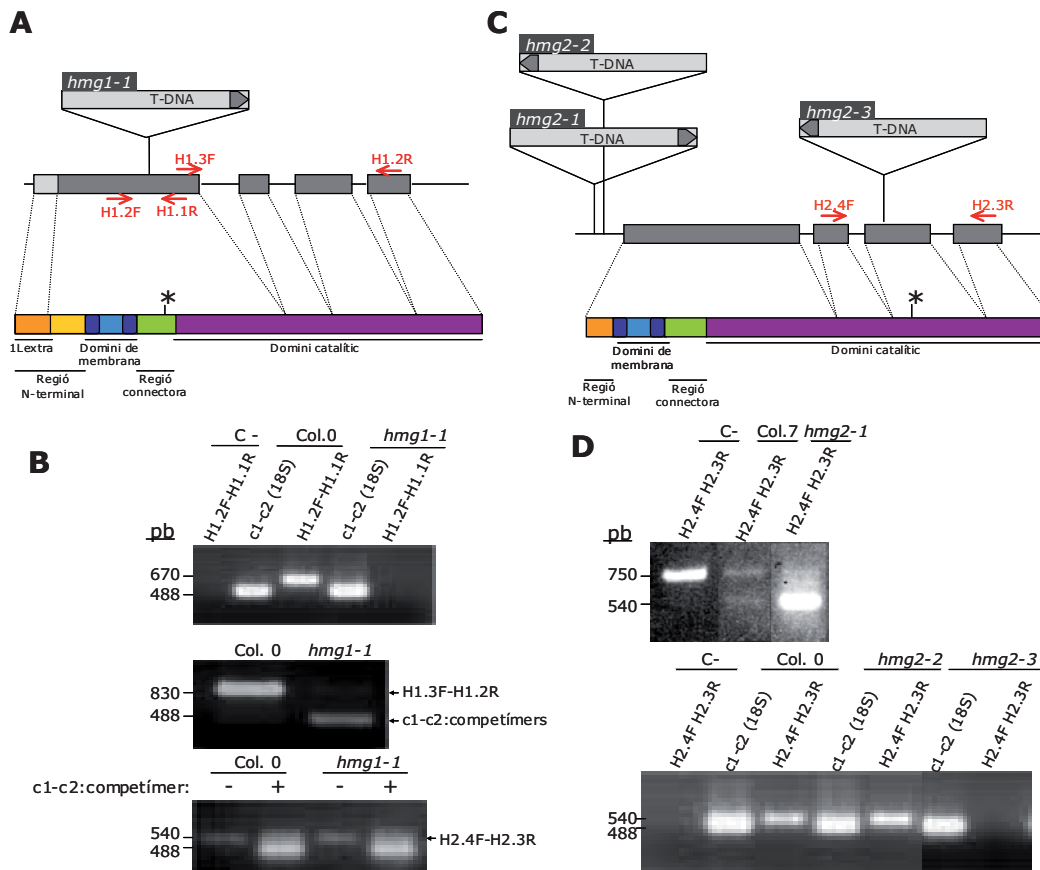
En plantes, l'HMG-CoA reductasa (HMGR) està codificada per més d'un gen (apartat 3.3 de la Introducció). No obstant, hi ha poques evidències experimentals de l'especialització funcional dels gens corresponents. En *Arabidopsis thaliana* dos gens (*hmg1* i *hmg2*) codifiquen per tres isoformes (HMGR1S, HMGR1L i HMGR2). Aproximacions de genètica reversa van aportar dades que indicaven que l'HMG1S està implicada en la síntesi d'esterols (González, 2002), però no en van aportar sobre la funció de l'HMG1L o de l'HMG2. Per tal d'aprofundir en aquest coneixement, es va decidir identificar i caracteritzar diferents mutants d'*hmg1* i *hmg2*. Concretament es va obtenir un mutant de la col·lecció GARLIC (actualment denominada SAIL, accessible des de la interfàç <http://tmri.org>) i tres mutants de la col·lecció SALK (accessible des de la interfàç <http://signal.salk.edu>). La línia SALK\_061790 conté el T-DNA en l'exó 1 del gen *hmg1* (línia *hmg1-1*). A nivell de proteïna, la inserció correspon a la zona connectora de les isoformes HMGR1S i HMGR1L (figura 22A). Les línies GARLIC\_1236 i SALK\_077006 contenen la inserció en la regió 5' transcrita no traduïda (5'UTR) del gen *hmg2* (línies *hmg2-1* i *hmg2-2*, respectivament) (figura 22C). La línia SALK\_073557 duu el T-DNA en l'exó III del gen *hmg2* (línia *hmg2-3*). A nivell de proteïna la inserció correspon al domini catalític (figura 22C).

Anàlisis per PCR de DNA genòmic procedent de la primera generació filial d'individus heterozigots, mostraren que el T-DNA en la posició descrita segregà 3:1 en cadascuna de les estirps. Aquests estudis demostraren que la inserció no era letal en homozigosi.

Es va estudiar la transcripció dels gens *hmg1* i *hmg2* en les quatre línies portadores de la mutació en homozigosi per la tècnica de retrotranscripció acoblada a PCR (RT-PCR). Per cadascuna de les estirps i les respectives línies parentals es va obtenir una població de cDNA a partir de la retrotranscripció d'una mostra de RNA total extreta de plantes de sis a deu dies, amb l'ús de *random decamers* (vegeu apartat 7 de Materials i Mètodes). Per analitzar la presència del transcrit *hmg1* en el mutant *hmg1-1* es van emprar dues estratègies d'amplificació per PCR amb l'ús d'encebadors específics. En la primera d'elles es van utilitzar els encebadors H1.2F i H1.1R que hibriden, respectivament, a 5' i a 3' del lloc d'inserció (figures 22A i 22B, imatge superior). En la segona s'aplicaren els encebadors H1.3F i H1.2R que hibriden a 3' del lloc d'inserció (figures 22A i 22B, imatge central). En cap de les dues estratègies emprades es donà amplificació del transcrit que confirmà que el mutant havia estat ben genotipat i que no es sintetitzava el transcrit complet corresponent a *hmg1*. En la mostra de cDNA procedent de la línia parental Columbia 0 sí que es donà amplificació dels transcrits *hmg1*. Com a control, es va amplificar l'RNA ribosomal 18S (18SrRNA) amb encebadors específic (c1 i c2).

L'ús alhora d'encebadors específics del gen a analitzar amb una mescla d'encebadors del 18SrRNA i competimers que regulen la seva amplificació (PCR *multiplex*, apartat 7.5 de Material i Mètodes), permet una anàlisi semiquantitativa dels nivells d'expressió dels transcrits de la mostra. Utilitzant aquesta aproximació s'estudiaren els nivells de transcrit d'*hmg2* en el mutant *hmg1-1* amb l'ús dels encebadors H2.4F i H2.3R (figura 22C i 22B, imatge inferior). S'observà que els nivells d'amplificació del transcrit d'*hmg2* eren similars en la mostra de cDNA de la línia *hmg1-1* i en la mostra de Columbia 0. Per tant, la manca de transcrit *hmg1* en *hmg1-1*, i, dels seus productes HMGR1S i HMGR1L, no és compensada per un augment en la síntesi del transcrit *hmg2*.

Anàlogament es va estudiar la presència o absència de transcrit *hmg2* en les línies mutants *hmg2-1*, *hmg2-2* i *hmg2-3* i en les parentals silvestres Columbia 7 i Columbia 0. Es va utilitzar la parella d'encebadors H2.4F i H2.3R per amplificar una mostra de cDNA de la línia *hmg2-1* i de la parental Columbia 0 (figura 22C i 22D, imatge superior). Els patrons electroforètics mostraren dues bandes d'amplificació derivades del transcrit *hmg2* tant en les mostres de Columbia 7 com en les mostres de *hmg2-1* de 750 i 540 parells de bases. Com a control d'amplificació per PCR s'utilitzà una mostra de RNA obtinguda de plantes de Columbia 7, no sotmesa a retrotranscripció. En aquest cas, també s'observà la presència d'un transcrit que migrà com a una única banda de 750 pb. La banda de 540 pb procedeix de l'amplificació del transcrit *hmg2*. La banda superior correspon a l'amplificació del gen *hmg2* que inclou exons i introns. Tot i que la mostra de RNA de partida contenia contaminació de DNA genòmic, es pot concloure que en el mutant *hmg2-1* està present el mRNA *hmg2*. Donat que la quantitat de mostra sotmesa a RT-PCR era la mateixa per la línia mutant i per la seva parental, l'amplificació de DNA genòmic serveix com a control en l'anàlisi relativa d'amplificació del transcrit *hmg2*. Els resultats indiquen una major presència de transcrit *hmg2* en el mutant *hmg2-1* que en la línia parental. La mateixa parella d'encebadors es va utilitzar per a l'estudi de la presència del transcrit *hmg2* en les línies *hmg2-2* i *hmg2-3* i en la respectiva línia parental Columbia 0 (figura 22D, imatge inferior). Com a control es va amplificar 18SrRNA amb encebadors específics (c1 i c2). El transcrit *hmg2* era present en la línia silvestre Columbia 0 i en la línia *hmg2-2* i era absent en la línia *hmg2-3*. Per tant la inserció en la zona 5'UTR no impedeix la transcripció del gen *hmg2* en els mutants *hmg2-1* i *hmg2-2*. Tot i que aquests mutants procedeixen de col·leccions diferents (GARLIC i SALK, respectivament), el T-DNA inserit no impedeix la transcripció d'*hmg2* quan es troba a la zona 5'UTR, que indica que el T-DNA podria aportar un promotor alternatiu per a la transcripció d'*hmg2*. En el cas de la línia *hmg2-1* aquest promotor dóna lloc a un increment en la quantitat de transcrit *hmg2* en comparació amb la línia parental silvestre. Seria interessant analitzar si es tracta d'una línia de sobreexpressió de l'HMGR2. La inserció en l'exó III del mutant *hmg2-3*, en canvi, impedeix la síntesi d'un transcrit complet d'*hmg2*. Per tant, en cas de donar-se traducció d'algun transcrit incomplet, se sintetitzaria un producte truncat a nivell del domini catalític al qual li mancarien residus essencials per a l'activitat enzimàtica.



**Fig. 22.** Estudi de la síntesi dels transcrits *hmg1* i *hmg2* en les línies mutants *hmg1-1*, *hmg2-1*, *hmg2-2* i *hmg2-3* (A) Organització estructural del gen *hmg1* (part superior) i de les proteïnes HMGR1S i HMGR1L (part inferior). S'indica el lloc d'inserció del T-DNA i la seva correspondència a nivell de proteïna assenyalada amb un asterisc (\*). Les fletxes en el T-DNA mostren la posició del *left border* i, per tant, l'orientació de la inserció. S'indica la posició on hibriden els encebadors utilitzats en l'amplificació per PCR: H1.2F-H1.1R o H1.3F-H1.2R. (B) Patró electroforètic dels productes de RT-PCR corresponent al transcrit *hmg1* (imatges superior i central) i al transcrit *hmg2* (imatge inferior) en les línies Columbia 0 (Col. 0) i *hmg1-1*. En les imatges s'indiquen les parelles d'encebadors utilitzades. Com a control, s'amplifica 18SrRNA amb la parella d'encebadors c1-c2. En els casos de PCR *multiplex* (imatge central i inferior) com a control s'amplifica 18SrRNA amb una mescla d'encebadors c1-c2 i dels seus competimers a una proporció de 3:7. C-, control negatiu d'amplificació d'una mostra de RNA de Columbia 0 no sotmesa a retrotranscripció. (C) Organització estructural del gen *hmg2* (part superior) i de la proteïna HMGR2 (part inferior). S'indiquen els llocs d'inserció del T-DNA i la seva correspondència a nivell de proteïna assenyalada amb un asterisc (\*). Les fletxes en el T-DNA mostren la posició del *left border* i, per tant, l'orientació de la inserció. S'indica la posició on hibriden els encebadors utilitzats en l'amplificació per PCR: H2.4F-H2.3R. (D) Patró electroforètic dels productes de RT-PCR corresponent al transcrit *hmg2* en les línies Columbia 7 (Col. 7) i *hmg2-1* (part superior), i a les línies Columbia 0, *hmg2-2* i *hmg2-3* (part inferior). Com a control, s'amplifica 18SrRNA amb la parella d'encebadors c1-c2. C-, control negatiu d'amplificació d'una mostra de RNA de Columbia 7 (imatge superior) o de Columbia 0 (imatge inferior) no sotmeses a retrotranscripció. pb. parells de bases.

### 1.1.2.- Característiques fenotípiques

Un cop finalitzat el genotipat i l'estudi d'expressió es va procedir a caracteritzar fenotípicament els mutants. Per a l'estudi fenotípic es van escollir les línies *hmg1-1* i *hmg2-3*, ja que no presenten els transcrits *hmg1* i *hmg2*, respectivament. Els individus de la línia *hmg2-3* portadors de la mutació en homozigosi presentaven el mateix aspecte i mostraven un desenvolupament equiparable al dels

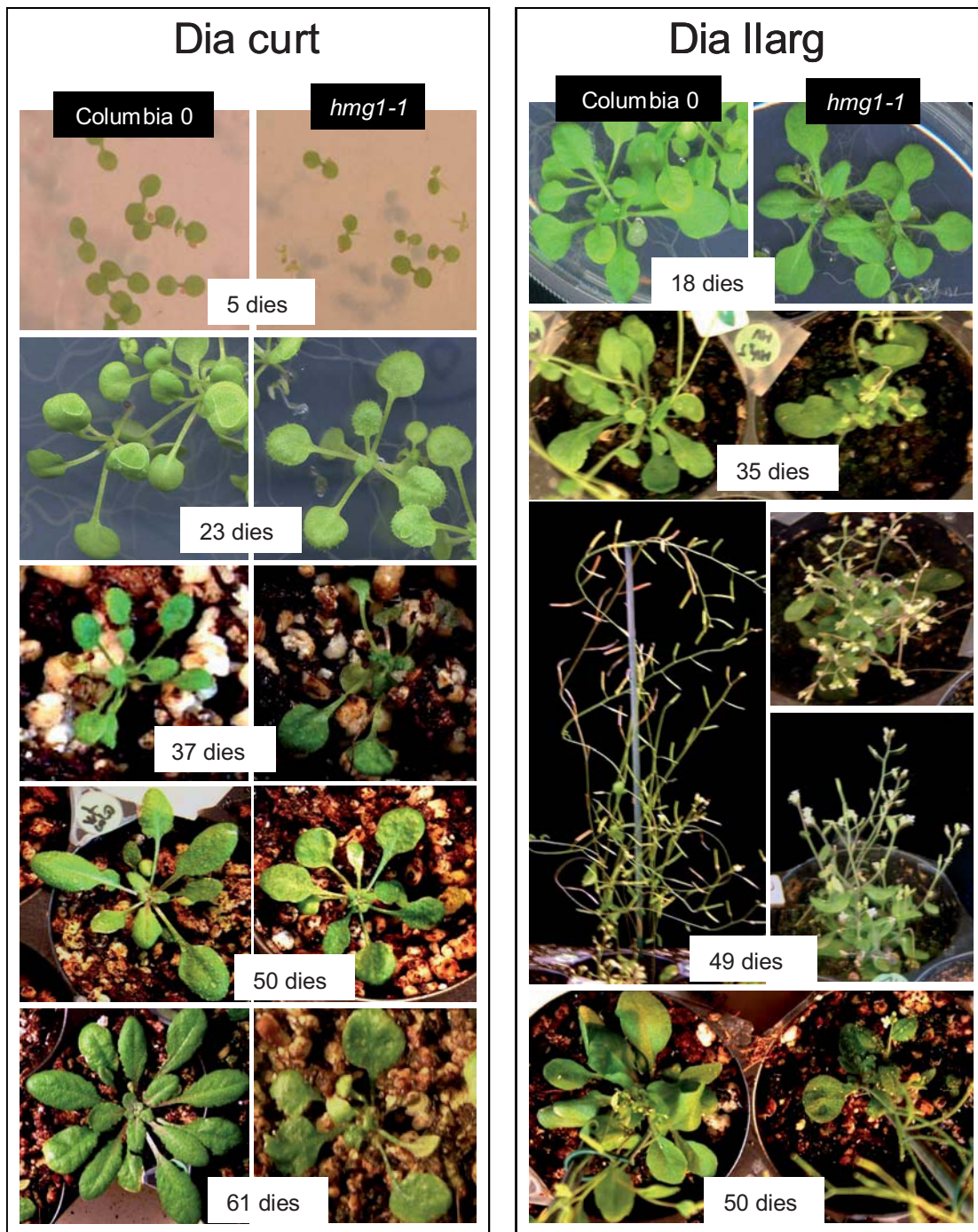
individus de la línia parental Columbia 0 (resultats no mostrats). Els individus de la línia *hmg1-1* portadors de la mutació en heterozigosi presentaven també un aspecte normal. En canvi, els homozigots per aquesta mutació estaven molt afectats, tal com es descriu a continuació.

Per analitzar si el mevalonat (producte de la reacció catalitzada per l'HMGR) tenia algun efecte sobre el mutant *hmg1-1* es van sembrar llavors d'individus homozigots *hmg1-1* en medi *Murashige and Skoog* (MS) suplementat amb aquest metabòlit. Les plantes van ser crescudes en condicions de dia curt (8 hores llum/16 hores foscor) o en condicions de dia llarg (16 hores llum/8 hores foscor). La presència de mevalonat no va causar cap efecte a nivell fenotípic. Durant les primeres 4 setmanes de creixement en placa no s'apreciaren diferències entre plantes de la línia *hmg1-1* i plantes de la línia parental Columbia 0 (figura 23).

Passat aquest temps, les plantes es van passar a terra. A partir d'aquest moment es començaren a advertir alteracions morfològiques (figura 23). L'alta humitat present en la placa podria haver preservat les plantes dels efectes derivats de la manca d'activitat HMGR. O bé, la transferència de la planta de medi MS a terra li podria haver provocat un estrès. La resposta a l'estrès ambiental en aquests mutants es trobaria doncs, alterada.

A dia curt, les plantes mutants passades a terra eren poc desenvolupades, amb fulles de menor mida i senescència primerenca que es produïa aproximadament als 60 dies. A més, en aquestes condicions les plantes eren menys viables que en condicions de dia llarg. En aquestes condicions la planta tindria doncs, més requeriments derivats del gen *hmg1*. A dia llarg, les plantes mutants també manifestaren un fenotip molt acusat d'enanisme amb tija de menor diàmetre, fulles de menor mida, denses inflorescències i siliques amb menys llavors i més petites. L'estirp *hmg1-1* mostrà un alt grau d'infertilitat que fou pal·liat en part pel tractament amb mevalonat de les inflorescències. Les plantes tractades amb mevalonat foren capaces de generar major nombre de llavors. En les no tractades amb mevalonat una gran part dels fruits foren abortats i no contenien llavors. No obstant, encara que en menys proporció, eren capaces de produir llavors fèrtils.

No es van observar diferències entre plàntules de la línia mutant *hmg1-1* i plàntules de la parental Columbia 0 crescudes en foscor (resultats no mostrats). Les plàntules etiolades no mostraren alteracions ni de germinació ni de desenvolupament. En aquestes condicions es dona una expressió molt alta tant del gen *hmg1* com del gen *hmg2*. L'alta expressió d'*hmg2* podria ser suficient per proporcionar un nivell d'activitat HMGR adequat.



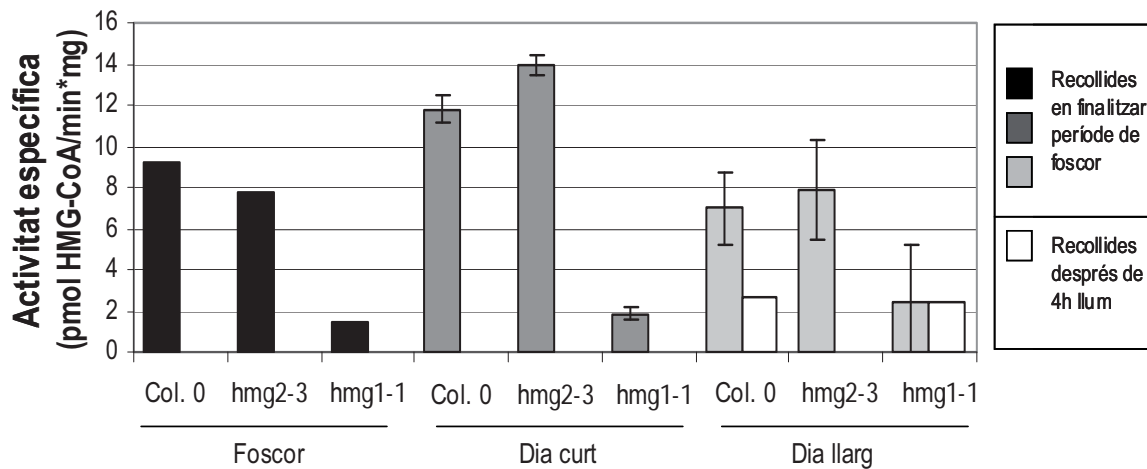
**Fig. 23.** Fenotip de les plantes mutants de la línia *hmg1-1* al llarg del desenvolupament. Les plantes van ser crescudes en condicions de dia curt (esquerra) o de dia llarg (dreta) en medi MS durant 28 dies. Passat aquest temps van ser transferides a terra i crescudes amb el mateix règim d'il·luminació. El mutant *hmg1-1* es creix en paral·lel amb la línia parental Columbia 0.

### 1.1.3.- Activitat HMGR i sensibilitat a inhibidors

El mutant *hmg1-1* és viable fins a l'estadi adult. Per tant, la manca d'HMGR1 hauria de ser compensada bé per un augment d'activitat de l'HMGR2, bé per una aportació plàstica d'IPP (o d'algun altre precursor isoprenoide). Cal assenyalar que en els experiments de RT-PCR semiquantitativa, no es van apreciar diferències en els nivells de transcrit *hmg2* entre el mutant *hmg1-1* i la corresponent línia parental. D'altra banda, també és interessant conèixer si l'absència de l'HMGR2 en el mutant *hmg2-3* és compensada per un increment d'activitat de l'HMGR1. Per aportar més dades sobre aquestes qüestions, es va determinar l'activitat HMGR en extractes de plantes de les línies *hmg1-1*, *hmg2-3* i Columbia 0 (figura 24). Les plantes van ser crescudes en foscor (plantes etiolades) durant 10 dies, o en condicions de dia curt o de dia llarg durant 21 dies. Les mostres es van recollir en finalitzar el període de foscor, moment on hi ha nivells relativament alts de transcrits *hmg1* i *hmg2* i d'activitat HMGR. També es va mesurar l'activitat HMGR en extractes de plantes *hmg1-1* i de Columbia 0 crescudes durant tres setmanes en condicions de dia llarg i recollides després d'haver estat 4 hores en llum (figura 24).

En condicions de foscor, l'activitat HMGR en el mutant *hmg1-1* mostrà nivells molt baixos i era d'un 16% respecte l'obtinguda en la varietat parental Columbia 0. En canvi, el mutant *hmg2-3* mostrà un 84% d'activitat respecte la mesurada en la parental. En condicions de dia curt el mutant *hmg1-1* mostrà una baixa activitat HMGR que fou d'un 16% en comparació amb l'activitat obtinguda en la línia parental. En canvi, en el mutant *hmg2-3* es manifestà fins i tot un petit augment d'activitat respecte la mostrada per Columbia 0. A dia llarg, els decrements a les plantes *hmg1-1* eren menys importants i l'activitat HMGR era d'un 34% respecte la mesurada en plantes silvestres, mentre que en el cas del mutant *hmg2-3* es trobà un petit augment de l'activitat HMGR. Es realitzà una mesura d'activitat enzimàtica en extractes de plantes Columbia 0 i del mutant *hmg1-1* crescudes en condicions de dia llarg i recollides després d'haver estat 4 h en llum. En aquest cas, s'observà un 10% menys d'activitat en el cas del mutant. En aquestes condicions l'activitat HMGR mesurada és molt baixa i, probablement compensada per la de la isoforma HMGR2. Aquests resultats estan en concordança amb el fet que *hmg1* és el gen d'expressió majoritària (Enjuto, 1994). A més, la seva expressió és reprimida per llum (Learned, 1996; Learned, 1997).

És interessant observar que en condicions de dia llarg l'activitat HMGR que presenten les plantes silvestres és menor i representa un 59% de l'activitat observada a dia curt, fet corroborat per altres treballs (Manzano et al., 2004). Coincideix, doncs, el fet que les condicions on hi ha menys activitat HMGR total (a dia llarg), són aquelles on el mutant *hmg1-1* es desenvolupa millor. D'altra banda, en plàntules etiolades es dona molta expressió dels gens que codifiquen per l'HMGR (Enjuto, 1994; Lumbreras et al., 1995) i a més tenen una activitat força alta (figura 24), similar a la mostrada per plantes crescudes a dia curt. No obstant, les plantes mutants es desenvolupen normalment. No sembla doncs que l'activitat HMGR sigui limitant en aquestes condicions.



**Fig. 24.** Activitat HMGR en les línies *hmg1-1*, *hmg2-3*, i Columbia 0 (Col. 0). Les mostres per la determinació d'activitat procedeixen de plantes crescudes en foscors durant 10 dies, de plantes crescudes en condicions de dia curt o de dia llarg durant 21 dies i recollides en finalitzar un període de foscors, o de plantes crescudes en condicions de dia llarg durant 21 dies i recollides després d'haver estat 4 h en llum. Es mostren els valors en activitat específica. Els valors d'activitat específica provenen d'una mesura en el cas de plantes etiolades, de tres mesures en el cas de plantes crescudes a dia curt, de quatre mesures en el cas de plantes crescudes a dia llarg i recollides en finalitzar un període de foscors i de dues mesures en el cas de plantes crescudes a dia llarg i recollides en llum. En els casos on la mesura s'ha realitzat al menys tres vegades es representa una mitjana del valor  $\pm$  l'error estàndard.

Que l'enzim HMGR és essencial en plantes és àmpliament demostrat pels múltiples treballs on concentracions al rang de  $\mu\text{M}$  de mevinolina (potent inhibidor competitiu de l'HMGR) bloquegen el creixement d'*A. thaliana* (Re, 1995; Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002; Rodríguez-Concepción et al., 2004). Tot i que el gen *hmg1* codifica per la isoforma majoritària de l'HMGR d'*A. thaliana*, el mutant d'aquest gen (*hmg1-1*) era capaç de créixer bé durant les primeres etapes de desenvolupament. La isoforma HMGR2, tot i que deriva d'un gen de baixa expressió, podria aportar l'activitat necessària per a què el mutant *hmg1-1* pogués prosperar. Tant a dia curt com en foscors, l'activitat HMGR romanent del mutant era d'un 16% en referència a la corresponent parental silvestre. Per tant, l'IPP necessari per a la síntesi d'isoprenoides citosòlics podria provenir en part per l'activitat HMGR residual (derivada d'HMGR2) i en part per una aportació d'IPP del cloroplast. En aquestes condicions, doncs, es podria donaria un intercanvi capaç de pal·liar els efectes de la baixa producció d'IPP en el citosol.

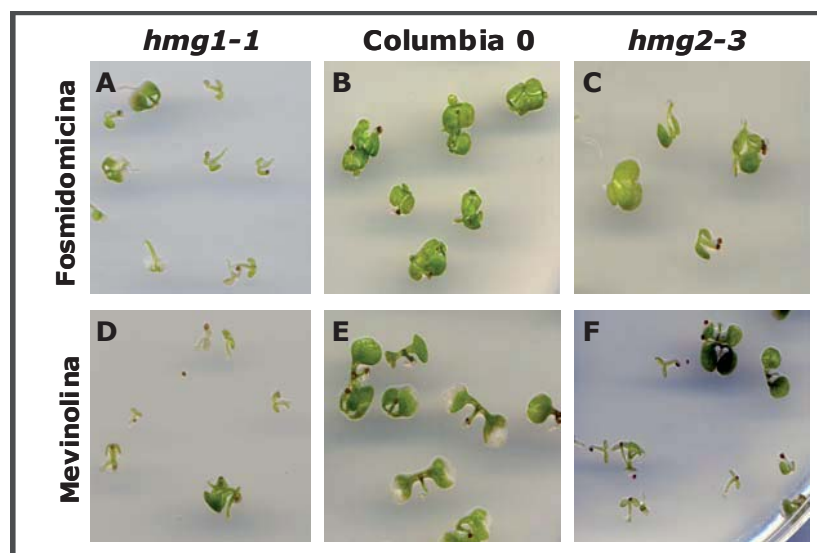
Per tal d'analitzar si la viabilitat de la línia *hmg1-1* es devia a una aportació de mevalonat procedent de l'HMGR2 o d'un major bescanvi d'IPP dels plastidis al citosol, plantes de la línia mutant *hmg1-1* es van créixer en presència de concentracions subletals de fosmidomicina ( $20 \mu\text{M}$ ) (inhibidor de la via MEP) o mevinolina ( $2 \mu\text{M}$ ). Degut als problemes de fertilitat d'aquesta línia, no va ser possible realitzar un estudi ampli amb gran nombre de llavors, però els resultats obtinguts van resultar força clars. Es van sembrar un total de 30 llavors del mutant *hmg1-1* en medi MS suplementat amb fosmidomicina (figura 25A). Quatre de les plàntules germinades no superaren l'estadi de dos cotilèdons, els quals mostraven



una mida similar als de Columbia 0 i un color verd-pàl·lid. Vint-i-una de les plàntules obtingudes manifestaven un fenotip molt acusat amb cotilèdons molts petits i de coloració albina. La resta, mostraven fenotips intermedis. En aquestes condicions al voltant d'un 80% de plàntules Columbia 0 supera el bloqueig provocat per fosmidomicina (figura 25B).

Es van créixer un total de 21 plàntules del mutant *hmg1-1* en medi MS suplementat amb mevinolina (figura 25D). Quinze d'elles eren completament bloquejades per l'inhibidor i romanien en un estadi de dos cotilèdons d'una mida molt menor a la que presentaven els cotilèdons de les plantes silvestres crescudes en les mateixes condicions. Només un 13% de les plantes silvestres quedaven bloquejades en aquest estadi (figura 25E). A més, el grau d'afectació era molt menor (compareu amb la figura 25D).

En ambdues condicions s'observà una major sensibilitat als inhibidors pel que es pot concloure que en aquestes condicions l'IPP substrat per a la síntesi d'isoprenoides citosòlics podria derivar del mevalonat sintetitzat per l'HMGR2 i de la via del MEP.



**Fig. 25.** Sensibilitat als inhibidors mevinolina i fosmidomicina en les línies *hmg1-1*, *hmg2-3* i Columbia 0. Les plantes van ser crescudes en condicions de dia llarg en presència de fosmidomicina 20  $\mu$ M o mevinolina 2 $\mu$ M, durant 12 dies.

El mutant *hmg2-3* també fou crescut en presència de fosmidomicina o de mevinolina en les mateixes condicions descrites per a la línia *hmg1-1*. Es van créixer al voltant de 50 plàntules d'aquest mutant i de la corresponent línia silvestre en presència de cadascun dels inhibidors. Un 53% de plantes *hmg2-3* es van mostrar resistents al bloqueig que provoca la mevinolina (figura 25C), quan en aquestes condicions un 87% de plantes de la línia parental són resistents. En el cas de fosmidomicina, no s'observaren diferències de desenvolupament entre el mutant *hmg2-3* i la línia parental (figura 25F). Es va repetir l'anàlisi en dues ocasions més, obtenint-se idèntics resultats. Sembla doncs que només en el cas del mutant *hmg1-1* l'aportació d'IPP dels plastidis sembla essencial per als seus requeriments metabòlics.

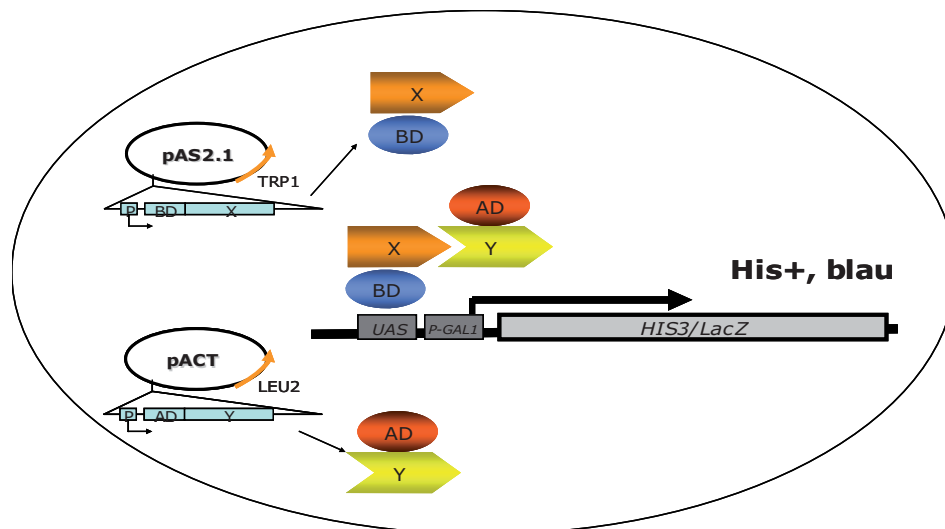
## 1.2.- Cerca de proteïnes que interaccionen amb l'HMGR

Fins al moment, s'han identificat tres proteïnes que interaccionen amb la regió N-terminal de l'HMGR d'*A. thaliana* (Leivar, 2003). Dues d'elles, AtB $\alpha$  i AtB $\beta$ , s'associen a l'HMGR1S i a l'HMGR1L, i la tercera, AtKLC-1 s'associa a l'HMGR1L (apartat 3.5 de la Introducció, figura 12). Cap d'aquestes proteïnes interaccionen amb l'HMGR2. Fins al moment tampoc s'han identificat proteïnes que interaccionin amb el domini catalític de l'HMGR. El domini catalític podria estar associat a altres enzims de la via de síntesi d'isoprenoides tal com s'havia proposat en la teoria de canals metabòlics (apartat 2.3 de la Introducció). Per tal d'ampliar l'espectre de proteïnes que puguin estar implicades en el control de l'HMGR, es van portar a cap crivellatges per doble híbrid, utilitzant la regió N-terminal de l'HMGR2 (apartat 1.2.2) o el domini catalític de l'HMGR1 (apartat 1.2.3) com a esquer. Per aquesta aproximació es va emprar la llibreria de cDNA pACT d'*A. thaliana*, obtinguda a partir de mRNA de plàntules etiolades de tres dies (Kim et al., 1997). En aquest moment del desenvolupament hi ha un bon nivell d'expressió de les tres isoformes d'HMGR (HMGR1S, HMGR1L i HMGR2) (Enjuto, 1994; Lumbreras et al., 1995).

### 1.2.1.- El sistema del doble híbrid per a l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna

La tècnica del doble híbrid en llevat permet detectar les interaccions entre proteïnes *in vivo*, mitjançant el sistema GAL4 de llevat (figura 26) (Fields and Song, 1989). Les proteïnes assajades són fusionades al domini d'unió a DNA (BD) o al domini d'activació de la transcripció (AD) del factor GAL4 que estan codificats, respectivament, en els vectors pAS2-1 i pACT2 (comercialitzats per Clontech). Les interaccions són monitoritzades per expressió dels gens marcadors *HIS3* (creixement en medi selectiu sense histidina) i *LacZ* (color de les colònies en l'assaig enzimàtic  $\beta$ -galactosidasa) en les soques de llevat CG-1945 o Y190.

Amb el mateix principi, el sistema de doble híbrid es pot utilitzar per al crivellatge d'una llibreria d'expressió per cercar proteïnes que interaccionin amb la d'interès. Els plasmidis de la llibreria proporcionen l'AD a la seqüència de cDNA, mentre que la proteïna esquer és la fusió entre el BD i la proteïna diana (Chien et al., 1991).



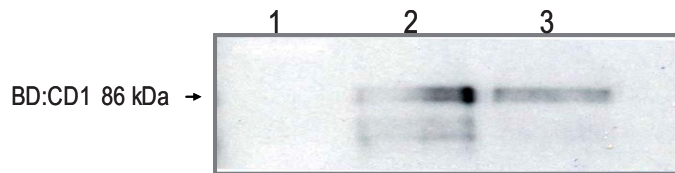
**Fig. 26.** El sistema de doble híbrid en llevat. Les proteïnes problema (X i Y) s'expressen en els llevats com a fusions amb els dominis d'activació (AD) o d'unió al DNA (BD) del factor de transcripció de llevat GAL4, a partir dels plasmidis pAS2-1 i pACT, respectivament. La interacció entre les proteïnes X i Y en les cèl·lules del llevat determina l'expressió dels gens marcadors *HIS3* i *LacZ*. El creixement en medi selectiu sense histidina (activació de *HIS3*) i l'aparició de color blau en les colònies per assaig  $\beta$ -galactosidasa (activació de *LacZ*) permet monitoritzar la interacció (adaptat de Gietz et al., 1997).

### 1.2.2.- Crivellatge amb el domini catalític de l'HMGR1

Amb l'objectiu d'identificar proteïnes implicades en la regulació de l'activitat HMGR i/o pertanyents a la formació d'un determinat canal metabòlic, es va procedir al crivellatge de la llibreria de cDNA d'*A. thaliana* per doble híbrid utilitzant el domini catalític d'HMGR1 (CD1) com a esquer. Es va pretransformar la soca CG1945 amb una variant del plasmidi que codifica per la proteïna de fusió BD:CD1. En aquest moment es va advertir que la soca transformada creixia més lentament en el medi de selecció i les colònies obtingudes es caracteritzaven per un menor diàmetre i una coloració més rogenca. Quan la soca CG1945-pAS2.1[BD:CD1] va ser transformada amb la llibreria l'eficiència de transformació era molt baixa i no superava les 2.300 unitats formadores de colònies per  $\mu\text{g}$  DNA ( $\text{ufc}/\mu\text{g}$  DNA) quan s'aconsegueix normalment una eficiència d'almenys 10.000  $\text{ufc}/\mu\text{g}$ . Aquestes dificultats indicaven que la proteïna BD:CD1 resultava tòxica per la cèl·lula de llevat. Per tant, la proteïna quimèrica recombinant podria presentar activitat enzimàtica en la cèl·lula de llevat, alterant d'aquesta manera el seu metabolisme.

Tenint en compte aquesta circumstància es va decidir comprovar la presència de la quimera BD:CD1 en la soca utilitzada per a l'estudi abans i després de la transformació amb la llibreria de cDNA. L'ús d'anticossos policlonals preparats contra el domini catalític de l'HMGR1 d'*A. thaliana* (anticossos  $\alpha$ -CD1), va permetre aquest estudi mitjançant la tècnica de *western-blot*. Es va partir d'extractes totals de cultius de llevat que es van resoldre per electroforesis en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE). Posteriorment es van electrotransferir les proteïnes a una membrana de PVDF i es va

immunodetectar la presència de la quimera BD:CD1 amb els anticossos  $\alpha$ -CD1 (figura 27). Es pot observar una banda de 86 kDa, que correspon a la mida de la quimera, en extractes procedents de la soca de llevat utilitzada en l'estudi (figura 27, carrils 2 i 3). La soca de llevat no transformada amb BD:CD1 no presenta cap banda d'aquesta mida (figura 27, carril 1). Es demostrà doncs que la proteïna BD:CD1 utilitzada com a esquer estava present durant el crivellatge.



**Fig. 27.** Immunodetecció de BD:CD1 en extractes totals de llevat amb anticossos  $\alpha$ -CD1. Extractes totals de llevat van ser resolts per SDS-PAGE i analitzat per *western-blot*. S'utilitzà una dilució 1/5.000 d'anticòs. Carril 1: control negatiu, soca CG1945 sense transformar. Carril 2: soca CG1945 pretransformada amb pAS2.1[BD:CD1]. Carril 3: soca CG1945 transformada seqüencialment amb pAS2.1[BD:CD1] i amb la llibreria pACT.

Típicament en un crivellatge per doble híbrid es realitza un rastreig d'un mínim d'un milió de clons de cDNA per a tenir una representació dels clons independents de la llibreria. La baixa eficiència de transformació dificultava el crivellatge d'aquest nombre de clons d'un sol cop. De forma empírica es va optimitzar el mètode de transformació per assolir una eficiència adequada (apartat 8 de Materials i Mètodes), que es basà en una disminució de l'escalat, en un augment de l'aireació dels cultius i en un pas final de recuperació de les cèl·lules transformades. El nou mètode va permetre obtenir una eficiència de fins a 38.600 ufc/ $\mu$ g DNA i un crivellatge de  $5,8 \cdot 10^6$  clons de cDNA independents. D'aquests, només vint-i-cinc van créixer en el medi de selecció per activació del gen marcador *HIS3*. Les interaccions es van confirmar reestriant les colònies positives en el mateix medi de selecció (activació de *HIS3*) i sotmetent-les a assaig de  $\beta$ -galactosidasa (activació de *lacZ*) (taula 4). Les estries que superaven per segon cop la selecció en medi sense histidina es reestriaren en un medi de selecció per afavorir la pèrdua del plasmidi derivat de pAS2.1 (on està clonada la construcció que codifica per BD:CD1) i el manteniment del derivat de pACT que codifica pel clon positiu. Aquest es transformà per electroporació en cèl·lules d'*E. coli* i es purificà. En alguns casos no va ser possible la recuperació del plasmidi pACT[cDNA] (taula 4). En aquells casos que es va recuperar es va procedir a l'anàlisi per restricció amb l'enzim *XhoI* i a la seva seqüenciació (taula 4). La digestió amb *XhoI* dóna normalment dos productes: un de 7,65 kb (corresponent al vector sense insert) i un d'entre 0,6 i 2,5 kb (corresponent a la mida dels inserts clonats a la llibreria). Cinc dels clons positius que alliberaven un insert d'aproximadament 1,5 kb codificaven per versions truncades del domini catalític de l'HMGR1 (taula 4, figura 28). En cinc ocasions va aparèixer un producte que digerit amb l'enzim de restricció *XhoI* alliberà un fragment lineal de 6 kb. Quan es van digerir amb altres enzims, donaven lloc als mateixos tipus de fragments, és a dir, mostraven idèntic patró de restricció (resultats no mostrats) La seqüenciació d'un d'ells (clon 10.2) va permetre comprovar que també codificava per una versió truncada del domini catalític de l'HMGR1 (taula 4, figura 28). En els casos on l'insert de cDNA no estava en pauta de lectura (clons 11.2, 11.3 i 15.2) no es pot descartar que una traducció accidental en

la soca de llevat per una col·locació incorrecta dels ribosomes, podria haver donat lloc a productes proteics amb capacitat per interaccionar amb la proteïna esquer.

La interacció entre BD:CD1 i els clons positius que codifiquen per versions truncades del domini catalític de l'HMGR1 es va confirmar en la soca de llevat Y190 mitjançant l'assaig  $\beta$ -galactosidasa. El creixement en un medi sense histidina no es va diferenciar del creixement basal, degut a problemes de toxicitat generats per l'expressió ectòpica del domini catalític en les cèl·lules de llevat. En enfrontar les proteïnes codificades per aquests clons al domini d'unió a DNA del factor de transcripció GAL4 (BD), o a una proteïna no relacionada, BD:laminina, no es donà activació dels gens marcadors *HIS3* o *LacZ* pel que es demostrava que la interacció era específica (resultats no mostrats). En canvi no va ser possible retransformar els plasmidis de 6 kb. Aquest fet indicava que una reordenació del plasmidi original havia implicat la pèrdua d'elements necessaris per al seu manteniment en la soca de llevat.

**Taula 4.** Resum del crivellatge per doble híbrid de la llibreria de cDNA pACT d'*A. thaliana* amb la proteïna esquer BD:CD1 en la soca de llevat CG1945. *HIS3*, clons identificats que han crescut de nou en reestriar-los en medi selectiu sense histidina. *LacZ*, color de les colònies en l'assaig  $\beta$ -galactosidasa. *Recuperació del plasmidi*, es simbolitza amb el signe  $\checkmark$  els clons dels quals se n'ha pogut aïllar el plasmidi pACT[cDNA]. *XhoI*, mida dels fragments resultat de la digestió del clon amb l'enzim de restricció. Es mostra la proteïna codificada d'aquells inserts que estan en pauta de lectura. Els números d'accés dels inserts dels clons són: 2.2, 2.5, 6.1, 6.2, 10.2, 13.4, NM\_106299; 11.3, NM\_122767.

<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	Recuperació del plasmidi pACT[cDNA]	<i>XhoI</i> (Kb)	en pauta	Proteïna codificada
1.1	blau	$\checkmark$	6		
1.2	blanc				
2.2	blau	$\checkmark$	7,65 + 1,5	sí	HMGR1
2.3	blanc				
2.5	blau	$\checkmark$	7,65 + 1,5	sí	HMGR1
3.4	blau				
4.1	blanc				
5.2	blau				
6.1	blau	$\checkmark$	7,65 + 1,5	sí	HMGR1
6.2	blau	$\checkmark$	7,65 + 1,5	sí	HMGR1
7.1	blau	$\checkmark$	6		
10.2	blau	$\checkmark$	6	sí	HMGR1
11.1	blanc				
11.2	blau	$\checkmark$	7,65	no	
11.3	blau	$\checkmark$	7,65 + 0,6	no	
11.6	blau				
13.1	blau	$\checkmark$	6		
13.3	blau				
13.4	blau	$\checkmark$	7,65 + 1,5	sí	HMGR1
13.5	blau				
13.6	blau				
15.1	blanc				
15.2	blanc	$\checkmark$	7,65 + 1,8	no	
15.3	blanc				
21	blau	$\checkmark$	6		



**Fig. 28.** Clons positius identificats en el crivellatge per doble híbrid corresponents a versions truncades del domini catalític. En la figura s'indica l'extrem 5' de l'insert. L'extrem 3' correspon al final de traducció d'*hmg1*.

Tot i les dificultats derivades del crivellatge de la llibreria pACT amb BD:CD1 com a esquer (probablement degudes a problemes de toxicitat que genera la quimera), va permetre identificar el propi domini catalític com a proteïna interaccionant. Tal com es mostra en la figura 28 els cinc clons que alliberaven un fragment d'aproximadament 1,5 kb en digerir-los amb l'enzim de restricció *XhoI*, codifiquen per versions truncades de l'HMGR1 que contenen gairebé la totalitat del domini catalític. Els clons que alliberen un fragment de 6 kb també codifiquen per una versió gairebé sencera del domini catalític (figura 28, clon 10.2). Es demostra que l'HMGR1 d'*A. thaliana* és capaç de dimeritzar interaccionant a través del domini catalític. Aquest fet està en concordança amb la descripció de l'estructura de l'HMGR en la literatura. Tal com ja s'ha descrit a la Introducció (apartat 3.4) l'estructura quaternària de l'HMGR de diferents organismes és un tetràmer. A més, es requereix dimerització per a que es doni activitat catalítica (Istvan et al., 2000, figura 9).

### 1.2.3.- Crivellatge amb la regió N-terminal de l'HMGR2

Per cercar proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal de l'HMGR2 (NT2), es va transformar la soca CG1945 amb una variant del plasmidi pAS2-1 que codifica per la proteïna de fusió BD:NT2. Quan aquesta soca CG1945-pAS2-1[BD:NT2] va ser transformada amb la llibreria pACT es va obtenir una bona eficiència (11.160 ufc/ $\mu$ g DNA). Es van crivar  $10^6$  clons, cinc dels quals van créixer en el medi de selecció sense histidina. En reestriar aquestes colònies en plaques amb el mateix medi, no s'obtingué creixement, pel que es conclougué que el sistema de doble híbrid no era adequat per a identificar una proteïna que interaccionés amb la regió N-terminal de l'HMGR2. Altres possibilitats són que la regió N-terminal no interacciona amb cap proteïna o que aquest factor no està representat a la llibreria utilitzada.

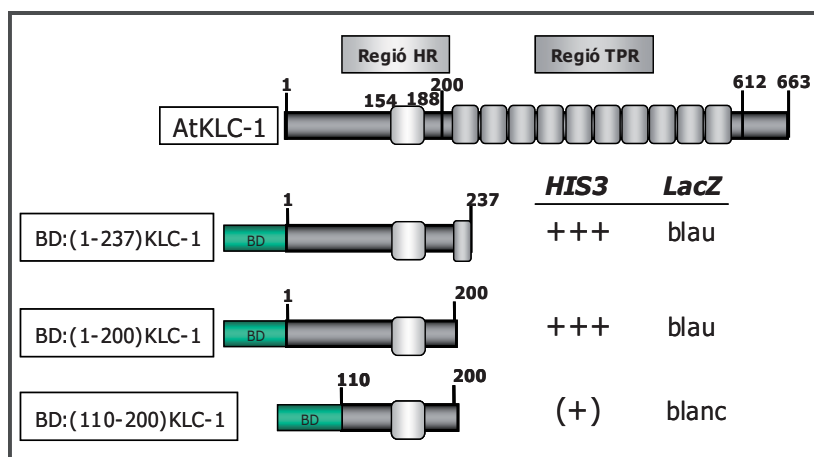
## 2.- CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB L'HMGR1

### 2.1.- La proteïna AtKLC-1

#### 2.1.1. Interacció amb la PR65

La cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal de l'HMGR1L va permetre identificar AtKLC-1 (Leivar, 2003). La conservació de seqüència i l'organització estructural suggerien que la proteïna identificada era una cadena lleugera de quinesina de tipus I (figura 29, part superior), la qual està formada per dues unitats de cadena pesant (KHC) i dues unitats de cadena lleugera (KLC). Tal com s'ha comentat a l'apartat 5 de la Introducció, en l'estructura primària de KLC poden distingir-se quatre regions: la regió a l'extrem N-terminal, la regió de *heptad repeats* (HR), la regió de repeticions de tetratricopèptid (TPR) i la regió a l'extrem C-terminal. Els motius HR i TPR són regions que participen habitualment en interaccions amb altres proteïnes (figura 29). En la KLC animal, la regió HR interacciona amb la KHC i la regió TPR interacciona amb el substrat a transportar (revisat a Manning and Snyder, 2000).

Es va plantejar la cerca d'una KHC d'*A. thaliana* que interaccionés específicament amb AtKLC-1. D'aquesta manera es confirmaria per una banda la identitat d'AtKLC-1 com a cadena lleugera de quinesina, i per altra, aportaria dades molt interessants sobre el transport intracel·lular de l'HMGR. Per assolir tal objectiu, es va decidir realitzar un crivellatge per doble híbrid de la mateixa llibreria de cDNA d'*A. thaliana* que havia permès la identificació d'AtKLC-1. Es va escollir com a esquer una regió a N-terminal de la proteïna que contingués la regió d'HR. Prèviament, es va comprovar la capacitat d'aquesta regió d'activar la transcripció dels gens marcadors *HIS3* i *lacZ* en la mateixa soca de llevat que s'utilitzaria per la crivellatge, la soca CG1945 (figura 29). Tant la quimera BD:(1-237)KLC-1 com BD:(1-200)KLC-1 activaven la transcripció dels gens marcadors *HIS3* i *lacZ*, no era el cas de BD:(110-200)KLC-1. Aquesta darrera, per tant, era la idònia per al crivellatge de la llibreria pACT, i fou per tant l'escollida en l'estudi.



**Fig. 29.** Selecció de la regió d'AtKLC-1 utilitzada en el crivellatge per doble híbrid. Es va analitzar l'activació dels gens *HIS3* (creixement en un medi sense histidina) i *LacZ* (color blau de les colònies en l'assaig  $\beta$ -galactosidasa) per a cada quimera. (+) creixement basal; +++ creixement abundant.

Amb una eficiència de transformació de 14.191 ufc/ $\mu$ g DNA, es va realitzar un crivellatge de  $1,4 \cdot 10^6$  clons de cDNA independents de la llibreria, dels quals, 17 superaven la selecció per creixement en medi sense histidina. Per tal d'identificar els clons positius es va procedir de forma anàloga a la descrita en l'apartat 1.2.2 de Resultats. En tots els casos es va recuperar el plasmidi pACT[cDNA] i es va seqüenciar l'insert de cDNA. En la taula 5 s'indica la proteïna codificada en els casos on es va obtenir una pauta de lectura oberta. De les seqüències que estaven en pauta de lectura, les corresponents als clons 1 i 11 codificaven per factors de transcripció i la del clon 27 per una hipotètica proteïna d'unió a GTP. Quatre dels disset clons codificaven per diferents formes truncades de la proteïna PDF2 i cinc d'ells codificaven per la mateixa forma truncada de la proteïna RCN1.

**Taula 5.** Resum del crivellatge per doble híbrid de la llibreria pACT d'*A. thaliana* amb la proteïna esquer BD:(110-200)KLC1 com a esquer en la soca de llevat CG1945. *HIS3*, clons identificats que han crescut de nou en reestriar-los en medi selectiu sense histidina. *LacZ*, color de les colònies en l'assaig  $\beta$ -galactosidasa. *XhoI*, mida dels fragments resultat de la digestió del clon amb l'enzim de restricció. Es mostra la proteïna codificada d'aquells inserts que estan en pauta de lectura. *GTP BP*, proteïna d'unió a GTP. Els números d'accés dels inserts dels clons són: 1, NM\_105637; 4, NM\_180734; 11, NM\_120916; 18, AP000423; 27, NM\_104483; 29, NM\_121623; 31, NM\_180653; 40, NM\_127874; 7, 10, 41.1, 50, NM\_102360; 34, 41.2, 41.3, 49, NM\_102360.

<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	<i>XhoI</i> (Kb)	en pauta	Proteïna codificada
1	blau	7,65 + 1,2	sí	Factor de transcripció
4	blau	7,65 + 0,8	no	
7	blau	7,65 + 1,8	sí	RCN1
10	blau	7,65 + 1,8	sí	RCN1
11	blanc	>10 + 0,8	sí	Factor de transcripció
16	blau	7,65 + 1,8	sí	RCN1
18	blanc	7,65 + 0,7	no	
27	blanc	7,65 + 0,6	sí	GTP BP
29	blau	7,65 + 0,75	no	
31	blau	7,65 + 0,8	no	
34	blau	7,65 + 1,3	sí	PDF2
40	blanc	7,65 + 1,9	no	
41.1	blau	7,65 + 1,8	sí	RCN1
41.2	blau	7,65 + 1,2	sí	PDF2
41.3	blau	7,65 + 1,4	sí	PDF2
49	blau	7,65 + 1,8	sí	PDF2
50	blau	7,65 + 1,8	sí	RCN1

Es confirmaren aquestes interaccions per doble híbrid en la soca de llevat Y190, on es van enfrontar les proteïnes codificades pels clons 41.3 (PDF2), 50 (RCN1), 11 (factor de transcripció), 1 (factor de transcripció) i 27 (proteïna d'unió a GTP) a la proteïna esquer BD:(110-200)KLC-1. Com a control, també es van enfrontar al domini d'unió a DNA del factor de transcripció Gal4 (BD), i a la proteïna no relacionada BD:laminina (taula 6). També com a control, s'analitzà si les proteïnes codificades per

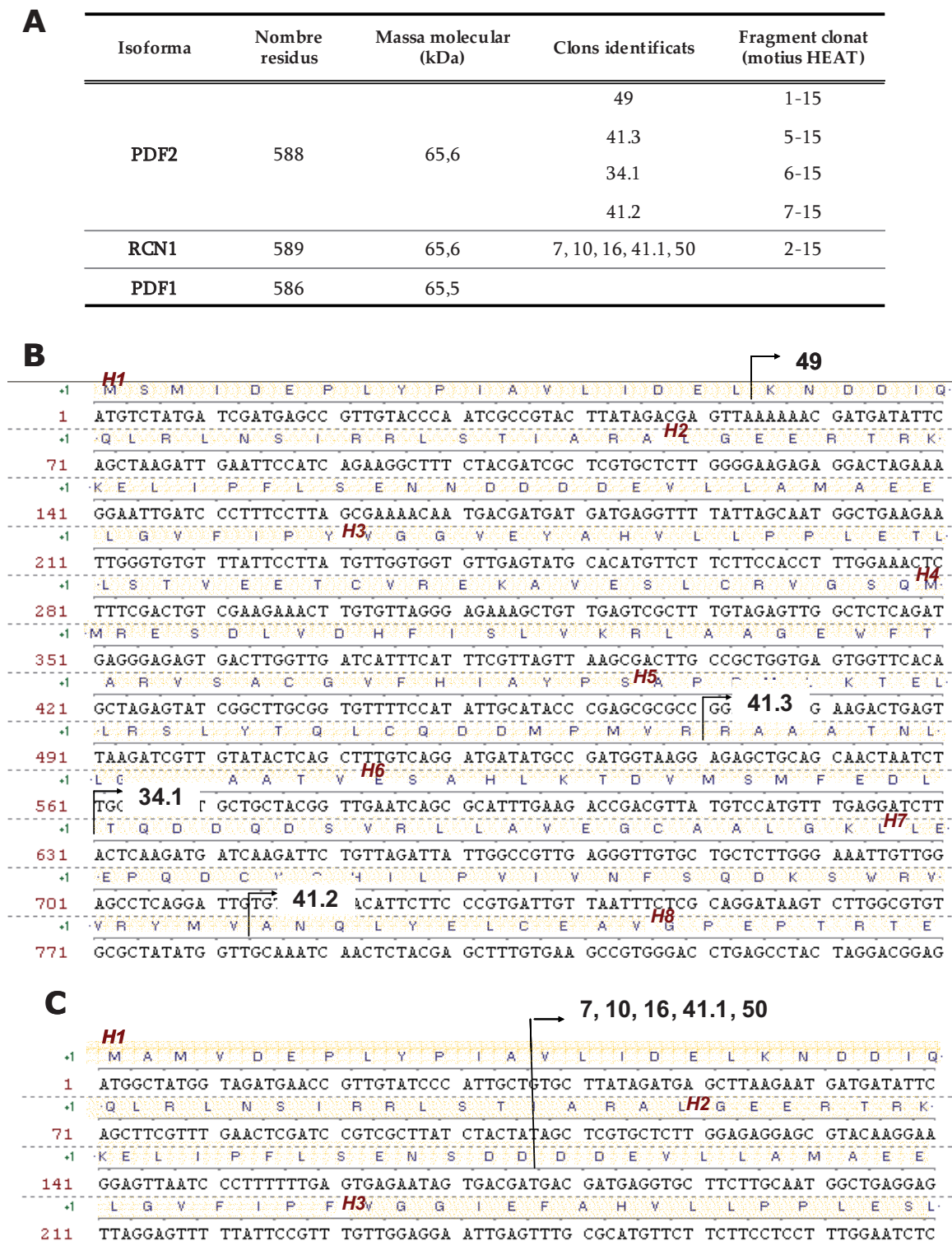


aquests clons tenien la capacitat d'activar la transcripció dels gens marcadors. Les proteïnes codificades pels clons 1 i 11 activaren la transcripció del gen de selecció *lacZ* en l'assaig  $\beta$ -galactosidasa en totes les combinacions utilitzades: eren clars exemples de falsos positius. La proteïna codificada pel clon 27, en canvi, va donar resultats negatius en totes les combinacions analitzades. En el cas dels clons 41.3 i 50 que codifiquen per PDF2 i RCN1, respectivament, l'assaig  $\beta$ -galactosidasa resultà positiu quan es van enfrontar a la proteïna esquer. No obstant, també donà positiu tot i que d'una forma més feble quan s'enfrontaren a BD i a BD:laminina. Tot i això, ni PDF2 ni RCN1 eren capaços d'activar la transcripció dels gens marcadors en transformar els clons de forma aïllada en la soca de llevat Y190.

**Taula 6.** Confirmació de les interaccions per doble híbrid en la soca Y190 de llevat. Les proteïnes codificades pels clons positius indicats es van enfrontar a BD:(110-200)KLC-1, a BD:laminina, a BD o s'analitzà la seva capacitat d'activar els gens marcadors ( $\phi$ ). S'analitzaren les interaccions per creixement en medi sense histidina (*HIS3*) i per assaig  $\beta$ -galactosidasa (*LacZ*). -, +, ++, +++ nivell de creixement o proporció de colònies blaves resultat de l'activació dels gens *HIS3* i *LacZ* (de menys a més).

Clons	BD:(110-200)KLC-1		BD:Laminina		BD		$\phi$	
	<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>
1	+	++	+	++	+	+++	+	+++
11	++	+	++	+	++	+	++	+
27	+	-	+	-	+	-	+	-
41.3 (PDF2)	++	++	+	+	+	+	+	+
50 (RCN1)	++	++	+	+	+	+	+	+

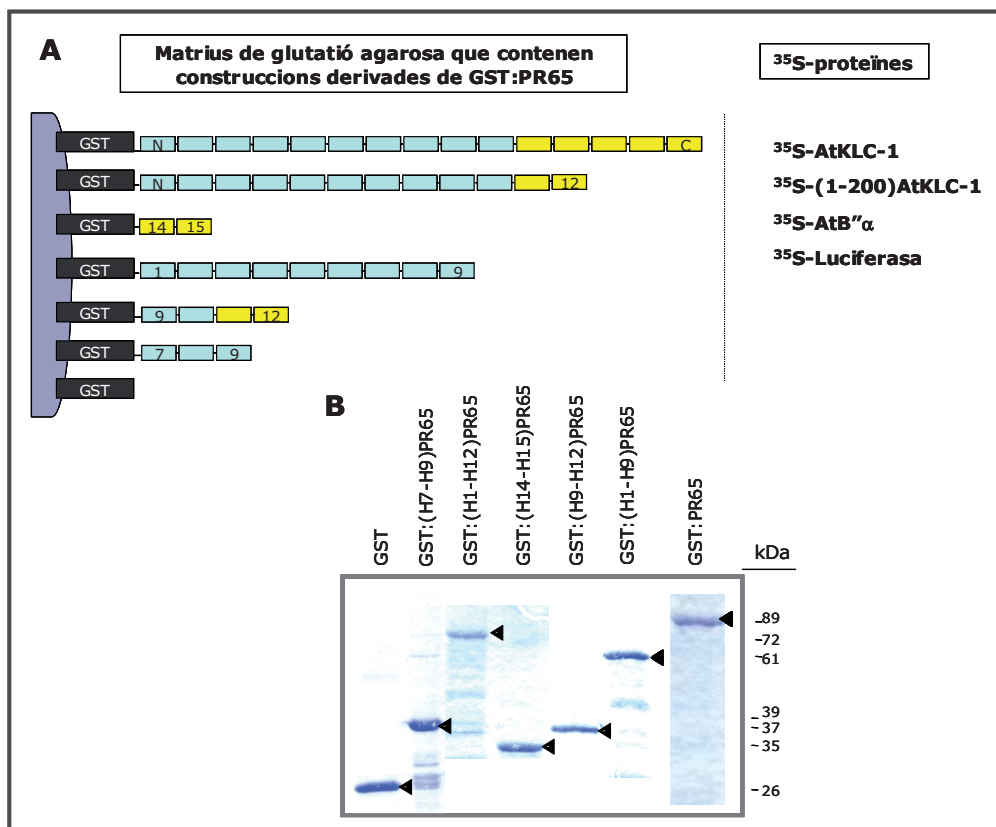
Els gens *pdf2* i *rcn1* codifiquen per dues isoformes de la subunitat A de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A). Aquest holoenzim és un heterotrímer format per tres subunitats: la subunitat subunitat A o PR65, la subunitat C o catalítica i la subunitat de tipus B o reguladora (vegeu apartat 4 de la Introducció per més detalls). La subunitat A s'estructura en quinze repeticions *en tandem* anomenades HEAT (apartat 4.1 de la Introducció, figura 16). En *A. thaliana* hi ha tres gens que codifiquen per tres isoformes de la PR65 anomenades PDF1, PDF2 i RCN1 (vegeu característiques a la figura 30A i a la figura 17 de la Introducció). En el crivellatge es van identificar clons de cDNA que codifiquen per PDF2 (figura 30B) i per RCN1 (figura 30C). En canvi, no es va identificar cap clon que codifica per la tercera isoforma, PDF1.



**Fig. 30.** Fragments d'isoformes de la PR65 identificats en el crivellatge per doble híbrid. **(A)** Característiques de les tres isoformes i extensió del fragment donat, definit pels motius HEAT que codifica. **(B)** Posició de l'extrem 5' dels clons de *pdf2* identificats. **(C)** Posició de l'extrem 5' dels clons de *rcn1* identificats. L'extrem 3' correspon al final de traducció de *pdf2* i *rcn1*. Els motius HEAT estan indicats ombrejats en groc (H1 a H8).

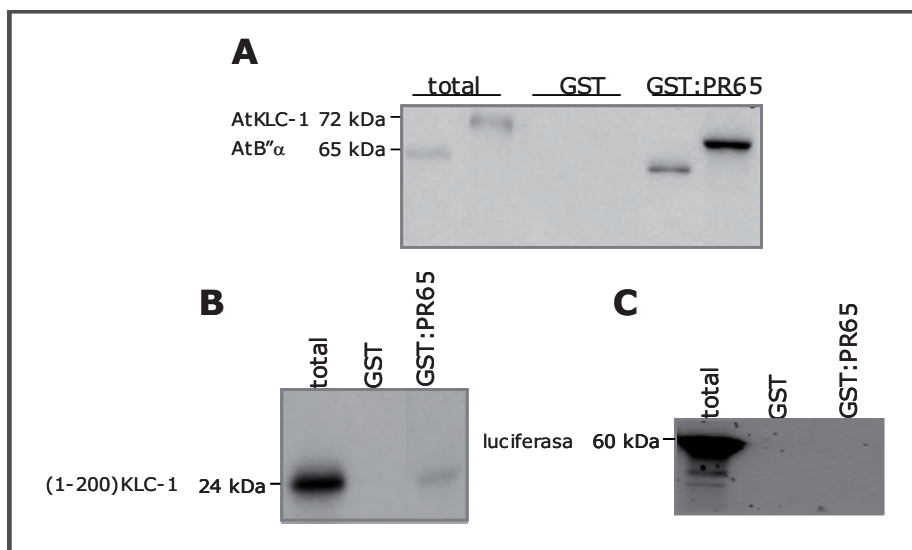
### 2.1.1.1.- Confirmació de la interacció per assaigs *in vitro*

Per tal de confirmar la interacció entre l'AtKLC-1 i la PR65 es van dur a terme assaigs del tipus GST *pull-down*. Es va clonar el gen *pdf2* (procedent del clon 49 identificat per doble híbrid) en un vector de la sèrie pGEX, per generar la proteïna de fusió a la glutatió-S-transferasa o GST (GST:PR65). La construcció quimèrica GST:PR65 es va expressar en la soca d'*Escherichia coli* BL21 i es va purificar mitjançant una matriu d'afinitat de glutatió-agarosa. D'altra banda es van marcar amb  $^{35}\text{S}$  per traducció *in vitro*, les proteïnes AtKLC-1, el fragment d'aquesta que conté els dos-cents primers residus (1-200)AtKLC-1 i la proteïna AtB'' $\alpha$ . La matriu de GST:PR65 es va enfrontar a les proteïnes sintetitzades *in vitro* marcades amb  $^{35}\text{S}$ . Com a controls, es van utilitzar les combinacions GST amb  $^{35}\text{S}$ -AtB'' $\alpha$  i GST amb AtKLC-1, per una banda, i la combinació GST:PR65 amb  $^{35}\text{S}$ -luciferasa, per una altra. En la figura 31 es pot apreciar un esquema de les diferents matrius de glutatió-agarosa que contenen les proteïnes de fusió a GST i les proteïnes marcades amb  $^{35}\text{S}$ , sintetitzades *in vitro*. Així mateix també es mostra el gel tenyit amb Blau de Coomassie de les proteïnes quimèriques purificades separades per SDS-PAGE.



**Fig. 31.** Esquema de les proteïnes utilitzades en els assaigs GST *pull-down in vitro*. **(A)** A l'esquerra es mostren les construccions quimèriques derivades de la isoforma PDF2 fusionades a GST i purificades mitjançant una matriu de glutatió-agarosa. Cada rectangle de l'esquema de la proteïna simbolitza un motiu HEAT; en blau estan indicats els implicats en la interacció amb la subunitat B; en groc estan indicats els implicats amb la subunitat C. Els números indiquen els motius HEAT presents en les construccions. A la dreta es mostren les proteïnes marcades amb  $^{35}\text{S}$ , per traducció *in vitro*. **(B)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs de GST *pull-down*. S'indica la massa molecular de les proteïnes quimèriques.

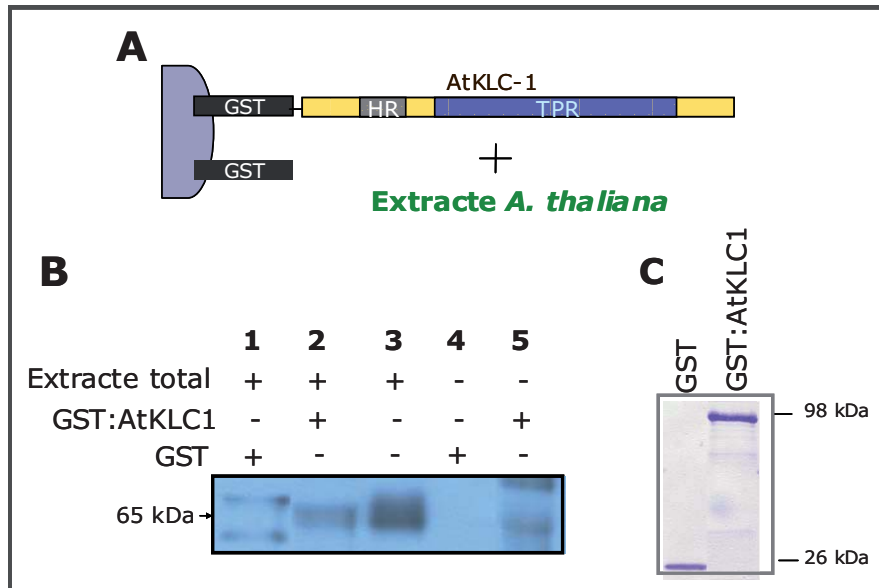
Tant AtB'' $\alpha$  com AtKLC-1 foren retengudes en la matriu de GST:PR65 i en canvi, no foren retengudes en la matriu de GST (figura 32A). El fragment de l'AtKLC-1 que contenia només els 200 primers residus de la proteïna fou retenguda tot i que menys eficientment en la matriu de GST:PR65 (figura 32B). Finalment, s'observà que una proteïna control no relacionada, la luciferasa, no era retenguda amb les matrius de GST o de GST:PR65 (figura 32C). Els resultats confirmaren doncs, la interacció específica entre l'AtKLC-1 i la PR65, i que en aquesta interacció hi estan implicats els 200 primers residus de l'AtKLC-1. Tot i això, els resultats indiquen que la resta de la proteïna també contribueix positivament a la interacció.



**Fig. 32.** Anàlisi de la interacció entre AtKLC-1 i PR65 per assaig GST *pull-down*. Les proteïnes GST i GST:PR65 van ser expressades en *E. coli* i retengudes en matrius de glutatió-agarosa. Les proteïnes AtKLC-1 i AtB'' $\alpha$  (A), (1-200)AtKLC-1 (B) i luciferasa (C) van ser sintetitzades *in vitro* utilitzant  $^{35}\text{S}$ -Metionina com a precursor radiactiu. Els assaigs d'interacció van ser realitzats mitjançant la tècnica de GST *pull-down in vitro*. Els productes retenguts van ser analitzats per SDS-PAGE i, seguidament, per fluorografia. Damunt de cada carril hi ha el nom de la proteïna quimèrica utilitzada en l'assaig. *Total*: extracte de traducció de la proteïna marcada utilitzada per la interacció.

Per tal d'aprofundir en la caracterització d'aquesta interacció, es va abordar l'estudi des d'una altra aproximació. En aquesta anàlisi es va expressar la quimera GST:AtKLC-1 en *E. coli* i es va purificar en una matriu de glutatió-agarosa. Es va incubar la quimera GST:AtKLC-1 o GST (control negatiu) amb un extracte total de plantes de la varietat Columbia 7 d'*A. thaliana* de 14 dies. Les fraccions retengudes en l'assaig d'interacció es van resoldre per SDS-PAGE, posteriorment les proteïnes van ser transferides a una membrana de PVDF, on es va immunodetectar la presència de PR65 amb un anticòs policlonal que reconeix les tres isoformes d'aquesta proteïna (anticòs  $\alpha$ -RCN) (Deruère et al., 1999). Es va comprovar que mentre la PR65 no era retenguda en la matriu de GST, sí que era específicament retenguda en la de GST:AtKLC-1 (figura 33, carrils 1 i 2). Tot i que la reïna de GST:AtKLC-1 conté bandes reconegudes per l'anticòs  $\alpha$ -RCN (figura 33, carril 5), aquestes no corresponen a la mida de la banda de la PR65 de l'extracte total (figura 33, carril 3). Per tant, la interacció entre la PR65 i l'AtKLC-1

també es va demostrar a partir de la purificació de la PR65 d'un extracte cru d'*A. thaliana* mitjançant la matriu de GST:AtKLC-1.

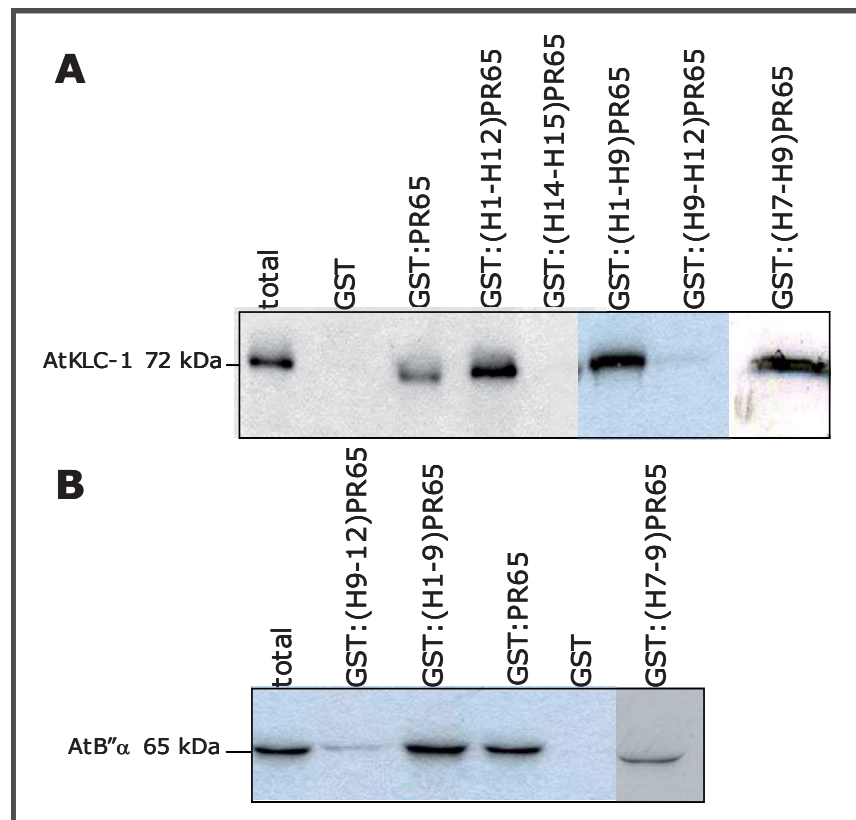


**Fig. 33.** Purificació de PR65 d'un extracte de plantes mitjançant la matriu de GST:AtKLC1. **(A)** Esquema de l'assaig d'interacció **(B)** Immunodetecció de la PR65 utilitzant l'anticòs  $\alpha$ -RCN. *Carril 1*: fracció retinguda en la matriu de GST; *carril 2*: fracció retinguda en la matriu de GST:AtKLC1; *carril 3*: mostra d'extracte total aplicada a les matrius; *carrils 4 i 5*: mostres de les matrius de GST i de GST:AtKLC1, respectivament, sense aplicar extracte total. **(C)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs d'interacció. L'extracte total procedeix de plantes Columbia 7 d'*A. thaliana* de 14 dies. S'indica la massa molecular de les proteïnes quimèriques.

### 2.1.1.2- Acotament de la zona de la interacció

La subunitat A o PR65 del complex PP2A actua com element estructural que uneix les altres dues subunitats (Ruediger et al., 1994). La PR65 està formada per quinze repeticions HEAT disposades en *tandem*, implicades en interaccions proteïna-proteïna. Els 10 motius HEAT situats a l'extrem N-terminal (HEAT 1-10) mitjancien la interacció amb la subunitat de tipus B mentre que els cinc motius localitzats a l'extrem C-terminal (HEAT 11-15) intervenen en la interacció amb la subunitat C (Groves et al., 1999). Per altra banda, s'han descrit altres proteïnes que poden interaccionar amb la subunitat A. Concretament, hi ha resultats que indiquen que el motiu HEAT 11 és important per a la interacció amb proteïnes com HSF-2, importina  $\beta$  o PP5 (Hong and Sarge, 1998; Lubert et al., 2001; Yang et al., 2001). Les dades indiquen que aquestes proteïnes substitueixen la subunitat C per formar complexes heterotrimèrics alternatius. Per tal d'esbrinar amb quina regió de la PR65 interacciona l'AtKLC-1 es van preparar una sèrie de construccions que codifiquen per proteïnes quimèriques de diferents fragments de la isoforma PDF2 fusionats a l'extrem C-terminal de la GST (figura 31). Aquestes construccions van ser expressades en *E. coli* i les proteïnes quimèriques es van purificar mitjançant una matriu de glutatió-agarosa (figura 31). Les reïnes obtingudes van ser utilitzades per realitzar assaigs d'unió a AtKLC-1. Les matrius amb els motius HEAT 1-12, HEAT 1-9 i HEAT 7-9 de PDF2 eren les

que més eficientment retenien la proteïna marcada *in vitro*  $^{35}\text{S}$ -AtKLC-1 (figura 34A). Com a control positiu es realitzaren assaigs d'interacció entre algunes de les proteïnes quimèriques i  $^{35}\text{S}$ -AtB $''\alpha$ . De nou, les matrius que més eficientment retenien AtB $''\alpha$  foren les que comprenen els motius HEAT 1-9 i HEAT 7-9 (figura 34B). Per tant, les regions implicades en la interacció amb la PR65 coincideixen per a AtKLC-1 i per a AtB $''\alpha$ . Els resultats suggereixen que es podria donar competència entre AtKLC-1 i AtB $''\alpha$  per al lloc d'interacció amb la subunitat A, del complex PP2A.



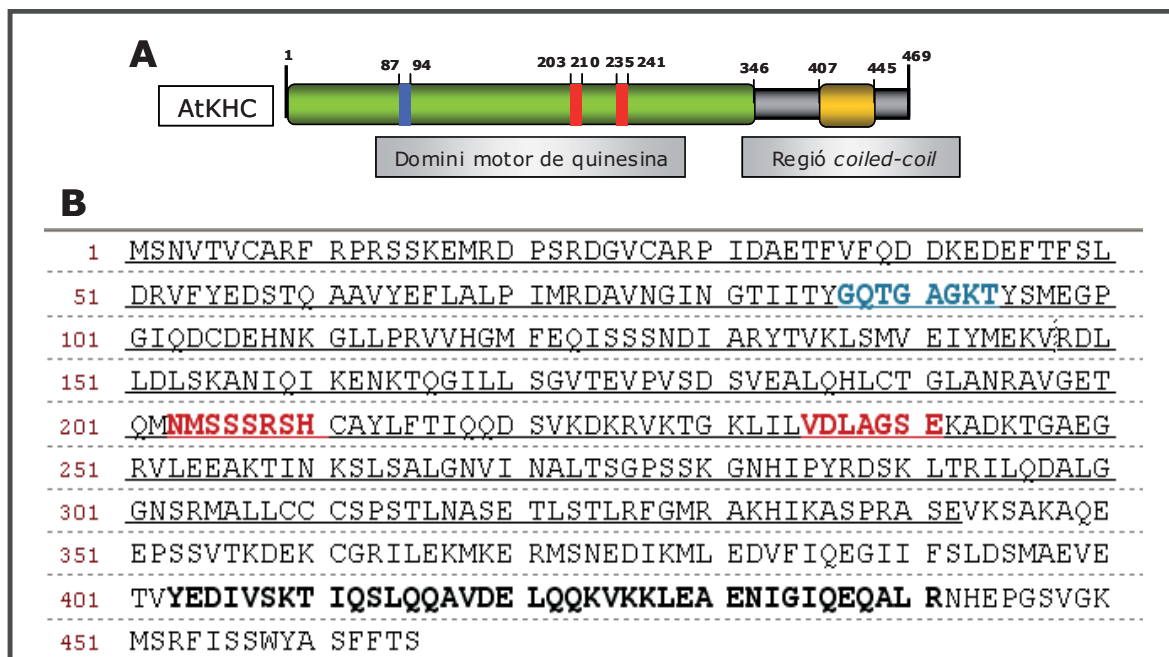
**Fig. 34.** Acotament de la zona de la PR65 que interacciona amb l'AtKLC-1. Diferents proteïnes quimèriques formades per fragments de PDF2 fusionats a GST van ser expressades en *E. coli* i retingudes en matrius de glutatió-agarosa. Les proteïnes AtKLC-1 (A) i AtB $''\alpha$  (B) van ser sintetitzades *in vitro* utilitzant  $^{35}\text{S}$ -Metionina com a precursor radiactiu. Els assaigs d'interacció van ser realitzats mitjançant la tècnica de GST *pull-down in vitro*. Els productes retinguts van ser analitzats per SDS-PAGE i, seguidament, per fluorografia. Damunt de cada carril hi ha el nom de la proteïna quimèrica utilitzada en l'assaig. Total, l'extracte de traducció de la proteïna marcada utilitzada per la interacció.

### 2.1.2.- Interacció amb la proteïna AtKHC

Es va utilitzar una regió que contenia els HR de l'AtKLC-1 com a esquer en un crivellatge per doble híbrid amb l'objectiu d'identificar la seva parella de cadena pesant de quinesina (KHC). No obstant, el rastreig va permetre identificar una subunitat del complex PP2A, però no la KHC.

Les quinesines constitueixen una superfamília de proteïnes motores d'unió a microtúbuls. En base a homologia amb el domini motor, el genoma d'*A. thaliana* conté 61 seqüències de proteïnes quinesina

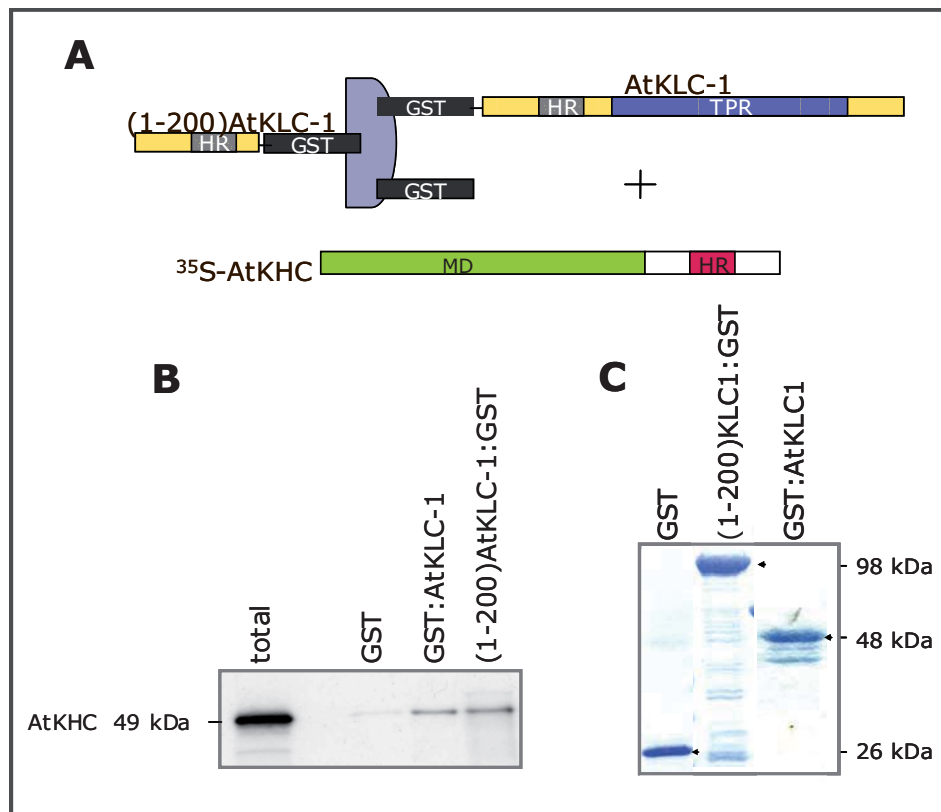
(Reddy and Day, 2001). La quinesina de tipus I, o convencional, és un tetràmer format per dues cadenes pesants (KHC) i dues cadenes lleugeres (KLC) (vegeu Introducció, apartat 5). La KHC conté el domini motor amb activitat ATPasa en l'extrem N-terminal, una regió central *coiled-coil* i una cua en l'extrem C-terminal que uneix la KLC. No obstant, les quinesines típicament implicades en transport (quinesina de tipus I) estan poc representades en *A. thaliana* i en plantes en general. Una de les seqüències, *At3g63480*, codifica per a una hipotètica KHC per homologia del domini motor i per la seva organització modular ja que conté el domini motor en l'extrem N-terminal i una petita regió *coiled-coil* en l'extrem C-terminal (Reddy and Day, 2001). No obstant, en el mateix treball, s'indica que la seqüència aminoacídica predita pel gen no conté les regions conservades implicades en la unió a ATP o bé que aquestes no estan completes. S'ha analitzat el cDNA (clon RAFL21-44-L04) que codifica per la hipotètica KHC (anomenada AtKHC) i s'ha identificat una seqüència compatible amb una regió d'unió a ATP (figura 35B, assenyalada en blau) i dues regions implicades en la interacció amb nucleòtids fosfat (figura 35B, assenyalades en roig). Mitjançant l'algoritme PSI-BLAST s'han realitzat anàlisis filogenètics amb el domini motor d'aquesta seqüència, el qual ha resultat homòleg al domini motor de la KHC de diferents espècies. No obstant, s'ha trobat que aquesta proteïna està més emparentada amb les KHC de fongs que amb la dels altres organismes. Tot i que fins al moment no s'han identificat cadenes lleugeres de quinesina en fongs, no es descarta que en plantes i concretament en *A. thaliana* pugui existir el complex de quinesina I format per una KHC i una KLC, donat que el genoma d'*A. thaliana* conté seqüències que codifiquen per proteïnes amb homologia a les cadenes d'aquest complex. Les KHC tenen a l'extrem C-terminal, una regió d'HR per interaccionar amb la regió d'HR de la KLC. La cua d'AtKHC presenta una similitud molt baixa a la pròpia de les KHC i la seqüència no presenta homologia amb regions HR. No obstant, és una seqüència compatible per adoptar una estructura tipus *coiled-coil* (figura 35).



**Fig. 35.** Estructura d'AtKHC. **(A)** Organització modular d'AtKHC. En verd s'indica el domini motor d'unió de quinesina que conté les regions d'interacció a ATP. En groc s'indica la regió *coiled-coil*. **(B)** Seqüència aminoacídica d'AtKHC. Es presenten subratllats els residus que formen part del domini motor, i en negreta els residus que formen part de la regió *coiled-coil*. En blau es mostra el lloc d'unió a ATP. En roig es mostren seqüències implicades en la interacció amb nucleòtids fosfat. La seqüència consens d'unió a ATP és [AG]XXXXGK[ST], i les seqüències consens d'interacció a nucleòtids fosfat són NXXSSRSH i VDLAGSE. La cerca de dominis proteics s'ha realitzat mitjançant les aplicacions PROSITE (domini motor de quinesina i regió d'unió a ATP) i SMART (domini motor de quinesina i regió *coiled-coil*) accessibles des de la interfàç <http://www.expasy.org/>.

Com a primera aproximació per a esbrinar si AtKLC-1 forma part d'un complex quinesina de tipus I en *A. thaliana*, es va estudiar la capacitat d'interacció entre l'AtKLC-1 i l'AtKHC. Els estudis d'interacció foren abordats mitjançant experiments *in vitro* GST pull-down (figura 36). En aquesta anàlisi s'enfrontà l'AtKHC marcada amb  $^{35}\text{S}$  per traducció *in vitro* amb una matriu que contenia GST:AtKLC-1; amb els 200 primers residus d'AtKLC-1 fusionats a l'extremN-terminal de GST, (1-200)KLC-1:GST; o amb GST (control negatiu). Només les matrius de GST:AtKLC-1 i de (1-200)KLC-1:GST eren capaces de retenir  $^{35}\text{S}$ -KHC encara que la retenció fou més eficient quan l'assaig contenia (1-200)KLC-1:GST. Per tant, s'observa que AtKLC-1 i AtKHC-1 tenen capacitat d'associar-se, i que la regió que conté els 200 primers residus d'AtKLC-1 està implicada en aquesta interacció.





**Fig. 36.** Anàlisi de la interacció entre AtKHC i AtKLC-1 per assaig GST *pull-down*. **(A)** Esquema de l'assaig d'interacció. Les proteïnes de fusió a GST indicades van ser expressades en *E. coli* i retintades en matriu de glutatió-agarosa. La proteïna AtKHC va ser sintetitzada *in vitro* utilitzant <sup>35</sup>S-Metionina com a precursor radiactiu. Els assaigs d'interacció van ser realitzats mitjançant la tècnica de GST *pull-down in vitro*. **(B)** Fluorografia dels productes retintats separats SDS-PAGE. Damunt de cada carril hi ha el nom de la proteïna quimèrica utilitzada en l'assaig. *Total*, extracte de traducció de la proteïna <sup>35</sup>S-AtKHC. **(C)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs. S'indica la massa molecular de les proteïnes quimèriques.

Per tal d'analitzar si aquesta interacció és possible a la planta es van estudiar els patrons d'expressió dels gens que codifiquen per AtKLC-1 i per AtKHC. La base de dades i les eines d'anàlisi de GENEVESTIGATOR (interfaç <http://www.genevestigator.ethz.ch>) permet examinar l'expressió de més de 22.000 gens d'*A. thaliana* utilitzant les dades aportades d'experiments realitzats en el microxip ATH1 d'Affymetrix (Zimmerman et al., 2004). S'utilitzà l'eina GeneAtlas per estudiar el patró d'expressió dels gens que codifiquen per l'AtKLC-1 (*At3g27960*) i per l'AtKHC (*At3g63480*) en els diferents òrgans. L'eina MetaAnalyser permet l'estudi simultani dels perfils d'expressió dels gens en els diferents òrgans, estadis de creixement o sota diversos tipus d'estrès. Mitjançant l'ús d'aquestes aplicacions s'observa que el gen *AtKLC-1* s'expressa sobretot en cèl·lules en suspensió, en radícula, en siliques, arrels laterals i en la zona d'elongació però sobretot en tija i nodes. El gen *AtKHC* s'expressa, en general, a nivells molt baixos. On s'expressa més, però, és en cèl·lules en suspensió i en calls (figura 37). D'altra banda, la isoforma HMGR1L també s'expressa de forma abundant en cèl·lules en suspensió (Leivar, 2003). Aquestes dades han de ser considerades com a preliminars, perquè no han estat contrastades amb resultats experimentals en el laboratori. Tot i això suggereixen que l'expressió

dels tres gens coincideix al mateix tipus cel·lular, concretament en cèl·lules poc diferenciades i sotmeses a activa divisió cel·lular. Aquesta observació reafirma la possibilitat que les proteïnes HMGR1L, AtKLC-1 i AtKHC interaccionen *in vivo*.

Probeset	0 callus	1 cell suspension	2 seedling	21 cotyledons	22 hypocotyl	23 radicle	3 inflorescence	31 flower	311 carpel	312 petal	313 sepal	314 stamen	315 pedicel	32 silique	33 seed	34 stem	35 node	36 shoot apex	37 cauline leaf	4 rosette	41 juvenile leaf	42 adult leaf	43 petiole	44 senescent leaf	5 roots	52 lateral root	55 elongation zone	
256848_at	441	2'370	1'543	1'035	1'711	2'234	1'335	828	444	1'573	1'194	735	868	2'483	385	5'797	5'389	296	714	937	713	1'431	917	233	1'710	2'855	3'589	AIKLC-1
251147_at	452	829	119	69	224	223	157	144	213	63	33	109	79	144	96	88	88	347	22	107	179	70	135	71	157	60	90	AIKHC

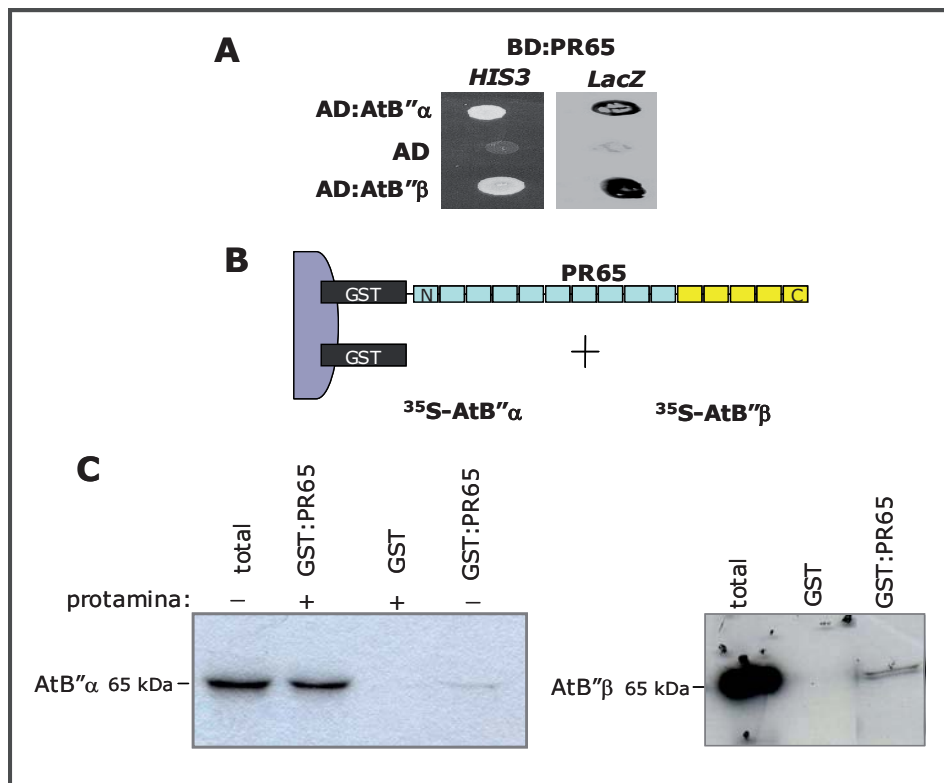
**Fig. 37.** Anàlisi de l'expressió dels gens que codifiquen per AtKLC-1 i AtKHC d'*A. thaliana*. Es mostren els nivells d'expressió en els diferents òrgans de la planta obtinguts amb l'aplicació MetaAnalyser de GENEVESTIGATOR. Els valors numèrics són obtinguts a partir de les dades experimentals processades amb el software Affymetrix MASS 5.0 (Liu et al., 2002) i són directament proporcionals als nivells d'expressió. Els perfils d'expressió dels gens estan representats per una gradació de color blau-blanc. Per cada gen, blau fosc significa expressió màxima i blanc absència d'expressió. *Probeset* és la sonda utilitzada en l'experiment. *AtKLC-1* és *At3g27960*; *AtKHC* és *At3g63480*.

## 2.2.- La família AtB''

### 2.2.1.- Caracterització, anàlisi filogenètic i patró d'expressió

Les isoformes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  s'han identificat recentment com a proteïnes que interaccionen específicament amb la regió N-terminal de l'HMGR1 (Leivar, 2003). Aquestes proteïnes s'uneixen a l'HMGR1L i a l'HMGR1S, però no a l'HMGR2. La cerca en bases de dades va revelar que aquestes proteïnes són homòlogues a la subunitat reguladora B'' de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) i que en *A. thaliana* existeixen cinc isoformes d'aquesta proteïna. A més a més, mitjançant una estratègia de doble híbrid, es va demostrar que tant AtB'' $\alpha$  com AtB'' $\beta$  interaccionen amb la PR65, que indica que poden formar part del complex PP2A. En aquest treball s'ha continuat amb la caracterització estructural i funcional de la família de proteïnes AtB''.

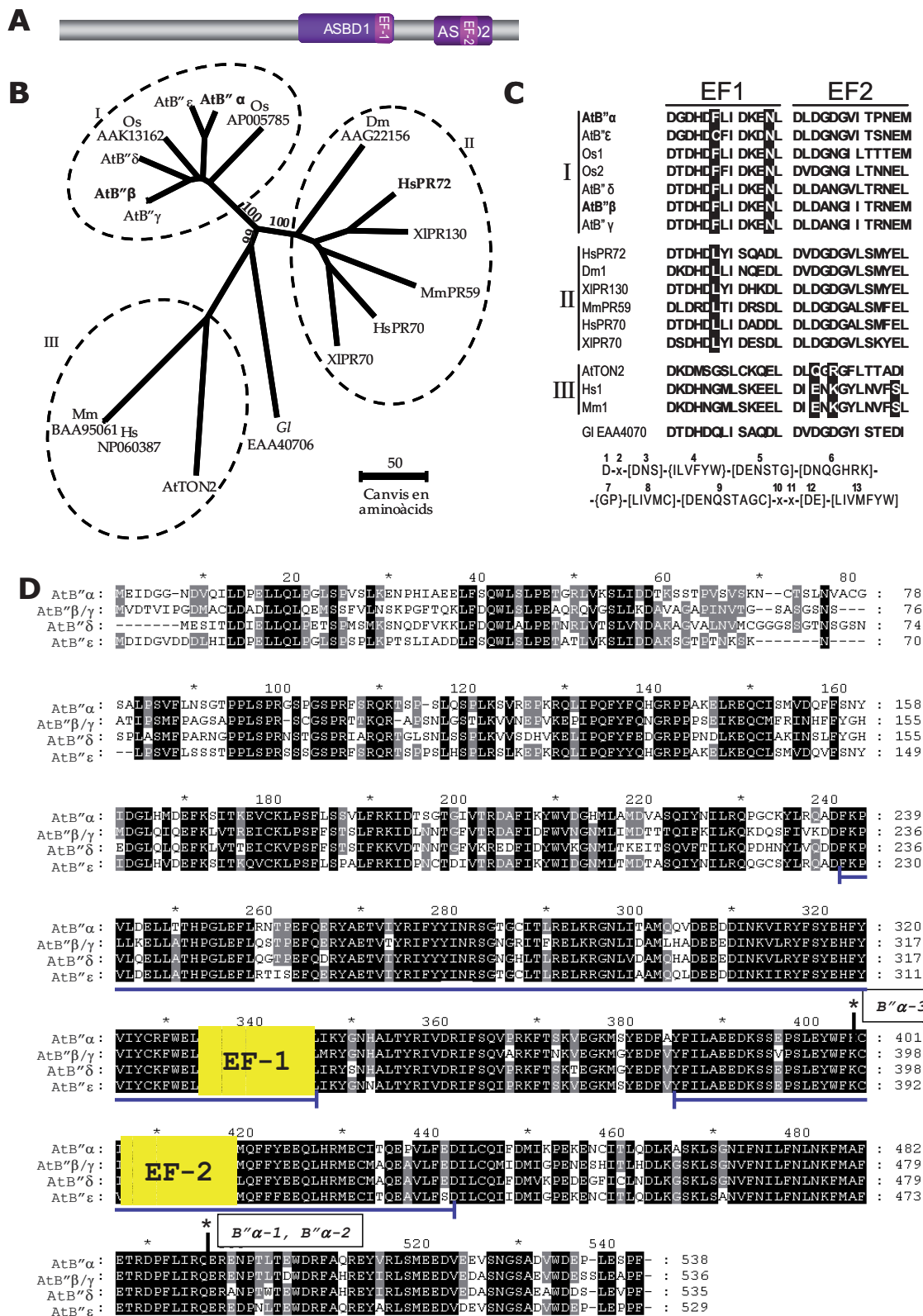
En primer lloc es va comprovar que AtB'' $\alpha$  pot interaccionar amb altres isoformes de la PR65. En la figura 38A es mostra la interacció positiva per doble híbrid d'AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  amb la isoforma PDF1 de PR65, tal com va ser reportat anteriorment (Leivar, 2003). A més, en la figura 38C es mostra la interacció positiva d'AtB'' $\alpha$  amb la isoforma PDF2 de la PR65. En aquest cas, es van realitzar assaigs *in vitro* de GST pull-down. Es pot observar que la presència de protamina (proteïna molt bàsica de mida petita) estimula notablement la interacció. Aquest factor va ser testat perquè s'havia observat que estimula l'activitat PP2A de mamífer (Waelkens et al., 1987).



**Fig. 38.** Anàlisi de la interacció entre la PR65 i les isoformes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$ . **(A)** Anàlisi mitjançant doble híbrid de la interacció d'AtB'' $\alpha$  i d'AtB'' $\beta$  amb PR65 (isoforma PDF1) en la soca de llevat Y190. La proteïna BD:PR65 es va enfrontar al domini d'unió a DNA del factor de transcripció GAL4 (AD) i a les proteïnes quimèriques AD:AtB'' $\alpha$ , AD:AtB'' $\beta$ . S'analitzà la interacció per creixement en medi sense histidina (*HIS3*) i per assaig enzimàtic  $\beta$ -galactosidasa (*LacZ*). **(B)** Esquema de l'assaig d'interacció. Les proteïnes GST i GST:PR65 (isoforma PDF2) van ser expressades a *E. coli* i retintades en matrius de glutatió-agarosa. Les proteïnes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  van ser sintetitzades *in vitro* utilitzant  $^{35}\text{S}$ -Metionina com a precursor radiactiu. Els assaigs d'interacció van ser realitzats mitjançant la tècnica de GST *pull-down in vitro*. **(C)** Fluorografia dels productes retintats separats per SDS-PAGE. Es mostra la presència o absència de protamina durant l'assaig d'interacció amb AtB'' $\alpha$ . *Total*, extracte de traducció de la proteïna marcada utilitzada per la interacció. La fluorografia on es mostra la interacció amb AtB'' $\beta$  és extreta de la figura 42C, part inferior.

S'ha aprofundit en l'anàlisi filogenètic de les subunitats B'' de la PP2A en base a un estudi més detallat de la seqüència. En l'estructura primària de les subunitats reguladores de la PP2A de tipus B (B, B', B'') s'han identificat regions (ASBD1 i ASBD2) necessàries per a la interacció amb la PR65 (figura 39A). Aquestes seqüències estan conservades en les variants B'' d'*A. thaliana*. Cadascuna de les regions ASBD conté un motiu d'unió a calci del tipus *EF-Hand* (figura 39A i D). Els motius *EF-Hand* estan formats per una seqüència conservada de dotze residus (*loop* central) flanquejat per seqüències menys conservades que adopten una estructura d'hèlix  $\alpha$  (Lewit-Bentley and Rety, 2000). La unió d'ions de calci al *loop* central determina un canvi conformacional que es transmet a la resta de la proteïna. El conjunt de les regions ASBD1 i ASBD2 i els motius *EF-Hand* constitueixen un nucli que és la part més conservada de la seqüència de subunitats B''. En aquesta part de la proteïna HsPR72 (isoforma B''

humana, residus 192-403) i AtB'' $\alpha$  (residus 232-442) tenen una identitat del 52,4% (similitud del 73,6%). Els extrems de la proteïna (regions N i C-terminal) estan menys conservades.

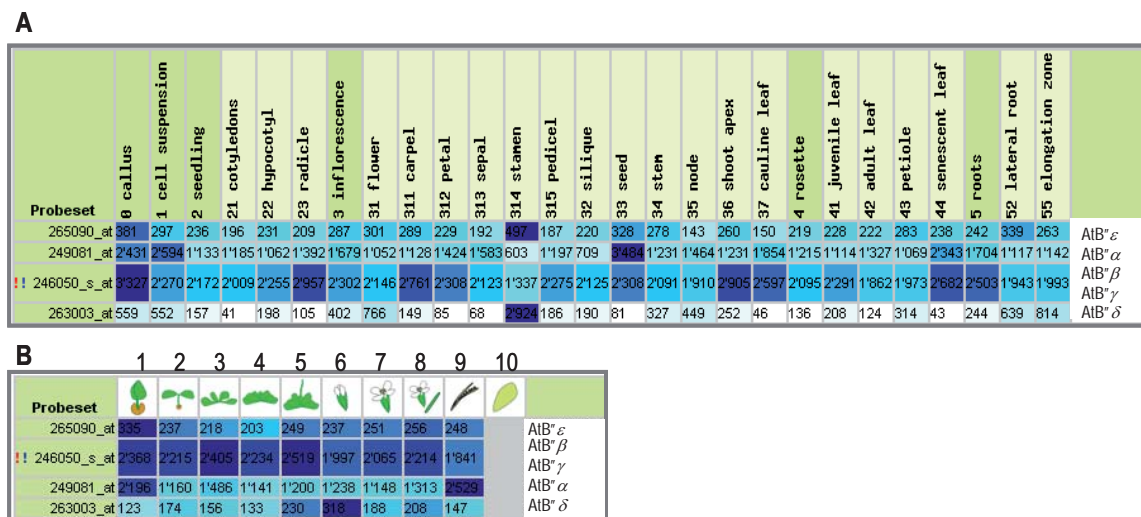


**Fig. 39.** Estructura primària i anàlisi filogenètic de les isoformes de subunitat B'' de la PP2A. **(A)** Esquema de la proteïna B'' on es mostra la seva organització modular. *ASBD1* i *ASBD2*, regió implicada en la unió a la subunitat A número 1 i número 2, respectivament. *EF-1* i *EF-2*, motiu *EF-hand* número 1 i número 2, respectivament. **(B)** Arbre filogenètic on es defineixen els tres grups de les subunitats B'' de PP2A. La seqüència de *Giardia lamblia* (protista que representa el llinatge més primerenc d'eucariotes) fou escollida com a referència. Els punts de ramificació que donen lloc als tres grups va ser altament significatiu. Van ocórrer en un 99 o 100% de 1.000 rèpliques segons el test *bootstrap*, tal com s'indica. Les dues primeres lletres del nom de la seqüència es refereixen a l'organisme a què pertanyen. At, *Arabidopsis thaliana*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gl, *Giardia lamblia*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Os, *Oryza sativa*; Xl, *Xenopus laevis*. **(C)** Comparació dels motius *EF-hand*. Les seqüències que corresponen als dos motius *EF-hand* de les subunitats B'' es van alinear i comparar amb el motiu *EF-Hand* consens mostrada al peu (entrada PS00018 del PROSITE). Els residus que no segueixen el consens són representats en blanc sobre fons negre. Les seqüències B'' s'han classificat en tres grups, d'acord amb la divergència d'EF-1 i EF-2 al consens. **(D)** Alineament múltiple de les isoformes de la subunitat B'' d'*A. thaliana*. En negre es mostra la zona conservada en l'alineament de les proteïnes. Estan indicats ombrejats en groc els dos motius *EF-hand* (EF-1 i EF-2). Amb un asterisc s'indica el punt on queda interrompuda la seqüència proteica AtB'' $\alpha$  en els mutants insercionals B'' $\alpha$ -1, B'' $\alpha$ -2 i B'' $\alpha$ -3 (vegeu apartat 3.3.1 de Resultats).

La família de subunitats B'' d'*A. thaliana* (AtB'') està altament conservada (figures 39B i D). Aquesta família té cinc membres codificats pels següents gens: AtB'' $\alpha$  (At5g44090), AtB'' $\beta$  (At5g28850), AtB'' $\gamma$  (At5g28900), AtB'' $\delta$  (At1g54450) i AtB'' $\epsilon$  (At1g03960). Un 58% dels residus aminoacídics són idèntics en les cinc proteïnes. Les seqüències més distants en el grup (AtB'' $\delta$  i AtB'' $\epsilon$ ) conserven una identitat del 65,8% (78,3% de similitud), mentre que AtB'' $\beta$  i AtB'' $\gamma$  són idèntiques en un 99,6%. En aquest darrer cas, els gens corresponents (At5g28850 i At5g28900 respectivament) estan separats per tan sols 44 kb en el cromosoma 5 i són pràcticament idèntics. Sens dubte deriven d'una duplicació recent. Les dues isoformes que interaccionen amb l'HMGR1, AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$ , són idèntiques en un 68,4% (80,3% de similitud), és a dir, gairebé tan divergides com AtB'' $\delta$  i AtB'' $\epsilon$  que són la parella més distant. Per tant, no seria sorprenent que les cinc proteïnes AtB'' interaccionessin amb l'HMGR.

Les cinc variants d'AtB'' estan representades per seqüències de cDNA, en la base de dades del GENE BANK (accessible des de la interfàcia <http://www.arabidopsis.org>), cosa que indica que totes elles s'expressen. No obstant, cal matisar que no és possible distingir entre els cDNAs d'AtB'' $\beta$  i d'AtB'' $\gamma$  (seqüències parcials) per la identitat existent entre els gens corresponents. Els nivells d'expressió relatius poden ser estimats indirectament a partir del nombre d'*expressed sequence tag* (EST) de cada gen. Per aquest criteri, es dedueix que AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta/\gamma$  tenen una distribució ubiqüa i són els d'expressió majoritària (14 i 28 seqüències EST, respectivament). Per examinar més detalladament els patrons d'expressió dels gens AtB'' es van utilitzar les eines GeneAtlas, GeneChronologer (expressió en els diferents estadis de desenvolupament) i MetaAnalyser de GENEVESTIGATOR. Cal tenir en compte que en aquests estudis no es podia diferenciar el patró d'expressió de AtB'' $\beta$  i AtB'' $\gamma$  per la seva gran homologia ja que la sonda utilitzada les reconeix per igual (figura 40). S'observa que tant l'expressió d'AtB'' $\alpha$  com la d'AtB'' $\beta/AtB''\gamma$  és molt superior a la de les altres isoformes i que tenen una expressió bastant ubiqüa. AtB'' $\alpha$  s'expressa sobretot en cèl·lules no diferenciades que es divideixen activament (calls i cèl·lules en suspensió), en llavors i en fulles senescentes. AtB'' $\beta/AtB''\gamma$  s'expressen de forma abundant en tots els teixits. On s'expressen menys, coincidint amb AtB'' $\alpha$  és en estams. AtB'' $\alpha$  s'expressa en tots els estadis de creixement i de forma més abundant durant la germinació i quan entra

en senescència un cop finalitzada l'etapa reproductiva. *AtB''β/AtB''γ* s'expressa de forma abundant durant tots els estadis de creixement. Pel que fa a *AtB''δ* tot i tenir una expressió molt baixa en tots els òrgans i en tots els estadis de desenvolupament, s'expressa de forma molt important en estams, on a més, és la forma majoritària en aquest òrgan, suggerint una especificitat de funció en aquest teixit. Finalment, *AtB''ε* s'expressa molt poc en tots els teixits i en tots els estadis de desenvolupament.



**Fig. 40.** Anàlisi de l'expressió dels gens que codifiquen per les cinc isoformes B'' d'*A. thaliana*. **(A)** Nivells d'expressió en els diferents òrgans de la planta. **(B)** Nivells d'expressió en els diferents estadis de desenvolupament definits com: 1 (fins a 5,9 dies), germinació; 2 (fins a 13,9 dies), 3 (fins a 17,9 dies), 4 (fins a 20,9 dies), desenvolupament i creixement de la roseta basal; 5 (fins a 24,9 dies), emergència de la tija; 6 (fins a 28,9 dies) emergència de les inflorescències; 7 (fins a 35,9 dies), producció de flors; 8 (fins a 44,9 dies), producció de siliques; 9 (fins a 50 dies) finalitzada la producció de flors i les siliques es comencen a obrir. Els valors numèrics són obtinguts a partir de les dades experimentals processades amb el software Affymetrix MASS 5.0 (Liu et al., 2002) i són directament proporcionals als nivells d'expressió. Els perfils d'expressió dels gens estan representats per una gradació de color blau-blanc. Per cada gen, blau fosc significa expressió màxima i blanc absència d'expressió. *Probeset* és la sonda utilitzada en l'experiment. *AtB''α* és *At5g44090*, *AtB''β* és *At5g28850*, *AtB''γ* és *At5g28900*, *AtB''ε* és *At1g03960*, *AtB''δ* és *At1g54450*.

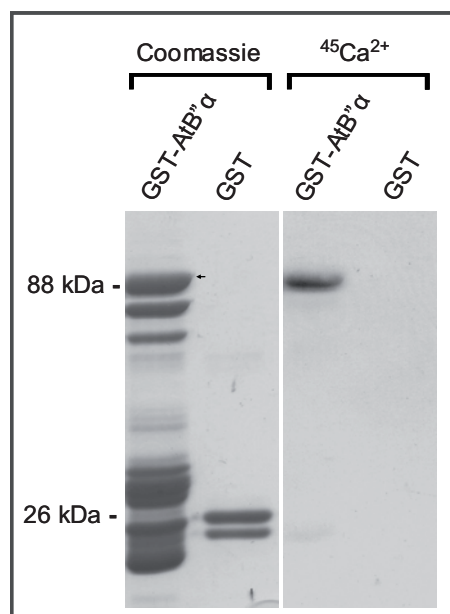
Les cinc seqüències d'*A. thaliana*, juntament amb altres dues d'*Oryza sativa*, formen un *cluster* compacte, pròxim a un altre *cluster* més lax de seqüència B'' d'animals (figura 39B). Més allunyada, però clarament emparentada, es troba la proteïna TON2 d'*A. thaliana* que està implicada en l'organització del citoesquelet cortical (Camilleri et al., 2002). La proteïna TON2 defineix una nova classe de subunitat B'' de PP2A, on s'inclouen seqüències d'animals i de plantes. És interessant observar que l'eucariota primitiu *Giardia lamblia* té homòlegs de la subunitat B'' de la PP2A (figura 39B) a pesar de que aquests són absents en llevat (Janssens and Goris, 2001). Això podria indicar que la subunitat B'' de PP2A existia en les primeres cèl·lules eucariotes, però desaparegueren en la línia evolutiva que va donar lloc als fongs.

La presència de dos motius *EF-Hand* (EF-1 i EF-2) és un element estructural característic de la subunitat B'' de PP2A (figura 39A). En la seqüència d'*A. thaliana* i d'*O. sativa* mostrats en la figura 39C

i en totes les seqüències EST de plantes disponibles (31 no redundants, no mostrat) el segon motiu *EF-Hand* (EF-2) segueix perfectament la seqüència canònica, mentre que EF-1 divergeix del consens en les posicions 6 i 12. El motiu EF1 de les subunitats B'' d'animals també divergeix del consens en la posició 8. Aquestes variacions també estan presents en motius *EF-Hand* funcionals d'altres proteïnes i demostren una menor afinitat pel catió (Janssens et al., 2003). Si les subunitats B'' es classifiquen d'acord a la divergència dels seus motius *EF-Hand* respecte el consens, s'obtenen tres grups que coincideixen perfectament amb els *clusters* dels anàlisis filogenètics de les seqüències completes (figura 39C, comparar amb la figura 39B). Aquesta conclusió suggereix que les variacions en els motius d'unió a calci ocorregudes durant l'evolució han jugat un paper important en l'especialització funcional de les subclasses de subunitat B''.

### 2.2.1.- Unió de calci i el seu paper en les interaccions

Per a comprovar si les proteïnes AtB'' uneixen calci específicament, es van realitzar dos tipus d'assaigs. En primer lloc, es va examinar si AtB'' $\alpha$  retenia  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Amb aquest propòsit, es van expressar mostres de GST:AtB'' $\alpha$  i GST en *E. coli*, i es van purificar parcialment. Les mostres foren resoltes per SDS-PAGE, transferides a una membrana de PVDF per electrotransferència i incubades amb  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Un gel control va ser tenyit amb Blau de Coomassie. En la figura 41 es pot observar que la banda corresponent a GST:AtB'' $\alpha$  queda marcada amb  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . El marcatge és específic, ja que la resta de proteïnes no retenen el catió. És important assenyalar que la unió a  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  es produeix a pesar de la desnaturalització de la proteïna.

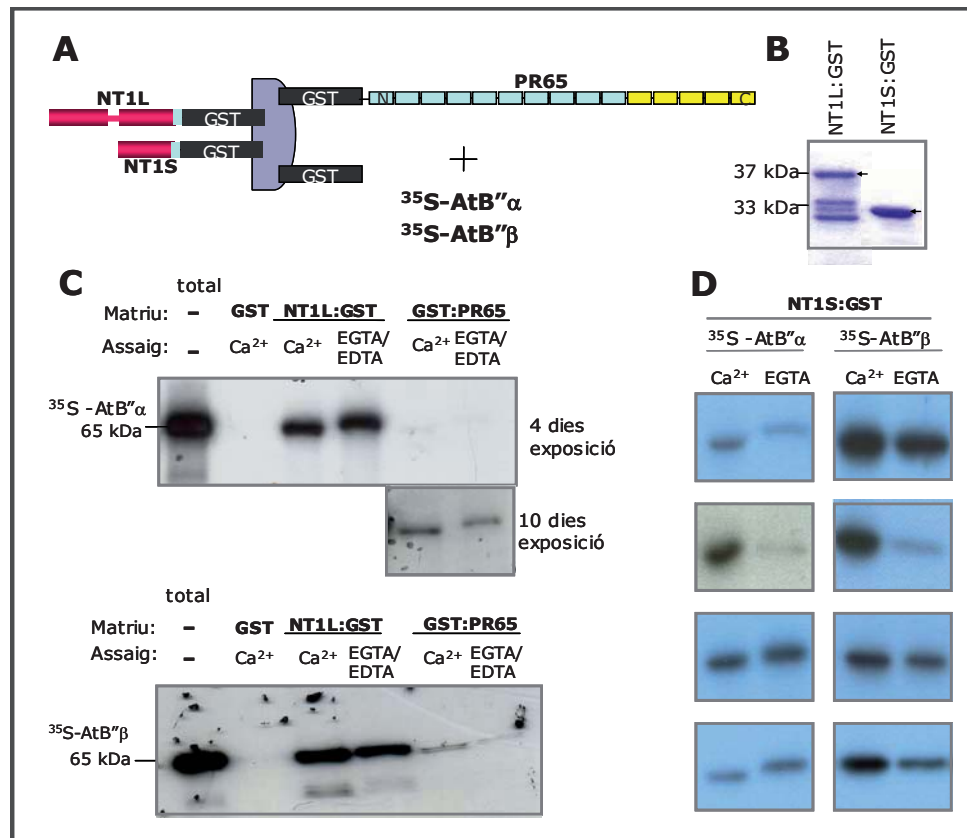


**Fig. 41.** Unió d'AtB'' $\alpha$  a calci. Mostres de GST:AtB'' $\alpha$  o GST parcialment purificades foren separades per SDS-PAGE (12,5%) per duplicat en dos gels paral·lels. Una de les rèpliques es va tenyir amb Blau de Coomassie (esquerra) i l'altra va ser electrotransferida a una membrana de PVDF (dreta). La membrana va ser incubada amb  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  seguint el protocol descrit (Maruyama et al., 1984) i exposada durant 18 h per autoradiografia. Amb una fletxa s'indica la proteïna quimèrica GST:AtB'' $\alpha$  en el gel tenyit amb Blau de Coomassie.

La segona aproximació per a detectar unió de la proteïna a calci es fonamenta amb el canvi conformacional induït per aquest. En ocasions, aquest canvi fa variar la mobilitat electroforètica, que acostuma a ser major en presència del catió (Klee et al., 1979). En els assaigs no tan sols s'estudià la mobilitat electroforètica, sinó també l'efecte del calci en la interacció d'AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  amb altres proteïnes (experimentes de GST *pull-down*). Concretament, s'analitzà la retenció de  $^{35}\text{S}$ -AtB'' $\alpha$  i  $^{35}\text{S}$ -AtB'' $\beta$  amb les matrius de GST, GST:PR65 (isoforma PDF2) i les que contenen les regions N-terminal d'HMGR1 (NT1L:GST, NT1S:GST) en presència de  $\text{CaCl}_2$  o bé, d'EDTA i d'EGTA (figura 42). Pel que fa a l'eficiència de la interacció, es pot observar que tant AtB'' $\alpha$  com AtB'' $\beta$  són retingudes més eficientment en la matriu de NT1L:GST que en la de GST:PR65 (figura 42C, gels superior i inferior). En aquests assaigs no s'utilitzà protamina per intensificar la interacció ja que precipita amb calci. Pel que fa a la mobilitat electroforètica, es pot afirmar que es produeixen diferències molt clares amb AtB'' $\alpha$ , tal i com s'observa en els assaigs amb NT1L:GST i amb GST:PR65 en la figura 42C (gel superior) i en els assaigs amb NT1S:GST en la figura 42D (part esquerra). En el cas d'AtB'' $\beta$ , els canvis de mobilitat electroforètica són amb prou feines apreciables (figura 42C, gel inferior i 42D, part dreta) però en cas d'existir, es produeixen en el sentit esperat, o sigui major mobilitat en presència del catió. Finalment, pel que fa a l'efecte del calci en la interacció, els resultats també són diferents per les dues isoformes AtB'', però en aquest cas el calci promou clarament la interacció d'AtB'' $\beta$  amb NT1S (figura 42D, part dreta), amb NT1L o amb PR65 (figura 42C, gel inferior). La tendència és menys clara en el cas d'AtB'' $\alpha$ , encara que en aquest cas sembla que el calci també promou la interacció (figura 46C, gel superior i 46D, part esquerra).

En resum i com a conclusió d'aquest treball, s'indica que tant AtB'' $\alpha$  com AtB'' $\beta$  són capaces d'unir calci, i que en presència de calci s'observa un lleuger augment en la intensitat de la interacció amb les matrius de GST:PR65, de NT1L:GST i de NT1S:GST.





**Fig. 42.** Efecte del calci en la interacció d'AtB $^{\alpha}$  o AtB $^{\beta}$  amb la PR65 i les regions N-terminal de l'HMGR1 (NT1S i NT1L). **(A)** Esquema de l'assaig d'interacció. Les proteïnes de fusió van ser expressades en *E. coli* i retingudes en matrius de glutatió-agarosa. Les proteïnes AtB $^{\alpha}$  i AtB $^{\beta}$  van ser sintetitzades *in vitro* utilitzant  $^{35}\text{S}$ -Metionina com a precursor radiactiu. Els assaigs d'interacció van ser realitzats mitjançant la tècnica de GST pull-down *in vitro*. **(B)** Gel tenyit amb Blau de Coomassie on es mostren les fusions a GST utilitzades en els assaigs. S'indica amb una fletxa la banda corresponent a NT1L:GST o a NT1S:GST. **(C)** Fluorografia dels productes retinguts separats per SDS-PAGE de l'assaig d'interacció entre les matrius de GST, de NT1L:GST o de GST:PR65 amb  $^{35}\text{S-AtB}^{\alpha}$  (part superior) o amb  $^{35}\text{S-AtB}^{\beta}$  (part inferior). Total, extracte de traducció de la proteïna marcada utilitzada per la interacció. **(D)** Fluorografia dels productes retinguts separats per SDS-PAGE de l'assaig d'interacció entre la matriu de NT1S:GST amb  $^{35}\text{S-AtB}^{\alpha}$  (esquerra) o amb  $^{35}\text{S-AtB}^{\beta}$  (dreta). S'indica la presència de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o dels quelants EGTA/EDTA durant l'assaig d'interacció.

### 3.- CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE L'HMGR

En un treball anterior es van identificar dues isoformes de la subunitat B'' de la PP2A, l'AtB'' $\alpha$  i l'AtB'' $\beta$ , que interaccionen amb l'HMGR1S i l'HMGR1L (Leivar, 2003) i en aquest treball (apartat 2.2.1 de Resultats) s'ha comprovat que l'AtB'' $\alpha$  i l'AtB'' $\beta$  uneixen calci específicament. Aquests resultats plantegen la possibilitat de què l'HMGR d'*A. thaliana* estigui regulada per la PP2A i/o els nivells de calci. L'AtB'' $\alpha$  i l'AtB'' $\beta$  podrien dur a terme un paper mediador en aquest control.

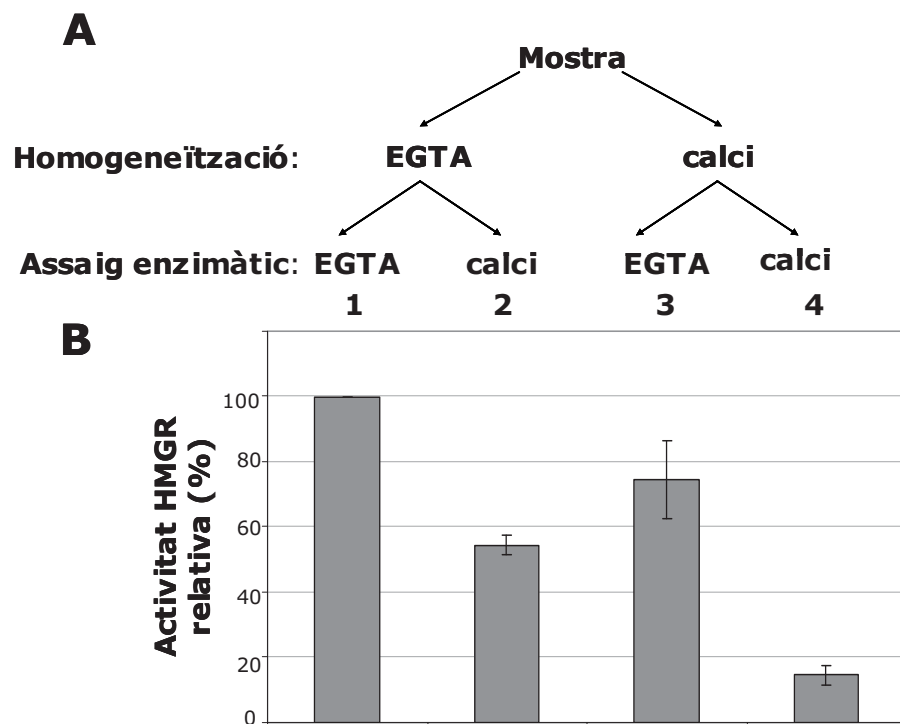
#### 3.1.- Efecte del calci

La mesura de l'activitat HMGR en extractes de planta comporta dues etapes ben diferenciades: l'obtenció de la mostra en un medi tamponat adequat (procés d'homogeneïtzació) i, la seva mescla i incubació amb la resta de components de la reacció (assaig enzimàtic) (apartat 9 de Materials i Mètodes). Per investigar el possible paper del calci en el control de l'HMGR es va estudiar el seu efecte en cadascuna de les dues etapes. Es va homogeneïtzar la mostra vegetal en presència de calci o del quelant de calci, EGTA. Els homogenats crus obtinguts, es van sotmetre a la mesura d'activitat enzimàtica en presència bé d'un excés de calci, bé d'un excés de quelant per tal de contrarestar l'efecte del component utilitzat anteriorment. S'obtingueren així quatre situacions experimentals que s'esquematitzen a la figura 43A i que són: homogeneïtzació i assaig enzimàtic en presència d'EGTA, homogeneïtzació en presència d'EGTA i assaig en presència de calci, homogeneïtzació en presència de calci i assaig en presència d'EGTA i finalment, homogeneïtzació i assaig en presència de calci. Els extractes es van preparar a partir de plantes d'ecotips silvestres d'*A. thaliana*, crescudes durant 3-4 setmanes a règim de dia curt (8h llum/16h foscor). El material vegetal va ser recollit en finalitzar el període de foscor, moment on l'activitat HMGR és elevada. S'ha comprovat que en aquestes condicions l'activitat HMGR deriva majoritàriament del gen *hmg1* (apartat 1.1.3 de Resultats).

L'assaig d'activitat HMGR presenta una gran variabilitat intrínseca conseqüència de múltiples factors no controlables, derivats entre d'altres, de la varietat o de l'estat de la planta. En aquests experiments el rang de variabilitat en la mesura d'activitat específica fou entre 5,83 i 12,12 pmol HMG-CoA/min \*mg. No obstant, en tots experiments realitzats els valors màxims d'activitat es van produir quan tant l'homogeneïtzació com l'assaig enzimàtic es van dur a terme en presència del quelant (figura 43B, columna 1). Les mesures d'activitat específica obtingudes en la resta de situacions experimentals es van normalitzar respecte aquest valor màxim. Els valors mínims s'obtingueren quan l'homogeneïtzació i l'assaig d'activitat es feren en presència d'un excés de calci (figura 43B, columna 4). En aquestes condicions s'arribà a obtenir al voltant d'un 15% respecte al valor màxim d'activitat. Es pot concloure que l'addició de calci en extractes crus d'*A. thaliana* té un efecte inhibitori molt notable sobre l'activitat HMGR. Aquesta observació està en concordança amb la descrita en plàntules de pèsol on concentracions nanomolars de calci causaven una inhibició reversible de fins al 97% de l'activitat HMGR (Russell et al., 1985). Es va proposar que en aquest sistema l'efecte inhibitori estaria mediat per un receptor de calci diferent a la calmodulina i de naturalesa desconeguda.

Quan l'homogeneïtzació es realitzà en presència d'EGTA i la mesura amb excés de calci, s'obtingué una inhibició del 46% (l'activitat romanent fou d'un 54%, figura 43B, columna 2). En aquestes circumstàncies (situació experimental 2) l'efecte inhibitori del calci en la mesura no era tan dràstic com en les condicions on el catió era present des de l'homogeneïtzació (situació experimental 4). Una possible interpretació és que l'EGTA podria haver afavorit la desagregació de complexos formats per l'HMGR i el/s factor/s sensors de calci causants d'aquesta repressió. En separar l'HMGR del seu entorn, la proteïna ja no respondria a la modulació instigada per calci.

Quan l'homogeneïtzació es realitzà en presència de calci, i la mesura amb un excés d'EGTA, s'obtingué al voltant d'un 75% de l'activitat respecte el valor màxim (figura 43B, columna 3). Per tant, el fet d'utilitzar calci en l'homogeneïtzació provoca que una part de l'HMGR quedi inaccessible durant l'assaig, o bé inhibida de forma irreversible. A més, en aquest cas el sistema roman més sensible a l'efecte inhibitori del calci durant l'assaig; la columna 4 és un 20 % respecte la columna 3, mentre que la columna 2 és un 54 % respecte la columna 1. Aquest fet és consistent amb la hipòtesi que la presència de calci durant l'homogeneïtzació podria haver preservat els complexos que contindrien l'HMGR i el/s factor/ sensor de calci responsables d'aquesta inhibició.



**Fig. 43.** Efecte del calci en la mesura d'activitat HMGR. **(A)** Esquema del disseny experimental. Es van aplicar quatre condicions diferents. **(B)** Activitat HMGR relativa (%). Les mesures procedeixen de tres experiments independents realitzats en extractes de plantes de diferents varietats silvestres de 3-4 setmanes crescudes en condicions de dia curt. Els valors d'activitat específica de cada situació experimental es van normalitzar respecte la mesura obtinguda en la situació experimental 1 (presència d'EGTA en l'homogeneïtzació i en l'assaig enzimàtic). Aquests valors (pmol HMG-CoA/min\*mg) van ser de 12,12 (varietat Columbia 0), 7,10 (varietat Columbia 7) i de 5,83 (varietat C24). S'han representat les mitjanes  $\pm$  els errors estàndards de les activitats relatives.

### 3.2.- Paper del domini N-terminal

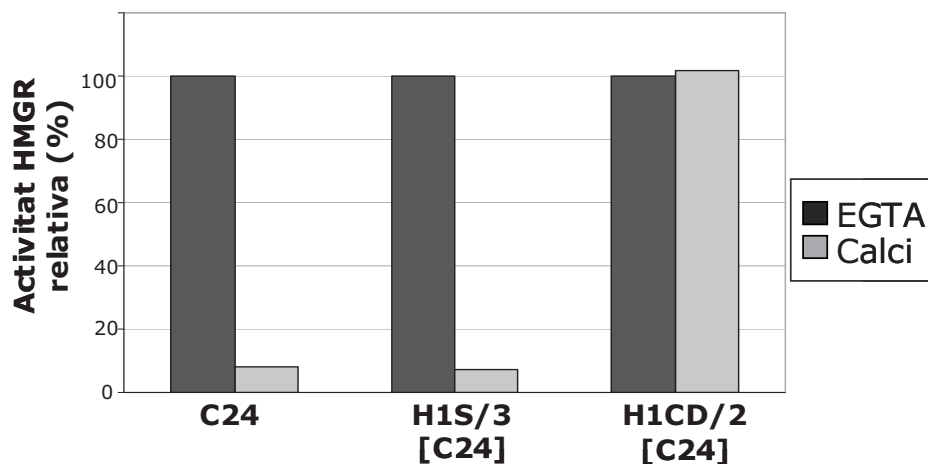
El fet que l'HMGR d'*A. thaliana* estigui inhibida per calci és consistent amb la hipòtesi inicial que l'AtB<sup>α</sup> i l'AtB<sup>β</sup> tenen un paper regulador sobre l'enzim. Aquestes proteïnes uneixen calci específicament i també interaccionen amb la regió N-terminal de l'HMGR1S i de l'HMGR1L. Dins d'aquest context va semblar interessant comprovar si el domini N-terminal de l'HMGR (que inclou la regió N-terminal) és necessari pel control de l'enzim provocat per calci. Per emprendre aquesta qüestió, es van preparar extractes de plantes que sobreexpressen l'HMGR1S (línia H1S/3 [C24]) o del domini catalític de l'enzim (línia H1CD/2 [C24]) (González, 2002). D'acord amb estudis previs es va comprovar que l'expressió dels transgens determina un notable augment de l'activitat (González, 2002; Leivar et al., 2005). Per tant, la major part de l'activitat HMGR detectada en les línies transgèniques és deguda a l'expressió ectòpica de l'HMGR1S o del seu domini catalític. Els valors d'activitat específica (pmol HMG-CoA/min\*mg) que es van obtenir foren de  $2,87 \pm 0,35$  en plantes de l'ecotip silvestre parental C24, de  $6,50 \pm 0,80$  en plantes de l'estirp H1S/3 [C24], i de  $16777,32 \pm 1269,10$  en plantes de l'estirp H1CD/2 [C24] (taula 7). En les plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S s'observaren increments entre dues i tres vegades respecte les plantes de la varietat parental C24, valors comparables als obtinguts en treballs anteriors (González, 2002; Leivar, 2003; Manzano et al., 2004). En el cas de les plantes que sobreexpressen el domini catalític, l'increment resultà de més de 6.000 vegades. Els valors obtinguts d'activitat específica en la línia H1CD/2 superaren en escreix els descrits en els treballs anteriors (González, 2002; Leivar, 2003; Manzano et al., 2004), on s'havien observat augments d'activitat de fins a 10 vegades respecte l'obtinguda en plantes parentals silvestres.

Els extractes de la línia H1CD/2 havien estat diluïts 1/500 amb tampó d'homogeneïtzació per tal de no saturar el sistema d'assaig i obtenir valors dins el rang lineal per al càlcul d'activitat. Quan els extractes de la línia C24 no transformada van ser sotmesos al mateix procediment (dilució 1/500 amb tampó) l'activitat detectada va ser nul·la (taula 7). No sembla, doncs, que l'elevada activitat detectada al diluir l'extracte H1CD/2 sigui deguda a la dilució o inactivació d'un hipotètic inhibidor de l'HMGR. Per tal de comprovar si aquest tipus d'inhibidor podria estar present a les plantes C24 no transformades, es van fer dilucions 1/500 de l'extracte H1CD/2 amb l'extracte C24. L'activitat detectada en aquest cas va ser sensiblement menor que la mesurada quan la mostra H1CD/2 havia estat diluïda amb tampó, però encara molt superior a la detectada en els extractes de C24 (més de 2.000 vegades). A més, l'activitat HMGR dels extractes H1CD/2 s'inhibeix quasi completament amb mevinolina 12,5 μM (queda un 0,008% d'activitat) (taula 7). Tots aquests resultats demostren que les plantes H1CD/2 tenen nivells d'activitat HMGR molt superiors als de les plantes H1S/3 i als de la corresponent línia parental, la qual cosa posa de manifest la importància del domini N-terminal (que inclou la regió N-terminal citosòlica, i el domini de membrana) pel manteniment de l'activitat HMGR a uns determinats rangs i que aquesta zona actua com a repressora de l'activitat.

**Taula 7.** Activitat HMGR en les plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S (H1S/3) i en les plantes que sobreexpressen el seu domini catalític (H1CD/2). Es mostren les dades obtingudes d'activitat específica de les línies indicades (mitjana  $\pm$  error estàndard), l'increment d'activitat que mostren les línies respecte la parental C24 i les condicions en què s'han fet les mesures. En el darrer cas, s'utilitza una concentració de mevinolina 12,5  $\mu$ M.

<b>Línia analitzada</b>	<b>Dilució</b>	<b>Activitat específica</b> (pmol HMG-CoA/min*mg)	<b>Increment activitat</b> (nombre de vegades respecte C24)
<b>C24</b>		2,87 $\pm$ 0,35	
<b>C24</b>	1/500 (tampó)	0	
<b>H1S/3</b>		6,50 $\pm$ 0,80	2,26
<b>H1CD/2</b>	1/500 (tampó)	16777,32 $\pm$ 1269,10	5831,35
<b>H1CD/2</b>	1/500 (extracte C24)	6229,85 $\pm$ 1111,68	2165,33
<b>H1CD/2 + mevinolina</b>		1,33 $\pm$ 0,16	

Finalment, es va procedir a analitzar l'efecte del calci sobre l'activitat HMGR en les línies de sobreexpressió. Es va testar com la inhibició mediada per calci present durant l'assaig enzimàtic afectava les diferents línies (C24, H1S/3 [C24] i H1CD/2 [C24]) (figura 44). Tant en extractes de plantes C24 no transformades, com en extractes de plantes que sobreexpressen l'HMGR1S (línia H1S/3), es van obtenir valors d'inhibició entre un 92 i un 93%. En canvi, en extractes de la línia de sobreexpressió del domini catalític (H1CD/2), el calci no provocà inhibició. Donat que la major part de l'activitat HMGR detectada en aquestes plantes és derivada de la proteïna sintetitzada pel transgen, es dedueix que l'HMGR1S és capaç de respondre a la repressió per calci, mentre que no ho fa així el domini catalític aïllat. Per tant, la presència de calci no té un efecte directe sobre l'activitat enzimàtica del domini catalític de l'HMGR. Els resultats indiquen que el domini N-terminal d'aquesta proteïna és necessari per a la inhibició produïda pel catió.



**Fig. 44.** Importància del domini N-terminal de l'HMGR en la inhibició per calci. La gràfica mostra l'activitat HMGR relativa en extractes de plantes de les línies indicades de 28 dies crescudes en condicions de dia curt. L'homogeneïtzació va ser realitzada en presència de calci i l'assaig en presència d'EGTA (barres fosques) o en presència de calci (barres clares). En la mesura d'activitat en la línia H1CD/2 es va treballar amb dilucions 1/500 realitzades amb el tampó d'homogeneïtzació. Els valors d'activitat específica es van normalitzar respecte la mesura en presència d'EGTA que expressades en pmol HMG-CoA/min\*mg van ser de 2,77 en plantes C24, de 8,63 en plantes que sobreexpressen l'HMGR1S (línia H1S/3 [C24]), i de 6357,55 en plantes que sobreexpressen el domini catalític (línia H1CD/2 [C24]).

### 3.3.- Paper de la PP2A

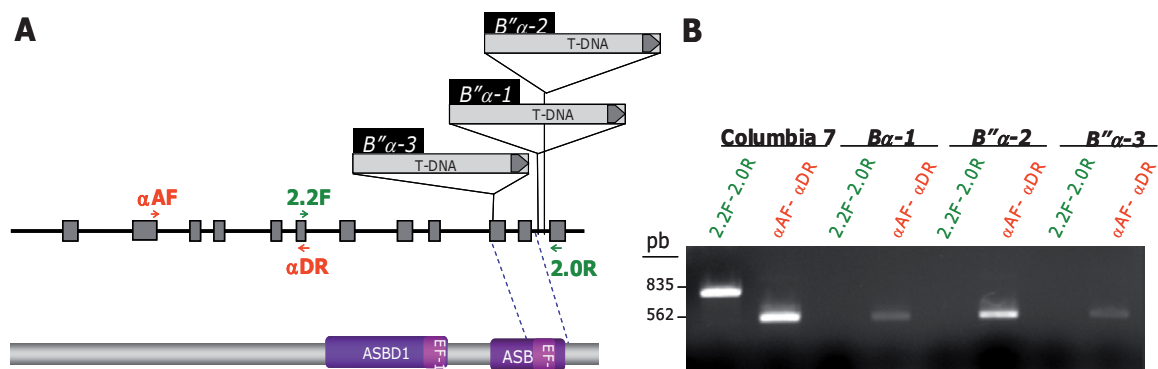
Tant l'HMGR1S com l'HMGR1L interaccionen amb l'AtB'' $\alpha$  i amb l'AtB'' $\beta$ , dues isoformes de subunitat B'' del complex PP2A. A més, l'HMGR1L interacciona amb l'AtKLC-1 que és capaç d'associar-se amb la subunitat A de la PP2A (vegeu apartat 2.1.1 de Resultats). Aquestes dades suggereixen que la PP2A podria jugar un paper important en el control de l'HMGR. Per tal de contrastar aquesta hipòtesi, es va determinar l'activitat HMGR en plantes sotmeses a bloqueig genètic o farmacològic de la PP2A. L'activitat HMGR es va mesurar en extractes d'aquestes plantes en assaigs realitzats *in vitro* (apartats 3.3.1 i 3.3.2). De forma addicional, es va comprovar que les variacions d'activitat HMGR són efectives *in vivo* mitjançant un test de resistència a mevinolina, inhibidor específic d'aquest enzim (apartat 3.3.3).

#### 3.3.1.- Efecte de mutants de la PP2A

Per tal d'analitzar si l'HMGR està sota control el de la PP2A es va procedir a l'estudi de l'activitat HMGR en mutants de la PP2A. Amb aquest propòsit es van caracteritzar tres línies mutants per inserció de T-DNA en el gen *At5g44090* que codifica per la isoforma l'AtB'' $\alpha$  i que, per simplicitat, s'anomena *AtB'' $\alpha$* . Es va començar la caracterització per les línies inicialment disponibles en les col·leccions de mutants d'*A. thaliana*: GARLIC 139\_A03 i GARLIC 76\_G08 que s'anomenaren, respectivament, *B'' $\alpha$ -1* i *B'' $\alpha$ -2*. En les dues estirps el T-DNA està inserit al darrer intró (figura 45A). La regió a 3' del lloc d'inserció de T-DNA correspon a una zona molt conservada entre les isoformes de la subunitat B'' (apartat 2.2 de Resultats, figura 39D). Posteriorment es va obtenir la línia mutant

SALK\_081091, que es va anomenar  $B''\alpha-3$ . En aquest cas, la inserció es dona en l'exó 10, que a nivell de proteïna (figura 39D i 45A) correspon a una de les dues regions necessàries per a la unió amb la subunitat A de la PP2A (ASBD2).

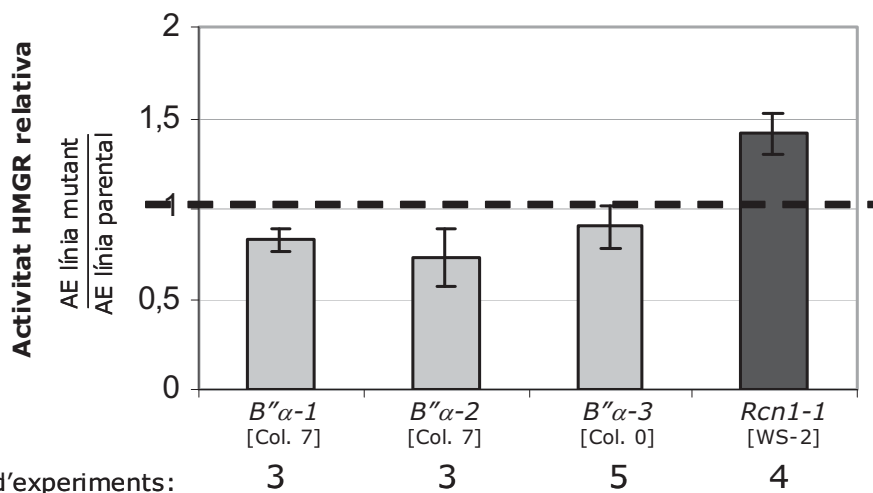
Cap de les mutacions en el gen  $AtB''\alpha$  afectà el fenotip de les plantes. Els individus portadors de la mutació en homozigosi presenten el mateix aspecte i es desenvolupen al mateix ritme que els individus parentals silvestres. Mitjançant la tècnica de RT-PCR es va estudiar la presència de transcrit  $AtB''\alpha$  en les tres línies mutants. Es van emprar dues estratègies d'amplificació per PCR amb l'ús d'encebadors específics per al gen  $AtB''\alpha$ , que no reconeixen altres gens  $AtB''$  (figura 49B). En la primera d'elles s'utilitzen els encebadors 2.2F i 2.0R que hibriden, respectivament, a 5' i a 3' del lloc d'inserció. En aquest cas no es donà amplificació del transcrit que confirma que el mutants havien estat ben genotipats i que la inserció impedia la síntesi d'un transcrit complet. En la segona s'aplicaren dos encebadors que hibriden a 5' del lloc d'inserció,  $\alpha AF$  i  $\alpha DR$ . En aquest cas sí s'amplificà la regió del cDNA compresa entre els dos oligonucleòtids, cosa que indica que en els mutants s'acumulen transcrits corresponents a aquesta regió. Es desconeix si es sintetitza alguna proteïna a partir d'aquests transcrits o si en cas de sintetitzar-se el producte truncat és estable i funcional. No obstant, les versions proteiques més extenses sintetitzades, quedarien truncades en la posició definida pel lloc d'inserció del T-DNA (vegeu figura 39D i figura 45A). En el cas del mutant  $B''\alpha-3$  la proteïna en qüestió no tindria el segon motiu d'unió a calci,  $EF-2$ .



**Fig. 45.** Estudi de la síntesi del transcrit  $AtB''\alpha$  en les línies  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  o  $B''\alpha-3$ . (A) Organització estructural del gen  $AtB''\alpha$  (esquerra) i de la proteïna  $AtB''\alpha$  (dreta). S'indica el lloc d'inserció del T-DNA en cada línia mutant i la seva correspondència a nivell de proteïna. Les fletxes en els T-DNA mostren la posició del left border i, per tant, l'orientació de la inserció. S'indica la posició on hibriden els encebadors utilitzats en l'estratègia de PCR: 2.2F-2.0R i  $\alpha AF$ - $\alpha DR$ . ASBD1, ASBD2; regió d'interacció amb la subunitat A número 1 i número 2, respectivament. EF-1, EF-2; motiu d'unió a calci número 1 i número 2, respectivament. (B) Patró electroforètic dels productes de RT-PCR corresponent al transcrit  $AtB''\alpha$  en les tres estirps mutants i en la línia silvestre Columbia 7 utilitzant les parelles d'encebadors indicades.

Es va procedir a la determinació de l'activitat enzimàtica l'HMGR en les línies mutants  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$ . Les mesures d'activitat es van realitzar en mostres vegetals homogeneïtzades en presència de calci per tal de preservar els possibles complexos proteics implicats en la regulació de l'HMGR. Els

valors d'activitat específica obtinguts en els extractes de les línies mutants es van normalitzar respecte l'obtingut en les respectives parentals. Es van realitzar tres experiments independents amb extractes de  $B''\alpha-1$ , tres en  $B''\alpha-2$  i cinc en  $B''\alpha-3$  i en tots ells s'observà un lleuger decrement de l'activitat HMGR (figura 46, columnes clares). Les diferències d'activitat respecte la parental són poc notables, al voltant d'un 20%, i en alguns casos es dona força variabilitat (vegeu l'error estàndard de les mesures de l'activitat relativa en  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$ ). Tot i això, les diferències sempre anaven en el mateix sentit, o sigui, una reducció en l'activitat HMGR. Els resultats presentats suggereixen que l'HMGR està modulada per l'AtB'' $\alpha$  però no revelen si la PP2A està implicada en aquest control. De fet es desconeix si les mutacions  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$  afecten l'activitat PP2A. Per comprovar si les variacions d'activitat PP2A afecten l'activitat HMGR es va emprar el mutant insercional *rcn1-1*. En *A. thaliana* hi ha tres gens que codifiquen per la subunitat A de la PP2A. El mutant *rcn1-1* és defectiu en la variant majoritària de subunitat A (proteïna RCN1). Com a conseqüència, aquestes plantes mostren entre un 40 i un 50% menys d'activitat PP2A (Deruère et al., 1999). Procedint de forma anàloga a la descrita en les línies  $B''\alpha$ , es van realitzar quatre experiments independents amb extractes de *rcn1-1* i de la seva línia parental Wassilewskija-2 (WS-2). En aquest cas s'observà un increment en l'activitat HMGR d'un 40% de mitjana (figura 46, columna fosca). Aquesta dada suggereix que la PP2A és un regulador negatiu de l'HMGR, la qual cosa és consistent amb la interacció de l'HMGR amb complexos PP2A mediada per la subunitat AtB'' $\alpha$ . No obstant això, les mutacions d'AtB'' $\alpha$  fan disminuir l'activitat HMGR, en comptes d'augmentar-la. Això podria ser degut a la presència de productes truncats de l'AtB'' $\alpha$  o a la substitució d'aquesta proteïna per altres subunitats B'' en els complexos HMGR-PP2A.



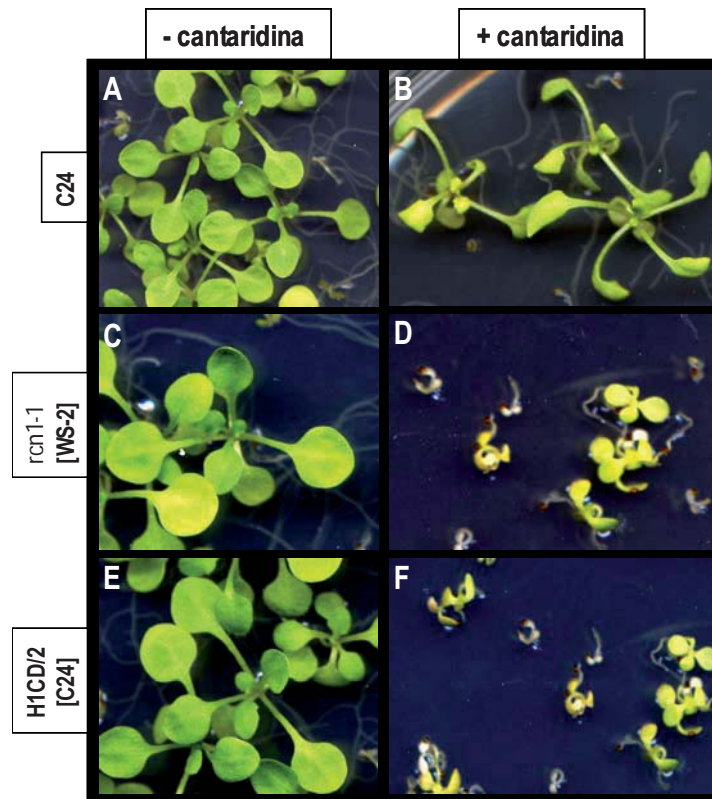
**Fig. 46.** Efecte de mutacions de la PP2A en l'activitat HMGR. Es representa la mitjana  $\pm$  l'error estàndard del nombre de vegades que varia l'activitat HMGR en les línies  $B''\alpha-1$  [Col. 7],  $B''\alpha-2$  [Col. 7],  $B''\alpha-3$  [Col. 0] o *rcn1-1* [WS-2] respecte els seus parentals silvestres indicats entre claudàtors. Les mostres s'obtingueren de plantes de 3-4 setmanes crescudes en condicions de dia curt homogeneïtzades en presència de calci. Es van realitzar quinze experiments en total distribuïts tal com s'indica. Els valors d'activitat específica (pmol HMG-CoA/min\*mg) foren de  $3,87 \pm 0,59$  (Columbia 7),  $3,28 \pm 1,10$  (Columbia 0),  $2,10 \pm 0,27$  (WS-2). *AE*, activitat específica.



### 3.3.2.- Efecte d'inhibidors de la PP2A

L'augment de l'activitat HMGR observat en el mutant *rcn1-1* (apartat 3.3.1) podria ser degut a la disminució d'activitat PP2A pròpia d'aquest mutant, però també per la manca d'interacció física entre l'HMGR i els complexos PP2A. Per discriminar entre aquestes possibilitats, es va analitzar l'efecte d'inhibidors de la PP2A en l'activitat HMGR. Concretament es va utilitzar la cantaridina, inhibidor de serina/treonina fosfatases que té major afinitat per la PP2A (la constant d'inhibició per la PP2A és un ordre de magnitud inferior a la constant d'inhibició per la PP1) (revisat a Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994).

Prèviament, es va analitzar l'efecte de l'inhibidor sobre el fenotip de plantes d'*A. thaliana* (figura 47). En un fons silvestre, la cantaridina provocà una disminució en la mida de la planta, un allargament del pecíol i un gir cap al mateix sentit de les fulles que recorden les aspes d'un molí (figura 47B). Com a control es van créixer plantes de la línia *rcn1-1* [WS-2]. Tal com està descrit (Deruère et al., 1999), el mutant *rcn1-1* mostrà una major sensibilitat a cantaridina (figura 47D). Les línies mutants *B'' $\alpha$ -1* i *B'' $\alpha$ -2* no es van veure més afectades per la presència de cantaridina que la línia silvestre parental Columbia 7 (resultats no mostrats). La línia de sobreexpressió de la isoforma HMGR1S mostrà un nivell d'afectació similar al de la línia silvestre parental C24 (resultats no mostrats). En absència de cantaridina, les plantes de sobreexpressió del domini catalític no mostraren cap fenotip (figura 47E). En canvi, en presència de cantaridina sí que mostraren una gran sensibilitat i aquest efecte es féu més evident quan les plantes van ser crescudes en condicions de dia llarg, condicions on hi ha menys activitat HMGR endògena (figura 47F). Els resultats indiquen que quan s'inhibeix l'activitat PP2A, augmenta l'activitat HMGR, però sorprenentment quan l'activitat HMGR és molt elevada, trobem més sensibilitat a l'inhibidor de la PP2A, la cantaridina. De manera que els nivells d'activitat d'aquestes dues proteïnes es troben inversament correlacionades. Una possible explicació a aquest fenomen és que les plantes que sobreexpressen el domini catalític són més sensibles a cantaridina perquè ja tenen l'activitat HMGR molt incrementada i no suporten un augment de l'activitat HMGR derivada de la proteïna endògena que provoca el bloqueig de la PP2A.

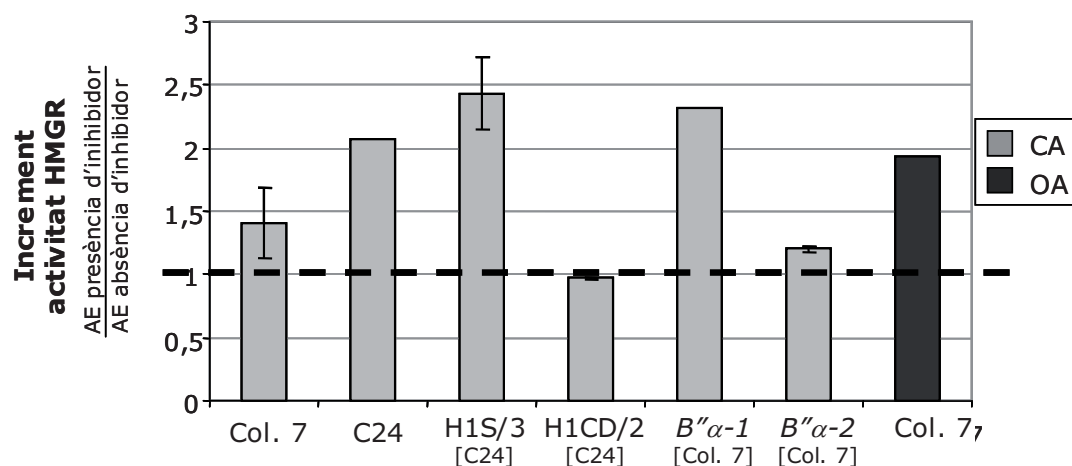


**Fig. 47.** Efecte de la cantaridina en el desenvolupament d'*A. thaliana*. Plantes de les línies C24, *rcn1-1* [WS-2] i H1CD/2 [C24] van ser germinades en medi MS en presència o absència de cantaridina 10  $\mu$ M. Les plantes van ser crescudes durant 15 dies en condicions de dia llarg.

Per investigar l'efecte de la cantaridina sobre l'HMGR, es va mesurar l'activitat d'aquest enzim en extractes de plantes crescudes en presència o absència de l'inhibidor (figura 48). S'observà un augment en l'activitat HMGR en plantes d'ecotips silvestres, tot i que l'increment diferí segons la línia utilitzada: en extractes de plantes Columbia 7 fou d'una mitjana d'un 40% i en extractes de plantes C24 fou d'un 100%. De forma anàloga, s'analitzà l'efecte de la cantaridina sobre l'activitat HMGR en les línies  $B''\alpha-1$  i  $B''\alpha-2$ . Mentre que en extractes del mutant  $B''\alpha-2$  l'increment fou relativament modest (un 20%), en el mutant  $B''\alpha-1$  fou d'un 130%. Es realitzà un experiment amb plantes de la varietat Columbia 7 crescudes amb un altre inhibidor de la PP2A, l'àcid okadaic. També en aquest cas s'advertí un increment en l'activitat HMGR que resultà de gairebé del 100%. Per tant, aquests resultats indiquen que un bloqueig de l'activitat PP2A provoca un augment de l'activitat HMGR. Es confirma doncs, que la PP2A és un regulador negatiu de l'HMGR i que en aquesta modulació hi està implicada la desfosforilació de l'HMGR o d'una altra proteïna fins al moment desconeguda.

Per esbrinar si en aquest control participa el domini N-terminal de l'HMGR, es va mesurar l'activitat HMGR en extractes de plantes que sobreexpressen l'HMGR15 (línia H1S/3 [C24]) i plantes que sobreexpressen el domini catalític (línia H1CD/2 [C24]) crescudes en presència o absència de cantaridina (figura 48). En la línia H1S/3, la presència de cantaridina induí un augment en l'activitat HMGR d'un 100%. Com s'ha descrit en l'apartat 3.2, l'elevada activitat HMGR d'aquesta línia és

deguda a l'expressió ectòpica de la isoforma HMGR1S. Per tant, aquesta isoforma respon a la modulació induïda per la PP2A. La presència de l'inhibidor, però, no afectà l'activitat HMGR de la línia H1CD/2. L'activitat HMGR derivada del domini catalític soluble no respon a la regulació per la PP2A. Aquests resultats suggereixen que el domini N-terminal de l'HMGR és necessari pel control exercit per la PP2A. No obstant, les plantes que sobreexpressen el domini catalític mostraren una activitat específica HMGR unes 6.000 vegades superior a la de la corresponent línia parental. En aquestes condicions, el sistema regulador podria resultar insuficient per modular aquests nivells d'activitat desmesurada.



Nombre d'experiments: 2 1 3 2 1 2 1

**Fig. 48.** Efecte del bloqueig farmacològic de la PP2A en l'activitat HMGR. Es representa la mitjana  $\pm$  l'error estàndard del nombre de vegades que incrementa l'activitat HMGR en les línies Columbia 7, C24, H1S/3 [C24], H1CD/2 [C24], B'' $\alpha$ -1 [Col. 7] i B'' $\alpha$ -2 [Col. 7] crescudes en presència de 10  $\mu$ M de cantaridina (CA) respecte a les no tractades (columnes gris clar) o tractades amb 20 nM d'àcid okadaic (OA) respecte a les no tractades (columna gris fosc). En el cas de la línia H1CD/2 es va treballar amb dilucions 1/500 en tampó d'homogeneïtzació. Les mostres es van obtenir de plantes de 3-4 setmanes crescudes en condicions de dia curt homogeneïtzades en presència de calci. Es van realitzar dotze experiments en total distribuïts tal com s'indica. Els valors d'activitat específica (pmol HMG-CoA/min\*mg) en absència d'inhibidor, foren de  $4,33 \pm 0,62$  (Col. 7),  $2,34$  (C24),  $5,80 \pm 0,53$  (H1S/3 [C24]),  $20274,43 \pm 831,16$  (H1CD/2 [C24]),  $2,96$  (B'' $\alpha$ -1 [Col. 7]),  $2,64 \pm 0,47$  (B'' $\alpha$ -2 [Col. 7]). AE, activitat específica.

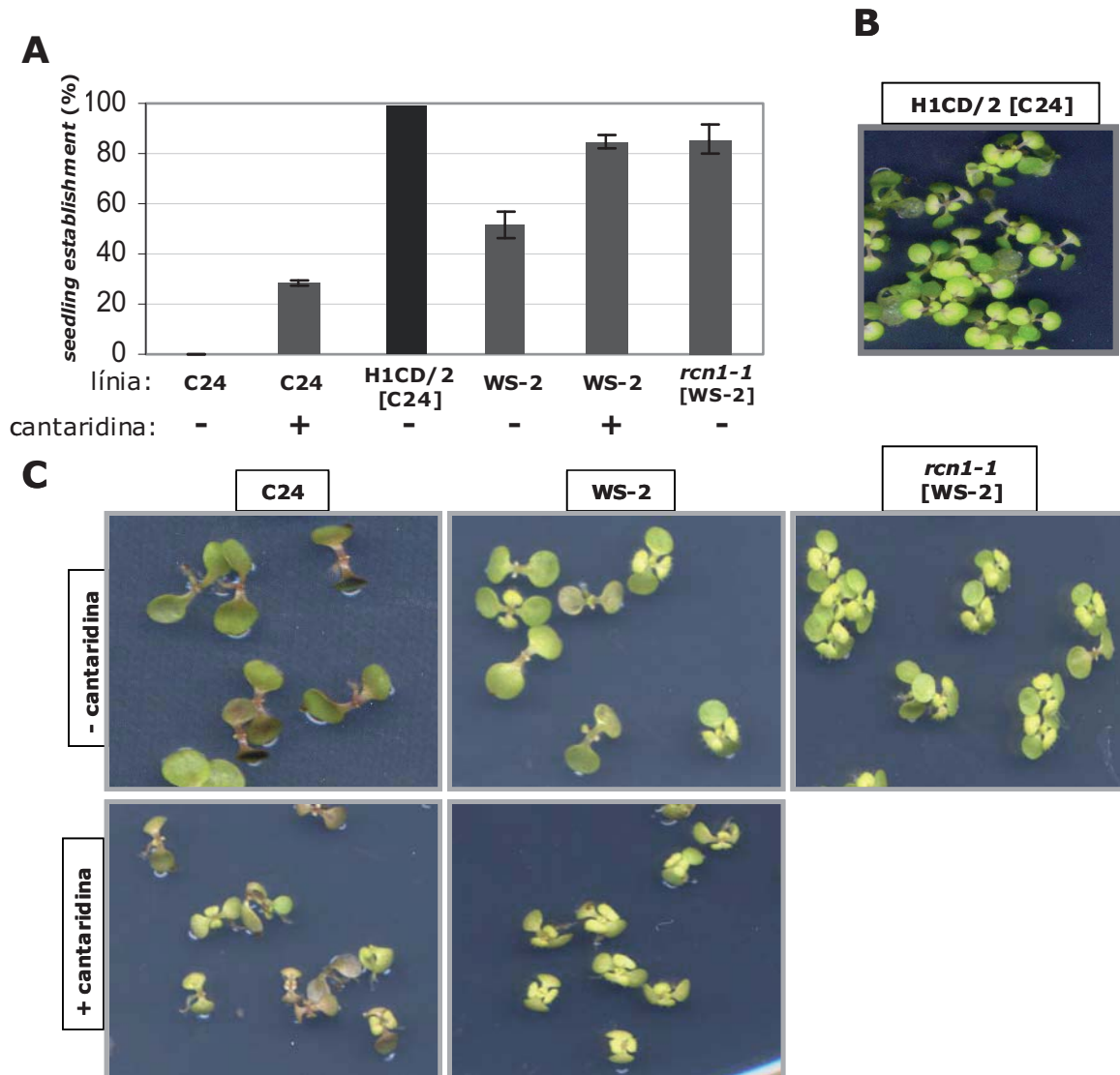
### 3.3.3.- Efecte sobre l'activitat HMGR mesurada *in vivo*

La mevinolina és un inhibidor específic de l'HMGR que bloqueja el desenvolupament de les plantes en l'estadi de dos cotilèdons (Re, 1995; Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002; Rodríguez-Concepción et al., 2004). Els individus afectats són incapaços de generar fulles veritables. La concentració de mevinolina necessària per al bloqueig no és una magnitud fixa, sinó que depèn de l'activitat HMGR. Si les plantes presenten major activitat HMGR com a conseqüència d'una mutació o de les condicions ambientals, són també més resistents a mevinolina. Per altra banda la resistència a mevinolina té un comportament poblacional. Tot i que pot haver força variabilitat entre individus, el percentatge de plantes que desenvolupen fulles veritables, designat com a percentatge de *seedling*

*establishment* en la literatura, és proporcional a l'activitat HMGR mesurada en la població (Rodríguez-Concepción et al., 2004).

Per tal de confirmar les variacions d'activitat HMGR induïdes pel bloqueig genètic o farmacològic de la PP2A es va realitzar un test de resistència a mevinolina, mesurada pel percentatge de *seedling establishment*. Concretament, es van comparar, per una banda, plantes dels ecotips C24 i WS-2 crescudes en presència o absència de cantaridina (situació de bloqueig farmacològic de la PP2A) i, per altra, plantes del mutant *rcn1-1* amb les de la corresponent línia parental (situació de bloqueig genètic de la PP2A). L'efecte de la mevinolina va diferir segons la línia utilitzada. Els casos més extrems foren la línia de sobreexpressió del domini catalític H1CD/2 que mostrà un 100% de resistència a mevinolina mentre que la línia silvestre parental C24 no mostrà cap resistència (figura 49). En canvi, l'altra línia silvestre utilitzada en l'estudi, WS-2, mostrà al voltant d'un 50% de *seedling establishment*. Això és degut a què WS-2 duu una mutació al gen que codifica pel fitocrom D (Aukerman et al., 1997). Com ja s'ha exposat a l'apartat 3.6.3 de la Introducció, els fitocroms estan implicats en la transducció de senyals que inhibeixen l'expressió dels gens *hmg1* i *hmg2* (Rodríguez-Concepción, 2004). Per aquesta raó s'espera que l'activitat HMGR estigui incrementada en la línia WS-2. Tot i això, la línia *rcn1-1* mostra més resistència a mevinolina (valor al voltant d'un 85%) que la seva respectiva línia parental WS-2. En presència de mevinolina i cantaridina, la línia C24 mostrà al voltant d'un 30 % en el *seedling establishment*. En la línia WS-2, la presència alhora de mevinolina i cantaridina provocà un grau de resistència molt similar al de la línia *rcn1-1*. S'observa que la mevinolina provoca una coloració vermellosa deguda a l'acumulació d'antocianines que denota la situació d'estrès a la què està sotmesa la planta (figura 49C, plantes C24). També s'observa que les plantes crescudes amb mevinolina i sotmeses a un bloqueig genètic o farmacològic de la PP2A tenen les fulles veritables corbades. Aquest fenotip no es presenta a les plantes de sobreexpressió del domini catalític (figura 49B) que també tenen major activitat HMGR.

Per tant, en els casos on es bloqueja l'activitat PP2A, bé amb l'inhibidor cantaridina, bé genèticament a la línia *rcn1-1*, el percentatge de resistència a mevinolina augmenta en un 30-40%. Es conclou doncs que l'augment d'activitat HMGR mesurat *in vitro* també es manifesta quan es determina *in vivo*, i aquest increment és degut a una reducció en l'activitat PP2A. Aquests assaigs demostren que els canvis d'activitat HMGR detectats mitjançant assaigs *in vitro* són realment operatius a la planta. En ambdues aproximacions (*in vitro* i *in vivo*) es mostra que el bloqueig genètic o farmacològic de la PP2A determina un augment de l'activitat HMGR.



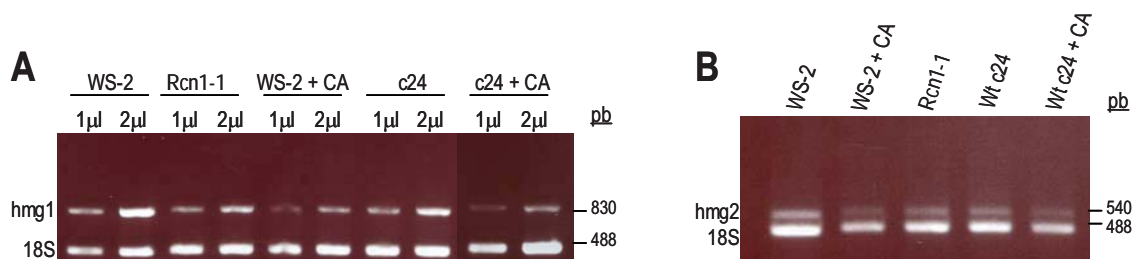
**Fig. 49.** Efecte del bloqueig de la PP2A en la resistència a mevinolina (percentatge de *seedling establishment*). Plantes de les línies C24, WS-2 i *rcn1-1* [WS-2] foren germinades en medi MS que contenia sempre mevinolina 5  $\mu$ M i que havia estat suplementat amb cantaridina 10  $\mu$ M en els casos on així s'indica. Les plantes foren crescudes durant 15 dies en condicions de dia llarg. **(A)** Percentatge de *seedling establishment* de les línies C24, WS-2 i *rcn1-1* [WS-2]. Als 15 dies, es comptabilitzà el percentatge d'individus que havien desenvolupat fulles veritables. El test de *seedling establishment* es va realitzar al menys en tres ocasions a partir del comptatge d'un mínim de 60 plantes cada cop. **(B)** Plantes de la línia de sobreexpressió del domini catalític (H1CD/2), utilitzades com a control de 100% de resistència a mevinolina. **(C)** Plantes de les diferents línies assajades, tal com s'indica.

### 3.3.4.- Efecte sobre els nivells de transcrits *hmg1* i *hmg2*

Els resultats presentats (apartats 3.3.1, 3.3.2 i 3.3.3) han revelat que el bloqueig de la PP2A determina un augment en l'activitat HMGR. Per a esbrinar si aquest control va associat a canvis en els nivells de transcrits *hmg1* o *hmg2*, es va seguir una aproximació de RT-PCR semiquantitativa. Es van obtenir mostres de RNA de les línies WS-2 i C24 crescudes en presència o absència de cantaridina i del mutant *rcn1-1* [WS-2] crescut en absència de cantaridina. La mostra de RNA es va retrotranscriure utilitzant *random decamers* per obtenir una població de cDNAs de tots els RNAs presents en la mostra. Com a

control d'amplificació semiquantitativa es van utilitzar una mescla d'encebadors del 18SrRNA i de competimers d'aquests (vegeu el procediment a Materials i Mètodes apartat 7.5). En l'estudi dels nivells d'*hmg1* s'utilitzà bé 1  $\mu$ l o bé 2  $\mu$ l de la mostra de cDNA total. S'advertí que quan s'utilitzaven 2  $\mu$ l de la mostra s'obtenia més amplificació del motlle, que indicava que la PCR es realitzava en un rang d'amplificació quantitatiu (figura 50A).

Els resultats de la RT-PCR (figura 50) indiquen que no han tingut lloc canvis importants en els nivells de mRNA d'*hmg1* (pannell A) i d'*hmg2* (pannell B). En tot cas, tant el bloqueig genètic com farmacològic de la PP2A semblen produir una lleugera disminució dels nivells d'aquests transcrits. Es pot concloure que l'augment de l'activitat HMGR induït pel bloqueig de LA PP2A no és degut a un increment en els nivells de transcrits *hmg*, sinó a algun tipus de control posttranscripcional.



**Fig. 50.** Efecte de la inhibició de la PP2A sobre els nivells de transcrits *hmg1* i *hmg2*. Els nivells de mRNA foren determinats mitjançant RT-PCR semiquantitativa a partir de mostres de plantes de 10 dies de diverses línies (indicades en la part superior de les fotografies), crescudes en absència o presència de cantaridina 10  $\mu$ M (CA). **(A)** Detecció del mRNA *hmg1* amb els encebadors específics del gen H1.3F, H1.2R i una mescla 4:6 d'encebadors del 18SrRNA i competimers. En la reacció de PCR s'afegí bé 1  $\mu$ l, bé 2  $\mu$ l de la població de cDNA retrotranscrita. L'amplificació per PCR fou de 25 cicles. **(B)** Detecció del mRNA *hmg2* amb els encebadors específics del gen H2.3R, H2.4F i una mescla de 2:8 d'oligonuclèotids del 18SrRNA i competimers. En la reacció de PCR s'afegí 2  $\mu$ l de la població de cDNA retrotranscrita. L'amplificació per PCR fou de 30 cicles.

## 4- FUNCIO DE LA PP2A EN LA LOCALITZACIO SUBCEL·LULAR DE L'HMGR

Les tres isoformes de l'HMGR d'*A. thaliana*, l'HMGR1S, l'HMGR1L i l'HMGR2, tenen com a primera destinació subcel·lular la membrana del reticle endoplasmàtic (RE). La subsegüent localització subcel·lular ha estat estudiada mitjançant l'expressió transitòria de proteïnes quimèriques derivades de les isoformes de l'HMGR en què el domini catalític ha estat substituït per la proteïna verda fluorescent GFP. Aquestes quimeres són: 1S:GFP, derivada de l'HMGR1S; 1L:GFP, derivada de l'HMGR1L i 2:GFP, derivada de l'HMGR2 (vegeu apartat 3.5 de la Introducció). En els experiments d'expressió transitòria es pot observar que les tres quimeres es confinen en la trama del RE. Les proteïnes 1S:GFP i 2:GFP, a més, també es localitzen en vesícules de 0,5 a 2 µm de diàmetre que aparentment estan connectades amb aquesta trama (Leivar, 2003). Ja que els estudis suggereixen que la regió N-terminal de l'HMGR està implicada en el seu trànsit subcel·lular a més d'interaccionar específicament amb la PP2A, es va procedir a l'estudi del paper d'aquest holoenzim en la localització subcel·lular de les isoformes de l'HMGR d'*A. thaliana*.

Per aquest propòsit, es van expressar transitòriament diverses proteïnes quimèriques en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* de diferents fons genètics (taula 8). Les construccions de DNA que codifiquen per les quimeres van ser introduïdes per biolística (apartat 11 de Materials i Mètodes). Després de la transfecció les fulles van ser incubades sota llum contínua, durant 18 h i posteriorment, van ser observades per microscopia làser confocal. Es va tenir molta cura en procedir amb idèntic mètode en totes les situacions experimentals per tal d'evitar variabilitat. No obstant, van haver factors que no es podien controlar com foren l'efecte de l'impacte de les micropartícules o el nombre de molècules de DNA introduïdes en les cèl·lules. També l'estat fisiològic de la cèl·lula que havia rebut l'impacte era un paràmetre variable no controlable. Tot això podia afectar el nivell d'expressió i/o localització subcel·lular dels productes quimèrics corresponents.

Es va distingir diversitat en els patrons de distribució subcel·lular dins de cada situació experimental que dificultava l'anàlisi. Per a valorar amb màxima objectivitat les diferències entre situacions experimentals, es van definir quatre patrons de distribució bàsics (figura 51) i es va quantificar el nombre d'imatges que corresponien a cadascun d'ells (taula 8). Va ser necessari analitzar un gran nombre d'imatges, corresponents a 326 cèl·lules epidèrmiques, per aportar dades objectives. Els mateixos patrons de distribució es van obtenir en cèl·lules vasculars, encara que les imatges obtingudes no van ser tingudes en compte per a l'anàlisi degut al baix nombre de cèl·lules transfectades d'aquest tipus (figura 51, panells E-I). Les quatre distribucions bàsiques són:

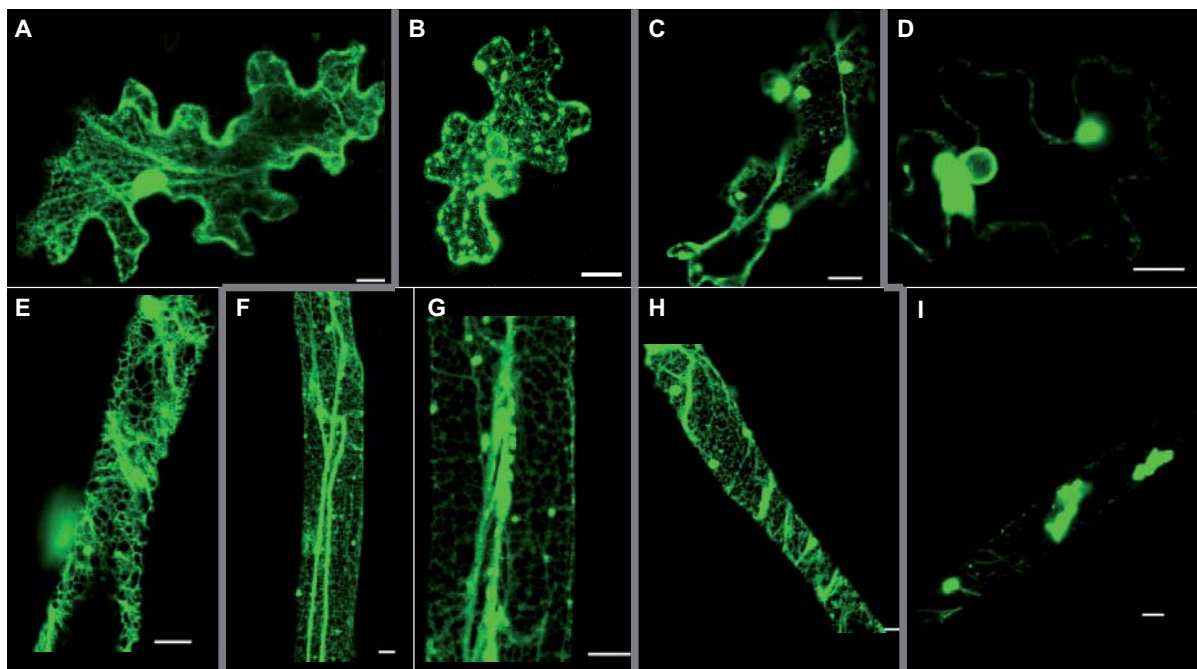
**Patró reticular (R):** s'hi observa majoritàriament la xarxa reticular, les cèl·lules contenen menys de cinc vesícules de mida entre 0,5 a 2,5 µm i no s'hi observen ni vesícules de major mida ni agregats (figura 51; panells A, E).

**Patró reticulo-vesicular (R-V):** s'hi observa el RE i unes vesícules d'entre 0,5 i 2,5  $\mu\text{m}$  interconnectades amb la trama reticular. Es considera que pertanyen a aquesta distribució les cèl·lules que contenen més de cinc vesícules de mida entre 0,5 i 2,5  $\mu\text{m}$  i la proporció de vesícules d'aquesta i altres mides és superior a cinc (figura 51; pannells B, F i G).

**Patró reticulo-vesicular amb grans vesícules (R-gV):** s'hi observa el RE i vesícules de mida compresa entre 2,5 i 10  $\mu\text{m}$ . Es considera que pertanyen a aquesta distribució cèl·lules on la proporció de vesícules de mida entre 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  i vesícules de mida entre 2,5-10  $\mu\text{m}$  és igual o inferior a cinc (figura 51; pannells C i H).

**Patró reticular amb agregats (R-A):** s'hi observen grans vesícules de mida superior a 10  $\mu\text{m}$  (agregats) que ocupen tot el gruix de la cèl·lula. En aquest cas, s'acostuma a observar un o dos agregats en tota la cèl·lula que no sol presentar altres tipus de vesícules (figura 51; pannells D, I).

En la taula 8 es mostren els percentatges en què es donen les distribucions tipus en cada situació experimental, que ve determinada per la proteïna quimèrica, el fons genètic on s'ha expressat i si procedeix, el tractament a què ha estat sotmesa la fulla microbombardejada.



**Fig. 51.** Resum dels patrons de distribució subcel·lular de quimeres de l'HMGR. Les fulles de plantes WS-2 (C, E, H) i *rcn1-1* [WS-2] (A, B, D, F, G, I) van ser microbombardejades amb construccions que codifiquen per 1S:GFP (A-D, I) o 2:GFP (E-H). Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22 °C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la projecció de 10 seccions de cèl·lules epidèrmiques (A-D), o cèl·lules vasculars (E-I). A, E: patró reticular; B, F, G: patró reticulo-vesicular; C, H: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; D, I: patró reticular amb agregats. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .



**Taula 8.** Resum dels experiments d'expressió transitòria de quimeres de l'HMGR en cèl·lules epidèrmiques d'*A. thaliana*. Les quimeres estan formades pel domini de membrana de la variant de l'HMGR fusionat a GFP. Les proteïnes assajades van ser: la 1S:GFP, quimera derivada de l'HMGR1S; la Rdel1S:GFP, quimera derivada de la 1S:GFP on s'han substituït les arginines en posició 4, 5 i 6 per alanines; la 1L:GFP, quimera derivada de l'HMGR1L; la 2:GFP, quimera derivada de l'HMGR2. Com a control, es va utilitzar el marcador de RE EGFP<sub>Per</sub> (Danon et al., 2004). Ocasionalment, les fulles transfectedes van ser incubades en presència de 10 µM de cantaridina (CA). Els patrons observats van ser R, patró reticular; R-V, patró reticulo-vesicular; R-gV, patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; R-A, patró reticular amb agregats.

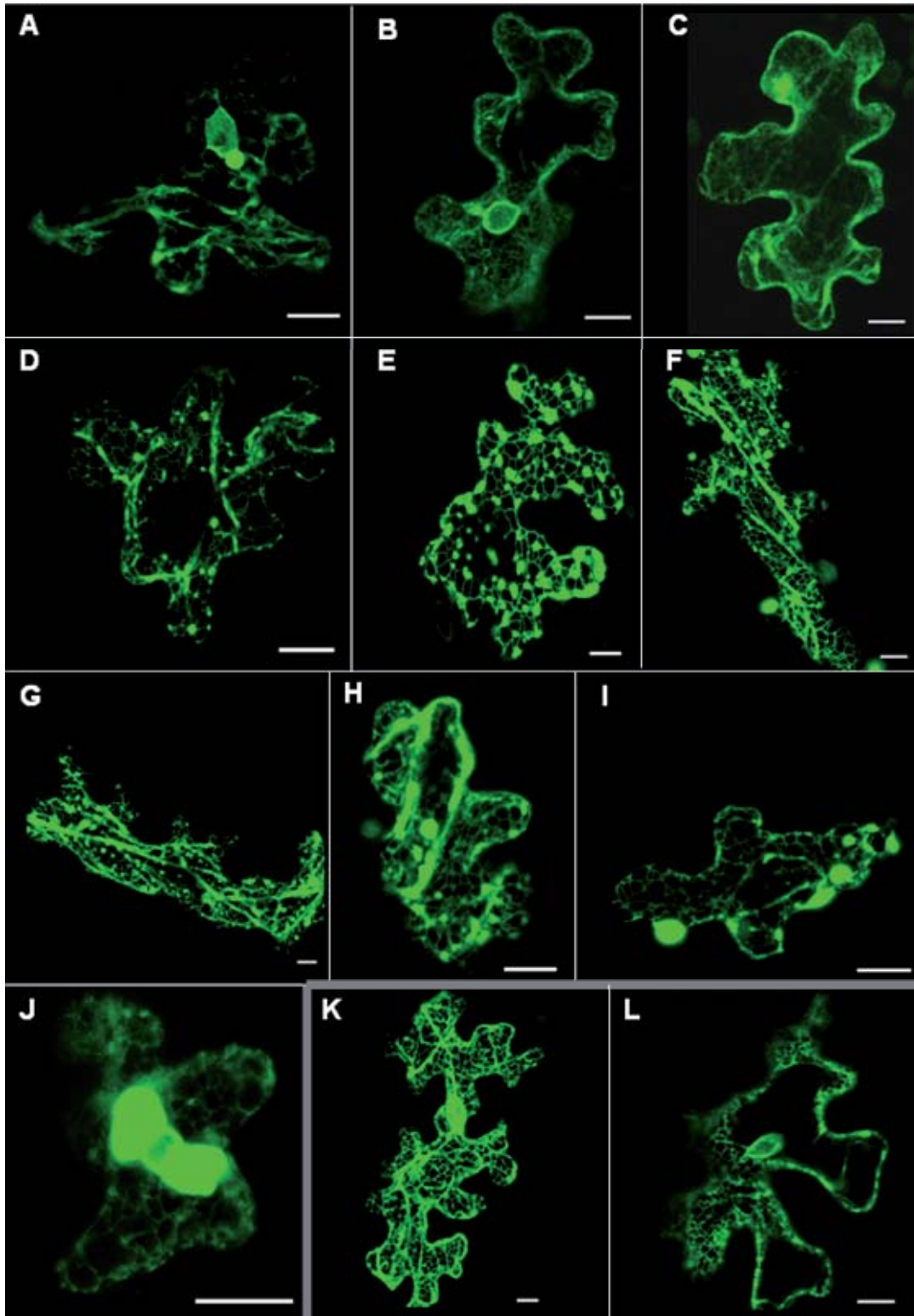
Proteïna quimèrica	Fons genètic (i tractament)	Nombre d'experiments independents	Nombre total de cèl·lules	Patrons observats (%)			
				R	R-V	R-gV	R-A
1S:GFP	WS-2	5	20	5	55	30	10
1S:GFP	Columbia	9	51	31	49	14	6
1S:GFP	Columbia [CA]	4	31	52	29	6	13
1S:GFP	<i>Rcn1-1</i>	5	36	33	22	14	31
1S:GFP	<i>B''α-1</i>	2	32	47	34	0	19
1S:GFP	<i>B''α-2</i>	1	13	69	15	8	10
1S:GFP	<i>B''α-3</i>	3	23	65	30	4	10
Rdel1S:GFP	WS-2	1	5	80		20	
Rdel1S:GFP	Columbia	2	25	84	5	12	4
1L:GFP	WS-2	2	4	100			
1L:GFP	<i>Rcn1-1</i>	6	24	67	12	4	17
2:GFP	WS-2	5	12	58	17	25	0
2:GFP	<i>Rcn1-1</i>	6	21	57	5	19	19
EGFP <sub>Per</sub>	WS-2	2	6	100			
EGFP <sub>Per</sub>	Columbia	1	2	100			
EGFP <sub>Per</sub>	Columbia [CA]	1	5	100			
EGFP <sub>Per</sub>	<i>Rcn1-1</i>	2	8	100			
EGFP <sub>Per</sub>	<i>B''α-1</i>	2	8	100			

#### 4.1.- Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de plantes d'ecotips silvestres

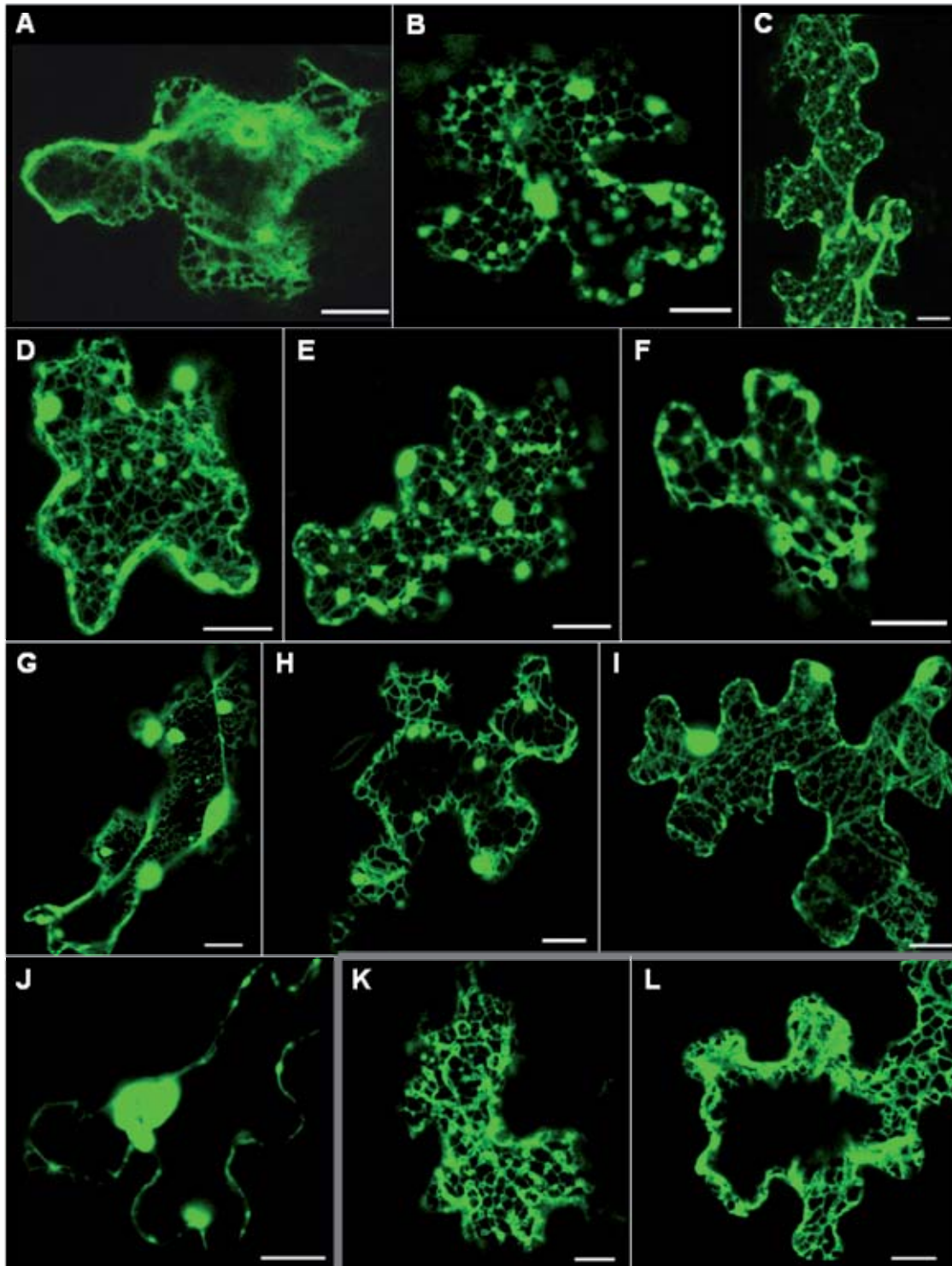
En primer lloc es van establir els patrons de localització de 1S:GFP en cèl·lules de fons genètics silvestres d'ecotip Columbia (Col. 7 i Col. 0) i d'ecotip Wassilewskija-2 (WS-2), que s'utilitzarien com a referència per l'estudi en les situacions experimentals presentades en els següents apartats. Els resultats en els fons genètics d'ecotip Columbia s'han considerat conjuntament ja que presenten freqüències de distribució equiparables.

En les figures 52 i 53 es pot observar una mostra representativa dels patrons descrits en els fons genètics Columbia i WS-2, respectivament. En la taula 8 es presenta un resum quantitatiu dels resultats. Tot i haver certes diferències entre els dos tipus de varietats utilitzades, en ambdós casos al voltant d'un 50 % de les cèl·lules fotografiades mostraren un patró reticulo-vesicular. Les vesícules sempre es troben pròximes a la trama del RE i, en l'ampliació de la imatge s'observa continuïtat entre les vesícules i la xarxa del RE (figura 52, pannells D-H; figura 53, pannells B-F). Cal destacar que en l'ecotip WS-2 es van trobar poques cèl·lules reticulars (figura 53, pannel A), i més proporció de cèl·lules amb vesícules de mida major a 2,5  $\mu\text{m}$  (figura 53, pannells G-I). En els fons tipus Columbia, en canvi, s'observà més proporció de cèl·lules que mostraven un patró reticular (figura 52, pannells A-C) i menys que acumulaven vesícules de mida superior a 2,5  $\mu\text{m}$  (figura 52, pannel I). En els dos casos també s'observaren, amb certa freqüència, cèl·lules amb grans agregats que normalment envoltaven el nucli, i on la trama reticular es presentava de forma més difosa (figura 52, pannel J; figura 53, pannel J).

Com a control s'utilitzà el marcador de RE, EGFP<sub>ER</sub> (Danon et al., 2004) (figures 52 i 53, pannells K i L). En aquest cas totes les cèl·lules observades mostraren un patró reticular. Això confirma que la trama on es localitza la 1S:GFP correspon realment al RE. D'altra banda, els resultats posen de manifest que la sobreexpressió d'una proteïna de RE no necessàriament desencadena la formació de vesícules.



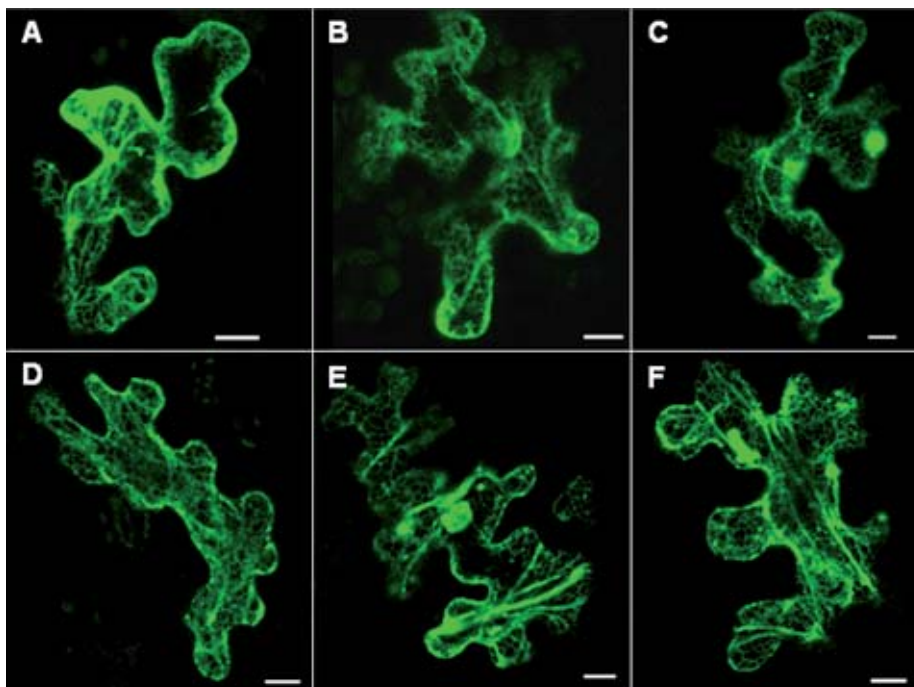
**Fig. 52.** Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* del fons genètic Columbia. Les fulles de les plantes van ser microbombardejades amb les construccions que codifiquen per 1S:GFP (A-J) o EGFP (K, L). Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la projecció de 10 seccions de la cèl·lula, excepte la imatge L que correspon a una secció individual. A-C, K, L: patró reticular; D-H: patró reticulo-vesicular; I: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; J: patró reticular amb agregats. La barra indica 10  $\mu$ m.



**Fig 53.** Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* del fons genètic WS-2. Les fulles de les plantes van ser microbombardejades amb les construccions que codifiquen per 1S:GFP (A-J) o EGFP (K, L). Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges dels panells C-F i I corresponen a la projecció de 10 seccions de la cèl·lula. Les imatges dels panells A, B, G-H corresponen a seccions individuals de la cèl·lula. A, K, L: patró reticular; B-F: patró reticulo-vesicular; G-I patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; J: patró reticular amb agregats. La barra indica 10 µm.

## 4.2.- Paper del motiu conservat d'arginines

La regió N-terminal de les HMGR de plantes conté un motiu d'arginines que s'ajusta al consens de senyal de retenció a RE de proteïnes de membrana de tipus II descrit en cèl·lules animals. En les variants HMGR1L i HMGR1S d'*A. thaliana* aquest motiu és necessari per a la seva interacció amb AtB"α i AtB"β. El paper d'aquest motiu va ser estudiat de forma preliminar en un treball anterior (Leivar, 2003). Concretament, es va examinar la localització subcel·lular d'una variant de la 1S:GFP en que els tres residus d'arginina del motiu conservat havien estat substituïts per alanines. Aquesta variant va ser anomenada Rdel1S:GFP. L'anàlisi d'un baix nombre de cèl·lules va suggerir que el motiu d'arginines podria estar implicat en el transport de l'HMGR en vesícules. Per tal d'aprofundir en aquesta hipòtesi, es va fer un estudi més exhaustiu amb un major nombre de cèl·lules d'altres ecotips: Columbia (figura 54, panells A-C) i WS-2 (figura 54, panells D-F). En ambdós casos es van obtenir un 80% o més de cèl·lules amb patró reticular (figura 54, panells A, B, D, E) i una minoria que contenien vesícules. De cinc cèl·lules examinades en el fons genètic WS-2, una va presentar vesícules de mida major a 2,5 μm (figura 54, panell F). Pel que fa a l'estudi en el fons genètic Columbia, un 12% de les cèl·lules examinades mostraven vesícules de mida superior a 2,5 μm (figura 54, panell C). En aquestes plantes, hi ha menys cèl·lules amb patró reticulo-vesicular o amb agregats (taula 8). S'adverteix, doncs, que la mutació de les arginines provoca una gran davallada de la freqüència de cèl·lules amb patró reticulo-vesicular. Es pot concloure que la integritat del motiu d'arginines és important per al confinament de la 1S:GFP en vesícules i per a la formació d'aquestes estructures.



**Fig 54.** Localització subcel·lular de la quimera Rdel1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana*. Les fulles de les plantes de fons genètic Columbia (A-C) o WS-2 (D-F) van ser microbombardejades amb la construcció que codifica per Rdel1S:GFP. Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la projecció de 10 seccions de la cèl·lula. A, B, D, E: patró reticular; C, F: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules. La barra indica 10 μm.

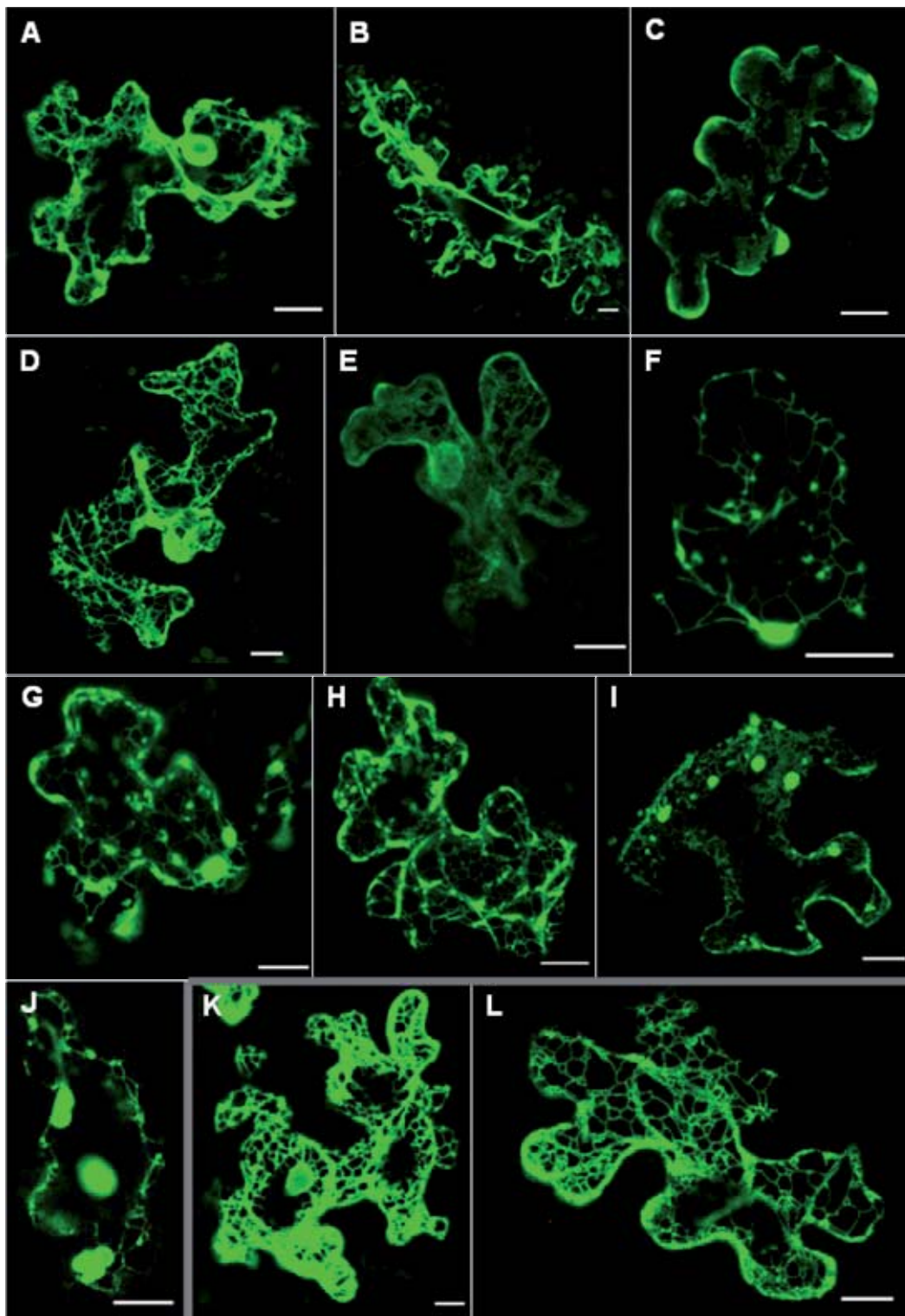
### 4.3- Efecte de la cantaridina en la localització subcel·lular de la 1S:GFP

Per tal d'esbrinar el paper de la PP2A en la localització subcel·lular de l'HMGR, es va analitzar l'efecte de la cantaridina (inhibidor específic de la fosfatasa) en la distribució subcel·lular de la quimera 1S:GFP. Per assolir aquest objectiu, es van incubar les fulles de plantes d'ecotip Columbia utilitzades en el microbombardeig, en una solució que contenia cantaridina 10  $\mu$ M durant 18 h, fins al moment de la preparació de la mostra per a l'observació al microscopi làser confocal. Els resultats es presenten resumits en la figura 54 i la taula 8.

El tractament amb cantaridina determinà un increment en la proporció de cèl·lules amb patró reticular (un 52% en aquest cas versus un 31% en el cas de fulles no tractades) (figura 54, pannells A-E). Aquest augment anà en detriment de la proporció de cèl·lules que manifestaven un patró reticulo-vesicular (un 29% versus un 49%) (figura 54, pannells F-H), com de cèl·lules amb una distribució reticulo-vesicular amb vesícules de mida superior a 2,5  $\mu$ M (un 6% versus un 14%) (figura 54, pannel I). També es feu notori un augment en la freqüència de cèl·lules que mostraven agregats (un 13% versus un 6%) (figura 54, pannel J). Cal destacar que el tractament amb cantaridina fa que les cèl·lules tinguin menys fluorescència i un patró reticular difús, la qual cosa dificulta l'obtenció de les imatges (resultats no mostrats). A més, les cèl·lules classificades dins de la distribució tipus patró reticulo-vesicular, acumulaven menys vesícules en comparació amb les de les fulles no tractades.

La PP2A té un ampli espectre de funcions en la cèl·lula (Virshup, 2000). Un inhibidor d'aquesta fosfatasa, doncs, podria estar afectant la integritat del RE. Per validar els resultats obtinguts, es considerà necessari estudiar la localització de la proteïna marcadora de RE, EGFP<sub>ER</sub>, en cèl·lules procedents de fulles tractades amb cantaridina (figura 54, pannells K i L). Les cèl·lules observades mostraren un patró reticular normal equiparable a l'obtingut en cèl·lules de fulles de plantes del mateix fons genètic no tractades. Tampoc minvà la lluminositat de les imatges com a conseqüència de l'expressió de la quimera.

Aquests resultats suggereixen que la PP2A està implicada en el transport d'1S:GFP i/o en la formació de vesícules. Molt probablement, aquest procés implica la desfosforilació d'un residu de l'HMGR, o d'alguna altra proteïna fins al moment desconeguda.



**Fig. 54.** Efecte de la cantaridina en la localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana*. Les fulles de les plantes de fons genètic Columbia van ser microbombardejades amb les construccions que codifiquen per 1S:GFP (A-J) o EGFP (K, L). Posteriorment, van ser incubades en presència de 10  $\mu$ M cantaridina en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la superposició de 10 seccions de la cèl·lula, excepte la imatge J que correspon a una secció individual. A-E, K, L: patró reticular; F-H: patró reticulo-vesicular; I: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; J: patró reticular amb agregats. La barra indica 10  $\mu$ m.

## 4.4- Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en mutants de la PP2A

Per tal de confirmar la participació de la PP2A en la localització subcel·lular de l'HMGR, es va estudiar la distribució subcel·lular de 1S:GFP en mutants de la PP2A. Concretament, es va emprar la línia *rcn1-1* que es defectiva en la isoforma majoritària de la subunitat A de la PP2A i les línies *B'' $\alpha$ -1*, *B'' $\alpha$ -2* i *B'' $\alpha$ -3* que tenen una inserció de T-DNA en el gen *AtB'' $\alpha$*  (vegeu l'apartat 3.3.1 de Resultats per més detalls).

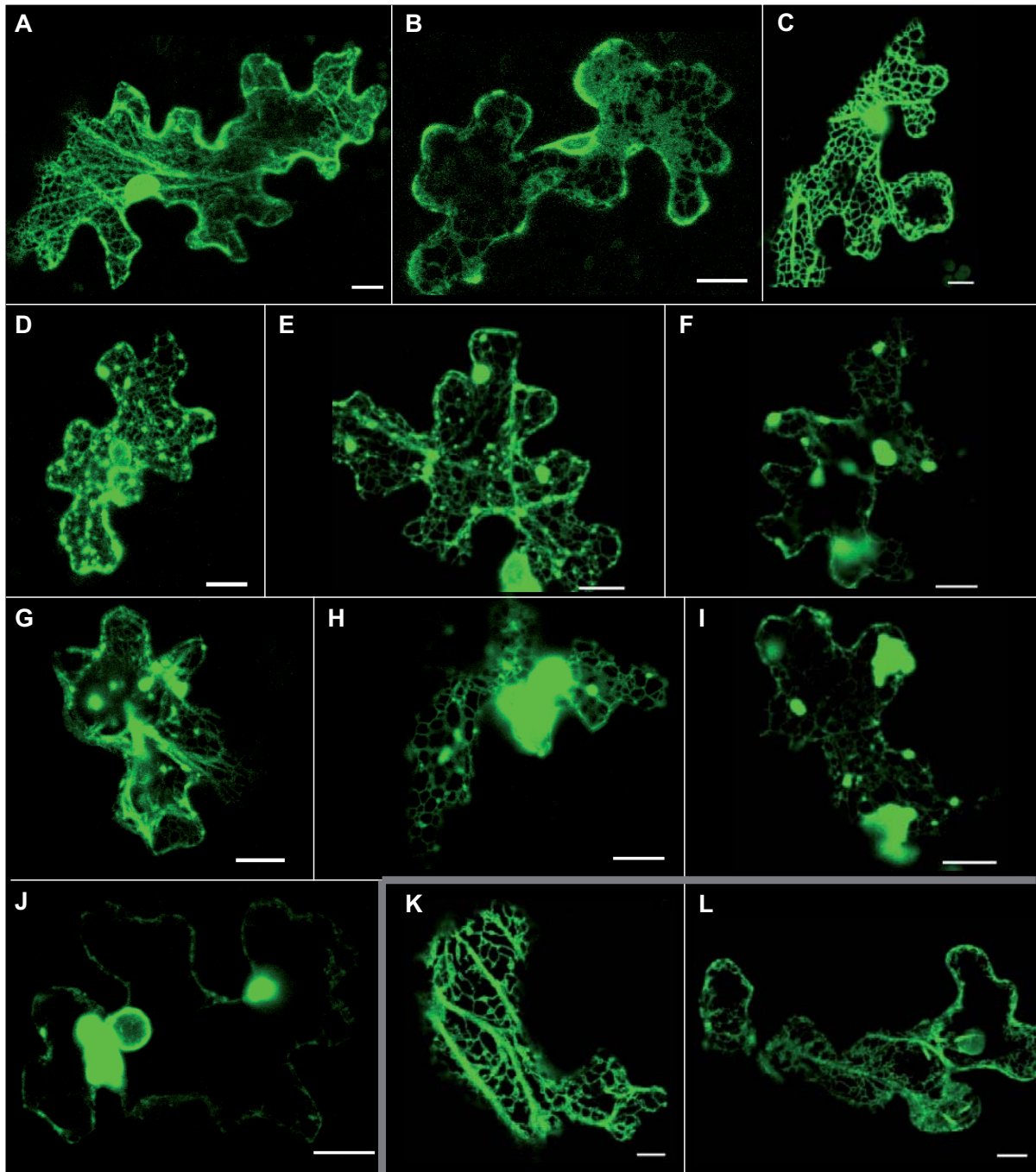
### 4.4.1.- Fons mutant *rcn1-1*

Per tal de confirmar que els resultats obtinguts amb el tractament amb cantaridina (apartat 4.3) es deuen a un decrement en l'activitat PP2A, s'analitzà la localització de 1S:GFP en el fons mutant *rcn1-1*. Cal recordar que la mutació determina una reducció del 50 % en l'activitat PP2A (Deruère et al., 1999).

Els resultats són presentats a la figura 55 i a la taula 8. En comparació amb la línia parental WS-2, el mutant *rcn1-1* presentà una reducció notable en la proporció de cèl·lules amb un patró reticulo-vesicular (un 22% en *rcn1-1* [WS-2] versus un 55% en WS-2) (figura 55; pannells D i E). També s'observà una disminució en la proporció de cèl·lules que mostraven un patró reticulo-vesicular amb vesícules de mida superior a 2,5  $\mu$ M (un 14% versus un 30%) (figura 55; pannells F i G). En canvi, augmentà el percentatge de cèl·lules que presentaven un patró reticular (un 33% versus un 5%) (figura 55, pannells A-C) o un patró reticular amb agregats (un 31% versus un 10%) (figura 55, pannells H-J). En moltes ocasions, els agregats es poden visualitzar al voltant del nucli (figura 55, pannells H-J). Es pot concloure que la PP2A està implicada en la formació de les vesícules en el sistema d'expressió transitòria i que un defecte en la fosfatasa determina l'acumulació de la quimera en la trama de RE o la formació de grans agregats.

Per tal de comprovar si la mutació *rcn1-1* afecta la integritat del RE, es va expressar el marcador de RE, EGFP<sub>ER</sub>. En totes les cèl·lules es va visualitzar el patró reticular (figura 55; pannells K i L). Per tant, la manca d'activitat PP2A en cèl·lules d'un fons genètic *rcn1-1*, no afecta la correcta disposició de la trama reticular. A més, s'evidencia que en aquestes cèl·lules la trama reticular no conté vesícules. Per tant, les vesícules observades en les diferents situacions experimentals són conseqüència de l'expressió de 1S:GFP.



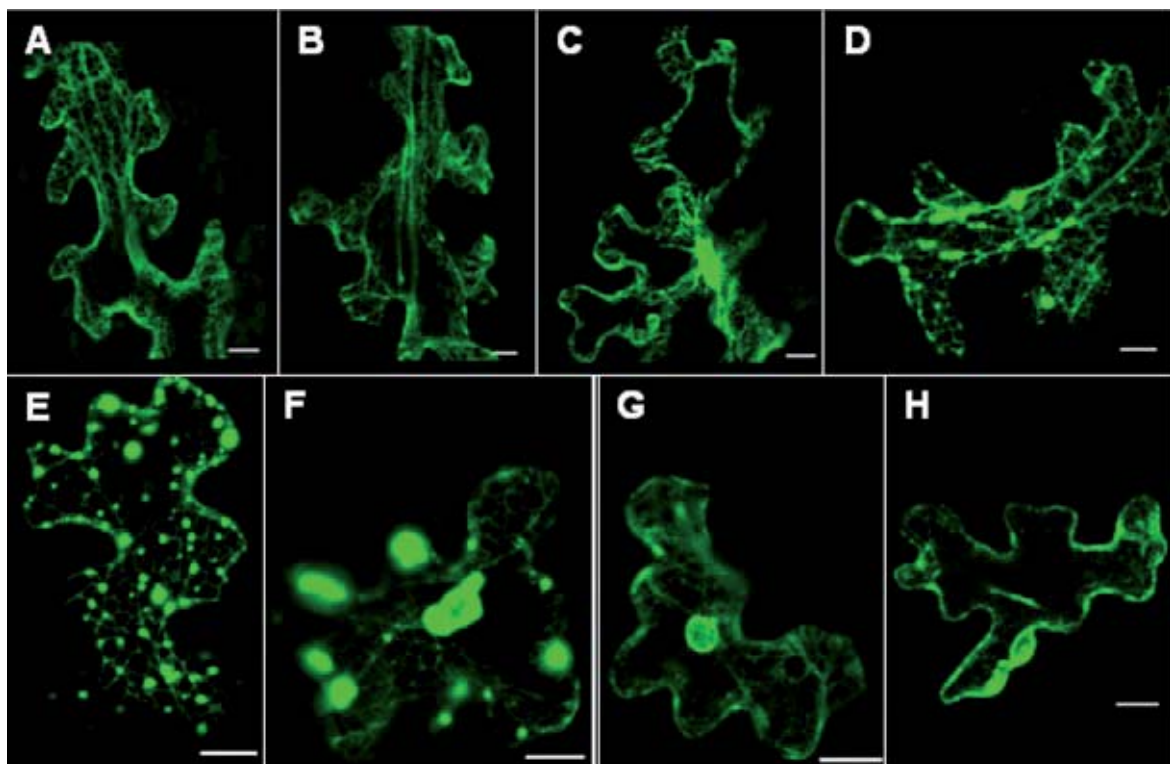


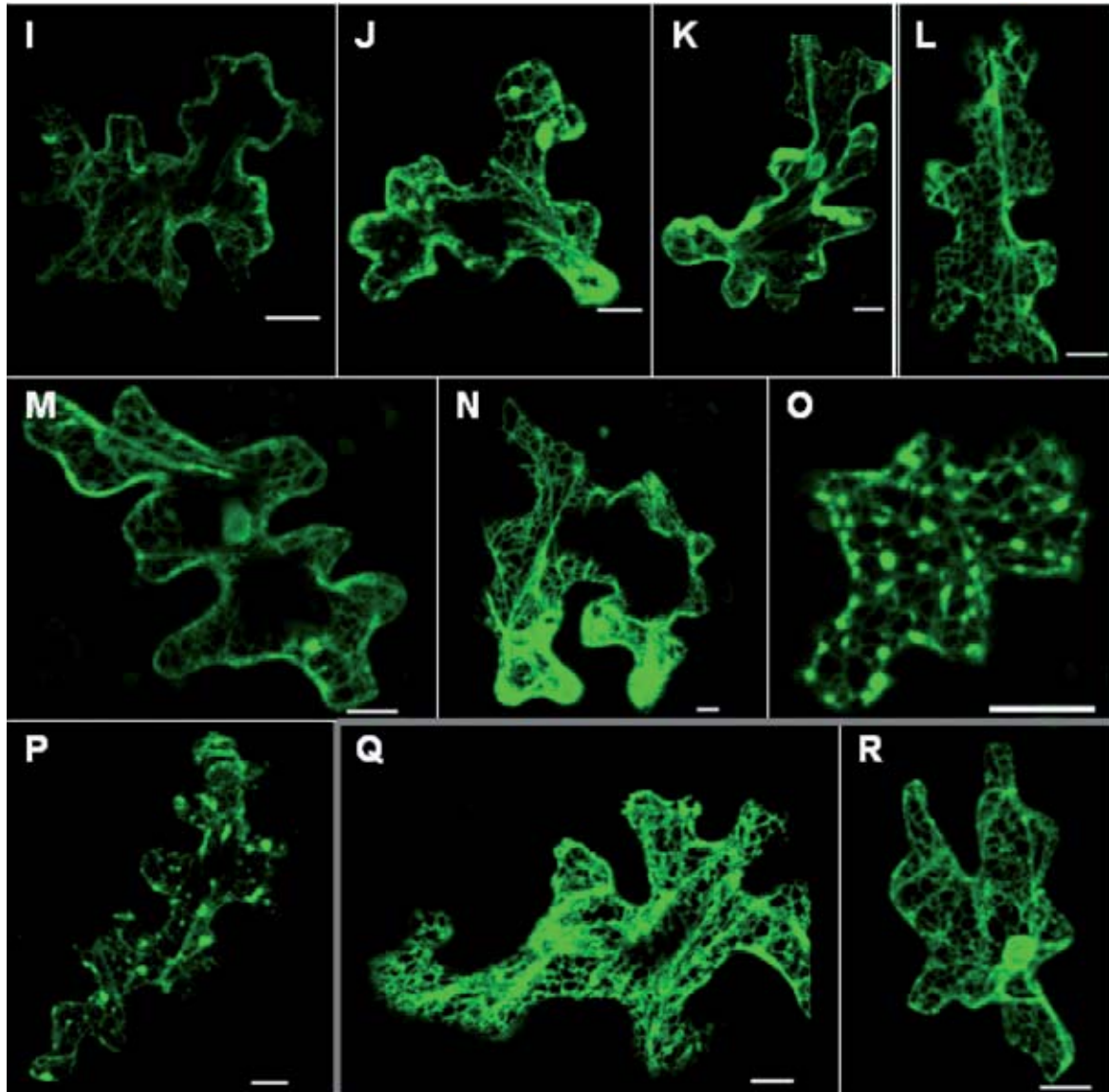
**Fig. 55.** Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* del fons mutant *rcn1-1*. Les fulles de les plantes van ser microbombardejades amb les construccions que codifiquen per 1S:GFP (A-J) o EGFP (K, L). Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la superposició de 10 seccions de la cèl·lula. A-C, K, L: patró reticular; D, E: patró reticulo-vesicular; F,G: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; H-J: patró reticular amb agregats de la quimera 1S:GFP. La barra indica 10 µm.

#### 4.4.2.- Fons mutant $B''\alpha-1$ , $B''\alpha-2$ o $B''\alpha-3$

La distribució subcel·lular de la 1S:GFP fou analitzada en els mutants insercionals  $B''\alpha-1$  (figura 56; panells A-F),  $B''\alpha-2$  (figura 56, panells G-K) i  $B''\alpha-3$  (figura 56, panells L-P). Aquests mutants contenen una inserció de T-DNA en el gen que codifica per l'AtB'' $\alpha$  (apartat 3.3.1 de Resultats).

En les tres línies mutants  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$  augmentà la proporció de cèl·lules amb patró reticular en detriment de les que presentaven un patró reticulo-vesicular (taula 8). Aquest efecte fou més evident per  $B''\alpha-2$  i per  $B''\alpha-3$  on el patró de distribució reticular igualà o superà el 65%. La línia  $B''\alpha-1$  presentava un patró reticular en gairebé un 50% de les cèl·lules observades. En  $B''\alpha-2$  només es van observar 13 cèl·lules, encara que probablement els resultats obtinguts es podrien afegir als de  $B''\alpha-1$ , ja que els T-DNA d'aquests mutants estan inserits en posicions molt pròximes del mateix intró. També s'observà un augment en el percentatge de cèl·lules que presentaven un patró reticular amb agregats, que se situà al 19% per  $B''\alpha-1$  i al 10% per  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$  (en comparació amb un 6% que mostrà el fons parental Columbia). Com a control, s'estudià la localització de EGFP<sub>er</sub> en la línia  $B''\alpha-1$ , que mostrà un patró reticular en totes les cèl·lules observades (figura 56; panells Q, R). Per tant, s'evidencia que la mutació  $B''\alpha-1$  no afecta per si mateixa a l'estructura del RE.



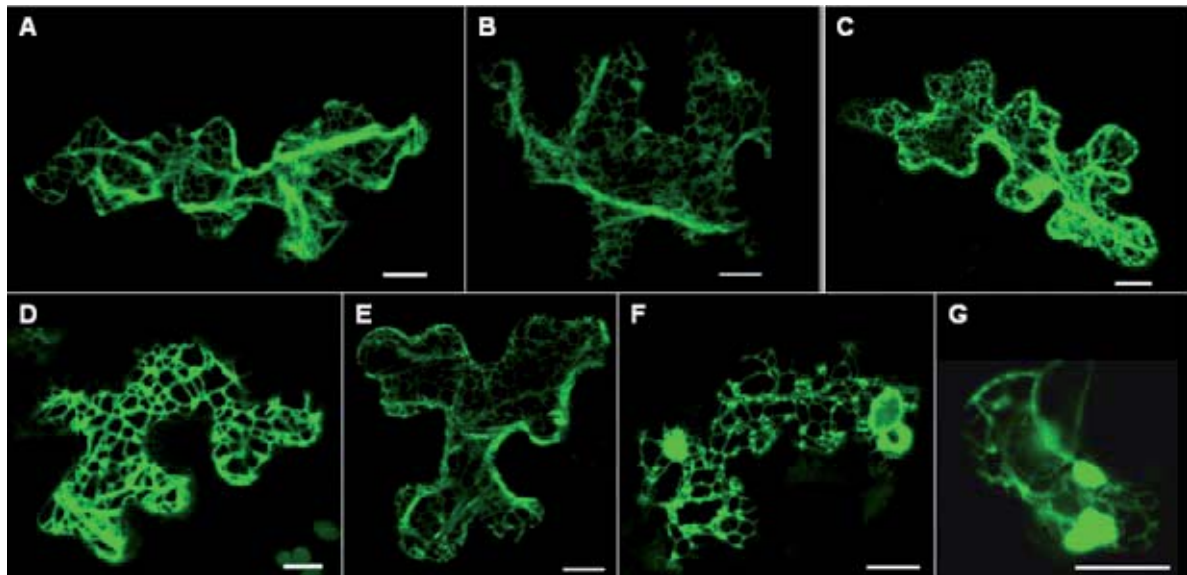


**Fig. 56.** Localització subcel·lular de la quimera 1S:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* en les línies mutants  $B''\alpha$ . Les fulles de les plantes de les línies  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$  van ser microbombardejades amb la construcció 1S:GFP ( $B''\alpha-1$ , pannells A-F;  $B''\alpha-2$ , pannells G-K;  $B''\alpha-3$ , pannells L-P). Les fulles de les plantes de la línia  $B''\alpha-1$  van ser microbombardejades a més amb la construcció EGFP<sub>er</sub> (Q, R). Posteriorment, les fulles van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la superposició de 10 seccions de la cèl·lula. A-C, G-I, L-N, Q, R: patró reticular; D, E, J, O, P: patró reticulo-vesicular; K: patró reticulo-vesicular amb grans vesícules; F: patró reticular amb agregats. La barra indica 10  $\mu$ m.

#### 4.5.- Localització subcel·lular de la quimera 1L:GFP en el fons mutant *rcn1-1*

El bloqueig genètic o farmacològic de l'activitat PP2A altera notablement la distribució subcel·lular de la quimera 1S:GFP (apartats 4.3 i 4.4). Concretament, la freqüència de patró reticulo-vesicular d'aquesta quimera està clarament disminuïda en els mutants *rcn1-1*, *B'' $\alpha$ -1*, *B'' $\alpha$ -2* i *B'' $\alpha$ -3*, si bé els efectes són més severes en el primer cas. Donat que les subunitats reguladores de la PP2A, l'AtB'' $\alpha$  i l'AtB'' $\beta$ , també interaccionen amb l'HMGR1L (Leivar, 2003), es va plantejar la qüestió de si la localització subcel·lular de la quimera 1L:GFP també es veuria afectada en els mutants de la PP2A. Com a primera aproximació per a dilucidar aquesta hipòtesi, es va analitzar la distribució subcel·lular de 1L:GFP en el mutant *rcn1-1* i fou comparada amb l'observada en la seva línia parental WS-2. Cal fer notar que en un fons silvestre la 1L:GFP es localitza al RE (Leivar, 2003). Aquest fet s'observà en cèl·lules epidèrmiques de fulles de l'ecotip Columbia i en la línia cel·lular T87 d'*A. thaliana*.

En el cas de l'estirp WS-2, totes les imatges obtingudes procediren de cèl·lules reticulades (figura 57; panells A i B). Al mutant *rcn1-1*, hi ha una majoria de cèl·lules (un 67%) amb patró reticular (figura 57, panells C-E), però també s'hi advertiren la resta de patrons de distribució subcel·lular. En un 12% dels casos es visualitzaren cèl·lules amb patró reticulo-vesicular (figura 57, pannel F), en un 4% cèl·lules amb un patró reticulo-vesicular amb vesícules de mida superior a 2,5  $\mu$ m i en un 17% cèl·lules que acumulaven grans agregats (figura 57, pannel G). Aquests resultats suggereixen que la PP2A també està implicada en la localització subcel·lular de l'HMGR1L.

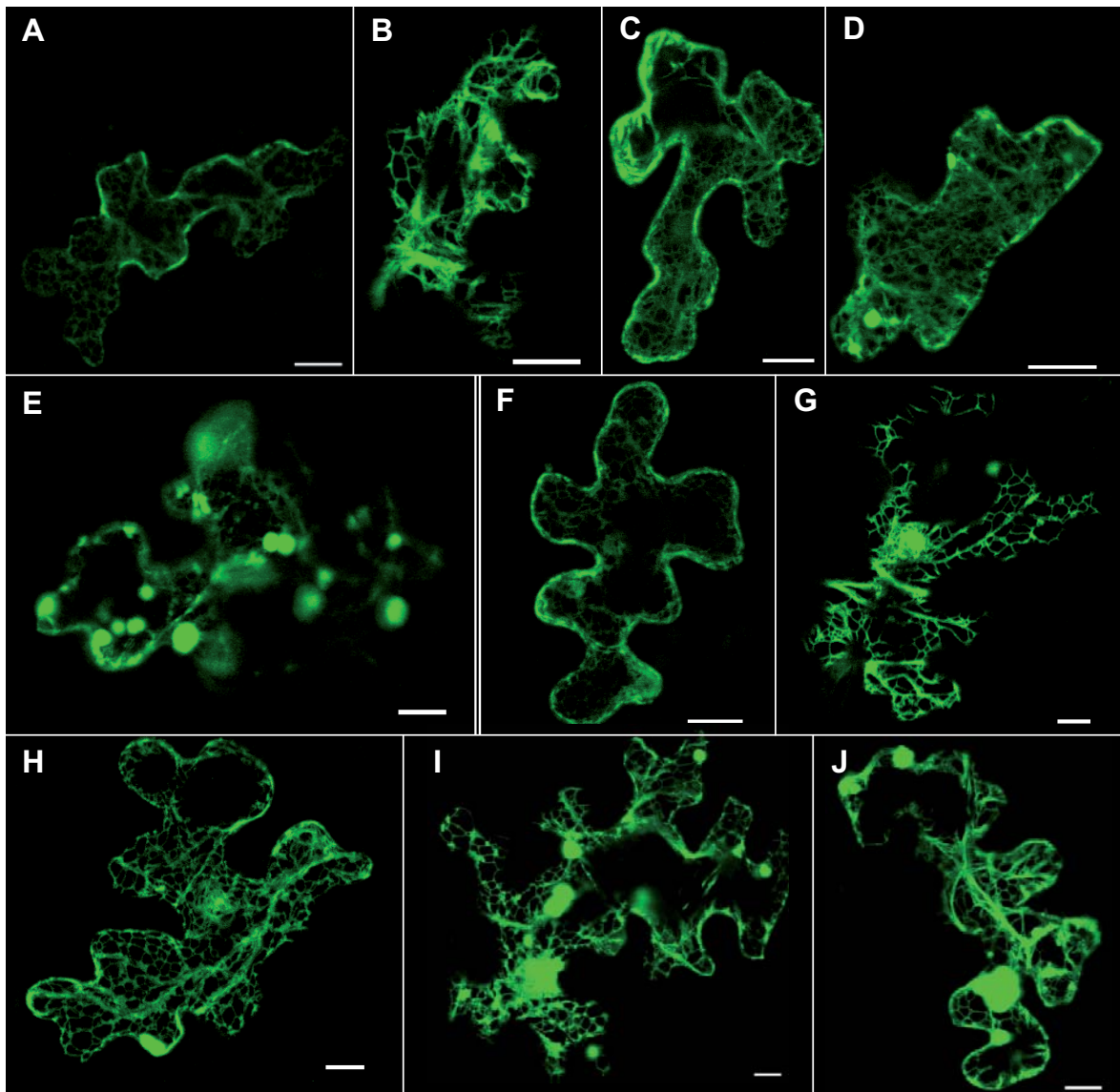


**Fig. 57.** Localització subcel·lular de la quimera 1L:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* del fons mutant *rcn1-1*. Les fulles de les plantes de fons genètic WS-2 (A, B) i *rcn1-1* (C-G) van ser microbombardejades amb la construcció que codifica per 1L:GFP. Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la superposició de 10 seccions de la cèl·lula. A-E: patró reticular, F: patró reticulo-vesicular, G: patró reticular amb agregats. La barra indica 10  $\mu$ m.

#### 4.6.- Localització subcel·lular de la quimera 2:GFP en el fons mutant *rcn1-1*

Les quimeres 1S:GFP i 2:GFP, derivades respectivament de l'HMGR1S i l'HMGR2, tenen una localització subcel·lular reticulo-vesicular. Per altra banda, les isoformes HMGR1S i HMGR1L, però no l'HMGR2, interaccionen amb AtB $\alpha$  i AtB $\beta$  que són subunitats reguladores de la PP2A. Els estudis realitzats, però, no descarten que l'HMGR2 interacció amb altres subunitats reguladores de la PP2A no estudiades i, per tant, pugui estar regulada per aquest enzim.

Per tal de comprovar si la PP2A pot regular la localització subcel·lular de l'HMGR2, es va expressar transitòriament 2:GFP en el fons mutant *rcn1-1*. Paral·lelament es va establir el patró de localització de 2:GFP en el fons parental WS-2. Tant en WS-2 com en *rcn1-1* es van trobar proporcions molt similars de cèl·lules amb patró reticular (58% en WS-2, figura 58, pannells A-C; 57% en *rcn1-1*, figura 58, pannells F-H; taula 8). També es van advertir proporcions relativament similars de cèl·lules que presentaven un patró reticulo-vesicular amb vesícules de mida superior a 2,5  $\mu\text{m}$  (25% en WS-2, figura 58, pannel E; 19% en *rcn1-1*, figura 58, pannel I). Diferències més àmplies foren observades en la freqüència de cèl·lules que mostraven un patró reticulo-vesicular (17% en WS-2, figura 58, pannel D; 5% en *rcn1-1*) i en la freqüència de cèl·lules que mostraven un patró reticular amb agregats (0% en WS-2 i 19% en *rcn1-1*, figura 58, pannel J). Encara que els estudis són preliminars, no s'aprecien diferències respecte a la localització al RE de la quimera 2:GFP. En canvi, sí que es presenten més diferències en la seva localització a vesícules de mida igual o inferior a 2,5  $\mu\text{m}$ . Caldrien estudis més exhaustius per aprovar o descartar la hipòtesi que la PP2A està regulant també la localització de l'HMGR2, però sembla clar que la formació de grans agregats induïts per la quimera 2:GFP també està determinada per la mutació *rcn1-1*. Cal recordar que les altres dues quimeres assajades (1S:GFP i 1L:GFP) també induïen la formació d'aquests derivats del RE en el fons mutant *rcn1-1* (apartats 4.4.1 i 4.5). Per tant, les tres quimeres derivades de l'HMGR, 1S:GFP, 1L:GFP i 2:GFP, induïen la formació d'agregats perinuclears quan s'expressa en el fons mutant *rcn1-1*.



**Fig. 58.** Localització subcel·lular de la quimera 2:GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana* del fons mutant *rcn1-1*. Les fulles de les plantes de fons genètic WS-2 (A-E) i *rcn1-1* (F-J) van ser microbombardejades amb la construcció que codifica per 2:GFP. Posteriorment, van ser incubades en llum contínua, a 22°C durant 18 h i observades per microscopia làser confocal. Les imatges corresponen a la superposició de 10 seccions de la cèl·lula. A-C, F-H: patró reticular; D: patró reticulo-vesicular; E, I: patró reticular amb grans vesícules; J: patró reticular amb agregats. La barra indica 10 µm.



**discussió**

---





## 1.- IDENTIFICACIÓ D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA PER LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID

El sistema del doble híbrid ha esdevingut una eina molt potent per a detectar interaccions proteïna-proteïna (Fields and Song, 1989; Chien et al., 1991; revisat a Gietz et al., 1997). És una tècnica que té en lloc en una cèl·lula eucariota i que per tant, és bastant probable un plegament correcte tant de la proteïna esquer com de les possibles proteïnes diana. A més, aquesta metodologia permet cercar entre totes les proteïnes codificades en una llibreria de cDNA obtinguda en unes determinades condicions. En el present treball (apartats 1.2 i 2.1.1), es van realitzar tres crivellatges de doble híbrid amb una llibreria de cDNA preparada a partir de plantes etiolades de tres dies d'*Arabidopsis thaliana*. En aquest moment del desenvolupament s'estan expressant una gran part dels gens de la planta.

En utilitzar la regió N-terminal de la isoforma HMGR1L (NT1L) com a esquer es van crivar  $1,5 \cdot 10^6$  clons independents de la llibreria i es van identificar tres positius. Dos d'ells codificaven per la subunitat reguladora de tipus B'' de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) i el tercer per una proteïna de funció desconeguda però amb homologia amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I identificada en animals, AtKLC-1 (Leivar, 2003).

En utilitzar el domini catalític de la isoforma HMGR1 com a esquer es van crivar fins a  $5,8 \cdot 10^6$  clons independents de la llibreria, deu dels quals codificaven per formes truncades del mateix domini catalític (apartat 1.2.2 de Resultats). En altres sistemes s'ha descrit que la forma activa de l'HMGR és oligomèrica (Lawrence et al., 1995; Istvan et al., 2000). Per tant, el fet que en el crivellatge s'hagi identificat el propi domini catalític com a proteïna interaccionant evidencia la potencialitat i veracitat d'aquesta tècnica. En aquest crivellatge no s'identificaren falsos positius en part perquè s'utilitzà un domini amb funcions catalítiques sense motius proteics implicats en interacció proteïna-proteïna. Moltes dificultats tècniques van procedir aquest estudi. Per una banda, la soca de llevat pretransformada amb la quimera esquer BD:CD1 creixia molt lentament en medi líquid i s'obtenien colònies de menor diàmetre en medi sòlid (apartat 1.2.2 de Resultats). Per altra, l'eficiència de transformació era molt baixa i insuficient per a obtenir un milió de clons crivats en una sola vegada. L'explicació a aquest fenomen es pot deduir en base a la bibliografia publicada. Es coneix que el domini catalític soluble, o sigui, sense el domini de membrana conserva l'activitat enzimàtica en les diferents HMGR descrites (Hampton et al., 1996). Per tant l'activitat enzimàtica derivada de la quimera BD:CD1 podia alterar el metabolisme de la cèl·lula de llevat. S'ha descrit a la Introducció (apartat 3.3) que l'oxigen és crític en la regulació del flux de la via mevalonat i de la síntesi d'esterols en llevat (Hampton et al., 1996). Quan la disponibilitat d'oxigen és alta se sintetitzen els productes finals de la via (esterols), però en condicions semi-anaeròbiques s'acumulen intermediaris com l'esqualè o el FPP que són citotòxics per la cèl·lula. La soca silvestre de llevat té mecanismes propis per regular-ho i en aquestes condicions, es reprimeix la transcripció i la traducció de la isoforma estable de l'HMGR (HMG1P) mentre que s'activa la transcripció i la traducció de la isoforma menys estable de l'HMGR (HMG2P) on la seva degradació és duta a terme per productes intermediaris de la via (FPP i

esqualè). Quan se sobreexpressa de forma ectòpica el domini catalític de l'HMG1P de llevat en aquestes cèl·lules es desregula el sistema de manera que s'acumula esqualè o algun precursor de l'esqualè en condicions aeròbiques i com a conseqüència, la soca creix més lentament degut a la citotoxicitat provocada per l'acumulació d'aquests compostos intermediaris (Hampton et al., 1996; Donald et al., 1997). En el crivellatge dut a terme, una millor aireació dels cultius de llevat i un pas final de recuperació de les cèl·lules transformades van incidir en una millora notable en l'eficiència de transformació.

En utilitzar la regió N-terminal de la isoforma HMGR2 (NT2) com a esquer, es van crivar un milió de clons independents de la llibreria de cDNA i, a pesar de tot, no es va identificar cap interacció positiva (apartat 1.2.3 de Resultats). Cal recordar que el gen *hmg2* d'*A. thaliana* té baixos nivells d'expressió. Aquest fet suggereix que les possibles proteïnes diana podrien provenir també de gens de baixa expressió. En utilitzar la regió NT1L com a esquer es va identificar un clon positiu per cada 500.000 clons independents crivats. No obstant, en aquest cas s'utilitzà una regió codificada pel gen *hmg1* que presenta alts nivells d'expressió. Per tant, el rastreig d'un nombre més elevats de clons podria permetre la identificació d'una possible interacció amb la proteïna esquer NT2.

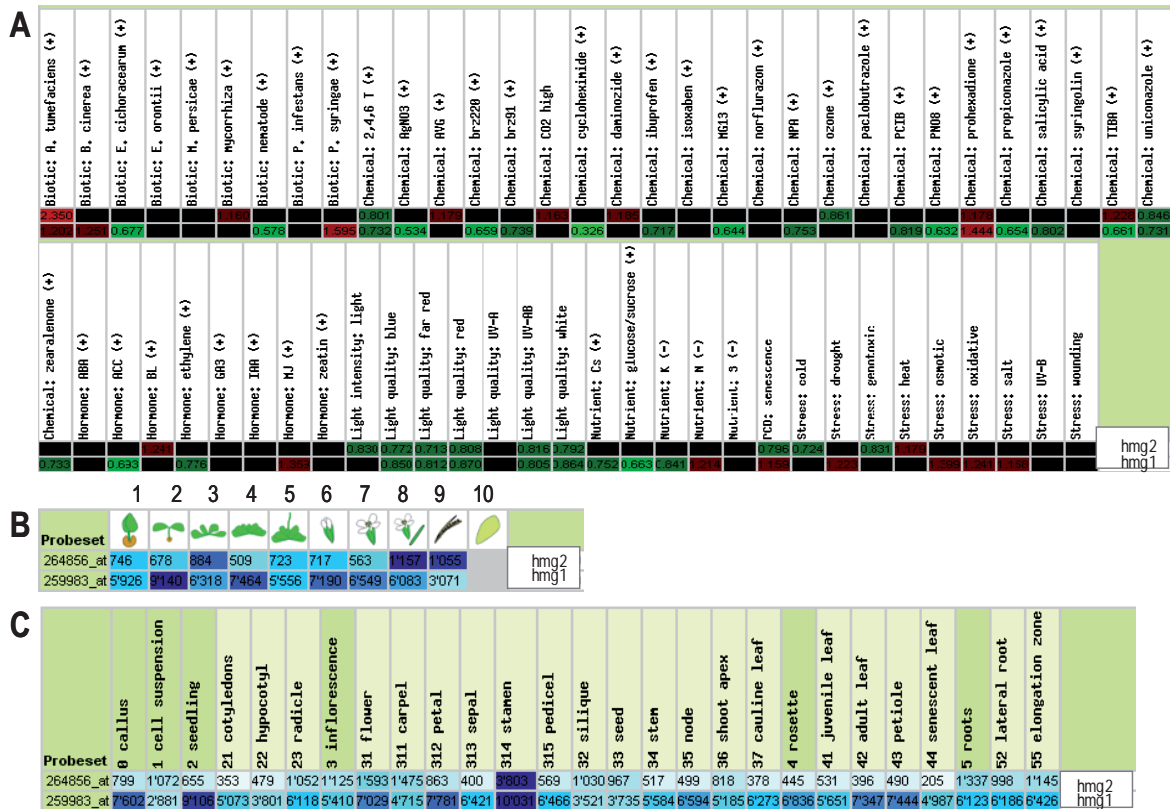
En el tercer crivellatge descrit, s'utilitzà una regió de la proteïna AtKLC-1 que conté motius d'*heptad repeats* (HR), que en altres casos s'ha implicat en interaccions entre proteïnes. En aquesta cerca es van identificar dues de les tres isoformes de subunitat A del complex PP2A, concretament les isoformes PDF2 i RCN1 (apartat 2.1.1 de Resultats). En confirmar la interacció en la soca de llevat Y190, es va observar que els clons identificats es comportaven en part com a falsos positius. Les proteïnes PDF2 i RCN1 interaccionaven de forma feble amb els controls utilitzats per doble híbrid, que són el domini d'unió a DNA del factor de transcripció Gal4 (BD) i la BD:laminina. Tenint en compte que els clons detectats codifiquen per una proteïna rica en motius que participen en interaccions amb altres proteïnes, no és d'estranyar que la seva combinació amb quimeres del BD en la cèl·lula de llevat pugui afavorir la reconstitució del factor de transcripció Gal4, bé per interacció directa o bé per associació amb altres factors que actuarien com a pont. Tot i això, la subunitat A, no és una de les proteïnes que sovint s'identifiquen com falsos positius en el sistema de doble híbrid com ho són alguns factors de resposta a xoc tèrmic (hsp), proteïnes ribosomals, factors de transcripció, etc. (vegeu [http://www.fcc.edu/research/labs/golemis/intro\\_f.html](http://www.fcc.edu/research/labs/golemis/intro_f.html)). A més, els altres crivellatges realitzats en aquest treball ens serveixen de control negatiu, ja que en cap cas es va identificar aquest clon de cDNA. En aquest rastreig, en canvi, s'identificà la subunitat A fins a nou vegades; cinc dels clons codificaven per la mateixa forma truncada de la isoforma RCN1, i quatre per diferents formes truncades de PDF2. El resultat obtingut en el mateix crivellatge suggereix un acotament de la zona d'interacció ja que el clon de menor mida codifica per un fragment que conté la regió compresa entre els residus aminoacídics 270-588 (motius HEAT 7-15).

## 2.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL GEN *HMG1* D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

### 2.1.- Anàlisi del fenotip en el mutant *hmg1-1*

Amb l'objectiu de conèixer la funció de les isoformes HMGR1S i HMGR1L d'*A. thaliana* es va procedir a caracteritzar un mutant en el gen *hmg1*, *hmg1-1*. Les plantes portadores de la mutació en homozigosi germinades i crescudes en foscor mostraven el mateix aspecte que les plantes de la línia parental Columbia 0. En aquestes circumstàncies la manca de les isoformes HMGR1 podria ser compensada per l'HMGR2, ja que en aquestes condicions tot i donar-se una expressió més elevada del gen *hmg1*, també es dona una alta expressió d'*hmg2* (Enjuto, 1994). Sota un règim d'il·luminació de dia curt (8h llum/16h foscor) o de dia llarg (16h llum/8 h foscor), la viabilitat en el mutant *hmg1-1* no es veia afectada quan creixia en medi MS estèril (en placa), i no requeria la presència de mevalonat. En transferir les plantes a terra es van començar a advertir alteracions en el desenvolupament que van desembocar en un acusat fenotip d'enanisme (figura 23 de Resultats). Pel que fa a l'etapa reproductiva, *hmg1-1* és incapaç d'iniciar-la en condicions de dia curt. A dia llarg exhibeix inflorescències denses amb tiges de menor longitud i d'aparent fragilitat. El mutant, a pesar de mostrar senescència primerenca, continua produint flors fins a etapes avançades del desenvolupament, quan la línia parental silvestre ja ha acabat el seu cicle vital. Tot i això la fertilitat en el mutant *hmg1-1* era molt reduïda i va ser parcialment pal·liada mitjançant l'aplicació exògena de mevalonat a les inflorescències. No obstant, és important recalcar que el mutant fou capaç de produir llavors fèrtils en absència d'aplicació exògena de mevalonat.

Experiments de *northern blot* demostraren que l'expressió del gen *hmg1* és molt superior a la del gen *hmg2* en tots els teixits d'*A. thaliana* (Enjuto, 1994). Aquestes dades s'han contrastat amb anàlisis dels nivells d'expressió dels gens *hmg1* i *hmg2* a partir d'experiments realitzats amb microxips d'Affymetrix (Redman et al., 2004), accessibles des de la interfície GENEVESTIGATOR (Zimmerman et al., 2004). Mitjançant l'aplicació MetaAnalyser es corrobora que *hmg1* té uns nivells d'expressió superiors als d'*hmg2* en tots els teixits i estadis de desenvolupament (figura 59). Per tant no resulta desconcertant que un mutant que tingui afectat aquest gen mostri un fenotip sever.



**Fig. 59.** Anàlisi de l'expressió dels gens *hmg1* i *hmg2* d'*A. thaliana*. Anàlisi utilitzant l'aplicació MetaAnalyzer sota condicions d'estrès (A), en els diferents estadis de desenvolupament (B), o en els diferents òrgans (C). Els estadis de desenvolupament han estat definits com: 1 (fins a 5,9 dies), germinació; 2 (fins a 13,9 dies), 3 (fins a 17,9 dies), 4 (fins a 20,9 dies), desenvolupament i creixement de la roseta basal; 5 (fins a 24,9 dies), emergència de la tija; 6 (fins a 28,9 dies) emergència de les inflorescències; 7 (fins a 35,9 dies), producció de flors; 8 (fins a 44,9 dies), producció de siliques; 9 (fins a 50 dies) finalitzada la producció de flors i les siliques es comencen a obrir. Els valors numèrics són obtinguts a partir de les dades experimentals processades amb el software Affymetrix MASS 5.0 i són directament proporcionals als nivells d'expressió (Liu et al., 2002). Els perfils d'expressió dels gens en els diferents òrgans i estadis de desenvolupament està representat per una gradació de color blau-blanc que representen valors absoluts d'intensitat de senyal. Per cada gen, blau fosc significa expressió màxima i blanc absència d'expressió. Els perfils d'expressió dels gens sota condicions d'estrès està representat per gradacions de color roig-verd, que representen valors relatius (tractament versus control). La gradació en roig indica un augment de la intensitat del senyal i la gradació en verd indica una reducció en la intensitat del senyal. *Probeset* és la sonda utilitzada en l'experiment. *Hmg2*, *At2g17370*; *hmg1*, *At1g76490*.

L'enzim HMGR és essencial per a la planta. Tot i això, en les primeres etapes de desenvolupament el mutant *hmg1-1* no presenta alteracions morfològiques. Ja que dins la família gènica *hmg* d'*A. thaliana* *hmg1* és el gen d'expressió majoritària, es suggereix que la manca de les isoformes derivades d'*hmg1*, HMGR1S i HMGR1L, hauria de ser pal·liada d'alguna manera. La manca de transcrit *hmg1* no era compensat per un augment en els nivells de transcrit *hmg2* (apartat 1.1.1 de Resultats). No obstant, mecanismes de regulació posttranscripcional podrien donar lloc una major activitat HMGR derivada de l'HMGR2. Per conèixer la contribució de l'HMGR2 durant aquesta etapa es van dur a terme mesures d'activitat específica en el mutant, que es van comparar amb les de la línia parental silvestre.

En totes les condicions de creixement, l'activitat HMGR en el mutant mostrava una significant reducció en comparació amb la de la línia parental. Per tant aquestes dades indiquen que l'HMGR2 no compensa aportant una major activitat HMGR en les plantes i que per tant, l'activitat residual és suficient per al desenvolupament d'*hmg1-1* durant les primeres setmanes de creixement. No obstant, l'activitat romanent és essencial per a la viabilitat del mutant com es dedueix de la incrementada sensibilitat que mostren les plantes d'aquesta línia en presència de mevinolina, inhibidor de l'HMGR. Part del substrat necessari per a la síntesi d'isoprenoides citosòlics podria procedir de la via plastídica, la via del MEP. Es va analitzar per RT-PCR si en un mutant al·lèlic, *hmg1-1b*, hi havia un mecanisme compensatori per sobreexpressió dels gens *dxs*, *dxr* o *cms* de la via del MEP (Suzuki et al., 2004). En comparació amb plantes silvestres no es donava augment en els nivells de transcrit en cap cas. No obstant, els mecanismes compensatoris poden venir de la regulació posttraduccional. De fet, el mutant *hmg1-1* mostra una incrementada sensibilitat a l'inhibidor de la via del MEP, la fosmidomicina. Aquest resultat és consistent amb que part dels isoprenoides podrien haver estat sintetitzats utilitzant IPP, o un altre precursor, de la via plastídica com a substrat. No obstant, estudis realitzats en plantes joves d'*A. thaliana* que tenen bloquejada una de les dues vies de síntesi de l'IPP, mostraren que l'aplicació del substrat de la via activa no és suficient per restablir un fenotip normal (Kasahara et al., 2002; Nagata et al., 2002). Per tant, tot i que la via del MEP podria col·laborar aportant part del substrat per a la síntesi d'isoprenoides, l'activitat residual del mutant, segurament, és suficient per a generar la gran majoria d'aquests. Així doncs, els alts nivells d'expressió d'*hmg1* i l'alta activitat HMGR detectada durant les primeres etapes del desenvolupament no semblen respondre a la necessitat de produir mevalonat i suggereix que l'HMGR podria dur a terme alguna altra funció en la planta.

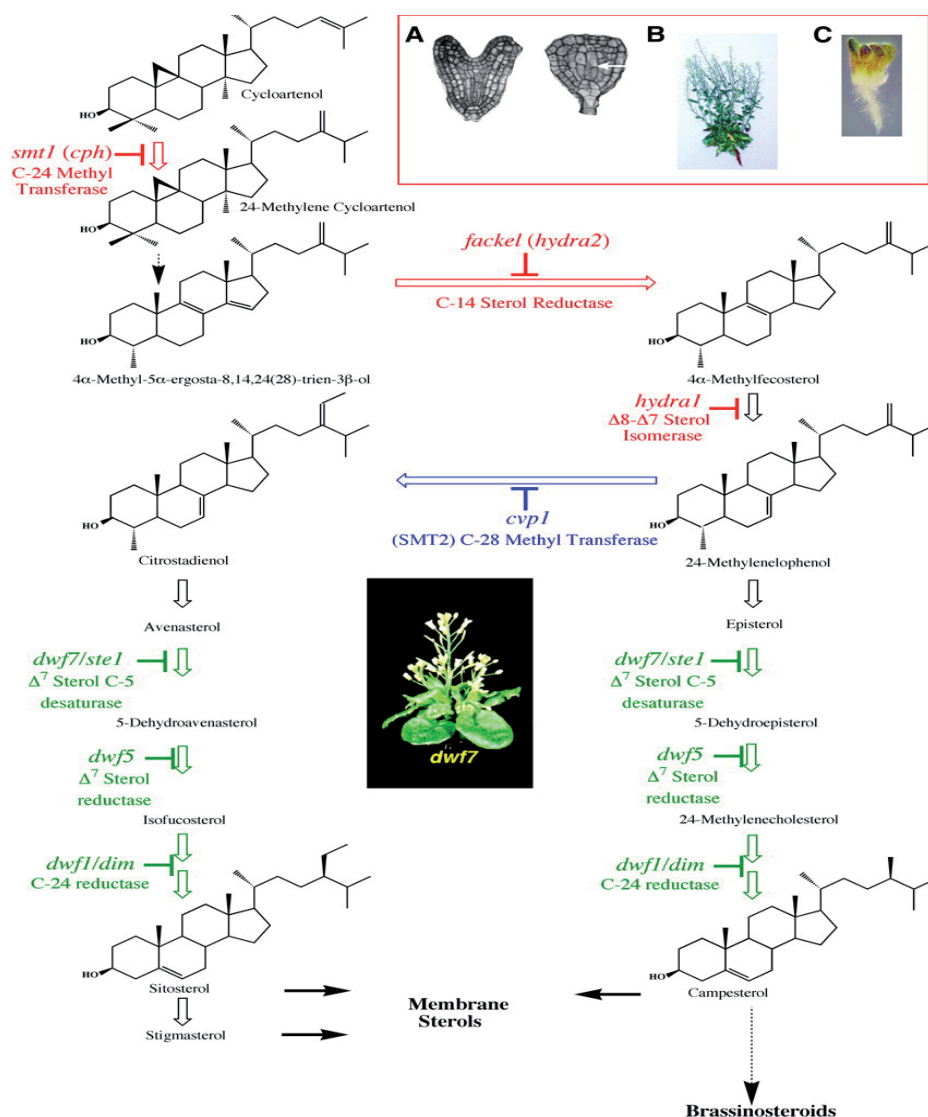
En el moment que les plantes *hmg1-1* són transferides de medi MS a terra comencen a manifestar alteracions. Diverses hipòtesis poden respondre a aquest fet. En primer lloc pot succeir que en aquestes circumstàncies, els requeriments d'isoprenoides de la planta siguin superiors als que es poden generar a partir de l'HMGR2. Una altra opció és que la planta requereix isoprenoides sintetitzats específicament per les isoformes HMGR1S i/o HMGR1L. Finalment una altra possible explicació, és que el mutant *hmg1-1* no pugui superar els efectes provocats per la nova situació perquè li manquen mecanismes de resposta a estrès. Segons aquesta hipòtesi les isoformes HMGR1S i/o HMGR1L durien a terme una altra funció en la cèl·lula i per tant el fenotip no seria revertit amb mevalonat.

S'ha descrit un mutant al·lèlic al mutant *hmg1-1*, al que ens referirem com a *hmg1-1b* per simplicitat, que conté una inserció de T-DNA en l'exó I, en una zona molt propera a la descrita en el mutant *hmg1-1* (Suzuki et al., 2004). El fenotip descrit en plantes adultes d'*hmg1-1b* és molt similar al mostrat en l'apartat 1.1.2 de Resultats. Mitjançant diferents aproximacions van deduir que el fenotip d'enanisme es devia a defectes en l'elongació cel·lular i no a divisió cel·lular. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts en altres sistemes com en fruit d'avocat on inhibidors de l'HMGR provoquen un decrement en el nombre de cèl·lules (Cowan et al., 1997). Els autors també van observar senescència primerenca no deguda a un decrement en el nivell de citoquinines (hormona antagonista de la senescència) i que es podia correlacionar amb un augment en l'expressió del gen *SAG12*, que codifica per una cisteïna

proteasa que s'expressa en senescència. Els autors descriuen que el mutant *hmg1-1b* és estèril i demostren que la infertilitat és deguda a que no es dona elongació del tub pol·línic. És interessant relacionar aquest fet amb la major expressió dels gens *hmg1* i *hmg2* en estams, on els productes d'aquests gens hi podrien realitzar funcions específiques (figura 59).

En el mutants *hmg1-1b* s'observà un decrement del contingut d'esterols d'un 47% en plàntules i d'un 25% en inflorescències (Suzuki et al., 2004). En canvi, en plantes de sobreexpressió de la isoforma HMGR1S, s'observa un increment en els nivells d'esterols campesterol, sitoesterol i estigmaesterol (González, 2002). Per tant, resulta evident que la isoforma HMGR1S catalitza un pas limitant en la síntesi d'esterols. Es desconeix, però, si els defectes observats en els mutants *hmg1* són deguts a la manca d'aquests compostos isoprenoides. Els mutants *hmg1* presenten algunes característiques pròpies dels mutants defectius en la síntesi d'esterols com el fenotip d'enanisme i la baixa fertilitat (revisat a Clouse, 2002; Schaller 2003, 2004). Es poden definir tres tipus de mutants d'esterols (figura 60). Els mutants que afecten les primeres etapes fins a l'obtenció de  $\Delta^7$ esterols (*smt1*, *fackel* i *hydra1*) mostren defectes en embriogènesi que desemboquen en malformacions en les plantes. Plantes madures mostren enanisme i baixa fertilitat. Aquests mutants no poden ser revertits amb el tractament amb brassinoesteroides (hormona vegetal derivada del campesterol). S'atribueixen aquests defectes a l'acumulació d'esterols atípics a la membrana i que, en conseqüència, alteren la senyalització hormonal. En segon lloc, els mutants que afecten l'enzim C28-metiltransferasa (SMT2), enzim que actua en el punt de ramificació de la via que per una banda dóna sitoesterol i estigmaesterol i per altra dóna campesterol i brassinoesteroides. La proporció sitoesterol:campesterol modula el creixement d'*A. thaliana*. En plantes que sobreexpressen la SMT2 la proporció sitoesterol:campesterol és més elevada i, en conseqüència, mostren enanisme que pot ser recuperat amb l'aplicació de brassinoesteroides. Plantes que expressen nivells reduïts de la SMT2 tenen nivells més alts de campesterol i mostren també enanisme, ramificació incrementada i baixa fertilitat, defectes no recuperats amb brassinoesteroides (Schaeffer et al., 2001). Finalment els mutants que afecten darrers passos en la síntesi d'esterols finals (*dwf7/ste1*, *dwf5*, *dwf1/dim*) no mostren defectes en embriogènesi, però sí altres defectes com creixement reduït, que pot ser recuperat amb l'aplicació exògena de brassinoesteroides. Els mutants *hmg1* no són defectius en brassinoesteroides ja que no presenten fotomorfogènesi en foscor (hipocòtil curt, cotilèdons oberts i deetiols) com ho fan mutants defectius en aquesta hormona (Chory et al., 1991). Tampoc mostren defectes en embriogènesi com els mutants *smt1*, *fackel* o *hydra1*. No obstant, a diferència d'aquestes línies, els mutants *hmg1* no acumularien esterols atípics. El fenotip del mutant és més semblant al que presenta la línia que té una baixa expressió de la SMT2. Una altra possibilitat és que un decrement en altres triterpenoides pugui causar el conjunt d'alteracions observades en els mutants *hmg1*. Les funcions dels triterpenoides són força desconegudes i fins al moment no s'ha descrit que tinguin un paper en la regulació del creixement (Chappell, 2002). Encara que alguns defectes del mutant *hmg1-1* com l'estatura reduïda, l'increment en la ramificació i la baixa fertilitat són similars als defectes que mostren alguns mutants d'esterols, cal recordar que aquestes alteracions apareixen en el moment en que la planta s'ha d'adaptar a un nou

ambient. Per tant, també és possible que les isoformes HMGR1S i/o HMGR1L duguin a terme una funció diferent a la metabòlica, com ja s'ha insinuat anteriorment.



**Fig. 60.** Via de biosíntesi d'esterols. El cicloartenol, alquilat en la posició C-24 per la metil transferasa SMT1 finalment es converteix en un intermediari triè. Una C-14 esterol reductasa (FK), i una  $\Delta^7$ - $\Delta^8$  isomerasa (HYD1), converteixen el triè en 24-metilenelofenol, un punt de ramificació de la via. Dues vies paral·leles condueixen als esterols de membrana sitoesterol i campesterol. La metiltransferasa SMT2 controla la proporció entre aquests dos esterols. El campesterol és el substrat per a la síntesi de brassinoesteroides, requerits per desenvolupament postembrionari. Defectes en embriogènesi són observats en mutants anteriors a 24-metilenefenol (en vermell) però no en posteriors (en blau o verd). Mutants mostrats en verd, com *dwf7/ste1* presenten fenotips alterats que poden ser recuperats amb el tractament amb brassinoesteroides. (A) Diferències morfològiques entre un embrió normal (esquerra) i *fackel* (dreta). (B) Planta adulta *fackel*. (C) Múltiples cotil·ledons de una planta *fackel* (Clouse, 2002).

L'esterilitat en *hmg1-1b* es recupera quan s'aplica de forma exògena mevalonat o esqualè (substrat dels triterpenoides) a les inflorescències. Això suggereix que un derivat de l'esqualè és necessari per a



l'elongació del tub pol·línic (Suzuki et al., 2004). En canvi, en el mutant *hmg1-1*, el tractament amb mevalonat permetia recuperar només parcialment la fertilitat. Es desconeixen moltes qüestions del treball publicat per Suzuki i col·laboradors (2004). Per exemple, no es detalla fins a quin punt observen recuperació de les inflorescències quan apliquen mevalonat de forma exògena, o si amb el tractament produeix major o menor nombre de llavors que la varietat parental. Aquesta manca d'informació fa pensar que, probablement, han tingut dificultats en propagar individus portadors de la mutació en homozigosi. Tenint en compte que la inserció de T-DNA té lloc en posicions molt semblants, es dedueix que es tracta del mateix tipus de mutant i, molt probablement, el mutant *hmg1-1* presenta també esterilitat masculina. Consistent amb aquesta hipòtesi, és el fet que va ser possible obtenir descendència en pol·linitzar oòcits de plantes *hmg1-1* amb pol·len de plantes silvestres (apartat 6 de Materials i Mètodes). Per a l'elongació del tub pol·línic és essencial el moviment de vesícules i d'òrgànuls cap a la membrana apical on hi participen elements del citoesquelet i la PP2A (Crowell, 2000; Foissner et al., 2002; Romagnoli et al., 2003b). No obstant, també la prenilació de proteïnes juga un paper central en l'organització del citoesquelet d'actina i és important per l'elongació del tub pol·línic (Li et al., 1999; Crowell, 2000; Gu et al., 2003). Per tant, una altra opció és que la síntesi d'aquest derivat isoprenoide sigui duta a terme específicament per l'HMGR1S o per l'HMGR1L. El fet que amb l'aplicació exògena de mevalonat no es recuperi d'una forma més evident la fertilitat fa pensar amb la possibilitat que les proteïnes HMGR1S i/o HMGR1L podrien tenir alguna funció diferent a la pròpiament enzimàtica.

S'ha observat que el domini N-terminal d'HMGR1S induïx la formació de vesícules derivades del RE (apartat 4 de Resultats i Leivar, 2003). Aquestes vesícules podrien tenir un paper en la biogènesi de membranes cel·lulars necessària per a l'elongació del tub pol·línic. En resposta a estrès ambiental, a ferida o a metiljasmonat (hormona que participa en les respostes de la planta a dany) s'indueix la formació de vesícules derivades del RE en *A. thaliana* (Matsushima et al., 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). És suggerent el fet que el mutant *hmg1-1* mostra alteracions més severes front l'estrès que li causa el canvi de medi MS a terra i en l'elongació del tub pol·línic, moments que coincideixen amb la proliferació de vesícules en les cèl·lules. Per conèixer si els defectes observats en el mutant *hmg1-1* són deguts a una manca d'isoprenoides específics (manca d'activitat enzimàtica) o a una deficiència en la generació d'estructures derivades del domini N-terminal d'HMGR1 (manca de la proteïna HMGR1S i/o HMGR1L en el sistema endomembranós), s'estan generant plantes portadores de la mutació *hmg1* en homozigosi que continguin bé una forma sencera de l'HMGR1S (es recuperaria el fenotip en ambdues hipòtesis), el domini catalític soluble (es recuperaria el fenotip si existeix una deficiència metabòlica) o bé una quimera amb el domini N-terminal d'HMGR1S, per exemple, 1S:GFP (es recuperaria el fenotip si el domini N-terminal d'aquesta isoforma té algun paper en la biogènesi de membranes cel·lulars essencials per a la viabilitat de la planta en determinats moments o teixits).

## 2.2.- Contribució del gen *hmg1* a l'activitat HMGR

S'estudiaren els nivells d'activitat HMGR en el mutant *hmg1-1*, que es compararen amb els obtinguts de la línia silvestre parental. En plantes mutants crescudes en foscor o a dia curt, l'activitat HMGR

estava disminuïda en un 84% (apartat 1.1.3 de Resultats, figura 24). Quan les plantes foren crescudes en condicions de dia llarg, el decrement d'activitat de la línia *hmg1-1* no fou tan abrupte i disminuï un 66%. Aquestes mesures d'activitat van ser realitzades amb extractes preparats a partir de plantes recollides en finalitzar un període de foscor, condicions on l'activitat HMGR és elevada. Es van fer mesures d'activitat en extractes de plantes crescudes en condicions de dia llarg i recollides després d'haver estat en llum durant quatre hores. Les diferències en aquest cas foren menors (les plantes de la línia mutant presentaven un 10% menys d'activitat respecte les de la línia parental). Finalment, cal recordar que en condicions de dia llarg, s'obtingué un 41% menys d'activitat que en condicions de dia curt en extractes de plantes silvestres. Les conclusions que poden derivar d'aquests resultats són diverses.

En primer lloc s'observa que tant en condicions de foscor com de dia curt és quan es dona més activitat HMGR. A més, en condicions de dia llarg, l'activitat HMGR que s'observa en les plantes silvestres és menor quan les plantes són recollides després d'haver estat en un període de llum. Aquests resultats es poden correlacionar amb els patrons d'expressió dels gens *hmg1* i *hmg2*, ja que s'ha observat que la llum reprimeix la seva expressió (Learned, 1996; Learned, 1997; Rodríguez-Concepción et al., 2004). A més, ja s'havia observat que plantes crescudes en condicions de dia curt mostraven més activitat HMGR que quan eren crescudes en condicions de dia llarg (Manzano et al., 2004).

En segon lloc, en condicions de dia curt, el mutant *hmg1-1* presenta un fenotip més sever. Això coincideix amb el fet que en aquestes circumstàncies és on es dona un decrement més important de l'activitat HMGR en la línia mutant, en comparació amb els elevats nivells d'activitat que mostra la línia silvestre. A dia llarg, el fenotip de les plantes també es veu afectat, però tot i això, el mutant és capaç d'entrar en l'etapa reproductiva. En aquest cas la reducció d'activitat HMGR és més moderada. Les plàntules etiolades de la línia mutant no mostren diferències de desenvolupament respecte les de la parental silvestre. En canvi, els nivells d'activitat HMGR detectats en extractes de plantes mutants eren força baixos. Tenint en compte que en aquestes condicions la via del MEP està reprimida, l'activitat HMGR derivada d'*hmg2* era suficient per als requeriments de la cèl·lula.

En tercer lloc, es pot deduir que les isoformes derivades del gen *hmg1* són les que més contribueixen a l'activitat HMGR total. Tenint en compte que els nivells de transcrit d'*hmg1s* és força superior als d'*hmg1l* (Lumbreras et al., 1995) es dedueix que la major part de l'activitat HMGR detectada prové de la isoforma HMGR1S. Globalment, s'observa que mentre l'activitat HMGR màxima (obtinguda de les plantes silvestres) varia en funció de les condicions, l'activitat mínima (obtinguda de les plantes *hmg1-1*) presenta un valor similar (al voltant de 2 pmol d'HMGCoA/min\*mg) en plantes crescudes en foscor, a dia curt o a dia llarg. També la línia parental silvestre crescuda a dia llarg i recollida després d'un període de llum mostra uns valors similars. Per tant, l'activitat HMGR de la planta derivada d'*hmg1* està sotmesa a regulació d'una forma transcripcional i/o posttranscripcional. Quan l'activitat HMGR és bloquejada del tot amb mevinolina, les plantes no superen l'estadi de dos cotilèdons. Per tant, aquest marge d'activitat és important per al desenvolupament de la planta.

### 2.3.- Paper del domini catalític en l'oligomerització de l'HMGR

A partir del crivellatge de  $5,8 \cdot 10^6$  clons de cDNA independents de la genoteca d'*A. thaliana* es van identificar fins a deu clons que codificaven per versions truncades del domini catalític de l'HMGR1.

A pesar que s'havia suggerit que l'HMGR podria formar part d'associacions enzimàtiques i constituir un canal metabòlic per a la síntesi específica d'isoprenoides, l'estudi realitzat no aporta dades que recolzin aquesta hipòtesi, tot i l'elevat nombre de clons crivats. Dins d'aquest context cal assenyalar que tampoc es van observar interaccions positives per doble híbrid en combinar enzims de la via del mevalonat (Leivar, 2003). El domini catalític de l'HMGR és conservat en tots els organismes coneguts. El grau de conservació és molt elevat en els residus implicats en la unió als substrats de la reacció i en un residu de serina que fosforilat impedeix la formació del centre actiu de l'enzim (Istvan et al., 2000). El mecanisme de regulació per fosforilació en aquest residu està descrit en animals i llevat (revisat a Halford and Hardie, 1998). S'ha estudiat en plantes i també hi ha indicis de la seva existència (vegeu Introducció, apartat 3.6.5). No obstant, en el crivellatge tampoc es van identificar proteïnes que poguessin participar en aquest mecanisme de regulació enzimàtica. Cal tenir en compte que les associacions que es donarien per aquest control podrien ser de caire puntual i massa febles per arribar a ser detectades en el sistema de doble híbrid.

Els resultats obtinguts no van ser sorprenents ja que els clons positius de cDNA identificats codificaven per formes truncades del domini catalític de l'HMGR1 (vegeu taula 4 i figura 28 de Resultats). Aquest resultat evidencia que el domini catalític de l'HMGR1 oligomeritza. Els fragments identificats engloben gairebé la totalitat del domini catalític. S'ha cristal·litzat el domini catalític de *Pseudomonas mevalonii* (classe I) i l'humà (classe II) i en ambdós casos ho fa en forma de tetràmer (Lawrence et al., 1995; Istvan et al., 2000). En les anàlisis dels estudis cristal·logràfics s'observa que per l'activitat catalítica és necessària la dimerització on es formen dos centres catalítics. Cada centre catalític està format per residus dels dos monòmers. Per tant, és essencial al menys la dimerització per a què es doni activitat HMGR. El monòmer del domini catalític de l'HMGR humana es pot dividir en tres subdominis: el domini-N (a l'extrem N-terminal), el domini-L (*large domain*) i el domini-S (*small domain*) (Istvan et al., 2000). Els tres subdominis participen en la formació del dímer. Per tant, no és d'estranyar que tots els fragments truncats identificats representen gairebé la totalitat del domini catalític. A partir dels resultats obtinguts, i en base als treballs publicats, es dedueix que l'HMGR d'*A. thaliana* dimeritza (o probablement tetrameritza) *in vivo*.

### 3.- CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL GEN *HMG2* D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

L'estudi de les funcions específiques de la isoforma HMGR2 d'*A. thaliana* es va abordar a partir de diferents aproximacions: estudi en mutants en el gen *hmg2* (apartat 1.1 de Resultats) i cerca de proteïnes que interaccionin amb la seva regió N-terminal (apartat 1.2.3 de Resultats).

Es va procedir a l'estudi de tres línies mutants per inserció de T-DNA en el gen *hmg2*. Dues d'elles contenen el T-DNA a la zona 5'UTR i no impedeix la transcripció del gen. La tercera, *hmg2-3*, conté la inserció a nivell del tercer exó. En aquest cas la transcripció d'*hmg2* queda interrompuda en la regió que codifica pel domini catalític. En aquest mutant, en cas de sintetitzar-se algun producte s'obtindria una forma no funcional de la proteïna HMGR2. Se'n va analitzar el fenotip, i no es va observar cap tipus d'alteració en les condicions de cultiu emprades. No obstant així, el mutant era més sensible al creixement en presència de mevinolina que la respectiva línia parental silvestre (apartat 1.1.3 de Resultats, figura 25C). Aquesta sensibilitat a la mevinolina també es va observar en l'estudi d'un mutant *hmg2* al·lèlic reportat a la literatura (Suzuki et al., 2004). Tot i aquesta major sensibilitat a la mevinolina, l'activitat HMGR determinada *in vitro* no es va veure disminuïda en el mutant *hmg2-3* crescut en condicions de foscor, de dia curt o de dia llarg. És més, fins i tot s'observà un lleuger increment en l'activitat HMGR en comparació amb la línia parental.

El gen *hmg2* s'expressa en menor proporció que el gen *hmg1* i ho fa en teixits meristemàtics, florals i arrels (Enjuto, 1994, 1995). En general s'expressa en teixits on les cèl·lules es divideixen activament, condicions on també hi ha una alta expressió del gen *hmg1*. Per tant, en les condicions de creixement emprades les funcions de la isoforma HMGR2 semblen redundants i poden ser substituïdes per l'HMGR1. En plantes de tabac transformades amb el gen GUS sota control del promotor del gen *hmg2*, s'ha vist expressió en teixits florals com el tub pol·línic (Enjuto, 1995). No obstant la manca d'expressió d'aquesta isoforma en aquest teixit no afecta el seu desenvolupament, a diferència del mutant en el gen *hmg1*, que presenta esterilitat masculina. L'HMGR2 té un hipotètic motiu d'N-glicosilació a la regió luminal (Enjuto, 1994). El lloc de N-glicosilació és present en les HMGR de plantes associades a la síntesi de compostos implicats en els mecanismes de defensa (McCaskill, 1998). No obstant, el promotor del gen *hmg2* d'*A. thaliana* no s'activa per ferida, encara que altres tipus d'estrès o d'elictors podrien propiciar l'expressió d'aquest gen (Enjuto, 1995).

Es va qüestionar si es dona alguna condició en què el gen *hmg2* respongui d'una forma diferencial al gen *hmg1*. Segons l'eina GeneAtlas de GENEVESTIGATOR, allà on més s'expressa *hmg2* és en estams, però també és en aquest teixit on s'observa més expressió d'*hmg1* i unes 2,6 vegades superior a l'expressió d'*hmg2* (figura 59C). En quan a la resposta a diferents factors, l'expressió de l'*hmg2* es manté força invariable sota la majoria de condicions (figura 59A). Augmenta per atac per *Agrobacterium*, per brassinòlids, per calor, i es reprimeix per llum, per alguns agents químics, per fred, i per estrès genotòxic. L'agent químic TIBA, inhibidor del transport d'auxines, provoca efectes contraris en els dos gens *hmg*: indueix l'expressió del gen *hmg2* i reprimeix la del gen *hmg1*. En canvi,

la senescència provoca una repressió del gen *hmg2* i un augment de la transcripció del gen *hmg1*. Totes aquestes dades són aportades a partir d'experiments amb microxips i s'han de considerar com preliminars. A partir d'aquí, s'haurien de confirmar mitjançant estudis més estrictes d'expressió tipus *northern-blot*, o RT-PCR quantitativa.

La regió N-terminal de l'HMGR1S i l'HMGR1L interacciona amb AtB" $\alpha$  i AtB" $\beta$  que són isoformes de la subunitat B'' de la PP2A (Leivar, 2003). A més, la regió N-terminal de l'HMGR1L interacciona específicament amb AtKLC-1 que és homòloga a cadena lleugera de quinesina de tipus I. Cap d'aquestes proteïnes és capaç d'interaccionar amb la regió N-terminal citosòlica de l'HMGR2. Aquests resultats suggereixen una regulació diferent de les isoformes de l'HMGR. En aquest treball no s'ha identificat cap proteïna capaç d'interaccionar amb aquest regió. Tot i això no es pot descartar la participació d'algun factor en la regulació específica d'aquesta isoforma.

## 4.- INTERACCIONS DE L'AtKLC-1 AMB ALTRES PROTEÏNES

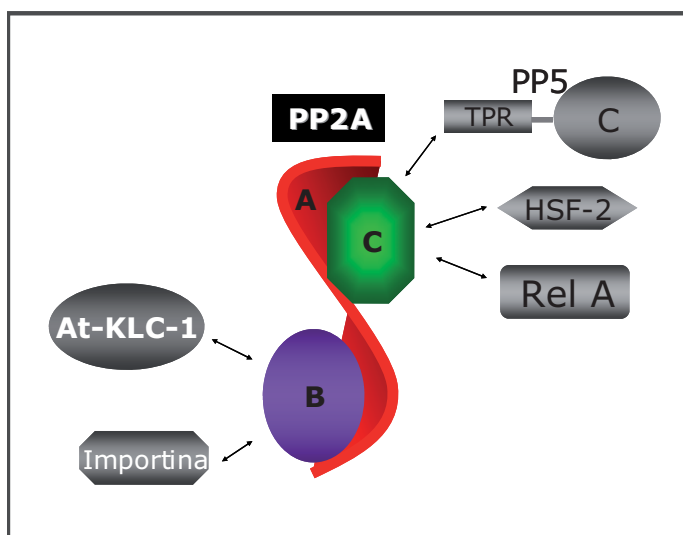
### 4.1.- Amb la subunitat A del complex PP2A

La quinesina de tipus I està formada per dues cadenes pesants (KHC) i dues cadenes lleugeres (KLC) (apartat 5 de la Introducció). La proteïna AtKLC-1 que interacciona amb la isoforma HMGR1L (Leivar, 2003) mostra homologia amb la KLC. A més d'una certa conservació de seqüència (14% d'identitat) aquestes proteïnes comparteixen una mateixa organització modular (figura 29). La regió d'unió a la molècula diana (zona de repeticions TPR) està flanquejada per una petita regió d'*heptad repeats* (HR) a N-terminal i una altra seqüència molt variable a l'extrem C-terminal. A la quinesina de tipus I descrita en cèl·lules animals, la regió HR de KLC interacciona amb una altra regió HR de KHC (Vale and Fletterick, 1997). Per tal d'identificar la cadena pesant corresponent a AtKLC-1 es va fer un crivellatge de la llibreria pACT amb un fragment N-terminal d'aquesta proteïna que inclou els motius d'HR. En aquest crivellatge, no es va identificar cap proteïna amb homologia a la KHC però sí es van identificar les proteïnes PDF2 i RCN1, isoformes de la subunitat A (PR65) de la PP2A. Tot i que tant PDF2 com RCN1 donen un cert grau d'interacció inespecífica en els experiments de doble híbrid, la seva interacció amb l'AtKLC-1 va ser confirmada *in vitro* en experiments de GST *pull-down*. A més la PR65 va ser aïllada a partir d'un extracte d'*A. thaliana* gràcies a la seva interacció amb la proteïna quimèrica GST:AtKLC-1.

En *A. thaliana* hi ha tres gens, *pdf1*, *pdf2* i *rcn1*, que codifiquen per isoformes de la PR65. En el crivellatge es van identificar quatre clons que codificaven per formes truncades a l'extrem N-terminal de PDF2, i cinc clons que codificaven per la mateixa forma truncada de RCN1 (apartat 2.1.1 de Resultats, figura 30). Tot i l'alta homologia que presenten les tres isoformes d'*A. thaliana* que codifiquen per PR65 (86% d'identitat en residus aminoacídics) (vegeu apartat 4.1 de la Introducció, figura 17) no es trobà cap clon que codifiqués per PDF1. En comparar els nivells d'expressió dels gens *pdf2* (*At1g13320*), *pdf1* (*At3g25800*) i *rcn1* (*At1g25490*) per GENEVESTIGATOR s'observa que els tres gens s'expressen de forma ubíqua en tots els teixits (aplicació Gene Atlas) i en tots els estadis de desenvolupament (aplicació Gene Chronologer). Pel que fa a les bases de dades d'ESTs, que són un reflex dels nivells d'expressió, s'observa que *rcn1* és el més representat (38 ESTs). En canvi es troben 13 ESTs de *pdf2* i 14 ESTs de *pdf1*. Aquest fet suggereix que els nivells d'expressió són similars pels dos gens. Per tant, probablement, la llibreria emprada conté el cDNA *pdf1*. Tot i l'homologia entre les tres isoformes, la interacció amb AtKLC-1 podria ser específica per a PDF2 i per a RCN1.

Els clons identificats en el rastreig foren fragments truncats a 5' dels cDNAs *pdf2* i *rcn1*. El fragment de menor longitud identificat corresponia al clon 41.2 que codifica per la proteïna PDF2 i que conté residus compresos entre el HEAT 7 i el HEAT 15 (apartat 2.1.1 de Resultats, figura 30B). Per tant, es suggereix que la zona implicada en la interacció està compresa entre aquests dos motius HEAT. Per assaigs GST *pull-down*, s'acotà la zona d'interacció que se situa entre el HEAT 7 i el HEAT 9 (apartat 2.1.1.2 de Resultats, figura 34A). És important subratllar que la regió d'interacció coincideix amb la regió d'interacció amb la subunitat reguladora AtB"α (apartat 2.1.2.2 de Resultats, figura 34B).

La subunitat A té un paper estructural en la PP2A ja que coordina l'engalament de la subunitat catalítica amb la subunitat reguladora de tipus B (per més detalls vegeu apartat 4 de la Introducció) (Strack et al., 2002). L'anàlisi estructural de la PR65 humana revela una conformació formada per 15 repeticions en *tandem* de 39 aminoàcids anomenades HEAT, motiu que presenten també altres proteïnes (Groves et al., 1999). Les PR65 dels diferents organismes mostren un alt grau de similitud que suggereix que comparteixen la mateixa arquitectura proteica. Les repeticions HEAT 11-15 són necessàries i suficients per a la interacció amb la subunitat catalítica. Les repeticions HEAT 1-10 estan implicades amb la interacció amb la subunitat B i amb antígens del virus del polioma i SV40 (figura 61) (Ruediger et al., 1994; Sontag, 2001). Altres treballs demostren la interacció de la PR65 amb altres proteïnes a través dels motius HEAT atribuint noves propietats al complex. Dins d'aquest context la proteïna interaccionant pot desplaçar la subunitat de tipus B o la subunitat C. Per exemple, la PR65 humana pot associar-se al factor de transcripció RelA (Yang et al., 2001). En aquesta situació, l'heterodímer format per les subunitats A i C és capaç de defosforilar i inactivar RelA. Per tant, es mostra un exemple de com el nucli de l'enzim PP2A és capaç de defosforilar una proteïna per interacció directa amb la PR65. Altres treballs demostren l'existència de proteïnes que interaccionen amb els darrers motius HEAT de la PR65 humana. Un exemple és la importina 9 que s'associa amb PR65 a través dels HEAT 6-15 (Lubert i Sarge, 2003). El factor de transcripció de resposta a xoc tèrmic (HSF2) s'associa a PR65 a través dels motius HEAT a l'extrem C-terminal desplaçant així la subunitat C (Hong and Sarge, 1998). El HEAT 11 de la subunitat A és important per a la interacció amb una regió de TPR de la proteïna fosfatasa 5 (PP5) (Lubert et al., 2001). A més, els resultats indiquen que en aquesta associació també es desplaça la subunitat C de manera que es forma un nou complex amb una altra fosfatasa.



**Fig. 61.** Esquema de l'heterotrímer PP2A. La PP2A està formada per la subunitat A o PR65 i la subunitat catalítica o C que formen el nucli de l'enzim. Tres famílies codifiquen per la subunitat de tipus B que dona especificitat de substrat al complex. Altres proteïnes interaccionen amb el nucli de l'enzim. En són alguns exemples Rel A; *HSF-2*, Heat Shock Factor 2; *PP5*, proteïna fosfatasa 5 o la importina i AtKLC-1, identificada en aquest treball.





La interacció entre la PP5 i la PR65 està mediada per motius TPR de la primera proteïna i motius HEAT de la segona (Lubert et al., 2001). Els motius TPR i HEAT són similars estructuralment i estan formats per hèlix  $\alpha$  antiparal·leles amfipàtiques (Groves and Bardford, 1999). En la interacció entre la PR65 i l'AtKLC-1 estan implicats motius HEAT per una banda i regions HR per l'altra. Aquesta interacció ha estat demostrada per doble híbrid (apartat 2.1.1 de Resultats) i per assaigs GST *pull-down* (apartat 2.1.1.1 de Resultats, figura 31). No obstant, els resultats també indiquen que la resta de proteïna potencia la interacció (compareu pannels A i B de la figura 32). La dilucidació d'estructures proteiques ha revelat que motius de repetició d'aminoàcids, que inclou motius *armadillo*, motius HEAT i les repeticions tetratricopèptid pertanyen a una classe de repeticions tipus hèlix  $\alpha$  (Groves and Bardford, 1999). Totes elles tenen en comú la propietat d'estar formades per repeticions en tàndem d'una unitat estructural formada per hèlix  $\alpha$ , i a vegades hèlix  $3_{10}$  generant estructures superhelicoidals ideals per formar una superfície de reconeixement proteic.

## 4.2.- Amb l'AtKHC

En el crivellatge realitzat per doble híbrid no havia estat possible identificar una cadena pesant de quinesina de tipus I (KHC) que interaccionés amb l'esquer que contenia la regió d'HR d'AtKLC-1. En base a un estudi anterior (Reddy and Day, 2001) i a anàlisis més exhaustives realitzades en el present treball, s'identificà un gen d'*A. thaliana* que, potencialment, codifica per KHC (proteïna AtKHC) (apartat 2.1.2 de Resultats). Mitjançant assaigs GST *pull-down* es va comprovar que AtKLC-1 interacciona amb AtKHC. Per a la interacció són suficients els 200 primers residus aminoacídics d'AtKLC-1, que contenen la regió d'HR. No s'ha comprovat si aquesta regió es dona realment a la planta ni s'han realitzat altres aproximacions experimentals per estudiar-ne la seva funció a la cèl·lula, però sí s'ha determinat que la interacció és específica. Cal afegir que els gens que codifiquen per AtKLC-1 i AtKHC s'expressen a baix nivell en *A. thaliana*. Tot i això, la seva expressió coincideix en cèl·lules en suspensió (apartat 2.1.2 de Resultats, figura 37). En aquestes condicions també es detecten alts nivells del transcrit *hmgr11* (Lumbreras et al., 1995). Es suggereix que en cèl·lules no diferenciades que es divideixen activament la formació d'aquest complex podria tenir un paper particularment important.

Les quinesines constitueixen una superfamília de proteïnes motores d'unió a microtúbuls que es troben en tots els organismes eucariotes (per més detalls vegeu apartat 5 de la Introducció). La funció de la quinesina de tipus I en animals és la de transportar vesícules i orgànuls a través de microtúbuls. Aquesta proteïna està formada per dues cadenes pesants o KHC i dues cadenes lleugeres o KLC (figura 19). L'AtKHC analitzada en el present treball té la regió motora d'unió a microtúbuls a l'extrem N-terminal que és homòloga a les KHC d'altres organismes (apartat 2.1.2 de Resultats). Tot i que li manca la regió d'HR, a la part C-terminal de la proteïna hi ha una seqüència que pot adoptar una estructura *coiled-coil*, la qual cosa permetria la interacció amb la regió HR d'AtKLC-1 (figura 36). Les regions TPR de les KLC estan implicades en el reconeixement i l'associació amb la diana cel·lular que ha de ser transportada (Manning and Snyder, 2000). Consistent amb la hipòtesi que pot existir un complex quinesina de tipus I en *A. thaliana* és que les regions TPR d'AtKLC-1 participen en

la interacció amb l'HMGR1L (Leivar, 2003). En la cèl·lula la isoforma HMGR1L es localitza exclusivament al reticle endoplasmàtic (RE) a diferència de l'HMGR1S i de l'HMGR2 que mostren una localització reticulo-vesicular (apartat 4 de Resultats i (Leivar, 2003). Es va suggerir que AtKLC-1 tot interaccionant amb una molècula KHC podia participar en el transport retrògrad al RE a través de microtúbuls (Leivar, 2003).

En el present treball s'ha observat que AtKLC-1 interacciona amb la subunitat A de la PP2A (apartat 2.1.1 de Resultats). Evidències experimentals en altres sistemes indiquen la implicació de la PP2A en la regulació del complex quinesina de tipus I. En cèl·lules humanes el tractament amb àcid okadaic (inhibidor específic de PP2A) provoca un increment en el nivell de fosforilació de la cadena lleugera de quinesina de tipus I. Això és suficient per augmentar el moviment de vesícules dependents de microtúbuls (Lindesmith et al., 1997). Seria interessant estudiar si en *A. thaliana* el moviment de vesícules a través del citoesquelet és dependent d'un complex quinesina de tipus I i, a més, regulat per la PP2A.

En plantes hi ha diverses seqüències que codifiquen per proteïnes amb homologia amb el domini motor de quinesina. Aquestes seqüències es poden agrupar en diferents famílies, algunes de les quals resulten exclusives de plantes i fins i tot d'*A. thaliana* (Reddy and Day, 2001). La subfamília de quinesines implicades en el transport està poc representada a les plantes i també a *A. thaliana*. Per tant, tot i que s'ha demostrat que AtKLC-1 és capaç d'associar-se amb una hipotètica AtKHC, cal qüestionar-se si aquest hipotètic complex participa en el transport de la isoforma HMGR1L pel sistema endomembranós. En cèl·lules animals, el sistema de microtúbuls és essencial per la dinàmica del RE (Lee and Chen, 1988). En plantes, en canvi, sembla que és el citoesquelet d'actina l'implicat en la dinàmica tant del RE com de l'aparell de Golgi (Brandizzi et al., 2002). La dinàmica del citoesquelet ha estat força estudiada en el tub de pol·len. En aquest sistema es dona un transport actiu d'òrgans i vesícules que contribueix a l'elongació del tub. Per aquest transport, són necessaris els elements del citoesquelet, principalment els filaments d'actina (Gu et al., 2003). No obstant, en altres treballs s'ha advertit que els microtúbuls i les proteïnes motores de quinesina intervenen en el transport d'òrgans en el tub pol·línic (Romagnoli et al., 2003a, b). En el treball presentat s'ha demostrat l'associació entre AtKLC-1 i AtKHC, que posa de manifest que la quinesina de tipus I pot existir també en plantes. La demostració que aquest complex té una funció de transport seria la primera evidència que en plantes existeix el complex de quinesina de tipus I i que, en conseqüència, els microtúbuls de les cèl·lules vegetals, tal com s'ha demostrat en les cèl·lules animals, serien vies per al transport de dianes cel·lulars.

## 5.- PAPER DEL DOMINI N-TERMINAL EN EL CONTROL DE L'HMGR

En les plantes d'*A. thaliana* que sobreexpressen la isoforma HMGR1S s'observen increments d'activitat HMGR de fins a tres vegades, en comparació amb la corresponent línia parental (apartat 3.2) (González, 2002; Leivar et al., 2005). En canvi, en les plantes que sobreexpressen el domini catalític soluble sota el mateix promotor s'arriben a obtenir increments d'activitat HMGR entre 2.000 i 6.000 vegades. No obstant, els increments en els nivells de mRNA *hmg* analitzats per *northern blot* són similars en els dos casos (González, 2002). D'altra banda, els increments de proteïna HMGR1S o del domini catalític detectats per *western-blot* no justifiquen en cap cas l'augment d'activitat que mostra la línia de sobreexpressió del domini catalític (González, 2002; Leivar et al., 2005). Per tant, els resultats indiquen que el domini N-terminal, que inclou la regió N-terminal citosòlica i les seqüències de transmembrana, és important per reprimir l'activitat catalítica de l'enzim. Per mesurar l'activitat en extractes de plantes que sobreexpressi el domini catalític va ser necessari treballar amb dilucions 1/500. Quan aquesta dilució es realitzà amb també d'homogeneïtzació, l'activitat específica de la línia de sobreexpressió fou unes 5.800 vegades la de la corresponent línia parental. Quan la dilució es realitzà amb extracte de plantes no transgèniques, les diferències d'activitat es van reduir a unes 2.100 vegades (taula 7). Cal tenir en compte que la dimerització (i probablement la tetramerització) de l'HMGR és necessària perquè aquest enzim sigui actiu. No sembla doncs que la dilució hagi impedit l'oligomerització de la proteïna. D'altra banda, la menor activitat aparent obtinguda quan la dilució es fa amb extracte d'*A. thaliana* podria ser deguda a la dimerització del domini catalític lliure (resultat de la sobreexpressió) amb el domini catalític de proteïna HMGR unida a membranes (present a l'extracte). També és possible que els extractes d'*A. thaliana* poguessin contenir inhibidors de l'HMGR, però en aquest cas, la seva dilució no seria responsable dels alts nivells aparents d'activitat HMGR en la línia de sobreexpressió. Si fos així, la dilució de l'extracte de plantes no transgèniques també provocaria un augment aparent de l'activitat HMGR. Es pot concloure que les plantes de sobreexpressió del domini catalític tenen nivells d'activitat HMGR molt superiors als de les plantes no transgèniques. La presència del domini de membrana de l'HMGR i/o la correcta localització de la proteïna al sistema endomembranós són necessaris per modular els nivells d'activitat enzimàtica.

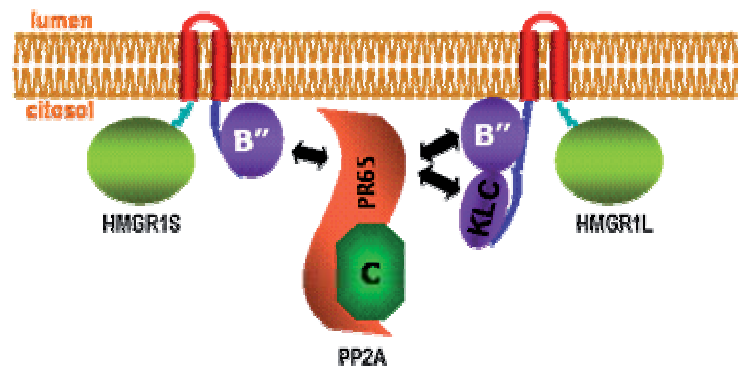
El domini N-terminal és una zona poc conservada de la proteïna en els diferents organismes (animals, llevat i plantes) (Hampton et al., 1996). Tot i això, en tots ells s'ha demostrat que aquest domini conté la informació necessària per a l'ancoratge de la proteïna al reticle endoplasmàtic (RE), per establir la correcta topologia i per la seva localització subcel·lular. A més, tant en llevat com en animals el control posttraduccional de l'HMGR s'assoleix en bona part per la regulació de la taxa de degradació promoguda per esterols i mediada per regions dels domini N-terminal (Goldstein and Brown, 1990; McGee et al., 1996; Moriyama et al., 1998; Gardner and Hampton, 1999a, b; Moriyama et al., 2001). En plantes, hi ha poques evidències experimentals que demostrin que la proteïna estigui regulada per un augment de la taxa de degradació promoguda per productes de la via (apartat 3.6.5 de la Introducció). No obstant, el domini de membrana té una sèrie de particularitats interessants. Tot i la divergència que mostra la regió N-terminal de l'HMGR de plantes, les seqüències de transmembrana conserven

una gran homologia la qual cosa suggereix que aquesta zona podria ser important per a la localització subcel·lular o per la regulació de la proteïna. En la regió N-terminal citosòlica, tal com s'indica en l'apartat 3.5 de la Introducció, es troba un motiu de tres arginines conservat en la majoria d'HMGR de plantes. En *A. thaliana* es va comprovar que aquesta regió és necessària per a la interacció amb isoformes de la subunitat B'' de la PP2A i per a la seva localització subcel·lular en vesícules derivades del RE (Leivar, 2003 i apartat 4 de Resultats). Per tant, això indica que el domini N-terminal de l'HMGR de plantes, podria ser important per la regulació de l'activitat HMGR i que aquest mecanisme de control podria ser conservat.

El domini catalític de l'HMGR està altament conservat en tota l'escala evolutiva i manté la seva activitat catalítica en expressar-se ectòpicament en un organisme diferent (Hampton et al., 1996). En el domini catalític resideix un residu conservat de serina susceptible de fosforilació que provoca una inhibició reversible de l'activitat en animals i llevat, mitjançant un mecanisme conservat (revisat a Halford and Hardie, 1998). En plantes també s'ha suggerit que existeix el mateix mecanisme de modulació reversible. No obstant, la sobreexpressió del domini catalític soluble en *A. thaliana* dona lloc a uns alts nivells d'activitat HMGR on no sembla que hi actuï cap sistema de control. Per tant, tot i que aquest mecanisme de regulació pot estar conservat en els diferents organismes, es posa de manifest la importància que la proteïna romangui en un entorn endomembranós per tal que aquest sistema pugui actuar.

## 6.- PAPER DE LA PP2A EN EL CONTROL DE L'HMGR

Tant l'HMGR1S com l'HMGR1L interaccionen amb dues isoformes de la subunitat B'' del complex PP2A, AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$ . L'HMGR1L interacciona a més amb AtKLC-1 que és capaç d'associar-se amb la subunitat A de la PP2A (figura 63). Aquesta trama d'interaccions potencials suggereix que l'HMGR podria estar controlada per la PP2A. Per analitzar aquesta possibilitat, en primer lloc va ser necessari trobar unes condicions adients per l'assaig de l'activitat HMGR.



**Fig. 63.** Interaccions potencials entre l'HMGR i la PP2A identificades per doble híbrid. L'HMGR1S i l'HMGR1L interaccionen amb les isoformes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  que formen part del complex PP2A a través de la seva associació amb la subunitat A (PR65). A més, l'HMGR1L, a través de la regió extra a N-terminal interacciona amb AtKLC-1. AtKLC-1 també té capacitat d'associar-se a la subunitat A. Molt probablement les isoformes B'' i AtKLC-1 interaccionen amb la subunitat A a través de la mateixa regió.

S'obté una mesura d'activitat HMGR elevada quan es parteix d'extractes de plantes crescudes en condicions de dia curt i recollides en finalitzar un període de foscor (apartat 1.1.3 de Resultats). En aquestes condicions l'activitat HMGR total procedeix majoritàriament de les isoformes codificades pel gen *hmg1* (apartat 1.1.3 de Resultats). Durant l'homogeneïtzació de la mostra vegetal és important la presència de calci per preservar l'HMGR en un entorn amb capacitat per regular la seva activitat (apartat 3.1 de Resultats, apartat 8 de Discussió). Dels estudis d'interacció entre proteïnes, es suggereix que l'enzim PP2A podria formar part d'aquest entorn (Leivar, 2003 i apartat 2 de Resultats). Les isoformes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  són proteïnes que uneixen calci i formen part del complex PP2A (Leivar, 2003 i apartat 2.2 de Resultats). Per tant, per la integració d'aquestes dades, es suggereix que els estudis de regulació de l'HMGR1 per la PP2A s'haurien de realitzar en unes condicions en què la proteïna romangués en un entorn amb capacitat de regulació. Per això, els experiments es van realitzar a partir de l'homogeneïtzació en presència de calci de plantes crescudes a dia curt i recollides en finalitzar un període de foscor.

Es van utilitzar diferents aproximacions experimentals per a analitzar el paper de la PP2A sobre l'activitat HMGR. Per una banda es van realitzar mesures d'activitat *in vitro* en extractes de mutants que afecten el gen *AtB'' $\alpha$*  (apartat 3.3.1). També es van realitzar mesures en extractes procedents de plantes amb un decrement en l'activitat PP2A. Dins d'aquest context es van emprar extractes de plantes crescudes amb inhibidors de la PP2A (apartat 3.3.2), o extractes de la línia *rcn1-1* (apartat

3.3.2). La línia *rcn1-1* és defectiva en la variant majoritària de subunitat A i mostra una reducció d'un 50% d'activitat PP2A (Deruère et al., 1999). Altrament, es van realitzar mesures d'activitat HMGR *in vivo*, o sigui una determinació de la proporció de plantes que superen el bloqueig del creixement causat per la mevinolina en unes condicions on l'activitat PP2A està disminuïda (apartat 3.3.3).

En les tres línies mutants *B''α* s'observaren diferències poc notables però que anaven en el mateix sentit. S'obtenia una reducció d'un 20% de l'activitat HMGR en comparació amb les línies parentals (figura 46). Els mutants *B''α* no van manifestar una sensibilitat incrementada a mevinolina en comparació amb les línies parentals silvestres (resultats no mostrats). Els resultats indiquen que l'HMGR està sota control d'At*B''α* i dóna suport a la hipòtesi que aquestes proteïnes interaccionen *in vivo*.

Es demostrà que l'activitat HMGR de plantes d'*A. thaliana* crescudes en presència d'inhibidors de la PP2A, la cantaridina o l'àcid okadaic, estava incrementada en assaigs enzimàtics *in vitro* (figura 48). Es corroborà que aquesta major activitat es devia a un bloqueig específic de la PP2A, ja que en el mutant *rcn1-1*, també s'observà un augment de l'activitat HMGR mesurada en les mateixes condicions (figura 46). L'increment fou entre 1,5 i 2 vegades l'observat en les mesures control de referència.

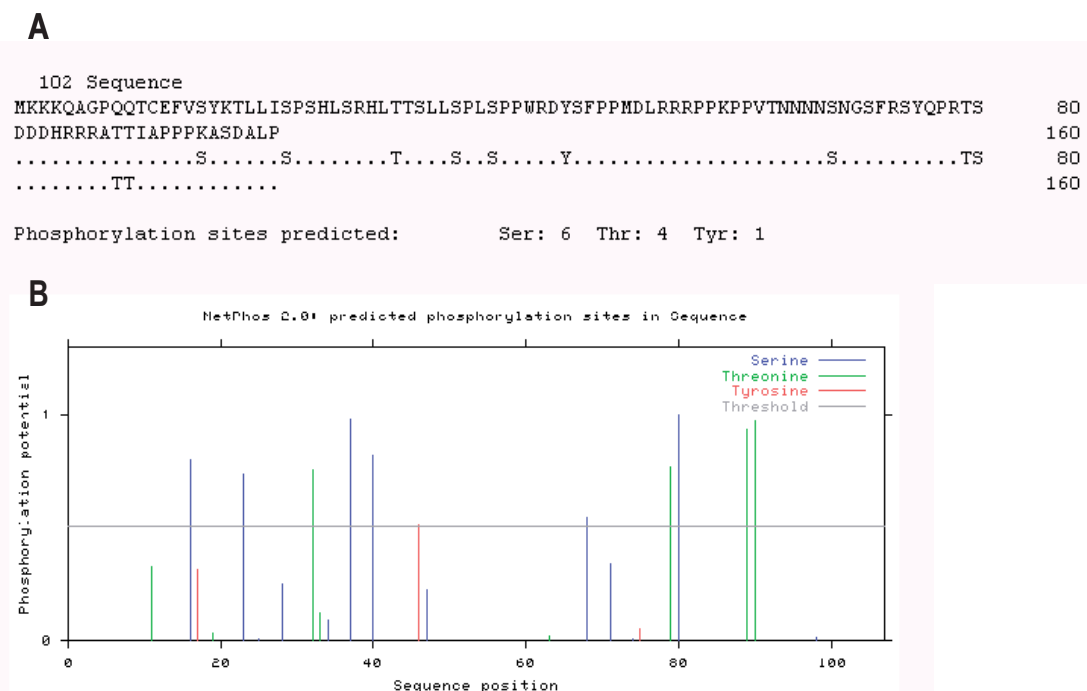
Per tal de confirmar aquests resultats es van realitzar mesures *in vivo* de l'activitat HMGR. Tant el bloqueig genètic (mutant *rcn1-1*) com farmacològic (presència de cantaridina) de la PP2A determinen un augment del 30% en el nombre de plantes que superen el bloqueig de l'inhibidor de l'HMGR. L'efecte de la mevinolina fou més dràstic quan s'utilitzà la varietat silvestre C24 (on s'observà un 100% de sensibilitat) que quan s'utilitzà la parental silvestre del mutant *rcn1-1*, WS-2. Això és degut a que aquesta última duu la mutació *phyD-1* (Aukerman et al. 1997) que li causa un increment en l'activitat HMGR (Rodríguez-Concepción et al., 2004). A pesar d'aquesta resposta, l'addició de cantaridina provoca un augment addicional d'activitat HMGR que es reflecteix en l'increment del nombre d'individus que superen el bloqueig de la mevinolina. Es pot concloure, doncs, que *phyD* i PP2A formen part de dues vies de control independents de l'activitat HMGR. A més, cal subratllar que l'augment d'activitat HMGR determinat a partir d'extractes de mostra vegetal (mesura *in vitro*), també es dóna en la planta (mesura *in vivo*). Per tant, els mecanismes de regulació de l'HMGR on hi participa la PP2A són actius en la planta.

Tant els estudis *in vitro* com els estudis *in vivo* demostren que la PP2A és un regulador negatiu de l'activitat HMGR. Per tal d'investigar si en aquesta regulació hi estava implicat el domini N-terminal de l'HMGR (que inclou la regió N-terminal citosòlica i les seqüències de transmembrana) es van realitzar mesures d'activitat en extractes de plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S i de plantes que sobreexpressen el domini catalític, que havien crescut en presència d'inhibidors de la PP2A (figura 48). Només en el cas de les plantes que sobreexpressen l'HMGR1S, la presència d'inhibidors va causar un increment en la seva activitat HMGR. Per tant els resultats suggereixen que el domini N-terminal és necessari per a la inhibició de l'activitat HMGR causada per la PP2A. Aquest comportament és consistent amb el fet que el domini N-terminal és la regió d'interacció amb isoformes de la subunitat At*B''*. No obstant aquest discerniment és només temptatiu ja que la línia de

sobreexpressió del domini catalític té incrementada l'activitat HMGR unes 6.000 vegades en comparació amb la parental silvestre, a més de tenir una localització citosòlica. Segons aquests resultats, és possible que l'enzim HMGR no sigui accessible a la PP2A pel fet de tenir una localització subcel·lular diferent, o bé que les molècules de PP2A disponibles podrien ser insuficients per a controlar aquesta activitat.

De forma oposada, en les línies mutants en *AtB'' $\alpha$* , no s'observà un increment en l'activitat HMGR. Diverses hipòtesis poden explicar aquest fet. En primer lloc tot i que és poc probable, podria ser que aquestes proteïnes estiguessin implicades en un mecanisme de regulació independent a la regulació exercida pel complex PP2A. La hipòtesi més plausible és que la resta d'isoformes B'' podrien exercir funcions redundants i tenir lloc una substitució d'*AtB'' $\alpha$*  per altres subunitats *AtB''* en el complex HMGR-PP2A. La presència de productes truncats d'*AtB'' $\alpha$*  no funcionals podrien tenir algun efecte com segrestar el complex PP2A a l'entorn de l'HMGR; o unir-se a l'HMGR en la forma menys activa (desfosforilada) perdent la facultat d'interacció amb la resta del complex PP2A. Caldria fer aquests estudis en doble mutants defectius en *AtB'' $\alpha$*  i *AtB'' $\beta$* , ja que són les dues isoformes que interaccionen amb l'HMGR1S i l'HMGR1L, a més de ser les isoformes que més s'expressen en les cèl·lules juntament amb *AtB'' $\gamma$* . No obstant aquest doble mutant és difícil d'obtenir ja que *AtB'' $\beta$*  té una alta homologia amb *AtB'' $\gamma$*  (99,6% d'identitat) i la dificultat radicaria en la genotipació del mutant per *AtB'' $\beta$*  i en l'estudi de la presència de transcrit. Es podria plantejar la possibilitat d'obtenir mutants *knock-out* mitjançant la tecnologia de l'RNAi on una determinada seqüència podria ser utilitzada per a bloquejar la transcripció de les isoformes *AtB''* (Klahre et al., 2002). Una altra possibilitat, és l'estudi de l'activitat HMGR en un fons mutant *hmg1* on s'expressi una isoforma derivada de l'HMGR1S que tingui delecionats els residus implicats en la interacció amb les isoformes *AtB'' $\alpha$*  i *AtB'' $\beta$* .

La inhibició de la PP2A en plantes no provoca un augment en els nivells de transcrit *hmg1* i *hmg2* (apartat 3.3.4, figura 50). Per tant, la hipòtesi més probable és que la regulació mediada per la PP2A sigui un mecanisme de desfosforilació. En aquest model de regulació que es planteja, la PP2A desfosforilaria un residu, probablement situat al domini N-terminal de l'HMGR1, que donaria lloc a una inhibició en l'activitat HMGR. Consistent amb aquesta hipòtesi és que en la regió N-terminal de l'HMGR1L (on una part de la seqüència és idèntica a la regió N-terminal de l'HMGR1S) s'observa una gran quantitat de residus de serina i treonina amb alta probabilitat de ser fosforilats, segons la predicció realitzada amb l'algoritme NetPhos 2.0 (figura 64).



**Fig. 64.** Predicció dels llocs de fosforilació possibles en la regió N-terminal de l’HMGR1L. **(A)** Seqüència de la regió NT1L i dels residus predits susceptibles de fosforilació. **(B)** Taula de la predicció realitzada per l’algoritme NetPhos2.0. L’eix de les x representa la posició de residus i l’eix de les y representa la probabilitat de ser fosforilat.

Sembla evident que el mecanisme de control exercit per la PP2A sobre l’HMGR és diferent del mecanisme de regulació covalent per fosforilació en una serina conservada del domini catalític. En aquest cas, la fosforilació d’aquest residu de serina per SnRK1 inhibeix l’activitat HMGR (Halford and Hardie, 1998). SnRK1 és alhora regulada per fosforilació on la forma activa és la fosforilada (vegeu apartat 3.6.5, figura 14). Per tant, en ambdós casos, si la PP2A participés en aquest mecanisme, en comptes d’inhibició s’observaria activació de l’HMGR. S’ha publicat un estudi on es comprova l’especificitat de la PP2A bovina i la PP2C humana sobre el domini catalític fosforilat de l’HMGR de hàmsster xinès expressat en *E. coli* (Ching et al., 1997). Tot i que pot ser desfosforilat per ambdues fosfatases, la PP2A ho fa d’una forma més ràpida. El complex PP2A és a més, més eficient en la defosforilació que quan s’utilitza tan sols el domini catalític. Això indica que, probablement la PP2A apropa el complex al seu substrat. No obstant s’ha observat que en *A. thaliana* la PP2C és capaç de desfosforilar l’HMGR i això condueix a una reactivació de la proteïna (Ishidaira et al., 2003). Per tant, segons aquestes observacions les fosfatases implicades en aquest mecanisme de modificació covalent podrien variar en funció de l’organisme estudiat.



## 7.- PAPER DEL CALCI EN EL CONTROL DE L'HMGR

Les proteïnes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  interaccionen de forma específica amb les isoformes HMGR1S i HMGR1L d'*A. thaliana*. En *A. thaliana* existeixen cinc isoformes de la subunitat B'' de PP2A, AtB'' $\alpha$ , AtB'' $\beta$ , AtB'' $\gamma$ , AtB'' $\delta$ , AtB'' $\epsilon$ , que presenten una elevada conservació de seqüència. La màxima conservació es dona en els dominis d'unió a PR65 (ASBD1 i ASBD2) que inclouen els motius d'unió a calci *EF-Hand* (EF-1 i EF-2) (apartat 2.2.1 de Resultats, figura 39). En el present treball es va demostrar que AtB'' $\alpha$  reté calci marcat radiactivament de forma específica i que la presència del catió provoca un canvi de mobilitat electroforètica en les proteïnes AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  (apartat 2.2.1 de Resultats). Donat que els motius *EF-Hand* estan molt conservats en les cinc isoformes i que EF-2 s'adequa perfectament a la seqüència canònica (Lewit-Bentley and Rety, 2000), és altament probable que totes elles uneixin calci. En la proteïna homòloga humana HsPR72 els motius *EF-Hand* uneixen calci i són importants per a la interacció amb la subunitat A del complex PP2A (Janssens et al., 2003).

En unir calci s'indueix un canvi conformacional en la proteïna que sovint implica l'exposició de superfícies hidrofòbiques que afavoreixen la interacció amb la molècula diana (Lewit-Bentley and Rety, 2000). En aquest treball es va analitzar l'efecte del calci sobre la modulació de la interacció d'AtB'' $\alpha$  i AtB'' $\beta$  amb altres proteïnes (figura 42). En assaigs de *GST pull-down in vitro* la presència de calci afavorí lleugerament la retenció d'AtB'' $\alpha$  i d'AtB'' $\beta$  en una matriu de PR65. En la majoria dels casos el calci provocà el mateix efecte en la retenció d'AtB'' $\alpha$  i d'AtB'' $\beta$  en matrius que contenien regions N-terminal de l'HMGR1. Aquest efecte fou més evident quan s'utilitzà la combinació NT1S (regió N-terminal de l'HMGR1S) i AtB'' $\beta$ . Els assaigs d'interacció *GST pull-down* es realitzen en uns termes on les proteïnes estan en excés, cosa que afavoreix les interaccions a pesar que les condicions d'incubació no siguin les òptimes. Per tant, el fet que en assaigs *in vitro* ja s'obtinguin lleus diferències, indica que el calci *in vivo* pot tenir repercussions més importants en la interacció entre les isoformes AtB'' i les molècules diana. Dins d'aquest context, el calci podria ser la molècula desencadenant d'un seguit d'esdeveniments que s'iniciarien a partir de seva unió amb AtB'' i que tindrien com a finalitat la regulació de l'HMGR.

Això ens duu a estudiar el paper del calci en la mesura de l'activitat HMGR. En l'apartat 3.1 de Resultats es demostra que el calci provoca fins a un 85% d'inhibició en l'activitat HMGR quan es present tant en el procés d'homogeneïtzació com durant l'assaig enzimàtic (figura 43). Valors intermedis d'inhibició són obtinguts quan només una d'aquestes dues operacions es realitza en presència del catió (l'altra es duu a terme en presència d'una molècula quelant). És important assenyalar que el sistema roman més sensible a l'efecte repressor del calci si l'homogeneïtzació es realitza en la seva presència. Per tant, els resultats indiquen que el calci present en l'homogeneïtzació preserva l'HMGR en uns complexos que conserven la capacitat de regular la seva activitat d'una forma dependent de calci.

A continuació es va comprovar que el domini N-terminal de l'HMGR és necessari per a què es doni la inhibició de l'enzim per calci. El calci provocà un 90% d'inhibició en plantes que sobreexpressen

l'HMGR1S. Ja que la major part de l'activitat d'aquesta línia prové de la proteïna sobreexpressada, es dedueix que al menys la isoforma HMGR1S respon a la inhibició per calci. En canvi, el calci no provoca inhibició en l'activitat HMGR derivada de la sobreexpressió del domini catalític. Per tant el calci no inhibeix l'activitat HMGR a través del seu domini catalític. Els resultats indiquen que l'efecte del calci es dona a través d'algun factor que actua regulant HMGR a través del seu domini N-terminal. S'ha observat un control de l'HMGR per calci en plàntules de pèsol, on l'addició de concentracions nanomolars del catió provoquen un decrement de l'activitat HMGR microsomal (fins a un 97% d'inhibició en presència de calci 100 nM) (Russell et al., 1985). Aquesta inhibició era completament reversible i per tant, no deguda a inducció de proteòlisis d'una forma dependent de calci. L'efecte observat no era mitjançat per una acció directa del calci sobre l'HMGR, i era molt sensible a les perturbacions suaus de les membranes microsomals. Tampoc no era afectada per l'addició, esgotament, o inhibició de la proteïna d'unió a calci, la calmodulina. Per tant, es va suggerir que altres proteïnes sensores d'unió a calci podien participar en la inhibició de l'HMGR.

En conclusió, en primer lloc es demostra que l'HMGR1 interacciona amb dues subunitats del complex PP2A (AtB $\alpha$  i AtB $\beta$ ) a través de la seva regió N-terminal (Leivar, 2003). En segon lloc es demostra que les isoformes AtB $\alpha$  i AtB $\beta$  uneixen calci i que el calci afavoreix la seva unió amb la subunitat A (formació del complex PP2A) i amb la regió N-terminal de l'HMGR1 (formació del complex AtB $\beta$ -HMGR1) (apartat 2.2.1 de Resultats). En tercer lloc es demostra que el calci és un regulador negatiu de l'activitat HMGR (apartat 3.1 de Resultats) i que el domini N-terminal de l'HMGR és necessari per a la inhibició provocada per calci (apartat 3.2 de Resultats). La PP2A és un regulador negatiu de l'activitat HMGR (apartat 3.3 de Resultats). Per tant, la integració d'aquests resultats suggereix que les proteïnes sensores de calci amb capacitat per regular l'activitat HMGR podrien ser les isoformes AtB $\beta$ . En aquest model, la unió de calci a la subunitat AtB $\beta$  implicaria un canvi conformacional en la seva estructura que afavoriria la formació de complexos amb l'HMGR i amb el nucli de la PP2A. La PP2A defosforilaria un residu del domini N-terminal de l'HMGR (o d'alguna altra proteïna desconeguda) que implicaria una inhibició o reducció de la seva activitat. Tot i que els resultats aportats són consistents amb aquest model, serien necessàries altres aproximacions experimentals per demostrar-lo.

## 8.- ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LES ISOFORMES DE L'HMGR

### 8.1.- Descripció del sistema d'estudi

L'estudi de la localització subcel·lular de proteïnes es pot abordar per diferents aproximacions, entre elles la immunodetecció a partir de fraccions subcel·lulars o la immunocitoquímica. No obstant aquestes tècniques requereixen l'ús d'anticossos que reconeixen la molècula diana. En cas d'existir diferents isoformes d'una mateixa proteïna, caldria obtenir anticossos específics per a cadascuna d'elles per estudiar-ne la localització particular. En el treball presentat es va optar per estudiar la localització subcel·lular de les isoformes de l'HMGR a partir de l'expressió transitòria de quimeres de la GFP i la seva posterior observació per microscopia làser confocal. Estudis anteriors van demostrar que el domini N-terminal de l'HMGR era necessari per a la localització subcel·lular de la proteïna (Leivar, 2003; Leivar et al., 2005). Per a l'estudi presentat es van emprar quimeres on el domini catalític de cada isoforma va ser substituït per GFP (Leivar, 2003). D'aquesta manera es va obtenir 1S:GFP (derivada de l'HMGR1S), 1L:GFP (derivada de l'HMGR1L) i 2:GFP (derivada de l'HMGR2).

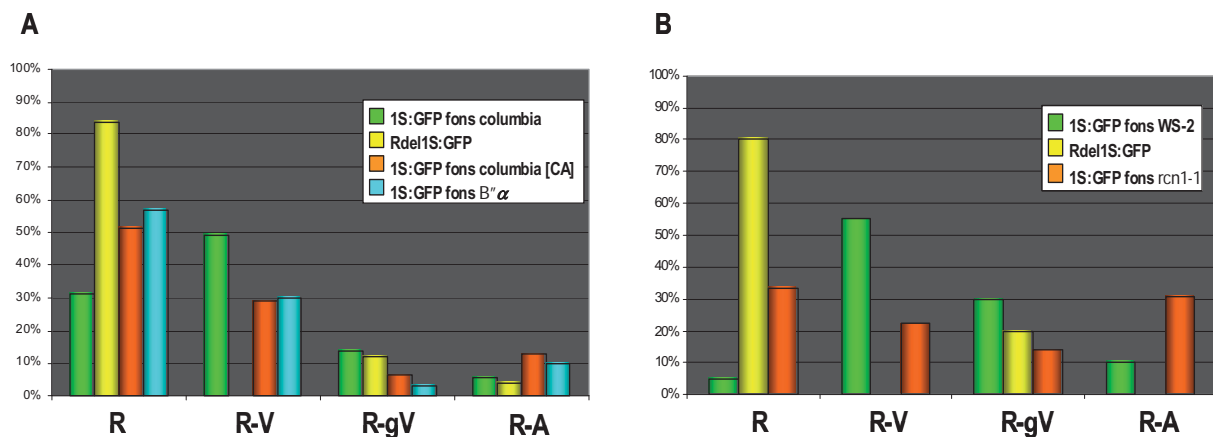
L'observació de múltiples imatges en experiments independents fa adonar-se de la complexitat del sistema d'estudi, ja que els patrons de distribució subcel·lular descrits per cada quimera no es dona en el 100% dels casos. Per exemple, en una proporció d'un 31% de les cèl·lules observades 1S:GFP mostra un patró reticular mentre que un 49% mostra un patró reticulo-vesicular. A més, en experiments d'expressió transitòria hi pot haver variabilitat causada pel dany que poden patir les cèl·lules en rebre l'impacte. Tampoc es pot controlar la quantitat de molècules codificants per la quimera introduïdes en la cèl·lula. Davant aquests inconvenients, si es vol analitzar com un determinat tractament afecta la localització subcel·lular de les proteïnes, es necessita fer una anàlisi més detallada i determinar en quina proporció varien els patrons de localització versus el cas de referència control. És per aquesta raó que en aquest treball es defineixen quatre distribucions tipus per classificar les imatges obtingudes per microscopia làser confocal (vegeu apartat 4 de Resultats) i es determinà en quina mesura canvien les freqüències de localització subcel·lular en les diferents situacions experimentals. En primer lloc, doncs, es van establir les freqüències de localització en els controls que s'utilitzarien de referència: localització de la 1S:GFP en fons silvestre tipus Columbia (per comparar amb fons mutants en les línies  $B''\alpha-1$ ,  $B''\alpha-2$  i  $B''\alpha-3$ , amb tractament de fulles amb cantaridina, amb l'ús de la quimera que té delecionats els residus d'arginina Rdel1S:GFP) i localització de la 1S:GFP en fons silvestre WS-2 (per comparar amb fons mutant de la línia *rcn1-1* i amb l'ús de la quimera Rdel1S:GFP).

### 8.2.- Participació de la PP2A

Les regions N-terminal citosòliques de l'HMGR1S i de l'HMGR1L interaccionen específicament amb subunitats del complex PP2A. Per tal de conèixer si la PP2A contribueix a determinar la localització subcel·lular de l'HMGR es van emprendre una sèrie d'aproximacions experimentals que tenien com a

denominador comú l'estudi de l'expressió transitòria de fusions del domini N-terminal de les isoformes de l'HMGR a GFP en cèl·lules epidèrmiques de fulla de plantes d'*A. thaliana*.

Es va analitzar el paper de la interacció de l'AtB'' amb la regió N-terminal de l'HMGR1S en la localització subcel·lular de la 1S:GFP mitjançant dues aproximacions. D'una banda es va realitzar l'estudi amb una quimera de GFP que té delecionats residus necessaris per a la unió amb AtB'' (Rdel1S:GFP). D'altra banda es van emprar mutants en el gen *B''α*. La interacció de l'HMGR amb subunitats del complex PP2A suggereix que un fenomen de desfosforilació pot regular la localització subcel·lular de la 1S:GFP. Per analitzar-ho es va estudiar la distribució subcel·lular de la quimera en un fons mutant *rcn1-1* i en cèl·lules de fulles tractades amb un inhibidor específic de la PP2A. S'analitzaren els patrons de distribució subcel·lular en cada situació experimental, que es compararen amb la situació experimental de referència (1S:GFP en fons silvestre) (figura 65A i B, columnes verdes). En les línies mutants *B''α*, les diferències van anar en el mateix sentit, pel que s'han agrupat les dades per considerar-les conjuntament.



**Fig. 65.** Patrons de localització subcel·lular en les diferents situacions experimentals. Es mostra el percentatge de cèl·lules que mostren una distribució reticular (R), reticulo-vesicular (R-V), reticulo-vesicular amb vesícules de mida entre 2,5 i 10 μM (R-gV), reticular amb agregats (R-A) de les quimeres indicades. CA, efecte de la cantaridina en la localització de la 1S:GFP. (A) Fons parental Columbia. (B) Fons parental WS-2.

Les diferències més notables s'estableixen en comparar els patrons de localització subcel·lular entre les quimeres Rdel1S:GFP i 1S:GFP en un fons silvestre. Tant en un fons tipus Columbia, com en un fons tipus WS-2, augmenta la proporció de cèl·lules que mostren un patró reticular quan s'utilitza la Rdel1S:GFP (figura 65A i B, columnes grogues). Tot i que en certa proporció s'observen vesícules, aquestes són d'una mida superior a 2,5 μm. Per tant, la Rdel1S:GFP té menys capacitat de formar vesícules de mida entre 0,5 i 2,5 μm, o sigui, té menys capacitat vesiculogènica. Per comprovar si aquest fet es deu al bloqueig de la interacció amb isoformes de la família AtB''α, es va estudiar la localització subcel·lular en les línies *B''α*, que els manca una isoforma AtB''α completa. En aquest cas incrementa també la proporció de cèl·lules amb patró reticular, en detriment de les que presenten patró reticulo-vesicular (figura 65A, columnes blaves). Quan s'inhibeix l'activitat PP2A (per bloqueig genètic o farmacològic) s'observa el mateix fenomen, o sigui, una disminució en el percentatge de

cèl·lules amb patró reticulo-vesicular i un augment en les que mostren patró reticular (cèl·lules de fulles tractades amb cantaridina, columnes taronja figura 65A; fons *rcn1-1*, columnes taronja figura 63B).

Es conclou que la PP2A està implicada en la localització de la 1S:GFP a vesícules, o més probablement en la seva formació. En aquest procés intervé un fenomen de desfosforilació i la interacció de l'HMGR1S amb isoformes AtB". Es suggereix que la subunitat B" apropiaria el complex PP2A a la isoforma HMGR1S que desfosforilaria algun dels residus de la seva regió N-terminal (o d'alguna altra proteïna fins al moment desconeguda). El fenomen de desfosforilació seria precedit per la formació de vesícules de l'HMGR1S.

Cal assenyalar que en el cas del mutant *rcn1-1*, és molt notori un augment en la proporció de cèl·lules que mostren agregats al voltant del nucli quan expressen la 1S:GFP. Tot i que no es pot descartar que aquests agregats puguin ser l'evolució final en l'acumulació de vesícules, sembla més possible la hipòtesi que la maquinària necessària per generar aquestes estructures és deficient i que en conseqüència, la gran quantitat de proteïna que se sintetitza s'acumula allà on s'està produint donant lloc a proliferació de membranes perinuclears (en l'apartat 8.3 es discutirà aquest fenomen).

La PP2A és un complex que realitza moltes funcions en la cèl·lula i molt probablement moltes d'elles són encara desconegudes (revisat a Virshup, 2000; Luan, 2003). No es pot descartar que la dinàmica i l'organització del sistema endomembranós pugui estar regulat per aquesta fosfatasa. De fet la integritat de la trama reticular depèn del citoesquelet d'actina (Brandizzi et al., 2002). També hi ha evidències que demostren que la PP2A està implicada en el manteniment del citoesquelet en cèl·lules vegetals (Camilleri et al., 2002; Foissner et al., 2002). Per tant, és important comprovar l'organització del reticle endoplasmàtic (RE) en aquelles cèl·lules on el complex PP2A es troba bloquejat. Com a control es va estudiar la localització subcel·lular d'una proteïna amb senyal de retenció a RE fusionada a GFP (EGFPer) (Danon et al., 2004). En tots els sistemes experimentals utilitzats (fulles tractades amb cantaridina, fons mutant *rcn1-1*, fons mutant B"α) EGFPer dibuixa un reticle endoplasmàtic íntegre i sense vesícules. Per tant, al menys en les condicions d'estudi, la PP2A no provoca una desorganització en la xarxa del RE.

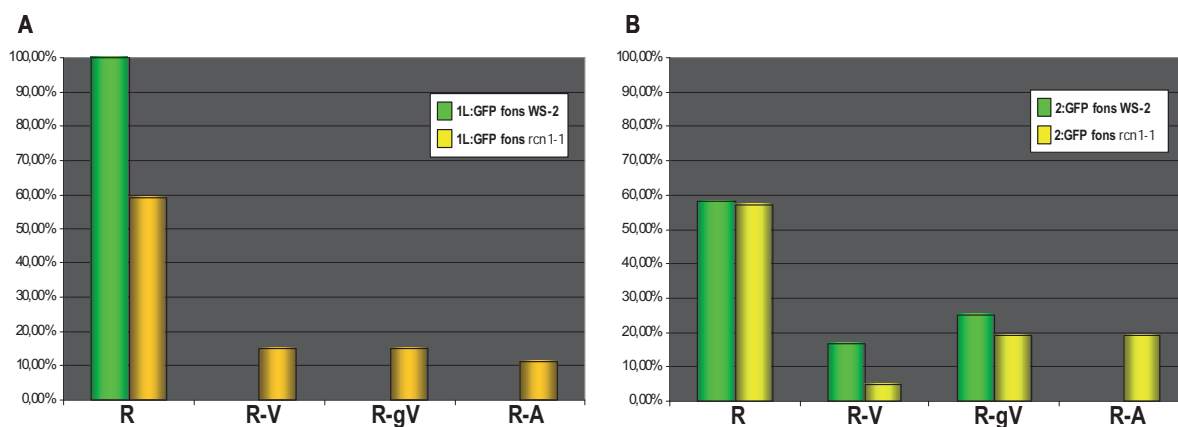
Algunes subunitats de la PP2A interaccionen amb la regió N-terminal de l'HMGR1L. En canvi, no s'ha trobat una relació directa d'interacció entre el complex PP2A i la isoforma HMGR2. Com a primera aproximació per indagar si la PP2A està implicada en la localització subcel·lular de l'HMGR1L i/o l'HMGR2 es va estudiar la localització subcel·lular de les quimeres 1L:GFP i 2:GFP en un fons mutant *rcn1-1*.

La quimera 1L:GFP mostra un patró reticular en cèl·lules epidèrmiques d'un fons silvestre tipus Columbia i en cèl·lules T87 d'*A. thaliana* (Leivar, 2003). En el fons silvestre WS-2, totes les cèl·lules observades mostraven un patró reticular. En canvi en el fons *rcn1-1*, els resultats obtinguts foren suggerents i interessants ja que tot i que gairebé un 70% de cèl·lules mostraven un patró reticular, també s'observaren cèl·lules que presentaven la resta de patrons de distribució subcel·lular (figura

66A). Per tant, la PP2A a través de la seva interacció amb una isoforma AtB'' o amb l'AtKLC-1, també podria regular la localització de l'HMGR1L.

Ja que l'HMGR1L interacciona amb una proteïna amb homologia amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I (AtKLC-1) i que a més aquesta és capaç d'interaccionar amb una cadena pesant de quinesina es va suggerir la hipòtesi que l'exclusivitat d'aquesta localització reticular podia venir donada per un transport retrògrad al RE mediat pel sistema de microtúbuls. En cèl·lules de mamífer, la integritat del sistema de microtúbuls és essencial per a la dinàmica del RE i el manteniment de l'aparell de Golgi (Lee and Chen, 1988). Això no és tan evident a les cèl·lules vegetals. Tot i que les cèl·lules vegetals es caracteritzen per una organització particular del citoesquelet el el què participen els microtúbuls i els filaments d'actina, es desconeix la seva implicació en la dinàmica i el transport de proteïnes entre orgànuls. S'observa que quan el sistema de microtúbuls és despolimeritzat no hi ha desintegració ni del RE ni de l'aparell de Golgi (Brandizzi et al., 2002). L'organització d'aquestes estructures endomembranoses depèn dels filaments d'actina (Tamura et al., 2005). Per tant, tot i estar implicada una proteïna amb homologia a la KLC, no s'ha demostrat que tingui la funció de transport a través del sistema de microtúbuls.

Pel que fa a la localització subcel·lular de 2:GFP en un fons *rcn1-1*, s'observà que no varià la proporció de cèl·lules que mostraven un patró reticular o un patró reticular amb grans vesícules en comparació amb el fons parental de referència. No obstant en el fons mutant, disminuï la proporció de cèl·lules amb patró reticulo-vesicular i augmentà la proporció que acumulaven grans agregats perinuclears. Per tant, aquests estudis indiquen que la PP2A podria tenir algun efecte en la localització subcel·lular de l'HMGR2, encara que es necessiten estudis més exhaustius o bé altres aproximacions experimentals per aprovar o rebutjar aquesta hipòtesi (figura 66B).



**Fig. 66.** Patrons de localització subcel·lular en les diferents situacions experimentals. Es mostra el percentatge de cèl·lules que mostren una distribució reticular (R), reticulo-vesicular (R-V), reticulo-vesicular amb vesícules de mida entre 2,5 i 10  $\mu$ M (R-gV), reticular amb agregats (R-A) de les quimeres indicades. **(A)** Localització subcel·lular de 1L:GFP. **(B)** Localització subcel·lular de 2:GFP.

La integració de totes les evidències experimentals aportades en aquest treball permeten construir un model de regulació de l'HMGR per la PP2A (figura 67). Segons aquest model la isoforma HMGR1S (i/o HMGR1L) fosforilada en un residu present a la regió N-terminal seria activa i sintetitzaria mevalonat a partir del substrat HMG-CoA. En resposta a algun tipus de senyal (a partir de la qual el calci podria actuar com a segon missatger) o davant un excés de molècules HMGR la subunitat B'' interaccionaria amb la regió N-terminal de l'HMGR1S i apropiaria el nucli de la PP2A a l'enzim. La PP2A desfosforilaria algun residu de la regió N-terminal de l'HMGR1S, que com a conseqüència quedaria en una forma inactiva o menys activa. La isoforma HMGR1S podria agregar-se en subdominis del RE fins a formar estructures vesiculars que de forma passiva pot arrossegar altres proteïnes residents del RE. En l'HMGR1L, l'AtKLC-1 podria competir amb una determinada isoforma AtB'' per la seva interacció amb el nucli de la PP2A i impedir que aquesta isoforma adoptés una forma menys activa i s'acumulés en vesícules. Cal destacar que aquesta regulació mediada per la PP2A és independent dels processos de fosforilació/desfosforilació que es podrien donar al domini catalític, mediat per la quinasa SnRK i alguna fosfatasa d'identitat desconeguda.

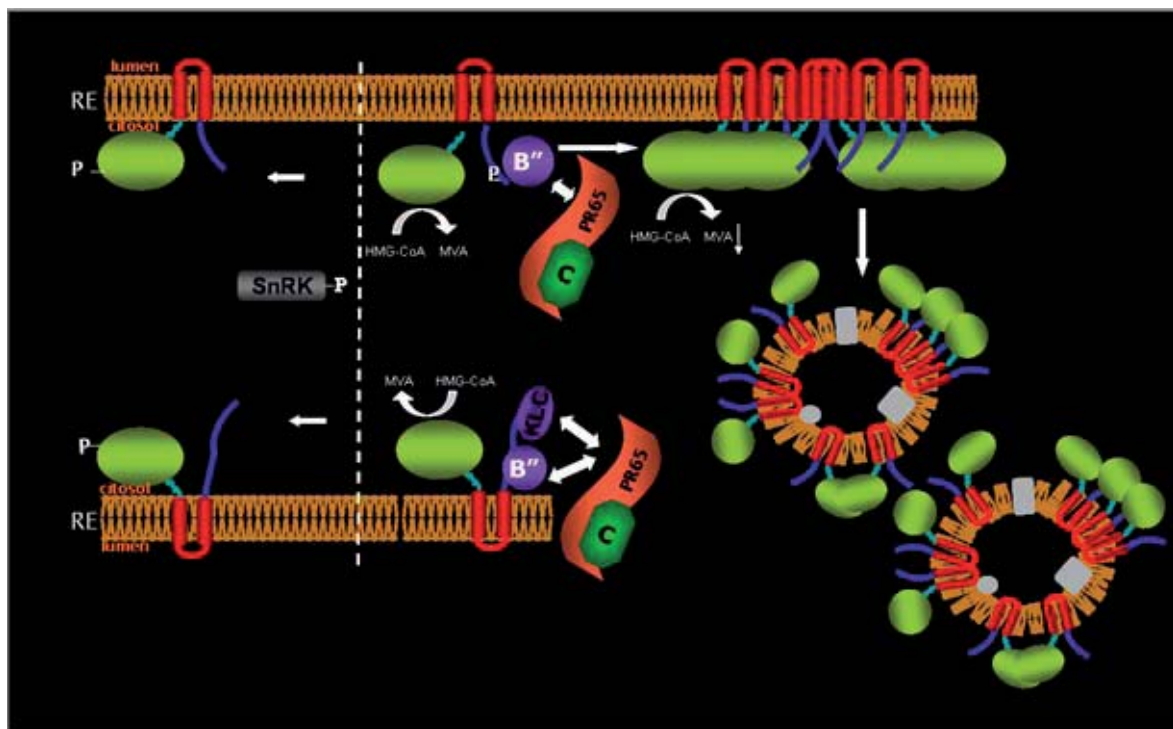


Figura 67. Model de regulació de l'HMGR per l'enzim PP2A.

### 8.3.- Funció del domini N-terminal de l'HMGR en la biogènesi de membranes

La quimera derivada de l'HMGR1S (1S:GFP) localitza en estructures vesiculars de mida entre 0,5 i 2,5 µm en cèl·lules epidèrmiques d'*A. thaliana*. En menor proporció en funció del fons silvestre utilitzat, la quimera també es localitza al RE o a vesícules de mida superior a 2,5 µm. En magnificar les imatges

obtingudes per microscopia làser confocal s'observa que existeix una continuïtat entre les vesícules i la trama de RE. Aquest fet indica que l'origen de les estructures és reticular. En menys proporció la quimera derivada de la isoforma HMGR2 (2:GFP) també es pot localitzar en estructures vesiculars. Aquest fenomen es podria atribuir a què la sobreexpressió d'una proteïna de localització reticular pot generar agregats proteics. Aquest fet s'ha descrit en la sobreexpressió de proteïnes amb senyal de retenció al RE que genera dilatacions en l'embolcall nuclear en cèl·lules de tabac (Crofts et al., 1999) o formació de vesícules en diferents tipus cel·lulars d'arròs (Torres et al., 2001). No obstant aquestes estructures no s'han observat amb la sobreexpressió de la 1L:GFP o de la Rdel1S:GFP en cèl·lules d'*A. thaliana*. Tampoc s'han advertit amb la sobreexpressió de la proteïna marcador del RE, EGFP<sub>ER</sub>. Per tant la formació de vesícules és induïda per l'expressió de la 1S:GFP, i mediada per tant pel domini N-terminal d'HMGR1S. Experiments de doble marcatge amb una proteïna marcador de RE (DsRed) i 1S:GFP van demostrar que ambdues proteïnes es localitzen a la trama reticular i a vesícules derivades d'aquesta xarxa (Sergi Ferrero, comunicació personal). Aquests resultats confirmen que la 1S:GFP induïx la formació de vesícules a partir de membranes del RE. Durant aquest procés s'arrossega a les vesícules proteïnes residents del RE.

Mitjançant estudis d'immunolocalització amb anticossos generats contra el domini catalític de l'HMGR en cotilèdons d'*A. thaliana* es visualitza l'HMGR endògena en estructures esfèriques distribuïdes per tota la cèl·lula que mostren coninuitat amb la trama del RE (Leivar et al., 2005). En plantes transgèniques que sobreexpressen l'HMGR1S s'observa més senyal distribuïda en un nombre superior de vesícules. En plantes que sobreexpressió el domini catalític, la proteïna truncada mostra una localització citosòlica. Aquests experiments demostren el requeriment del domini N-terminal perquè l'HMGR endògena es trobi a vesícules.

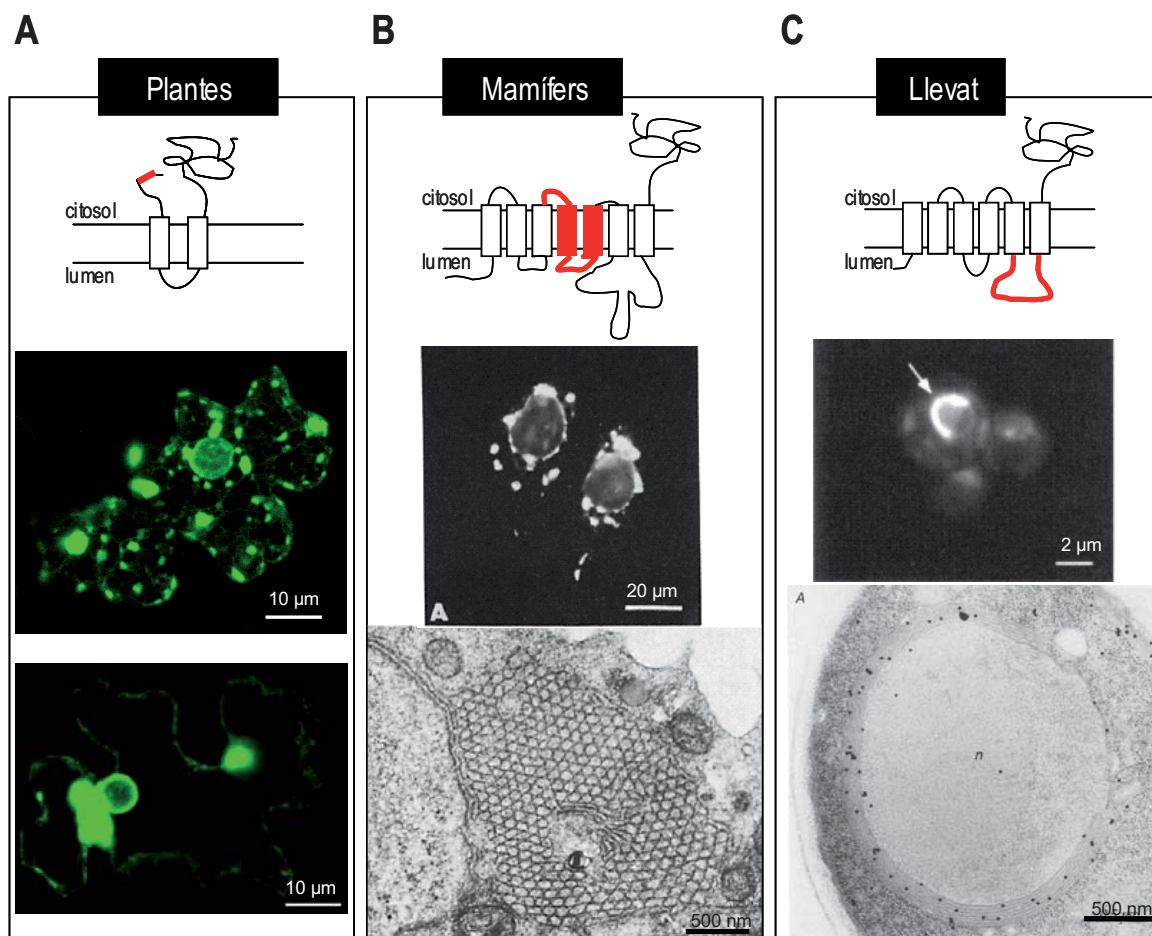
S'ha observat que la proteïna HMGR s'acumula en estructures derivades del RE en cèl·lules de mamífer i de llevat. En llevat hi ha dues isoformes de l'HMGR i cadascuna induïx morfologies diferents a les membranes intracel·lulars que s'originen per la proliferació del RE. En sobreexpressar-se la isoforma HMG1P, es van advertir piles de membranes aparellades associades a l'embolcall nuclear les quals es van anomenar karmel·les (figura 68C) (Wright et al., 1988). En sobreexpressar-se la isoforma HMG2P la morfologia que adopten les membranes cel·lulars derivades del RE són distintes. En aquest cas s'observen piles de membrana que encara que algunes poden estar associades amb el nucli, la majoria són a la perifèria cel·lular. Estudis amb quimeres on es substituï el domini catalític per una altra proteïna van demostrar que la zona implicada en la proliferació de la membrana del RE es troba al domini N-terminal. Concretament, l'estudi de mutants va permetre identificar el *loop* luminal entre els fragments transmembrana 6 i 7 de l'HMG1P (*loop* G) com a una zona necessària per a la formació de les karmel·les (Parrish et al., 1995).

En cèl·lules de mamífer, només hi ha una isoforma de l'HMGR. En incrementar la síntesi de l'enzim, l'embolcall nuclear dóna lloc a plegaments en sèrie de cisternes de RE que formen túbuls (figura 68B). Els túbuls s'empaqueten en trames hexagonals molt regulars, anomenades RE cristal·loides (Anderson et al., 1983). També en l'HMGR de mamífers la regió implicada en la proliferació de membranes



induïda per la proteïna està en el domini N-terminal, concretament entre els fragments transmembrana 4 i 5 (Jingami et al., 1987).

Els dominis de membrana de les HMGR dels diferents organismes no són homòlegs entre ells, però cadascun és capaç d'induir la proliferació de membranes en els diferents tipus cel·lulars. L'organització específica de membranes en resposta a l'HMGR és determinat per la cèl·lula. Com a conseqüència, l'expressió de l'HMGR de mamífer en llevat induïx la formació de karmel·les. En canvi, l'expressió de l'HMGR de llevat en cèl·lules de mamífer dóna lloc a la formació de RE cristal·loide (Wright et al., 1990).



**Fig. 68.** Relació entre l'HMGR i estructures derivades del RE en plantes, mamífers i llevat. **(A)** Vesícules en plantes. Formació de vesícules en cèl·lules epidèrmiques de fulla de la línia WS-2 (imatge central) i de grans vesícules perinuclears en cèl·lules epidèrmiques de fulla de la línia *rcn1-1* (imatge inferior) per la quimera 1S:GFP **(B)** Cossos cristal·loides en mamífers. Immunolocalització de la sobreproducció de l'HMGR de hámster en cèl·lules CHO per immunofluorescència indirecta (imatge central) i observació de la proliferació del RE per microscopia electrònica (imatge inferior) (Jingami et al., 1987). **(C)** Karmel·les en llevat. Proliferació de karmel·les per la sobreproducció de l'HMG1P de llevat en cèl·lules JRY282 tenyides amb DiOC<sub>6</sub> visualitzades per microscopia confocal (imatge central) (Parrish et al., 1995) i immunodetecció de la sobreproducció d'HMG1P en cèl·lules JRY1239 visualitzada per microscopia electrònica (Wright et al., 1988). S'assenyala en roig la zona de la proteïna implicada en la proliferació de les estructures derivades del RE. Les barres mostren l'escala de les imatges.

De forma relacionada, s'ha demostrat que també en *A. thaliana* i, probablement, en la resta de plantes, el domini N-terminal de l'HMGR indueix la biogènesi de membranes del RE en forma de vesícules. En *A. thaliana* aquest fenomen s'ha observat en cèl·lules epidèrmiques de fulla de roseta basal. En condicions normals aquestes cèl·lules no acumulen vesícules. Aquest fet s'ha comprovat en analitzar la localització del marcador del RE, que dibuixa tan sols una trama reticular. A més, aquesta inducció en la formació de vesícules és específica d'isoforma. En analitzar el patró de localització de les quimeres de GFP (1S:GFP, 1L:GFP, 2:GFP) en el fons *rcn1-1* s'ha observat una gran proporció de cèl·lules que mostren agregats perinuclears. Aquest fenomen és especialment evident en l'expressió de la quimera que conté el domini N-terminal de l'HMGR1S. En cèl·lules de llevat la sobreexpressió d'HMGR1P també té lloc al voltant del nucli, formant les estructures karmel·lars (Wright et al., 1988). També en cèl·lules de mamífer, s'observa que el RE cristal·loide es genera en aquesta zona de la cèl·lula (Anderson et al., 1983). Es va estudiar la biogènesi de RE cristal·loide en cèl·lules derivades d'ovari de hamster xinès, cèl·lules que tenen la particularitat que poden admetre una gran sobreexpressió d'HMGR quan se'ls aplica un inhibidor específic d'aquest enzim (Pathak et al., 1986). Per estudiar el fenomen de biogènesi, van incubar les cèl·lules amb una estatina i observaren a diferents temps el perfil que adopta el RE per microscopia electrònica. S'observà que la síntesi de la proteïna es duu a terme a partir de ribosomes ancorats a la membrana externa de l'embolcall nuclear. A temps més llargs d'incubació amb estatines, continua sobreexpressant-se HMGR i en conseqüència la membrana lipídica en contacte amb l'embolcall nuclear comença a proliferar generant túbuls que s'agrupen tot formant el RE cristal·loide. En cèl·lules epidèrmiques de fulla d'*A. thaliana*, la 1S:GFP indueix la formació de vesícules. Però quan es troba en un fons mutant *rcn1-1*, en un 30% dels casos, indueix la formació d'agregats al voltant del nucli. Aquests agregats, probablement, són replegaments del RE que han proliferat a partir de la membrana de l'embolcall nuclear. Per una banda aquest fet suggereix, que també en les cèl·lules vegetals la síntesi de l'HMGR té lloc a partir de ribosomes ancorats a la membrana externa de l'embolcall nuclear. En les cèl·lules que contenen una PP2A funcional l'excés de proteïna que es sintetitza s'acumula en vesícules. Seria interessant observar per microscopia electrònica la ultraestructura de les vesícules generades producte de l'expressió de la 1S:GFP en un fons silvestre i en un fons *rcn1-1*. Cal fixar-se que les vesícules observades per sobreexpressió de la 1S:GFP mostren marca fluorescent en "l'interior" de l'estructura, quan la GFP en la quimera està encarada al citosol de la cèl·lula. Aquest fet s'explica si aquestes vesícules, així com també els agregats, estan formades per un replegament de membranes lipídiques.

#### 8.4.- Paper de les vesícules

S'ha observat que el domini N-terminal de l'HMGR1S té la capacitat d'induir la proliferació de RE que acaba donant lloc a vesícules de major o menor mida en cèl·lules epidèrmiques de fulla de roseta basal d'*A. thaliana*. En estudis preliminars de doble marcatge amb l'ús d'anticossos  $\alpha$ -CD1 es va advertir que les vesícules de la 1S:GFP també contenen l'HMGR endògena (Leivar, 2003). Els resultats condueixen a la qüestió de quina pot ser la finalitat fisiològica d'aquestes vesícules. Podrien representar un subdomini implicat en emmagatzemar un excés d'HMGR en una forma no funcional, una manera

d'eliminar HMGR traslladant aquestes vesícules a vacúol, o una forma de transportar enzims implicats en la síntesi d'isoprenoides a altres subcompartiments cel·lulars. O bé, la biogènesi de membranes lipídiques induïda per l'HMGR podria tenir una atribució diferent.

S'ha descrit que en cotilèdon d'*A. thaliana* existeixen unes vesícules fusiformes derivades del RE anomenades *RE bodies* de mida 1 µm x 10 µm que es van observar en plantes transgèniques que expressaven una quimera de GFP amb senyal de trànsit a RE (Matsushima et al., 2003a). Les cèl·lules epidèrmiques de fulla de roseta basal d'*A. thaliana* no mostraven aquestes vesícules en condicions normals, però sí que es van advertir quan la fulla havia patit una ferida (Matsushima et al., 2002). També l'hormona metiljasmonat (que mitjanciant respostes de la planta front dany) i estrès ambiental podien induir la formació de *RE bodies*. En els *RE bodies* abunden proteïnes implicades en defensa com la β-glucosidasa PYK10 (Matsushima et al., 2003b). Per tant, aquestes dades suggereixen que els *ER bodies* són una estructura vesicular derivada dels sistema endomembranós implicada en la resposta a estrès ambiental o a ferida (Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). El domini N-terminal de l'HMGR1S indueix la formació de vesícules derivades del RE en cèl·lules de fulla de roseta basal, encara que la morfologia de les vesícules de la 1S:GFP és diferent a la mostrada pels *RE bodies*. Així mateix en cèl·lules de cotilèdon s'ha observat l'HMGR endògena en vesícules (Leivar et al., 2005). En plantes joves hi ha un excés d'activitat HMGR que no respon als requeriments metabòlics de la cèl·lula. Aquest excés de proteïna HMGR podria induir la formació de vesícules que podrien tenir una funció de defensa i protegir la planta front l'estrès ambiental. Dins d'aquest context és important assenyalar que les plantes de la línia mutant *hmg1-1* creixen correctament en un ambient controlat estèril i amb una alta humitat ambiental. L'estrès provocat en transferir les plantes a terra, va causar en les plantes severes alteracions de desenvolupament. Per tant la mutació *hmg1*, segurament, provoca una elevada sensibilitat a l'estrès. En consistència amb aquesta hipòtesi és que l'hormona metiljasmonat indueix l'expressió d'*hmg1* (figura 59). Així, integrant aquest resultat es pot suggerir que una funció de la proteïna HMGR1S seria la inducció de vesícules en resposta a l'estrès. Aquestes vesícules podrien ser les mateixes ja descrites com *RE bodies* o bé un altre tipus d'estructura derivada del sistema endomembranós.

## conclusions

---



## CONCLUSIONS

- I. S'ha identificat i caracteritzat un mutant insercional del gen *hmg1* d'*Arabidopsis thaliana* que conté un T-DNA que impedeix la síntesi de productes funcionals derivats d'aquest gen. El mutant *hmg1-1* es desenvolupa normalment en medi estèril MS sense requeriments de mevalonat, producte de l'enzim HMGR. En aquestes condicions, el mutant *hmg1-1* mostra una activitat HMGR molt disminuïda en comparació amb la de la línia parental Columbia 0. La presència de mevinolina (inhibidor de l'HMGR) en el medi de creixement afecta molt notablement el desenvolupament de les plantes *hmg1-1*. Per tant, l'activitat HMGR residual (procedent de l'HMGR2) d'*hmg1-1* és necessària per acomplir les necessitats metabòliques en aquesta etapa.
- II. Les plantes *hmg1-1* comencen a manifestar alteracions morfològiques quan són transferides a terra que desemboquen en un acusat fenotip d'enanisme i en una senescència primerenca. Tot i que pot iniciar la fase reproductiva, mostra un alt grau d'infecunditat. L'aplicació exògena de mevalonat atenua només parcialment aquesta esterilitat. El fenotip en les plantes *hmg1-1* pot ser degut a deficiències metabòliques derivades de la manca de les isoformes HMGR1S i HMGR1L. Alternativament, l'HMGR1S i/o l'HMGR1L podrien efectuar alguna altra funció essencial en la cèl·lula.
- III. S'ha comparat l'activitat HMGR en extractes de plantes de la línia *hmg1-1*, de la línia *hmg2-2* (mutant insercional que afecta la isoforma HMGR2) i de la seva línia parental silvestre. La línia *hmg1-1*, mostra una reducció molt considerable en l'activitat HMGR en comparació amb la de la parental i la de la línia *hmg2-3*. Aquest resultat indica que el gen *hmg1* codifica per les isoformes que més contribueixen en l'activitat HMGR total de la planta.
- IV. S'ha realitzat una cerca de proteïnes que interaccionin amb la regió N-terminal de l'HMGR2 i amb el domini catalític de l'HMGR1 (CD1) mitjançant crivellatges per doble híbrid d'una llibreria de cDNA d'*A. thaliana* obtinguda de plantes etiolades de tres dies. La utilització del CD1 com a esquer ha permès identificar el propi CD1. Aquest resultat suggereix que l'HMGR d'*A. thaliana* pot dimeritzar (o oligomeritzar) *in vivo* a través d'aquesta regió.
- V. Mitjançant un crivellatge per doble híbrid amb la llibreria de cDNA d'*A. thaliana*, s'ha demostrat que la proteïna AtKLC-1 interacciona amb la proteïna PR65, subunitat A del complex PP2A. Aquesta interacció s'ha confirmat per la retenció específica de la PR65 d'un extracte d'*A. thaliana* en una matriu que conté GST:AtKLC-1 i per la retenció d'AtKLC-1 sintetitzada *in vitro* en una matriu de GST:PR65.

- VI.** Assaigs de GST *pull-down* amb matrius que contenen construccions derivades de GST:PR65 han permès determinar que la regió de la PR65 que intervé en la interacció comprèn els residus inclosos entre els motius HEAT 7 i HEAT 9. Aquesta regió també està implicada en la interacció amb AtB'' $\alpha$ . Es suggereix que es pot establir una competència entre AtKLC-1 i AtB'' $\alpha$  per a la seva unió a PR65.
- VII.** La proteïna AtKLC-1 mostra similitud amb la cadena lleugera de quinesina de tipus I i la proteïna AtKHC mostra similitud amb la cadena pesant de quinesina de tipus I. Assaigs de GST *pull-down in vitro* demostren la interacció entre aquestes dues proteïnes. Aquesta associació és la primera evidència experimental que suggereix l'existència de la quinesina de tipus I en plantes.
- VIII.** Les cinc isoformes de la subunitat reguladora AtB'' de la PP2A tenen dos motius conservats (*EF-Hand*) d'unió a calci. S'ha demostrat que la isoforma AtB'' $\alpha$  reté  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  i que la presència del catió indueix un canvi conformacional tant en AtB'' $\alpha$  com en AtB'' $\beta$  que es tradueix en una major mobilitat per SDS-PAGE. La presència de calci en assaigs d'interacció afavoreix la retenció d'AtB'' $\alpha$  i d'AtB'' $\beta$  sintetitzades *in vitro* en les matrius de GST:PR65 i les que contenen fusions a GST de les regions N-terminal de l'HMGR1. Mentre que l'augment en la mobilitat electroforètica és més evident en la proteïna AtB'' $\alpha$ , la retenció en matrius d'afinitat afavorida per calci és més manifest a AtB'' $\beta$ .
- IX.** S'ha estudiat l'efecte del calci sobre l'activitat HMGR. S'obtenen valors màxims d'activitat quan el calci és absent tant en l'homogeneïtzació com en l'assaig enzimàtic. La presència del catió en les dues operacions provoca una disminució molt important de l'activitat HMGR. Quan l'homogeneïtzació es realitza en presència del calci, l'HMGR roman més sensible a l'efecte induït pel catió.
- X.** L'activitat HMGR en plantes que sobreexpressen la isoforma HMGR1S augmenta fins a tres vegades en comparació amb l'obtinguda de plantes de la línia parental i, s'inhibeix per calci. En plantes que sobreexpressen el seu domini catalític l'activitat incrementa entre 2.000 i 6.000 vegades i, no s'inhibeix per calci. L'augment en la quantitat de proteïna sobreexpressada no justifica els elevats nivells d'activitat HMGR en la línia de sobreexpressió del domini catalític. Per tant, es demostra que el domini N-terminal de l'HMGR (que inclou la regió N-terminal citosòlica, i els segments de transmembrana) és un element modulador que participa en la inhibició per calci de l'activitat HMGR.

- XI.** Plantes que presenten una activitat PP2A disminuïda, línia mutant *rcn1-1* o plantes crescudes en presència d'un inhibidor, revelen un increment en l'activitat HMGR mesurada *in vitro* o *in vivo*. Per tant la PP2A és un regulador negatiu de l'HMGR. No obstant, tres línies mutants insercionals del gen *AtB'' $\alpha$*  mostren aproximadament un 20% menys d'activitat HMGR en comparació amb la línia parental. Aquest comportament oposat podria ser degut a la presència de productes truncats d'*AtB'' $\alpha$*  o a la substitució d'aquesta proteïna per altres isoformes *AtB''* en els complexos HMGR-PP2A.
- XII.** Per tal d'estudiar el paper del domini N-terminal de l'HMGR en la localització subcel·lular de la proteïna s'han expressat quimeres en què el seu domini catalític ha estat substituït per la proteïna verda fluorescent GFP. Les quimeres s'han expressat transitòriament en cèl·lules de fulla d'*A. thaliana* i s'ha determinat el patró de localització subcel·lular per microscopia làser confocal. L'observació d'un elevat nombre d'imatges en diferents situacions experimentals ha permès definir quatre distribucions bàsiques de localització subcel·lular: patró reticular, patró reticulo-vesicular, patró reticulo-vesicular amb grans vesícules, patró reticular amb agregats.
- XIII.** La quimera 1S:GFP, derivada de l'HMGR1S, mostra en un 50% dels casos un patró de localització reticulo-vesicular quan s'expressa en un fons silvestre. En l'estudi d'una variant d'aquesta quimera, Rdel1S:GFP, que té substituïts els residus implicats en la interacció amb *AtB'' $\alpha$*  i *AtB'' $\beta$* , s'observa una reducció molt notable en el nombre de cèl·lules amb patró reticulo-vesicular a favor de les que presenten un patró reticular. S'observa el mateix fenomen, encara que d'una forma menys evident, en l'estudi de localització de la quimera 1S:GFP en fons mutants *B'' $\alpha$* , en fons mutant *rcn1-1* i en cèl·lules procedents de fulles tractades amb un inhibidor de la PP2A. Per tant, la PP2A afecta la localització de la 1S:GFP a vesícules o a la formació de les mateixes. Les diferents aproximacions indiquen que tant un procés de desfosforilació com la interacció HMGR1S-*AtB''* intervien en la generació d'aquestes estructures.
- XIV.** La quimera 1L:GFP (derivada de l'HMGR1L) té un patró de localització subcel·lular reticular quan s'expressa en un fons silvestre. Quan s'estudia la localització subcel·lular de la 1L:GFP en un fons mutant *rcn1-1* s'observa en un 33% dels casos un patró reticulo-vesicular, reticulo-vesicular amb grans vesícules o reticular amb agregats. Aquest resultat indica que la PP2A està implicada en la localització d'1L:GFP al reticle endoplasmàtic.





## **bibliografia**

---



- Ahumada, I.** (2001). Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular de la acetoacetil-coenzima A tiolasa de *Arabidopsis thaliana*. In Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 108.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.** (1989). Biología Molecular de la Cèl.lula. (Barcelona: Edicions Omega).
- Anderson, R.G.W., Orci, L., Brown, S., Garcia-Segura, L.M., and Goldstein, J.** (1983). Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol. *J Cell Sci* **63**, 1-20.
- Aoyagi, K., Beyou, A., Moon, K., Fang, L., and Ulrich, T.** (1993). Isolation and characterization of cDNAs encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiol* **102**, 623-628.
- Ariño, J., Pérez-Callejón, E., Cunillera, N., Camps, M., Posas, F., and Ferrer, A.** (1993). Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **21**, 475-485.
- Aukerman, M.J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M., and Sharrock, R.A.** (1997). A Deletion in the *PHYD* Gene of the *Arabidopsis* Wassileskija Ecotype Defines a Role for Phytochrome D in Red/Far-Red Light Sensing. *The Plant Cell* **9**, 1317-1326.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.** (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: John Wiley and Sons, Inc.).
- Awotunde, O.S., Lechward, K., Krajewska, K., Zolnierowicz, S., and Muszynska, G.** (2003). Interaction of maize (*Zea mays*) protein phosphatase 2A with tubulin. *Acta Biochim Pol* **50**, 131-138.
- Ayaydin, F., Vissi, E., Mészáros, T., Miskolczi, P., Kovács, I., Fehér, I., Dombrádi, V., Erdödi, F., Gergely, P., and Dudits, D.** (2000). Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *The Plant Journal* **23**, 85-96.
- Bach, T.J.** (1987). Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**, 163-178.
- Bach, T.J., Rogers, D.H., and Rudney, H.** (1986). Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur J Biochem* **154**, 103-111.
- Basson, M., Thorness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R., and Rine, J.** (1988). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, the rate limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Biol Cell* **10**, 3797-3808.
- Bick, J.A., and Lange, B.M.** (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**, 146-154.
- Bramley, P.** (1997). Isoprenoid Metabolism. In *Plant Biochemistry* (Academic Press Ltd), pp. 417-434.

- Brandizzi, F., Saint-Jore, C., Moore, I., and Hawes, C.** (2002). The relationship between endomembranes and the plant cytoskeleton. *Cell Biol Int* **27**, 177-179.
- Brown, D.A., and Simoni, R.D.** (1984). Biogenesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, an integral glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1674-1678.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The Arabidopsis TONNEAU2 Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.
- Campos, N., and Boronat, A.** (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**, 2163-2174.
- Campos, N., Boronat, A.** (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**(12), 2163-2174.
- Carretero-Paulet, L.** (2003). Caracterización a nivel molecular de los genes 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa de *Arabidopsis thaliana*. In *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III* (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 270.
- Casamayor, A., Pérez-Callejón, E., Pujol, G., Ariño, J., and Ferrer, A.** (1994). Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **26**, 523-528.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chapman, A., and Hill, B.** (2000). *Dictionary of Natural Products on CD-ROM* (version 9.1.) (London, New York: CRC Press).
- Chappell, J.** (1995a). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* **107**, 1-6.
- Chappell, J.** (1995b). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 521-547.
- Chappell, J.** (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 151-157.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., and Saunders, C.** (1995). Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol* **109**, 1337-1343.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., Saunders, C.** (1995c). Is the reaction catalyzed by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol* **109**, 1337-1343.
- Cheng, H.H., Xu, L., Kumagai, H., and Simoni, R.D.** (1999). Oligomerization state influences the degradation rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **274**, 17171-17178.

- Chien, C., Bartel, P., and Fields, S.** (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-9582.
- Ching, Y.P., Kobayashi, A., Tamura, Y., and Hardie, D.G.** (1997). Specificity of different isoforms of protein phosphatase-2A and protein phosphatase-2C studied using site-directed mutagenesis of HMG-CoA reductase. *FEBS Lett* **411**, 265-268.
- Choi, D., and Bostock, R.M.** (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**, 1237-1244.
- Choi, D., Ward, B.L., and Bostock, R.M.** (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4(10)**, 1333-1344.
- Choi, D., Ward, B.L., Bostock, R.M.** (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4(10)**, 1333-1344.
- Chory, J., Nagpal, P., and Peto, C.A.** (1991). Phenotypic and Genetic Analysis of *det2*, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **3**, 445-459.
- Chye, M.L., Tan, C.T., and Chua, N.H.** (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol Biol* **19**, 473-484.
- Clouse, S.D.** (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell* **14**, 1995-2000.
- Cordier, H., Karst, F., and Berges, T.** (1999). Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. *Plant Mol Biol* **39**, 953-967.
- Cowan, A.K., Moore-Gordon, C.S., Bertling, I., and Wolstenholme, B.N.** (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**, 511-518.
- Cramer, C.L., Cottingham, C.K., Denbow, C.J., Eisenback, J.D., Radin, D.N., and Weissenborn, D.L.** (1993). Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* **25**, 507-518.
- Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L.E., Ashford, D.A., and Denecke, J.** (1999). Saturation of the Endoplasmic Reticulum Retention Machinery Reveals Anterograde Bulk Flow. *The Plant Cell* **11**, 2233-2247.
- Crowell, D.N.** (2000). Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Prog Lipid Res* **39**, 393-408.
- Cunillera, N., Boronat, A., and Ferrer, A.** (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* **272**, 15381-15388.

- Cunillera, N., Boronat, A., and 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**, 747-758.
- Cunillera, N., Arró, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A., and Ferrer, A. (1996). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* **271**, 7774-7780.
- Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G., and Ferrer, A. (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**, 506-513.
- Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., and Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C Overexposure Induces Programmed Cell Death in *Arabidopsis*, Which Is Mediated by Caspase-like Activities and Which Can Be Suppressed by Caspase Inhibitors, p35 and *Defender against Apoptotic Death*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 779-787.
- Davis, S.J., and Vierstra, R.D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**, 521-568.
- Del Arco, A. (1999). Biosíntesis de isoprenoides en plantas: Caracterización molecular del gen SQS1 que codifica para la escualeno sintasa de *Arabidopsis thaliana*. In Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III (Barcelona: Universidad de Barcelona), pp. 282.
- Demel, R.A., and de Kruffyff, B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta* **457**, 109-132.
- Denbow, C.J., Lang, S., and Cramer, C.L. (1996). The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem* **271**, 9710-9715.
- Deruère, J., Jackson, K., Garbers, C., Söll, D., and DeLong, A. (1999). The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo*. *The Plant Journal* **20**, 389-399.
- Donald, K.A.G., Hampton, R., and Fritz, I.B. (1997). Effects of Overproduction of the Catalytic Domain of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase on Squalene Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **63:9**, 3341-3344.
- Douglas, P., Pigaglio, E., Ferrer, A., Halfords, N.G., and MacKintosh, C. (1997). Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are required by reversible phosphorylation and/or Ca<sup>2+</sup> ions. *Biochem J* **325 ( Pt 1)**, 101-109.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78-84.
- Enjuto, M., Lumbreras, V., Marín, C., and Boronat, A. (1995). Expression of the *Arabidopsis* HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7**, 517-527.

- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arró, M., and Boronat, A. (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 927-931.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., Boronat, A. (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **91(3)**, 927-931.
- Enjuto, M., Lumbreras, V., Marin, C., Boronat, A. (1995). Expression of the *Arabidopsis* HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7(5)**, 517-527.
- Ferrer, A., Aparicio, C., Nogues, N., Wettstein, A., Bach, T.J., and Boronat, A. (1990). Expression of catalytically active radish 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **266**, 67-71.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 45-246.
- Foissner, I., Grolig, F., and Obermeyer, G. (2002). Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid. *Protoplasma* **220**, 1-15.
- Garbers, C., DeLong, A., Deruère, J., Bernasconi, P., and Söll, D. (1996). A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **15**, 2115-2124.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y. (1999a). A highly conserved signal controls degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in eukaryotes. *J Biol Chem* **274**, 31671-31678.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y. (1999b). A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *Embo J* **18**, 5994-6004.
- Gauger, A.K., and Goldstein, L.S. (1993). The *Drosophila* kinesin light chain. Primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J Biol Chem* **268**, 13657-13666.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Marbach, J., A., D., Fleck, J., and Jamet, E. (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol* **20**, 337-341.
- Gietz, R., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K.C., and Woods, R.A. (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeasts two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry* **172**, 67-79.
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J., and Brown, A. (1985). Membrane-bound domain of HMG-CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* **41**, 249-258.
- Gill, J.L., Beach, M.J., and Rodwell, V.W. (1985). Mevalonate utilization in *Pseudomonas* sp. M. Purification and characterization of an inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **260**, 9393-9398.



- Glomset, J.A., Gelb, M.H., and Farnsworth, C.C.** (1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* **15**, 139-142.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343(6257)**, 425-430.
- Goldstein, L.S.** (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol* **11**, 477-482.
- González, V.** (2002). Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilmetilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. In Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-División III (Barcelona: *Universitat de Barcelona*).
- Groves, M.R., and Bardford, D.** (1999). Topological characteristics of helical repeat proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 383-399.
- Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A., and Barford, D.** (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**, 99-110.
- Gu, Y., Vernourd, V., Fu, Y., and Yang, Z.** (2003). ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *Journal of Experimental Botany* **54**, 93-101.
- Gunning, B.E.S.** (1998). The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends in Plant Science* **3**, 417.
- Halford, N.G., and Hardie, D.G.** (1998). SNF1-related protein kinase: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* **37**, 735-748.
- Hampton, R.** (2002). Proteolysis and Sterol Regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 18.
- Hampton, R., D., D.-D., and Rine, J.** (1996). The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci* **21**, 140-145.
- Hanson, M.R., and Köhler, R.H.** (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 529-539.
- Hara-Nishimura, I., and Matsushima, R.** (2003). A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 583-588.
- Hara-Nishimura, I., Matsushima, R., Shimada, T., and Nishimura, M.** (2004). Diversity and Formation of Endoplasmic Reticulum-Derived Compartments in Plants. Are These Compartments Specific to Plant Cells? *Plant Physiol* **136**, 3435-3439.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., and Nishimura, M.** (1999). Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Haseloff, J., Dormand, E.L., and Brand, A.H.** (1999). Live imaging with green fluorescent protein. *Methods Mol Biol* **122**, 241-259.

- Hawes, C., Saint-Jore, C., Martin, B., and Zheng, H.-Q. (2001). ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP! Trends in Plant Science **6**, 245-246.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (1999). Accumulation of a fusion protein containing 2S albumin induces novel vesicles in vegetative cells of *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol **40**, 263-272.
- Haynes, J.G., Hartung, A.J., Hendershot, J.D., 3rd, Passingham, R.S., and Rundle, S.J. (1999). Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of *Arabidopsis* protein phosphatase 2A. Eur J Biochem **260**, 127-136.
- Hemmerlin, A., and Bach, T.J. (2000). Farnesol-Induced Cell Death and Stimulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Activity in Tobacco cv Bright Yellow-2 Cells. Plant Physiol **123**, 1257-1268.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., and Bach, T.J. (2003). Crosstalk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. J Biol Chem.
- Hendershot, J.D., Esmon, C.A., Lumb, J.E., and Rundle, S.J. (1999). Identification and characterization of sequences encoding a 62kD B'' regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* protein phosphatase 2A. Plant Gene Register/Plant Physiol **121**, 311.
- Herman, E.M., and Larkins, B.A. (1999). Protein storage bodies and vacuoles. Plant Cell **11**, 601-613.
- Holmberg, N., Harker, M., Gibbard, C.L., Wallace, A.D., Clayton, J.C., Rawlins, S., Hellyer, A., and Safford, R. (2002). Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. Plant Physiol **130**, 303-311.
- Hong, Y., and Sarge, K.D. (1998). Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity by Heat Shock Transcription Factor 2. The Journal of Biological Chemistry **274**, 12967-12970.
- Hunter, T. (1995). Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. Cell **80**, 225-236.
- Initiative\*, T.A.G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature **408**, 796-815.
- Ishidaira, T., Izume, S., Yamada, M., Ohsato, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Shirano, Y., Hayashi, H., Shibata, D., Mizayaki, S., Bohnert, H.J., and Fukuhara, T. (2003). Characterization of type 2C protein phosphatases (PP2C) in *Arabidopsis thaliana*. In 7th International Congress of Plant Molecular Biology (Barcelona: The International Society for Plant Molecular Biology), pp. 218.
- Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science **292**, 1160-1164.
- Istvan, E.S., Palnitkar, M., Buchanan, S.K., and Deisenhofer, J. (2000). Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. Embo J **19**, 819-830.
- Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J.

- Janssens, V., Jordens, J., Stevens, I., Van Hoof, C., Martens, E., De Smedt, H., Engelborghs, Y., Waelkens, E., and Goris, J. (2003). Identification and functional analysis of two Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand motifs in the B"/PR72 subunit of Protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem* **10**, 10.
- Jingami, H., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., and Luskey, K.L. (1987). Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **104**, 1693-1704.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 45188-45194.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., and Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 908-925.
- Kim, D.Y., Stauffacher, C.V., and Rodwell, V.W. (2000). Engineering of *Sulfolobus solfataricus* HMG-CoA Reductase to a Form Whose Activity is Regulated by Phosphorylation and Dephosphorylation. *Biochemistry* **39:9**, 2269-2275.
- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11786-11791.
- Klahre, U., Cr  t  , P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V., and Meins, F. (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11981-11986.
- Klee, C.B., Crouch, T.H., and Krinks, M.H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6270-6273.
- Korth, K.L., Jaggard, D.A., and Dixon, R.A. (2000). Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J* **23**, 507-516.
- Kwak, J.M., Moon, J.H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A., and Schroeder, J.I. (2002). Disruption of a Guard Cell-Expressed Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit, RCN1, Confers Abscisic Acid Insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2849-2861.
- Lange, B.M., and Ghassemian, M. (2003). Genome organization in Arabidopsis thaliana: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **51**, 925-948.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13172-13177.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(24)**, 13172-13177.
- Larsen, P.B., and Cancel, J.D. (2003). Enhanced ethylene responsiveness in the Arabidopsis eer1 mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant J* **34**, 709-718.

- Lawrence, C.J., Malmberg, R.L., Muszynski, M.G., and Dawe, R.K.** (2002). Maximum likelihood methods reveal conservation of function among closely related Kinesin families. *J Mol Evol* **54**, 42-53.
- Lawrence, C.M., Rodwell, V.W., and Stauffacher, C.V.** (1995). Crystal structure of *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution. *Science* **268**, 1758-1762.
- Learned, R.M.** (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**, 645-655.
- Learned, R.M., Connolly, E.L.** (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.
- Lee, C., and Chen, L.B.** (1988). Dynamic behaviour of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* **54**, 37-46.
- Lee, Y.R., and Liu, B.** (2004). Cytoskeletal Motors in *Arabidopsis*. Sixty-One Kinesins and Seventeen Myosins. *Plant Physiol* **136**, 3877-3883.
- Leivar, P.** (2003). Anàlisi funcional de la regió N-terminal de l'HMG-CoA Reductasa d'*Arabidopsis*. In Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 148.
- Leivar, P., González, V., Castel, S., Trelease, R.N., López-Iglesias, C., Arró, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., and Fernández-Busquets, X.** (2005). Subcellular Localization of *Arabidopsis* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *Plant Physiology* **137**, 57-69.
- Lewit-Bentley, A., and Rety, S.** (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *curr opin struc biol* **10**, 637-643.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X., and Yang, Z.** (1999). Control of Pollen Tube Tip Growth by a Rop GTPase-Dependent Pathway That Leads to Tip-Localized Calcium influx. *The Plant Cell* **11**, 1731-1742.
- Li, X., and Virshup, D.M.** (2002). Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* **269**, 546-552.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 47-65.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., and Schwender, J.** (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia plantarum* **101**, 643-652.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M.** (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**, 271-274.
- Lindesmith, L.C., McIlvain, J.M., Argon, Y., and Sheetz, M.P.** (1997). Phosphotransferases Associated with the Regulation of Kinesin Motor Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 22929-22933.

- Lindsey, K., Pullen, M.L., and Topping, J.F.** (2003). Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends Plant Sci* **8**, 521-525.
- Liu, W.-m., Mei, R., Di, X., Ryder, T.B., Hubbell, E., Dee, S., Webster, T.A., Harrington, C.A., Ho, M.-h., Baid, J., and Smeekens, S.P.** (2002). Analysis of high density expression microarrays with signed-rang call algorithms. *Bioinformatics* **18**, 1593-1599.
- Lloyd, C., and Hussey, P.** (2001). Microtubule-associated proteins in plants-why we need a map. *Nature Reviews* **2**, 40-47.
- Luan, S.** (2003). Protein Phosphatases in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 63-92.
- Lubert, E.J., Hong Yi, Y., and Sarge, K.D.** (2001). Interaction between protein phosphatase 5 and the A subunit of protein phosphatase 2A: Evidence for a heterotrimeric form of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* **14**, 14.
- Lumbreras, V., Campos, N., and Boronat, A.** (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J* **8**, 541-549.
- Lumbreras, V., Albà, M.M., Kleinow, T., Koncz, C., and Pagès, M.** (2000). Domain fusion between SNF1-related kinase. *EMBO reports* **2**, 55-60.
- Lumbreras, V., Campos, N., Boronat, A.** (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J* **8(4)**, 541-549.
- MacKintosh, C., and Cohen, P.** (1989). Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem J* **262**, 335-339.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Burnett, R.J., and Nessler, C.L.** (1992). Nucleotide sequence of cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **100**, 1613-1614.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Vincent, R.M., and Nessler, C.L.** (1997). Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Mol Biol* **34**, 781-790.
- Manning, B.D., and Snyder, M.** (2000). Drivers and passengers wanted! the role of kinesin-associated proteins. *Trends Cell Biol* **10**, 281-289.
- Manzano, D., Fernández-Busquets, X., Schaller, H., González, V., Boronat, A., Arró, M., and 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**, 982-992.
- Marín, C.** (2003). Regulació de l'expressió del gen HMG1 d'*Arabidopsis thaliana*: paper de la regió 5'-transcrita no traduïda. In Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III (Barcelona: Universidad de Barcelona), pp. 233.

- Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S.** (1984). Detection of Calcim Binding Proteins by <sup>45</sup>Ca Autoradiography on Nitrocellulose Membrane after Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. *J. Biochem.* **95**, 511-519.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003a). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**, 493-502.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2002). An Endoplasmic Reticulum-Derived Structure That Is Induced under Stress Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**, 1807-1814.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003b). The ER Body, a Novel Endoplasmic Reticulum-Derived Structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **44**, 661-666.
- Mayer-Jaekel, R.E., and Hemmings, B.A.** (1994). Protein phosphatase 2A- a "ménage a trois". *Trends in Cell Biology* **4**, 287-291.
- McCaskill, D., Croteau, R.** (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *TIBTECH* **16**, 349-355.
- McGarvey, D.J., and Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.
- McGee, T.P., Cheng, H.H., Kumagai, H., Omura, S., and Simoni, R.D.** (1996). Degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in endoplasmic reticulum membranes is accelerated as a result of increased susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* **271**, 25630-25638.
- Millward, T.A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B.A.** (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* **24**, 186-191.
- Monroy, A.F., Sangwan, V., and Dhindsa, R.S.** (1998). Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *The Plant Journal* **13:5**, 653-660.
- Moore, K.B., and Oishi, K.K.** (1993). Characterization of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity during Maize Seed Development, Germination, and Seedling Emergence. *Plant Physiol* **101**, 485-491.
- Moore, K.B., and Oishi, K.K.** (1994). 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in the Endosperm of Maize vivipary Mutants. *Plant Physiol* **105**, 119-125.
- Moriyama, T., K., S.S., McGee, T.P., and Simoni, R.D.** (1998). Degradation of HMG-CoA Reductase *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* **273:34**, 22037-22043.
- Moriyama, T., Wada, M., Urade, R., Kito, M., Katunuma, N., Ogawa, T., and Simoni, R.D.** (2001). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is sterol-dependently cleaved by cathepsin L-type cysteine protease in the isolated endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **386**, 205-212.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.

- Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., and Muranaka, T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway **216**, 345-350.
- Narita, J.O., and Grissem, W. (1989). Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1**, 181-190.
- Okita, T.W., and Rogers, J.C. (1996). Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 327-350.
- Olender, E.H., and Simoni, R.D. (1992). The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **267**, 4223-4235.
- Parrish, M.L., Sengstag, C., Rine, J.D., and Wright, R.L. (1995). Identification of the sequences in HMG-CoA reductase required for karmellae assembly. *Mol Biol Cell* **6**, 1535-1547.
- Pathak, R.K., Luskey, K.L., and Anderson, R.C. (1986). Biogenesis of the Crystalloid Endoplasmic Reticulum in UT-1 Cells: Evidence That Newly Formed Endoplasmic Reticulum Emerges from the Nuclear Envelope. *The Journal of Cell Biology* **102**, 2158-2168.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Camacho, A., Gallego, C., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D. (1997). A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **324(2)**, 619-626.
- Pérez-Callejón, E., Casamayor, A., Pujol, G., Camps, M., Ferrer, A., and Ariño, J. (1998). Molecular cloning and characterization of two phosphatase 2A catalytic subunit genes from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**, 105-112.
- Preuss, M.L., Kovar, D.R., Lee, J.R., Staiger, C.J., Delmer, D.P., and Liu, B. (2004). A Plant-Specific Kinesin Binds to Actin Microfilaments and Interacts with Cortical Microtubules in Cotton Fibers. *Plant Physiol* **136**, 3945-3955.
- Rashotte, A.M., DeLong, A., and Muday, G.K. (2001). Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* **13**, 1683-1697.
- Re, E.B., Jones, D., Learned, R.M. (1995). Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **7(5)**, 771-784.
- Reddy, A.S., and Day, I.S. (2001). Kinesins in the *Arabidopsis* genome: A comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* **2**, 2.
- Redman, J.C., Haas, B.J., Tanimoto, G., and Town, C.D. (2004). Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *The Plant Journal* **38**, 545-561.
- Ridge, R.W., Uozumi, Y., Plazinski, J., Hurley, U.A., and Williamson, R.E. (1999). Developmental Transitions and Dynamics of the Cortical ER of *Arabidopsis* Cells Seen with Green Fluorescent Protein. *Plant Cell Physiol* **40**, 1253-1261.
- Rodríguez-Concepción, M., and Grissem, W. (1999). Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol* **119(1)**, 41-48.

- Rodríguez-Concepción, M., and 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**, 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Fores, O., Martínez-García, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., and Boronat, A.** (2004). Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *Plant Cell* **16**, 144-156.
- Rohmer, M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16(5)**, 565-574.
- Romagnoli, S., Cai, G., and Cresti, M.** (2003a). In Vitro Assays Demonstrate That Pollen Tube Organelles Use Kinesin-Related Motor Proteins to Move along Microtubules. *Plant Cell* **15**, 251-269.
- Romagnoli, S., Cai, G., and Cresti, M.** (2003b). Kinesin-like proteins and transport of pollen tube organelles. *Cell Biol Int* **27**, 255-256.
- Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M., and Walter, G.** (1994). Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol* **68**, 123-129.
- Ruediger, R., Roedel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G., and Walter, G.** (1992). Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol* **12**, 4872-4882.
- Rundle, S.J., Hartung, A.J., Corum, J.W., 3rd, and O'Neill, M.** (1995). Characterization of a cDNA encoding the 55 kDa B regulatory subunit of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Plant Mol Biol* **28**, 257-266.
- Russell, D., Knight, J.S., and Wilson, T.M.** (1985). Pea seedling HMG-CoA reductases: regulation of activity in vitro by phosphorylation and calcium, and posttranslational control in vivo by phytochrome and isoprenoid hormones. In *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, T. Kagawa, ed (Missouri: The Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program).
- Sambrook, R., Fritsch, E., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (N.Y.: Cold Spring Harbor).
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., and Schaller, H.** (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J* **25**, 605-615.
- Schaller, H.** (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res* **42**, 163-175.
- Schaller, H.** (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 456-476.
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., and Gietl, C.** (1998). A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the rinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**, 466-475.



- Schrack, K., Mayer, U., Martin, G., Bellini, C., Kuhnt, C., Schmidt, J., and Jurgens, G. (2002). Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of Arabidopsis. *Plant J* **31**, 61-73.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **13**, 1696-1705.
- Singer, S.J. (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann Rev Cell Biol* **6**, 247-296.
- Slabas, A.R., Fordham-Skelton, A.P., Fletcher, D., Martínez-Rivas, J.M., Swinhoe, R., Croy, R.R., and Evans, I.M. (1994). Characterisation of cDNA and genomic clones encoding homologues of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **26**, 1125-1138.
- Sontag, E. (2001). Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* **13**, 7-16.
- Staehelin, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**, 1151-1165.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M., Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35**(7), 1133-1140.
- Strack, S., Ruediger, R., Walter, G., Dagda, R.K., Barwacz, C.A., and Cribbs, J.T. (2002). Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly. Identification of contacts between B-family regulatory and scaffolding A subunits. *J Biol Chem* **2**, 2.
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., and Hardie, D.G. (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* **120**, 257-274.
- Suzuki, M., Kamide, Y., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H., Masuda, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yoshida, N., and 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. *The Plant Journal* **37**, 750-761.
- Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005). KATAMARI1/MURUS3 Is a Novel Golgi Membrane Protein That is Required for Endomembrane Organization in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 1764-1776.
- Terol, J., Bagues, M., Carrasco, P., Perez-Alonso, M., and Paricio, N. (2002). Molecular Characterization and Evolution of the Protein Phosphatase 2A B' Regulatory Subunit Family in Plants. *Plant Physiol* **129**, 808-822.
- Torres, E., Gonzalez-Melendi, P., Stöger, E., Shaw, P., Twyman, R.M., Nicholson, L., Vaquero, C., Fischer, R., Christou, P., and Perrin, Y. (2001). Native and Artificial Reticuloplasmic Co-Accumulate in Distinct Domains of the Endoplasmic Reticulum and in Post-Endoplasmic Reticulum Compartments. *Plant Physiol* **127**, 1212-1223.
- Toyooka, K., Okamoto, T., and Minamikawa, T. (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* **148**, 453-463.

- Turowski, P., Favre, B., Campbell, K.S., Lamb, N.J.C., and Hemmings, B.A.** (1997). Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit. *Eur J Biochem* **248**, 200-208.
- Vale, R.D., and Fletterick, R.J.** (1997). The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 745-777.
- Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P.** (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- Virshup, D.M.** (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 180-185.
- Wasteneys, G.O.** (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci* **115**, 1345-1354.
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L., and Rine, J.** (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**, 101-114.
- Wright, R., Keller, G.A., Gould, S.J., Subramani, S., and Rine, J.** (1990). Cell-type control of membrane biogenesis induced by HMG-CoA reductase overproduction. *New Biol.* **2**, 915-921.
- Yalovsky, S., Kulukian, A., Rodriguez-Concepcion, M., Young, C.A., and Grissem, W.** (2000). Functional Requirement of Plant Farnesyltransferase during Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**, 1267-1278.
- Yang, J., Fan, G.-H., Wadzinski, B.E., Sakurai, H., and Richmond, A.** (2001). Protein Phosphatase 2A Interacts with and Directly Dephosphorylates RelA. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 47828-47833.
- Zhou, H.W., Nussbaumer, C., Chao, Y., and DeLong, A.** (2004). Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Plant Cell* **16**, 709-722.
- Zimmerman, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Grissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.