



Estudio del silenciamiento de los genes farnesildifosfato sintasa e Ingeniería metabólica para la producción de sesquiterpenos en Arabidopsis

Paola Andrea Andrade Poveda

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado de Biotecnología - Bienio 2010-2012

Estudio del silenciamiento de los genes farnesildifosfato
sintasa e Ingeniería metabólica para la producción de
sesquiterpenos en Arabidopsis

Paola Andrea Andrade Poveda

Barcelona 2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado de Biotecnología - Bienio 2010-2012

Estudio del silenciamiento de los genes farnesildifosfato
sintasa e Ingeniería metabólica para la producción de
sesquiterpenos en Arabidopsis

Memoria presentada por Paola Andrea Andrade Poveda para optar por el título de
Doctor por la Universidad de Barcelona.

Directores:

Autora:

Dr. Montserrat Arró Plans

Dr. David Manzano Alías

Paola Andrea Andrade
Poveda

Barcelona 2014

*En memoria de Pablo Vergara Matta, mi esposo, mi mejor amigo y padre de mi hija
Estés donde estés amor mío, misión cumplida!!!*

Agradecimientos

Ha llegado el momento de agradecer a todos aquellos quienes durante estos largos años me han ayudado, de alguna u otra forma, a llegar hasta este momento. En primer lugar agradecer a la Agencia de Cooperación Española por concederme una beca MAE-AECID, para cursar una Master, la cual me permitió arribar el año 2008 hasta estas lejanas tierras, sin esa primera oportunidad jamás hubiese llegado hasta donde me encuentro hoy, a punto de ser Doctora!!

En segundo lugar al Dr. Albert Ferrer Prats por atender a mi solicitud para formar parte de su grupo de investigación durante el Máster y posteriormente permitir que desarrollara mi tesis doctoral bajo el alero de sus proyectos de investigación. Muchísimas gracias por la oportunidad ha sido una muy buena experiencia. Gracias por su colaboración, buena disposición y comprensión hacia mí, sé que no fui la mejor, pero intente dar lo mejor de mí siempre.

A mis directores de tesis, a Montserrat Arró y David Manzano, muchísimas gracias por vuestra paciencia y comprensión. Gracias Montse por enseñarme con manzanitas (o dibujitos) algunas cosas de la ciencia que me costaba entender, y además gracias por ser la gran persona que eres, por tenderme una mano cuando más lo necesité, esas cosas no las hace cualquier persona, tienes un corazón inmenso. A ti David no me cansaré de agradecer tú arribo al laboratorio, siempre habrá un antes y un después de Manzano, de amigo y compañero pasaste a ser mi Director de tesis, fue un poco extraño la verdad, me costó un poco disociar las cosas, sin embargo, has sido un gran director y te la has jugado por mi tesis, gracias por enseñarme a pensar y a madurar las ideas, por enseñarme a que siempre hay algo más allá de lo evidente. Muchas pero muchas gracias a los dos, sobre todo por las horas de esfuerzos que representó la escritura y corrección de la tesis, lamento haberles hecho padecer tantísimo, pero ya está, ya la tenemos y podrán descansar de mi!!!!!!

Gracias también al Dr. Michael Phillips, Investigador del CRAG, por su colaboración en el proyecto de volátiles y en la implementación del sistema de captación de nerolidol. Gracias Mike por esas horas dedicadas a mí, y por la paciencia para conmigo.

A mis compañeros de Laboratorio, los AFP o más bien conocidos por los "Ferreros Rocher", sin vosotros nada hubiese sido posible, el apoyo científico y moral ha sido fundamental durante estos años, la amistad y el compañerismo a prueba de todo, agradezco de haberles tenido cerca de mí durante estos años, fuimos un gran grupo y lo pasamos genial.

Vero, gracias por esa complicidad, a mi lado estuviste el día en que supe que iba a ser madre y a mi lado estuviste el día en que me dieron las peores noticias de mi vida, has sido una gran amiga y lo sigues siendo a través del wasap o face. Dani, eres más bueno que el pan querido amigo, sobre todo cuando te pedía ayuda por enésima vez para hacer los cálculos de las diluciones jajajaja, eres transparente y leal no cambies nunca porque tú esencia es maravillosa!!!.. gracias por esas risas que nos echábamos haciendo el tonto jajajaja. David, amigo mío, eres un muy buen partner, tú piensas, “yo hago” y funcionaba bien la verdad, contigo no sólo aprendí de ciencia si no que también de música y también a filosofar sobre la vida y darnos apoyo en días malos que a menudo solíamos tener. En resumen gracias por ser parte de mi vida, por haber estado junto a mí en el momento más feliz como la llegada de Gabriela, como así cuando perdí a Pablo, gracias por sostener mi mano en los momentos más duros y no permitir que me hundiera o dejará todo tirado.... Han sido parte fundamental y les estaré eternamente agradecida por esa amistad sincera e incondicional y por las tantas veces que me ayudaron con los experimentos.... Os quiero muchísimo a los tres...Los extrañaré!!!

A los vecinos, los “Manolos”, por esas risas, por esas locuras, por ese intercambio de ideas u opiniones algunas científicas y otras no tanto, por los bailes o las tonterías varias que se nos ocurrían de tanto en tanto. Rosa, Lucio, Miriam, Cata, Briardo, Pablo, Jordi B, Jordi P. y en especial a Aguila, waxita nunca pensé el día que te conocí en el máster terminaríamos casi juntas el doctorado y que nos uniría una linda amistad, gracias por reír y llorar conmigo, gracias por esos wasap de apoyo día tras día mientras escribíamos la tesis. Os quiero muchísimo a todos, gracias porque siempre estuvieron al pendiente de mi y dispuestos a ayudar en lo que fuese, como el pobre Jordi P. que se pego el palizón de darle formato a ésta tesis jajaja y así tantas otras cosas más desde que llegamos a invadir el Lab jajajajaja.

A los que siempre estuvieron ahí, Karel, Lore Toloza, Patri Lorden, Joan, Tomi, Ares, Nico, Norma, Pep, Mariana, Chiqui, Mari jo, y los que me haya dejado...es tarde y mis neuronas no dan para mucho después de escribir la tesis jajajaja.... Gracias por las risas, por las charlas, alguna que otra fiesta y en especial por los ánimos brindados!!!

A la gente de Farmacia, mi primera parada en toda esta aventura!!!. Gracias Pepita por toda las ayudas administrativas, a Teresa Altabella, por su amistad y en general a todos los que conforman el departamento de Bioquímica y Biología Molecular, muchísimas gracias por todo el apoyo y preocupación que me han brindado durante estos 5 años, pese a que ya hace 3 estamos en el CRAG.

A todo el personal del CRAG y en especial a los encargados de los servicios, gracias por toda vuestra ayuda y buena disposición para conmigo.

A mis amigos de estas tierras lejanas, Jorge, Soledad, Montse, M^a Pilar, Junan, los Tetes, María, Pancho, Paola gracias por hacernos parte de vuestras familias y que a pesar de Pablo nos dejó, vosotros jamás nos dejaron solas, gracias por haber sido tan buenos amigos durante todos estos años.

A mis amigos en Chile, gracias por estar ahí durante estos 6 largos años, a los incondicionales de toda la vida y que no hace falta nombrarlos porque sin que se los diga ya lo saben, gracias por esperarme durante tantos años, en breve estaré cerca vuestro!!!!

Gracias a mi Gabriela, hija si no fuese por tú hermosa sonrisa mamá se hubiese hundido, pero por ti y gracias a ti, mamá sacó fuerza y coraje de donde ya no había y salió adelante, como fuese, porque le prometí a tú papá que nunca te faltaría nada y que serías una niña feliz y no descansaré ni un solo día de mi vida para que sea así. Te amo hija esto logro es por ti y para ti mi vida. jijiMamá volverá a ser normal!!!!

A mi mamá, por dejar todo tirado en Chile y quedarse el tiempo que fuese necesario para cuidarnos.... Mami eres la mejor, sin ti no hubiese acabado jamás el doctorado. Tu ayuda y apoyo incondicional sólo una madre lo puede dar. Gracias por cuidar de nosotras, en especial de mi pequeña hija. Mami este logro también es tuyo....es de las tres!!!!.....

A mi tía luli, mi weli, mi hermano, mi papi, mis primos y mis tíos en general, gracias porque siempre estuvieron al pendiente de mi brindándome mucho cariño y amor.

Por último y aunque sé que jamás leerás estas letras, a ti mi vida, partiste muy pronto a no sé dónde, ni siquiera sé si existe el más allá, sólo sé que aquí en la tierra aun te amamos y te extrañamos mucho, ha costado salir adelante, pero finalmente lo logramos...se que estarías orgulloso de mi y eso es lo que me conforma.

Y bueno si me he dejado algo o a alguien, lo siento ha sido sin querer... En esta tierra he aprendido a porrazos que si uno no se esfuerza no llega a la meta, que los errores están para cometerlos, porque siempre se aprende algo bueno de ellos y que esto de la ciencia es una vida complicada por estos días, sin embargo, yo sigo pa' delante, a lo que venga y con la mochila cargada de vivencias y aprendizajes que más de alguna vez me servirán en la vida.

Y como dijo mi querido Gustavo Cerati..... Gracias... Totales!!!!!!.....

ÍNDICE

INTRODUCCION	3
1. Isoprenoides.....	3
1.1. Biosíntesis de isoprenoides.....	5
1.2. Síntesis de IPP.....	6
1.2.1. Vía del Mevalonato.....	6
1.2.2. Vía del Metileritritol fosfato (MEP).....	8
1.3. Compartimentalización subcelular de las vías de síntesis de isoprenoides.....	9
1.4. Etapas posteriores a la síntesis de IPP.....	11
1.4.1. Enzimas preniltransferasas.....	12
1.4.2. Enzimas terpeno sintasas.....	14
2. Biosíntesis de Esteroles.....	15
3. Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.....	17
3.1. Regulación de la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía del MVA: Papel regulador de la HMGR.....	18
4. Farnesildifosfato sintasa: otra enzima clave de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.....	20
4.1. FPS en plantas.....	21
4.2. Expresión temporal y espacial de los genes <i>AtFPS1</i> y <i>AtFPS2</i>	23
4.3. Localización subcelular de las enzimas FPS.....	23
4.4. Las FPS y sus funciones en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.....	24
4.5. Mutantes de <i>A. thaliana</i> con pérdida de función de los genes <i>AtFPS1</i> y <i>AtFPS2</i>	26
5. Compuestos volátiles vegetales de naturaleza isoprenoide.....	27
5.1. Biosíntesis de isoprenoides volátiles.....	28
5.2. Ingeniería metabólica de isoprenoides volátiles.....	30
6. La Linalool/Nerolidol sintasa de <i>Fragaria ananassa</i> (FaNES1).....	33
OBJETIVOS	39
CAPITULO I Estudio del silenciamiento de los genes farnesildifosfato sintasa en Arabidopsis.....	41
RESULTADOS I Silenciamiento inducible de la expresión de los genes <i>AtFPS</i> mediante amiRNA.....	45
1. Estudio de los efectos causados por el silenciamiento inducible de los genes <i>AtFPS</i>	48
2. Caracterización molecular de las líneas A y B.....	52
3. Efecto del silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> sobre los niveles de esteroides.....	54
4. Efecto del silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> sobre la actividad HMGR.....	56
5. El silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> altera la estructura de los cloroplastos.....	59
6. Efecto del silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> sobre la expresión génica global.....	62

6.1. Extracción, cuantificación y control de calidad del RNA.....	62
6.2. Secuenciación masiva mediante la tecnología de RNA-seq.....	64
6.3. Selección y Expresión diferencial (DE) de los genes.	65
6.4. Análisis de significación biológica. Enriquecimiento funcional de genes expresados diferencialmente.....	66
6.5. Validación mediante RT-PCR de los resultados obtenidos a partir del estudio transcriptómico (RNA-seq).....	70
DISCUSION I	75
1. El silenciamiento inducible de los genes <i>AtFPS</i> provoca una alteración del fenotipo y una reducción importante de los niveles de expresión de mRNA, proteína y actividad FPS	80
2. El bloqueo de la síntesis de FPP provoca un aumento de la actividad HMGR a través de un mecanismo post-traduccional	87
3. El silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> provoca una reducción significativa en los niveles de los esteroides mayoritarios.....	89
4. El silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i> provoca una importante reducción en los niveles de isoprenoides plastídicos como clorofilas y carotenoides y afecta al desarrollo de los cloroplastos	92
5. El análisis transcriptómico mediante RNA-seq revela un grupo importante de genes desregulados como consecuencia del silenciamiento de los genes <i>AtFPS</i>	96
CONCLUSIONES I	109
CAPITULO II Ingeniería Metabólica para la producción de sesquiterpenos en Arabidopsis	111
RESULTADOS II Ingeniería metabólica para la producción de sesquiterpenos en el citosol-RE	115
1. Versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE para la redirección del FPP citosólico hacia la síntesis de sesquiterpenos	115
1.1. Localización subcelular de las versiones quiméricas, dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA- FaNES1dmSQS1 y FaNES1-3HA fusionadas a la GFP en hojas de <i>N. benthamiana</i>	117
1.2. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> para sobreexpresan las versiones de la enzima FaNES1 en el RE y en el citosol.....	120
1.3. Caracterización molecular de líneas transgénicas sobreexpresoras de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE y citosólica	122
1.4. Expresión transitoria de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas RE y citosólica en hojas de <i>N. benthamiana</i>	125

2. Enzimas bifuncionales FPS1S/FaNES1 para la redirección del FPP citosólico hacia la síntesis de sesquiterpenos	130
2.1. Expresión transitoria de las fusiones quiméricas FaNES1-FPS1S y FPSIS-FaNES1 en hojas de <i>N. benthamiana</i>	131
2.2. Determinación de los niveles de mRNA de las distintas versiones de FaNES1 expresadas en hojas de <i>N. benthamiana</i>	132
3. Determinación de los niveles de nerolidol en hojas de <i>N. benthamiana</i> que expresan las distintas versiones de FaNES1.....	134
3.1. Optimización de las condiciones de retención de nerolidol en la fibra de SPME.....	134
3.1.1. Determinación del umbral de captación y detección de nerolidol en el sistema HS-SPME.	135
3.1.2. Determinación de la temperatura óptima de captación de nerolidol por la fibra SPME	137
3.1.3. Determinación del tiempo óptimo de captación de nerolidol por la fibra SPME.	138
3.1.4. Determinación de la cantidad óptima de tejido vegetal para la determinación de nerolidol	139
3.2. Recta patrón de nerolidol para la cuantificación del nerolidol.....	140
3.3. Determinación de nerolidol mediante HS-SPME-GC-MS en hojas de <i>N. benthamiana</i> que expresan las diferentes versiones de FaNES1.....	142
DISCUSION II La sobreexpresión de distintas versiones de FaNES1 produce nerolidol en el citosol.....	149
1. Localización subcelular de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE en hojas de <i>N. benthamiana</i>	150
2. Expresión estable de FaNES1 soluble y ancladas al RE en <i>A. thaliana</i>	151
3. Expresión transitoria de FaNES1 soluble y ancladas al RE en <i>N. benthamiana</i>	153
3.1. Enzimas bifuncionales de FaNES1/FPS1S.....	155
4. Producción de nerolidol en hojas de <i>N. benthamiana</i> que expresan distintas versiones de FaNES1	157
CONCLUSIONES II	165
MATERIALES Y METODOS	169
1. Materiales	169
1.1. Material vegetal.....	169
1.1.1. Condiciones de cultivo del invernadero y cámaras visitables.....	169
1.1.2. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	170

1.2. Material bacteriológico.....	171
1.2.1. Cepas bacterianas	171
1.2.2. Medios de cultivo	171
2. Vectores plasmídicos.....	172
2.1. Vectores para subclonaje	172
2.2. Vectores para la expresión estable de proteínas en plantas de <i>A. thaliana</i>	172
2.2.1. Generación del sistema de silenciamiento inducible de los genes <i>AtFPS</i> mediante amiRNAs.....	173
2.2.2. Modificación del vector pCAMBIA2300 para generar construcciones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE	176
2.2.3. Construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA para la generación de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	178
2.2.3.1. Obtención de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA.....	178
2.2.3.2. Obtención de la construcción quimérica 3HA-FaNES1-dmSQS1.....	179
2.2.3.3. Obtención de la construcción quimérica FaNES1-3HA	180
2.3. Vectores y construcciones utilizadas para la expresión transitoria <i>N. benthamiana</i>	181
2.3.1. Vectores y construcciones utilizadas en la localización subcelular de las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA fusionadas GFP	181
2.3.1.1. Generación de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP	182
2.3.1.2. Generación de la construcción quimérica GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1	183
2.3.1.3. Generación de la construcción quimérica FaNES1-3HA-GFP	184
2.3.2. Obtención de fusiones de las enzimas FaNES1 y FPS1S para la síntesis de nerolidol a partir de IPP y DMAPP en hojas de <i>N. benthamiana</i>	184
3. Métodos	188
3.1. Técnicas aplicadas en plantas	188
3.1.1. Esterilización de semillas.....	188
3.1.2. Siembra de semillas	188
3.1.3. Cultivo de plantas en tierra.....	189
3.1.4. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	190
3.1.5. Selección de plantas transgénicas.....	191
3.1.6. Selección de líneas homocigóticas para el transgén	192
3.1.7. Expresión transitoria en hojas de <i>N. benthamiana</i>	193
3.2. Técnicas aplicadas en bacterias	194
3.2.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> EHA105.....	194
3.2.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> GV3102.....	195
3.2.3. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> EHA105.....	195
3.2.4. Genotipado de la cepa <i>A. tumefaciens</i> transformada.....	196

3.2.5. Preparación de <i>A. tumefaciens</i> transformado para agroinfiltrar <i>A.thaliana</i>	197
3.2.6. Preparación de <i>A. tumefaciens</i> para la infiltración en <i>N. benthamiana</i>	197
3.3. Técnicas con RNA.....	198
3.3.1. Extracción de RNA de <i>A.thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	198
3.3.2. Cuantificación de las muestras de RNA.....	199
3.3.3. Tratamiento para eliminar la posible presencia de DNA genómico	199
3.3.4. Síntesis de cDNA a partir de RNA total mediante reacción de retrotranscripción	200
3.3.5. Amplificación de cDNA mediante RT-PCR.....	200
3.3.6. PCR en tiempo real (qPCR).....	203
3.4. Técnicas con proteínas	206
3.4.1. Obtención de extractos proteicos de <i>A. thaliana</i>	206
3.4.2. Obtención de extractos proteicos de hojas de <i>N. benthamiana</i>	208
3.4.3. Determinación de la concentración de proteína	208
3.4.4. Western blot	209
3.4.4.1. Electroforesis de poliacrilamida-SDS (PAGE)	210
3.4.4.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF	210
3.4.4.3. Hibridación con el anticuerpo.....	211
3.4.4.4. Inmunodetección quimioluminiscente	212
3.4.4.5. Tinción de las proteínas de la membrana de PVDF.....	212
3.4.4.6. Cuantificación de los niveles de proteínas desde el <i>Western blot</i>	214
4. Análisis de compuestos de naturaleza isoprenoide	214
4.1. Extracción y análisis de esteroides	214
4.2. Análisis de carotenoides y clorofilas en plantas de <i>Arabidopsis</i>	216
4.3. Captación, análisis y cuantificación de la emisión de nerolidol en hojas de <i>N benthamiana</i>	217
4.3.1. Curvas patrón de nerolidol y geraniol captados mediante HS-SPME	218
4.3.2. Captación nerolidol desde hojas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con las versiones quiméricas de FaNES1 mediante HS-SPME.....	220
4.3.3. Separación cromatográfica mediante GC-MS y cuantificación de los compuestos volátiles retenidos mediante HS-SPME	221
5. Ensayos de actividad enzimática	222
5.1. Determinación de la actividad HMGR.....	223
5.1.1. Reacción enzimática.....	223
5.1.2. Cromatografía en capa fina.....	224
5.1.3. Cuantificación de la mevanolactona marcada con [14C].....	225
5.1.4. Cálculo de la actividad específica.....	226
5.2. Determinación de la actividad FPS	226
5.2.1. Reacción enzimática.....	227
5.2.2. Cálculo de la actividad específica.....	228

6. Microscopía e imagen	228
6.1. Microscopía óptica	228
6.2. Microscopía Láser confocal	229
6.3. Microscopía electrónica.....	229
6.4. Fotografía e imagen.....	230
7. Análisis transcriptómico RNA-seq	230
7.1. Condiciones de crecimiento de las plántulas y recolección de muestras.....	231
7.2. Extracción y cuantificación del RNA.....	232
7.3. Cuantificación y control de calidad del RNA.....	232
7.4. Secuenciación masiva mediante plataforma <i>Illumina</i>	233
7.5. Análisis bioinformático	234
7.5.1. Control de calidad	234
7.5.2. Pre-procesado de los datos.....	235
7.5.3. Mapeo de las secuencias.....	235
7.5.4. Expresión diferencial (DE) y análisis de significancia biológica	235
BIBLIOGRAFÍA	239
PUBLICACIONES	273
ANEXO	295

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Esquema de las vías del MVA y del MEP de síntesis de IPP y DMAPP.

Figura 2. Compartimentación subcelular de la síntesis de isoprenoides en plantas.

Figura 3. Esquema representativo de la síntesis de prenildifosfatos y sus productos finales.

Figura 4. Esquema representativo de la biosíntesis de esteroides en plantas.

Figura 5. Esquema de la topología de la enzima HMGR.

Figura 6. Esquema de la reacción catalizada por la enzima FPS.

Figura 7. Estructura de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* de *A. thaliana*.

Figura 8. Patrones de expresión de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* en plantas de *A. thaliana* transformadas con los genes quiméricos FPS1S:GUS y FPS2:GUS

Figura 9. Síntesis de isoprenoides volátiles a partir de precursores producidos a través de las vías del MVA y del MEP

Figura 10. Metabolismo del S-linalol y 3S-(E)-nerolidol en plantas transgénicas.

Resultados

Capítulo I

Figura 11. Diagrama esquemático de sistema inducible utilizado para silenciar la expresión de los genes *AtFPS* mediado por amiRNA.

Figura 12. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* mediado por amiRFPSa y amiRFPSb sobre el fenotipo.

Figura 13. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre la longitud de las raíces.

Figura 14. Efecto de las condiciones de tratamiento con metoxifenocida sobre el fenotipo causado por el silenciamiento de los genes *AtFPS*.

Figura 15. Análisis de los niveles de mRNA *AtFPS1* y *AtFPS2*, y de proteína FPS.

Figura 16. Análisis de los niveles de esteroides.

Figura 17. Análisis de los niveles de actividad HMGR.

Figura 18. Análisis de los niveles de proteína HMGR.

Figura 19. Análisis de los niveles de mRNA de los genes *AtHMG*.

Figura 20. Análisis de los cloroplastos en hojas de plántulas de las líneas A, B y EV

Figura 21. Análisis de la ultraestructura de los cloroplastos en hojas de plántulas de las líneas A y EV

Figura 22. Análisis de los niveles de clorofilas y carotenoides.

Figura 23. Análisis de la integridad del RNA de plántulas de la línea A en MS y MFZ.

Figura 24. Diagrama de sectores con los términos GO de procesos biológicos (BP) enriquecidos.

Figura 25. Diagrama de sectores con los términos GO de funciones moleculares (MF) enriquecidos.

Figura 26. Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-PCR de genes candidatos diferencialmente expresados.

Capítulo II

Figura 27. Topología de las fusiones quiméricas 3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA en la membrana del RE.

Figura 28. Esquema de la región del T-DNA del vector pCAMBIA2300MUT que incluye las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, y FaNES1-3HA.

Figura 29. Esquema de la región del T-DNA de los vectores utilizados para la localización subcelular de las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1,-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA en *N. benthamiana*

Figura 30. Localización subcelular de las construcciones quiméricas de FaNES1 expresadas *N. benthamiana*

Figura 31. Región del T-DNA del vector pCAMBIA2300MUTPA que incluye las construcciones para expresar las proteínas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA.

Figura 32. Determinación de los niveles de mRNA dmHMGR1S-FaNES1-3HA mediante RT-PCR.

Figura 33. Determinación de los niveles de mRNA 3HA-FaNES1-dmSQS1 mediante RT-PCR

Figura 34. Determinación de los niveles de mRNA FaNES1-3HA mediante RT-PCR.

Figura 35. Análisis de los niveles de proteína de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE y citosólica mediante *Western blot*.

Figura 36. Cinética de expresión de las diferentes versiones quiméricas de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*.

Figura 37. Cinética de expresión de las diferentes versiones quiméricas de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*.

Figura 38. Cuantificación de los niveles de proteína dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA-GFP en hojas de *N. benthamiana*.

Figura 39. Esquema de las enzimas bifuncionales FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1.

Figura 40. Análisis de la expresión de fusiones quiméricas FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*.

Figura 41. Determinación de los niveles de mRNA de las distintas versiones de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*.

Figura 42. Retención de nerolidol en el sistema HS-SPME.

Figura 43. Cromatograma y espectro de masas del patrón de trans-nerolidol comercial.

Figura 44. Efecto de la temperatura de incubación sobre la captación de nerolidol por el sistema HS-SPME.

Figura 45. Efecto del tiempo de incubación sobre la captación de nerolidol por el sistema HS-SPME.

Figura 46. Optimización de la cantidad de muestra de hojas de *N. benthamiana* requerida para la cuantificación de nerolidol

Figura 47. Recta patrón de nerolidol.

Figura 48. Recta patrón de geraniol.

Figura 49. Cromatogramas de los patrones comerciales de trans-nerolidol y geraniol.

Figura 50. Emisión de nerolidol en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan versiones de FaNES1 citosólicas y ancladas al RE.

Figura 51. Emisión de nerolidol en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan versiones de FaNES1 fusionada a la FPS.

Figura 52. Tasa de emisión de nerolidol de muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan distintas versiones de FaNES1.

Figura 53. Tasa de emisión de nerolidol normalizada respecto a la cantidad de proteína en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan las distintas versiones de FaNES1.

Materiales y métodos

Figura 54. Estrategia de clonaje de amiRNA en un pre-miRNA

Figura 55. Esquema del plásmido pB110-Red-2844 con el promotor inducible basado en el receptor de ecdisona.

Figura 56. Modificación del sitio de clonaje múltiple.

Figura 57. Esquema del vector pCAMBIA2300MUTPA.

Figura 58. Esquema de los plásmidos pMDC.

Figura 59. Esquema del diseño experimental usado para inducir el silenciamiento de los genes *AtFPS*

Figura 60. Sistema de micro-extracción en fase sólida (SPME) para la captación de volátiles.

Figura 61. Representación esquemática del proceso de captación de volátiles.

Figura 62. Representación esquemática de las divisiones realizadas sobre una placa de silicagel 60

Figura 63. Representación esquemática del proceso de RNA-seq.

Índice de Tablas**Introducción**

Tabla 1. Clasificación y funciones de los isoprenoides según el número de carbonos

Resultados

Tabla 2. Secuencia de los amiRNAs utilizados para silenciar simultáneamente los genes *AtFPS1* y *AtFPS2*

Tabla 3. Selección de genes asociados a procesos biológicos (BP).

Tabla 4. Selección de genes asociados a funciones moleculares (MF).

Materiales y métodos

Tabla 5. Composición del medio MS 1 con vitaminas y concentraciones de antibióticos e inductores utilizados en plantas.

Tabla 6. Medios y antibióticos utilizados para cultivo de bacterias.

Tabla 7. Listado de *primers* utilizados para la generación de amiRNAs.

Tabla 8. Reacción PCR para la generación de amiRNAs.

Tabla 9. Reacción PCR para genotipado de *A. tumefaciens*.

Tabla 10. Mezclas para síntesis de cDNA.

Tabla 11. Reacción RT-PCR

Tabla 12. Reacción q-PCR

Tabla 13. Tampones de homogenización para la extracción de proteína desde plántulas de *A. thaliana*

Tabla 14. Tampón de homogenización desnaturizante (DB) para la extracción de proteína desde hojas de *N. benthamiana*.

Tabla 15. Tampón desnaturizante de proteínas 2x

Tabla 16. Soluciones *Western Blot*.

Tabla 17. Componentes de la mezcla reacción para medir actividad HMGR.

Tabla 18. Componentes de la mezcla reacción para medir actividad FPS.

Tabla 19. Concentraciones de RNA.

Abreviaturas

35S CaMV	promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor
AACT	enzima acetoacetil-CoA tiolasa
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ABA	ácido abscísico
AE	actividad específica
amiRNA	artificial micro RNA
AMPK	AMP quinasa
Bisacrilamida	N,N'-metilen-bisacrilamida.
BrEt	bromuro de etidio
BRs	brasinosteroides
BSA	albúmina sérica bovina
BY-2	Bright Yellow - 2 (células en cultivo de plantas de tabaco)
C/COOH-terminal	extremo carboxiterminal
C-14 reductasa	enzima esterol C-14 reductasa
CCF	cromatografía de capa fina
cDNA	DNA complementario
CDP-ME	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato
Ci, μCi	curies, microcuries
CMK	enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinasa
CMP	enzima citidina-5'-monofosfato
CMS	enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
Col0	ecotipo columbia 0 de Arabidopsis thaliana
Col3	ecotipo columbia 3 de Arabidopsis thaliana
Cpm	cuentas por minuto
CTP	enzima citidina-5'-trifosfato
Da	dalton
DC	fotoperiodo de día continuo
DEPC	dietilpirocarbonato
DHS	dihidroesfingosina
DMAPP	dimetilalilpirofosfato
DMNT	4,8-Dimetilnonnatrieno
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos.
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitrol
DXP	enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
DXR	enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
DXS	enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
DsRed	proteína fluorescente roja de dicosoma
E.coli	Escherichia coli
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
E64	Inhibidor de proteasa
EST	expressed sequence tag.
FaNES1	Linalol/Nerolidol sintasa 1

FE	hierro
Fpm	fenpropimorf
FPP	farnesil difosfato
FPS	enzima farnesildifosfato sintasa
GAP	gliceraldehido 3-fosfato
GC-MS	espectrometría de gases masas
GE	glucósidos de esteroides
GFP	green fluorescent protein
GFPS	enzima geranilfarnesil pirofosfato sintasa
GGPP	enzima geranilgeranildifosfato
GGPS	enzima geranilgeranildifosfato sintasa
GPP	geranildifosfato
GPS	enzima geranildifosfato sintasa
GO	gene ontology
GUS	β -Glucuronidasa
HA	hemaglutinina
HDS	enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintasa
HDR	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil 4-fosfato
HE	head space
HIVP	herbivore induced plant volatiles
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato
HMG	gen que codifica para HMGR
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
HMGR	enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HMGS	enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
HPT	higromicina B fosfotransferasa
HRK	HMGR related kinase
IDI	enzima IPP isomerasa
IDS	enzima IPP/DMAPP sintasa
IPI	enzima isopentenil pirofosfato isomerasa
IPP	isopentil difosfato
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
JA	jasmonico
JAS	Jasmonatos
kDa	kilo daltons
km	kanamicina
LD	long day, día largo, fotoperiodo con 16h de luz/8h de oscuridad
Ler	landsberg erecta
MCP	muerte celular programada
MCS	enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa
ME-cPP	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MFZ	metoxifenocida
min	minutos
MP	membrana plasmática
MRD	membranas resistentes a detergentes

mRNA	RNA mensajero
MVA	mevalonato
MVD	enzima difosfomevalonato decarboxilasa
MVK	enzima mevalonato quinasa
Myr	miriocina
N/NH₂-terminal	extremo aminoterminal.
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida).
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma reducida)
pb,kb	pares de bases, kilobases
PBS	tampón de fosfato sódico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PLC	fosfolipasa C
PMK	enzima fosfomevalonato quinasa
PP2A	protein phosphatase 2A
PSA	persulfato amónico
PVDF	difluoruro de polivinilideno
qRTPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
S1P	esfingosina 1-fosfato
sd	desviación estándar
SD	short day, día corto, fotoperiodo de 8h de luz/16h de oscuridad
SDS	dodecilsulfato amónico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
SH	enzima esfinganina hidroxilasa
SMT	SAM-esterol-C24-metiltransferasas
SnRKs	SNF1-related quinasa
SPK	enzima esfingosina quinasa
SPS	solanesil pirofosfato sintasa
SPT	enzima serina-palmitoil transferasa
Sq	escualestatina
SQE	enzima escualeno epoxidasa
SQS	enzima escualeno sintasa
SREBP's	sterol regulatory element binding proteins
SSC	sal de citrato sódica
Sb	escualetatina
Tb	terbinafina
TE	tampón Tris-EDTA.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TLC	cromatografía en capa fina
TMTT	(E,E)4,8,11-Trimetiltetradecaeno
TPS	terpeno sintasa
Tris-HCl	tris (hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico
SPME	microextracción en fase sólida

UPPS	undecanil pirofosfato sintasa
UTR	región transcrita no traducida
UV	ultravioleta.
wt	wild type
x g	unidades de fuerza centrífuga relativa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1. Isoprenoides.

Los isoprenoides o terpenos, constituyen una de las familias más grandes y diversas de metabolitos de las plantas. Hasta ahora se han identificado más de 55.000 isoprenoides (Thulasiram et al., 2007) que participan en diversos procesos biológicos vitales tales como; el crecimiento, el desarrollo (Croteau et al., 2000), y las interacciones de las plantas con su entorno (Pichersky et al., 2006; Gershenzon and Dudareva, 2007).

Las plantas sintetizan la gran mayoría de los isoprenoides conocidos, que desde un punto de vista funcional, pueden dividirse en metabolitos primarios y secundarios (Tabla 1) (Chappell, 1995a, 1995b). Los metabolitos primarios participan en procesos celulares esenciales para las plantas, como la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas, plastoquinonas), la respiración (ubiquinonas), la fluidez de la membrana (esteroles) y la regulación del crecimiento y del desarrollo (citoquininas, esteroles, brasinoesteroides, giberelinas, ácido abscísico) (Croteau et al., 2000; Tholl and Lee, 2011; Vranová et al., 2012), mientras que los metabolitos secundarios, que no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo (Croteau et al., 2000), participan activamente en las interacciones de las planta con su entorno (Vranová et al., 2012). Un ejemplo de ello son los terpenos que pueden actuar como fitoalexinas en la defensa de las plantas contra patógenos (Hasegawa et al., 2010), o como defensas directas contra los herbívoros (Keeling and Bohlmann, 2006; Heiling et al., 2010). Estos metabolitos secundarios, también llamados compuestos especializados, actúan como aleloquímicos que participan en la competencia entre diferentes especies de plantas (Weir et al., 2004; Tharayil, 2009), proporcionan protección frente al estrés oxidativo y térmico (Gershenzon and Dudareva, 2007), y atraen a agentes polinizadores y animales dispersores de semillas (Vranová et al., 2013). Isoprenoides volátiles como los monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) volátiles son constituyentes principales de olores florales que permiten atraer a los polinizadores (Pichersky and Gershenzon, 2002). Estos mismos compuestos a menudo se emiten a partir de tejidos vegetativos en respuesta al ataque de un herbívoro y cumplen una función de defensa indirecta

mediante la atracción de depredadores naturales de los herbívoros (Dicke et al., 2003; Turlings and Ton, 2006; Unsicker et al., 2009). Además, los terpenos volátiles liberados por las plantas dañadas pueden inducir respuestas de defensa en las plantas vecinas (Arimura et al., 2000).

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

Tabla 1. Clasificación y funciones de los isoprenoides según el número de carbonos que forman parte de su estructura. (Adaptado de Chappell et al., 1995a)

Por otro lado, y además de sus beneficios ecológicos, muchos isoprenoides tienen un especial interés económico y son ampliamente utilizados en la industria cosmética, agrícola y farmacéutica (Rodríguez-Concepción, 2004; Chang and Keasling, 2006). A nivel farmacológico algunos isoprenoides son utilizados en tratamientos contra el cáncer y la malaria, como el taxol (Rowinsky, 1994) y la artemisinina (Firestone and Sundar, 2009), respectivamente, o constituyen en sí mismos compuestos nutracéuticos como los fitoesteroles (Gupta et al., 2011). Algunos incluso se encuentran en fase de prueba como posibles tratamientos en enfermedades como el *HIV* (Sabde et al., 2011). Los isoprenoides también son utilizados para la producción de caucho, desinfectantes, productos agroquímicos y como posibles precursores en la producción de biocombustibles (Bohlmann y Keeling, 2008). Actualmente también son ampliamente estudiados dado que la ruta de la biosíntesis de isoprenoides es una diana molecular ideal para numerosos herbicidas ya en uso (Wakabayashi and Boger, 2004).

1.1. Biosíntesis de isoprenoides

A pesar de la enorme diversidad estructural y funcional de estos compuestos, todos derivan de un mismo precursor común de cinco átomos de carbono, denominado isopentenildifosfato (2-metil-1,3-butadienofosfato; IPP, C₅) (McGarvey and Croteau, 1995) y su isómero dimetilalildifosfato (DMAPP).

El proceso de síntesis de los isoprenoides, puede dividirse en tres etapas. La primera consiste en la biosíntesis del IPP y su isómero DMAPP. La segunda contempla la producción de prenildifosfatos lineales, como el geranildifosfato (GPP), el farnesildifosfato (FPP) y el geranilgeranildifosfato (GGPP), a partir de los cuales la vía metabólica se ramifica para dar lugar a los diferentes isoprenoides finales que incluyen mono, sesqui, di, tri, tetra y politerpenos (Tabla 1). La tercera etapa comprende todas aquellas reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos de los productos anteriores, como metilaciones, desmetilaciones, ciclaciones, isomerizaciones, hidroxilaciones, oxidaciones y reducciones necesarias para la obtención de los productos finales (Chappell, 1995b).

1.2. Síntesis de IPP en plantas

Las plantas sintetizan IPP y DMAPP a través de dos vías metabólicas: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Lichtenthaler et al., 1997; Laule et al., 2003; Rodríguez-Concepción, 2004). La vía del MVA fue la primera en ser descubierta (en los años cincuenta) y es la mejor estudiada, razón por lo cual también suele llamarse vía clásica. Por otro lado, en la década de los 90 se descubrió la existencia de otra vía distinta de la clásica, la vía del metileritritolfosfato (MEP) o vía de Rohmer, en referencia a su descubridor (Rohmer et al., 1993), también llamada vía alternativa, aunque prevalece el nombre químico del primer compuesto específico de la misma.

1.2.1. Vía del Mevalonato (MVA)

La vía del MVA (Figura 1) opera en el citosol-peroxisomas-retículo endoplasmático (RE) y produce IPP y DMAPP para la biosíntesis de terpenoides citosólicos y mitocondriales tales como sesquiterpenos, esteroides, brasinoesteroides, triterpenos, poliprenoles, dolicoles, grupos farnesilo de proteínas preniladas, y las cadenas laterales de las ubiquinonas y el grupo hemo A de los citocromos (Newman and Chappell, 1999; Tholl and Lee, 2011; Vranová et al., 2012). La primera reacción de esta vía está catalizada por la acetoacetil-CoA tiolasa (AACT ; EC 2.3.1.9) que condensa dos moléculas de acetil-CoA para obtener acetoacetil-CoA en una reacción reversible (Miziorko, 2011). A continuación, el acetoacetil-CoA se convierte en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por acción de la HMG-CoA sintasa (HMGS; EC 2.3.3.10). Seguidamente, el HMG-CoA es reducido por la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR; EC 1.1.1.34), produciendo mevalonato (primer intermediario específico de esta vía). La enzima mevalonato kinasa (MK; EC 2.7.1.36) es la responsable de fosforilar el MVA obteniéndose así, mevalonato-5-fosfato. Este es nuevamente fosforilado por la enzima mevalonato-5-fosfato kinasa (PMK; EC 2.7.4.2), que lo convierte en mevalonato-5-difosfato. A continuación, este compuesto es descarboxilado por acción de la mevalonato-5-difosfato descarboxilasa (MVD; EC 4.1.1.33), dando lugar al IPP (Miziorko, 2011).

El IPP, no es lo suficientemente reactivo por sí mismo para llevar a cabo las reacciones de condensación que permiten formar isoprenoides de longitud mayor, por lo tanto, una parte de este debe ser previamente convertido en su isómero DMAPP mediante una reacción reversible catalizada por la isopentenil difosfato isomerasa (IDI; EC 5.3.3.2) (McGarvey and Croteau, 1995).

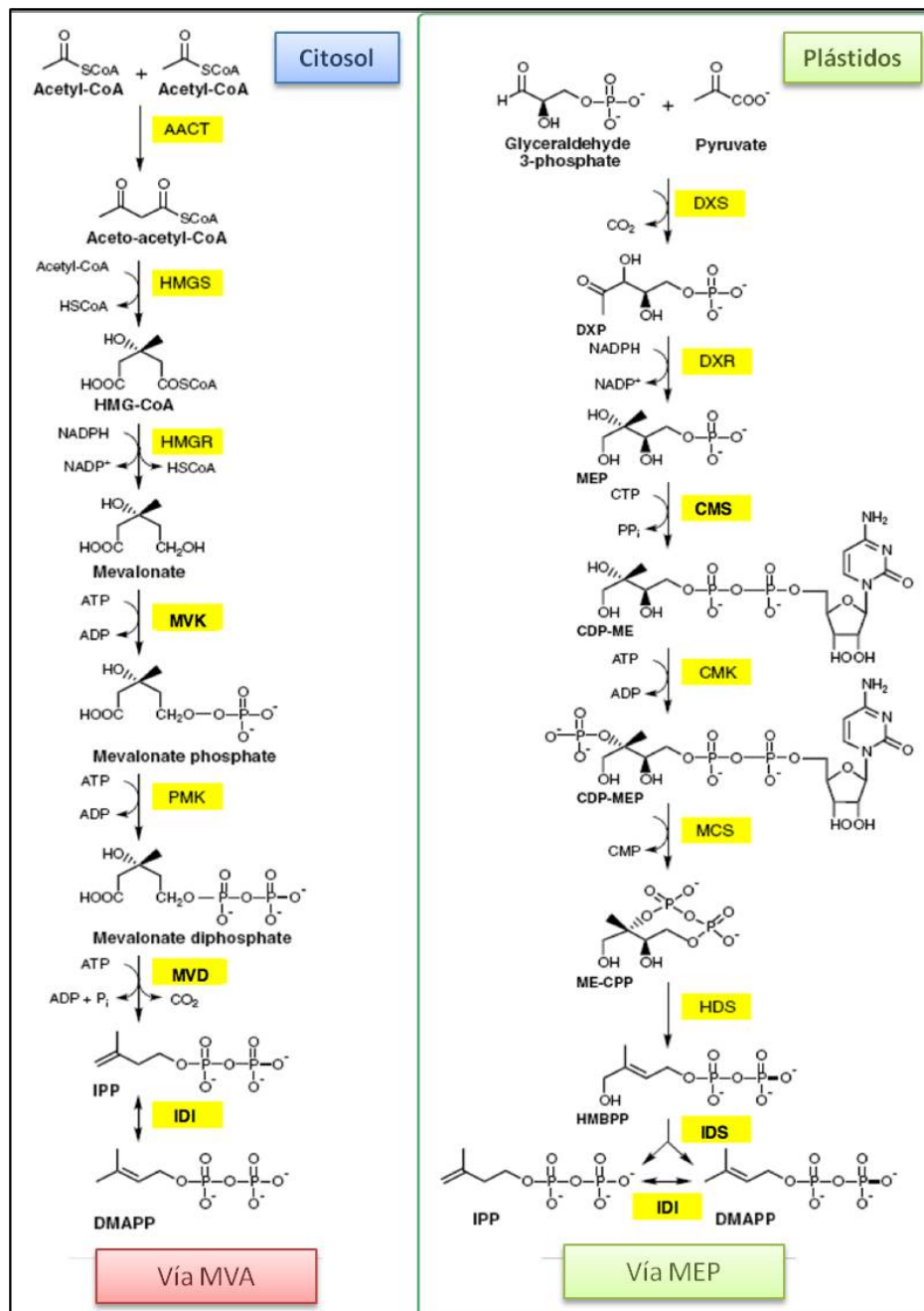


Figura 1. Esquema de las vías del MVA y del MEP de síntesis de IPP y DMAPP: Vía MVA: AACT, acetoacetyl-CoA tiolasa; HMG-CoA, 3 hidroxil-3-metilglutaril-CoA; HMGs, HMG-CoA sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa; MVK, mevalonato quinasa; PMK, fosfomevalonato quinasa; MVD, difosfomevalonato descarboxilasa; IDI, IPP isomerasa; DMAPP, dimetilalilpifosfato. Vía MEP: DXS, 1-

desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; **DXP**, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; **DXR**, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; **MEP**, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato; **CDP-ME**, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol; **CMS**, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa; **CMK**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinasa; **CDP-MEP**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat; **ME-cPP**, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato; **MCS**, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa; **HMBPP**, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato; **HDS**, 1-hidroxi-2- metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintasa; **HDR**; 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato reductasa; **IDI**, IPP/DMAPP sintasa (Imagen adaptada de Bouvier et al., 2005).

1.2.2. Via del Metileritritol fosfato (MEP)

La vía del MEP, que se encuentra en su totalidad en los plástidos (Tholl and Lee, 2011), proporciona los precursores necesarios para la biosíntesis de carotenoides, clorofilas, plastoquinonas, filoquinonas, tocoferoles, giberelinas, mono y diterpenos con funciones especializadas y grupos geranilgeranilo de proteínas preniladas (Lichtenthaler, 1999; Phillips et al., 2008b; Pulido et al., 2012).

La reacción inicial de la vía del MEP (Figura 1) consiste en la condensación de una molécula de piruvato con el grupo aldehído de una molécula de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) para producir 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). Esta reacción está catalizada por la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS; EC 2.2.1.7). Seguidamente, se produce un reordenamiento intramolecular y una reducción del DXP que da lugar a 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). En este paso interviene la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR; EC 1.1.1.267) (Schwender et al., 1999; Carretero-Paulet et al., 2002) 2002). Posteriormente, el MEP es conjugado con citidinatrifosfato (CTP), paso catalizado por la MEP-citidil-transferasa (MCT; EC 2.7.7.60;) para obtener 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) (Rohdich et al., 1999, 2000a). Este es fosforilado por la acción de la 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol kinasa (CMK; EC 2.7.1.148;) (Lange and Croteau, 1999; Lüttgen et al., 2000; Rohdich et al., 2000b), que da lugar al compuesto 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol-2 fosfato (CDP-MEP), el cual, es convertido en 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-CPP) a través de la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS; EC 4.6.1.12). Finalmente, el producto anterior es reducido por acción de la 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato sintasa (HDS ; EC 1.17.7.1) a 4-hidroxi-3-metil-buten-2-il difosfato (HMBPP). A partir del HMBPP se sintetizan los productos

principales de la vía: IPP y DMAPP, en proporción 5 o 6:1 (Rohdich et al., 2002, 2003; Tritsch et al., 2010) por acción de la HMBPP reductasa (HDR; EC 1.17.1.2) (Phillips et al., 2008b). Cabe destacar que este paso marca una diferencia con la vía del MVA, debido a que esta última no es capaz de sintetizar simultáneamente IPP y DMAPP, como ocurre en la vía del MEP. No obstante, se ha observado la presencia de una IDI en los plástidos, por lo cual es posible que el IPP también sea convertido en DMAPP y viceversa mediante la acción de esta enzima. Sin embargo, hay evidencias que indican que la IDI de los cloroplastos no es esencial para el funcionamiento de la vía (Phillips et al., 2008a).

1.3. Compartimentalización subcelular de las vías de síntesis de isoprenoides.

Basándose en datos obtenidos *in vivo* e *in silico*, se ha determinado que la síntesis de isoprenoides se encuentra compartimentalizada entre el citosol, el retículo endoplásmico, los plástidos, y las mitocondrias (Figura 2). Además, se ha demostrado que algunas enzimas de la ruta, pueden residir en otros lugares tales como el peroxisoma, la vacuola, la membrana plasmática, pequeñas vesículas del RE, el espacio extracelular o el núcleo (Leivar et al., 2005; Sapir-Mir et al., 2008; Vranová et al., 2012) (www.atipd.ethz.ch). En el citosol-peroxisomas-RE se localiza la vía del MVA que proporciona los precursores para la biosíntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales (Newman and Chappell, 1999; Vranová et al., 2012), mientras que en los plástidos, se encuentra la vía del MEP (Figura 2) (Lichtenthaler, 1999).

El hecho de que las vías del MVA y la del MEP se encuentren en compartimentos separados, no implica que operen de forma absolutamente independiente, sino que al parecer existe un cierto, aunque limitado, intercambio de IPP o de algún prenildifosfato entre ambas vías (Laule et al., 2003; Rodríguez-Concepción et al., 2004). Por ejemplo, experimentos de suplementación utilizando con DX marcado radioactivamente, han demostrado que intermediarios de la ruta de MEP pueden dirigirse, en cierta medida, hacia la biosíntesis de esteroides (Arigoni et al., 1997; Hemmerlin et al., 2003a) y pueden contribuir a la prenilación de proteínas en el citosol (Gerber et al., 2009). Intermediarios derivados de la vía del MVA también pueden contribuir a la formación de isoprenoides plastídicos (Kasahara et al., 2002;

Hemmerlin et al., 2003a). En experimentos con inhibidores y mutantes defectuosos en etapas concretas de las vías MEP o MVA se evaluó el grado de intercambio entre estas dos vías. Por ejemplo, la suplementación con 1-desoxi-D-xilulosa en células de tabaco BY-2 permitiría rescatar parcialmente la inhibición de la vía de MVA causada por la mevinolina, un inhibidor específico de la vía del MVA (Hemmerlin et al., 2003a). La adicción de MVA exógeno podría rescatar parcialmente el fenotipo del mutante *cla1-1* de *A. thaliana*, defectuoso en la primera enzima de la vía del MEP (Nagata et al., 2002). Por otro lado la síntesis de esteroides podría ser rescatada probablemente a través de flujo de la ruta de MEP, después de la inhibición de la vía de MVA con lovastatina en plántulas de *A. thaliana* (Laule et al., 2003).

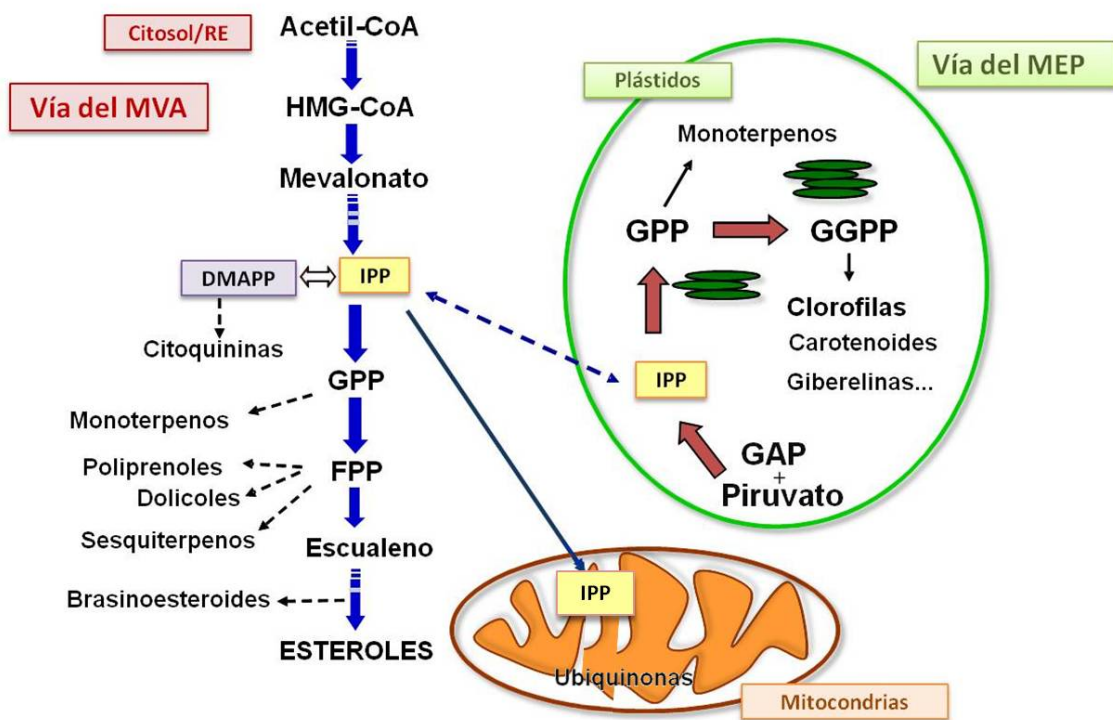


Figura 2. Compartimentación subcelular de la síntesis de isoprenoides en plantas. La vía del MVA se encuentra en el citosol/RE y genera IPP a partir de acetil-CoA para la síntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales. La vía MEP tiene lugar en los plástidos y produce IPP y DMAPP a partir de GA3P y piruvato para la síntesis de los isoprenoides plásticos. (Imagen adaptada de Manzano et al., 2006)

Hasta el momento no ha sido posible establecer el o los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el transporte de los compuestos entre ambas vías, aunque se ha planteado en diferentes especies vegetales la posible existencia de transportadores de prenil difosfatos (Bick and Lange, 2003; Flügge and Gao, 2005; Rodríguez-Concepción, 2010). Sin embargo, la regulación del intercambio entre las vías MEP/MVA parece ser mucho más compleja y dependiente de otros factores aún no dilucidados.

1.4. Etapas posteriores a la síntesis de IPP

Una vez sintetizados el IPP y su isomero el DMAPP, la respectiva condensación secuencial de IPP y DMAPP y los sucesivos intermediarios alílicos dan lugar a la síntesis de geranildifosfato (GPP; C₁₀), farnesildifosfato (FPP; C₁₅) y geranilgeranildifosfato (GGPP; C₂₀) (Wang and Ohnuma, 2000).

Estas reacciones están catalizadas por diferentes preniltransferasas (Figura 3). El IPP producido a través de la vía del MVA es el precursor del FPP citosólico y mitocondrial, que a su vez es el precursor de la síntesis de sesquiterpenos, esteroides, brasinoesteroides, triterpenoides, poliprenoles, cadenas laterales de la ubiquinona, dolicoles y proteínas farnesiladas. En cambio, el IPP derivado de la vía del MEP se emplea para fabricar GPP, precursor de los monoterpenos y GGPP, punto de partida en la síntesis de diterpenos, giberelinas, carotenoides, ácido abscísico, cadenas laterales de la clorofila, filoquinonas, plastoquinonas, tocoferoles y proteínas geranilgeraniladas (Tholl and Lee, 2011).

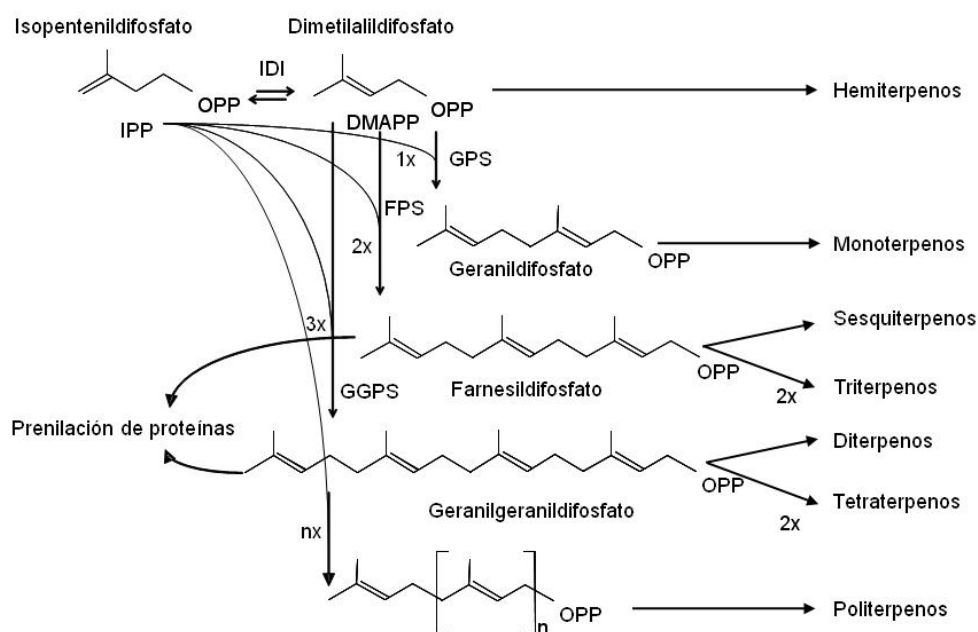


Figura 3. Esquema representativo de la síntesis de prenildifosfatos y sus productos finales. Las reacciones de condensación entre IPP y DMAPP están catalizadas por diferentes preniltransferasas que originan los intermediarios GPP, FPP y GGPP. A partir de estos intermediarios se forman los diferentes grupos de compuestos isoprenoides. **IDI:** IPP/DMAPP isomerasa, **GPS:** geranildifosfato sintasa, **FPS:** farnesildifosfato sintasa, **GGPS:** geranilgeranildifosfato sintasa. (Imagen adaptada de McGarvey y Croteau, 1995).

1.4.1. Enzimas preniltransferasas

Las preniltransferasas, también llamadas prenildifosfato sintasas (IDS, EC 2.5.1.1), son las enzimas responsables de catalizar las reacciones de condensación entre el IPP y los diferentes sustratos alílicos. Esta reacción, se inicia con la eliminación del grupo difosfato de la posición C₁ del sustrato alílico, formando un carbocatión alílico, en un proceso activado por la presencia de un catión divalente como el Mg²⁺. El carbocatión resultante es atacado en el entorno del C₄ por una molécula de IPP formando un nuevo enlace carbono-carbono y un doble enlace. El resultado es una condensación 1'-4 entre el C₁ del sustrato alílico y el C₄ del IPP (Poulter and Rilling, 1976). Las preniltransferasas repiten esta condensación entre el IPP y el sustrato alílico hasta producir un prenildifosfato de longitud y estereoquímica específicas (Chappell, 1995b).

Dependiendo de la estereoquímica de los dobles enlaces en el producto enzimático, las preniltransferasas se clasifican como *trans*-preniltransferasas (*E*) o *cis*-preniltransferasas (*Z*), que forman familias de enzimas estructuralmente relacionadas (Kharel and Koyama, 2003). La mayoría de las preniltransferasas conocidas pertenecen a la familia de las *E*-preniltransferasas y se clasifican en función de la composición de sus subunidades y de la longitud del producto de reacción resultante (Koyama, 1999). Las *E*-preniltransferasas de tipo I o de cadena corta catalizan la síntesis de prenilfosfatos de hasta 25 átomos de carbono. Dentro de este grupo se encuentran las preniltransferasas de la parte troncal de la síntesis de isoprenoides como son la GPS, la FPS y la GGPS. Las *E*-preniltransferasas de tipo II o de cadena mediana catalizan la síntesis de cadenas prenilicas de 30 y 35 átomos de carbono a partir de IPP y GPP, FPP, o GGPP pero no de DMAPP (Hsieh et al., 2011). En este grupo se incluyen enzimas bacterianos como la hexaprenildifosfato sintasa y la heptaprenildifosfato sintasa. Finalmente, las *E*-preniltransferasas de tipo III o de cadena larga catalizan la síntesis de cadenas prenilicas de C40, C45 y C50 a partir de IPP y FPP o GGPP pero no utilizan DMAPP y GPP (Oh et al., 2000; Hirooka et al., 2003; Chen et al., 2005). En este grupo se encuentran enzimas como las octaprenildifosfato sintasa, la solanesildifosfato sintasa y la decaprenildifosfato sintasa.

Las *Z*-preniltransferasas son un grupo menos caracterizado de enzimas que se clasifican en *Z*-preniltransferasas de tipo IV o de cadena larga y *Z*-preniltransferasas de tipo V o de cadena corta. La mayoría de las *Z*-preniltransferasas descritas pertenecen al grupo de las *Z*-preniltransferasas de tipo IV. Son enzimas que sintetizan *E*-*Z*-prenildifosfatos de cadena larga mediante la condensación sucesiva de IPP sobre el sustrato *E*-FPP. En este grupo se encuentran las undecaprenildifosfato sintasas procariontas (Shimizu et al., 1998; Apfel et al., 1999) que sintetizan undecaprenilfosfato (C55), las dehidrodoliquildifosfato sintasas implicadas en la síntesis de dehidrodoliquildifosfato (Sato et al., 1999; Cunillera et al., 2000), y la enzima responsable de la síntesis de caucho en *Hevea brasiliensis*, que es capaz de condensar hasta 1500 moléculas de IPP (Oh et al., 2000). Dentro del grupo de las *Z*-preniltransferasas de tipo V o de cadena corta, se encuentra una *cis*-preniltransferasa de *Micobacterium tuberculosis* que sintetiza *E,Z*-FPP (C15) condensando un IPP en *cis* sobre una molécula de GPP en presencia de Mg^{2+} (Schulbach et al., 2000). Más

recientemente se ha descrito una Z,Z-FPP sintasa capaz de catalizar la síntesis de Z,Z-FPP a partir de IPP y DMAPP en la especie de tomate *Solanum habrochaites* (Sallaud et al., 2009).

1.4.2. Enzimas terpeno sintasas

En pocas ocasiones los productos de las reacciones catalizadas por las preniltransferasas constituyen en sí mismos productos isoprenoides finales. En la mayoría de los casos, los prenildifosfatos son objeto de múltiples modificaciones para producir finalmente isoprenoides concretos. Las enzimas responsables de estas modificaciones y que catalizan la síntesis de isoprenoides como los mono, sesqui y diterpenos se denominan genéricamente terpeno sintasas (TPS) (Bohlmann and Keeling, 2008)

Las TPS forman productos cíclicos y acíclicos simples o múltiples, y son las principales responsables de la diversidad de los compuestos terpénicos que se encuentran en la naturaleza (Degenhardt et al., 2009). Los productos primarios de las TPS pueden ser modificados por reacciones secundarias, tales como hidroxilación, peroxidación, reducción, metilación, isomerización, acilación, y glicosilación, entre otras, que originan compuestos terpénicos más complejos. Las TPS contribuyen a la variación y la plasticidad de la formación de terpenos, ya que pueden fácilmente adquirir nuevas propiedades catalíticas por pequeños cambios estructurales (Köllner et al., 2004; Xu et al., 2007; Keeling et al., 2008).

Las enzimas TPS varían en su especificidad de acuerdo al sustrato utilizado y su localización subcelular. Así, las TPS dirigidas a los plástidos generalmente producen mono (C_{10}), di (C_{20}) o tetraterpenos (C_{40}) a partir del GPP y el GGPP plastídicos, respectivamente, mientras que las TPS citosólicas convierten principalmente FPP en sesqui (C_{15}) o triterpenos (C_{30}) (Tholl and Lee, 2011).

2. Biosíntesis de Esteroles

Los esteroides son los metabolitos primarios mayoritarios sintetizados a través de la vía del MVA (Schaller, 2004). Su estructura base deriva del anillo perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno sustituido por un hidroxilo con configuración β en el carbono 3, por sendos grupos metilo en los carbonos 10 y 13, y por una cadena de ocho a diez unidades carbonadas en el carbono 17 (Hartmann, 1998).

Los animales vertebrados y los hongos sintetizan colesterol y ergosterol, respectivamente, como esteroides mayoritarios, mientras que las plantas producen una compleja mezcla de esteroides, entre los que el colesterol es uno de los componentes minoritarios y el sitoesterol, el estigmasterol y el campesterol son los componentes mayoritarios (Benveniste, 2002). Los insectos no son capaces de sintetizar esteroides sino que los incorporan a través de la dieta (Svoboda and Weirich, 1995).

Los esteroides son triterpenos que se sintetizan a partir de FPP citosólico (Tholl and Lee, 2011). En la primera reacción específica de la síntesis de esteroides, la escualeno sintasa (SQS) cataliza la condensación de dos moléculas de FPP para producir escualeno, que se convierte en 2,3-epóxido de escualeno, el cual, mediante una reacción de ciclación catalizada por la cicloartenol sintasa (CAS) forma cicloartenol. A partir de este primer intermediario cíclico (Piironen et al., 2000), la ruta biosintética de los esteroides se bifurca en dos ramas (Schaller, 2003) (Figura 4), una que da lugar a los 24-etilesteroides, siendo los mayoritarios el sitoesterol y el estigmasterol, y otra que da lugar a los 24-metilesteroides, en la cual el campesterol es el más abundante. Los esteroides pueden encontrarse en las células de las plantas en dos estados distintos; como esteroides libres o conjugados como ésteres de ácidos grasos y, en menor abundancia, en forma de glucósidos y acilglucósidos que se localizan preferentemente en la membrana plasmática (Benveniste, 2002; Schaller, 2003; Banas et al., 2005; Chen et al., 2007).

Los esteroides poseen múltiples funciones, una de las principales es la de ser importantes reguladores de la fluidez de la membrana y por lo tanto influyen en sus propiedades, funciones y estructura, regulando la permeabilidad de la misma (Demel and De Kruffy, 1976; Bloch, 1983; Schuler et al., 1991) y modulando la actividad de las proteínas asociadas a ellas, incluyendo enzimas, transportadores, canales, receptores o

componentes de cadenas de transducción de señales (Hartmann, 1998, 2004). Asimismo, participan en la regulación de procesos fisiológicos asociados a la membrana, a través de la interacción con otros lípidos como los esfingolípidos, formando balsas lipídicas llamadas *lipid rafts* (Xu et al., 2001). También son precursores de hormonas vegetales, ya que el campesterol se utiliza como precursor para la síntesis de brasinoesteroides, conocidos por su función como reguladores del crecimiento (Schaller, 2003).

Por otro lado, algunos estudios sugieren que los esteroides están involucrados en diferentes procesos biológicos como por ejemplo, la regulación de la división y elongación celular, el establecimiento de la polaridad celular, la acumulación de celulosa, la regulación del desarrollo del embrión, así como también podrían estar relacionados con la síntesis del etileno (Boutté and Grebe, 2009). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos procesos todavía aún no han podido establecerse.

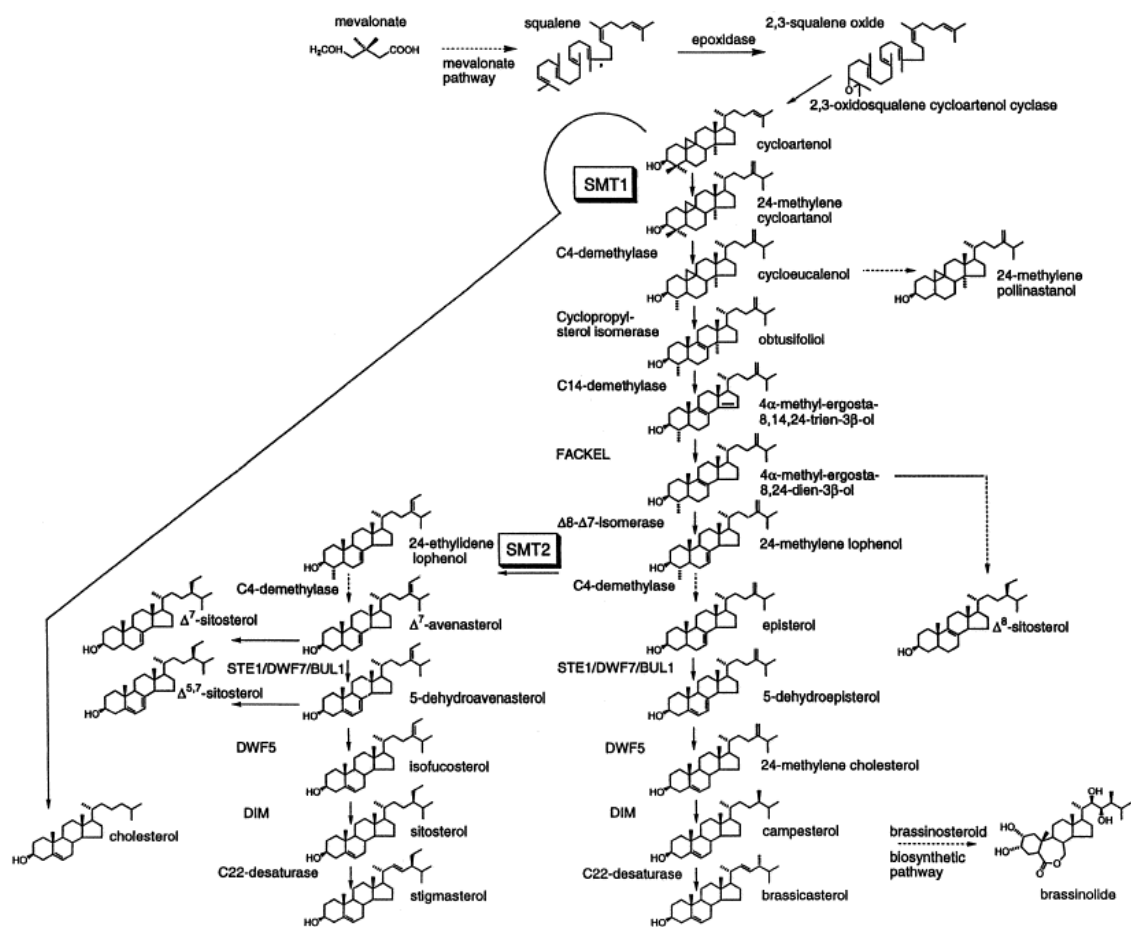


Figura 4. Esquema representativo de la biosíntesis de esteroides en plantas (Schaller, 2003)

Los esteroides son los isoprenoides de mayor requerimiento para la célula, por lo tanto su síntesis debe estar correctamente regulada y coordinada. Al comienzo de la vía, se encuentra la enzima SQS, que es considerada un punto importante de control (Busquets et al., 2008). Posteriormente, se han identificado otros puntos de control de la vía que son las etapas catalizadas por las enzimas esteroil metiltransferasa, SMT1 y SMT2. La primera, es la responsable de catalizar la metilación del cicloartenol para formar 24-metilcicloartanol, mientras que SMT2 controla los niveles relativos de campesterol/sitosterol, catalizando la metilación del 24-metilenlofenol para obtener 24-etiliden-lofenol (Schaller, 2003). Si bien los esteroides libres constituyen la mayor parte del total de estos compuestos encontrados en las células, también es posible hallarlos bajo la forma de esteril-ésteres (donde el hidroxilo en C₃ es sustituido por un ácido graso) que se almacenan en forma de gotas lipídicas. La esterificación constituye una forma de regulación de los niveles de esteroides libres ya que si se acumulan en exceso pueden llegar a ser tóxicos (Schaller, 2003).

3. Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas

La enorme diversidad estructural y funcional de los isoprenoides requiere de una estricta regulación espacial y temporal de la síntesis de los diferentes compuestos. La visión actual es que dicha regulación se puede ejercer a través de distintos mecanismos de regulación que actúan de forma conjunta y orquestada sobre la vía metabólica, más que a través de cambios en la actividad de una o unas pocas enzimas limitantes del flujo (Vranová et al., 2012; Hemmerlin, 2013).

Además de este tipo de regulación se han propuesto otros factores que determinan la dinámica del flujo de la ruta de isoprenoides. Uno de ellos es la posible co-localización de las enzimas de la ruta. Así, enzimas metabólicas que catalizan una serie de reacciones secuenciales, pueden formar complejos enzimáticos en las membranas o en estructuras del citoesqueleto dentro del mismo compartimento celular (Newman and Chappell, 1999). Tales complejos se llaman "*metabolones*" y se cree que podrían operar como canales metabólicos facilitando el flujo de metabolitos hacia la formación de familias específicas de isoprenoides, evitando así la competición de otras enzimas por los mismos sustratos (Chappell, 1995a, 1995b). Por ejemplo, la

HMGR, la SQS y otras enzimas de la vía biosintética de esteroides-brasinoesteroides están localizadas en el RE o en vesículas derivadas de RE (Kribii et al., 1997; Klahre et al., 1998; Lange and Ghassemian, 2003; Leivar et al., 2005; Busquets et al., 2008; Vranová et al., 2012), lo que sugiere la posible existencia de un metabolón dedicado a la síntesis de esteroides y/o brasinoesteroides dentro de la ruta de isoprenoides localizada en el citosol-RE.

3.1. Regulación de la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía del MVA: Papel regulador de la HMGR.

La enzima HMGR cataliza la conversión del HMG-CoA en MVA, siendo clasicamente uno de los puntos de regulación del flujo de la vía más estudiados (Stermer et al., 1994; Schaller et al., 1995; Bach et al., 1999; Manzano et al., 2004; Leivar et al., 2005; Bouvier et al., 2005; Vranová et al., 2013). Todas las HMGR de plantas conocidas están localizadas en el RE y tienen la misma topología (Campos and Boronat, 1995) (Figura 5). La enzima cuenta con una región N-terminal citosólica (muy divergida entre diferentes especies), dos secuencias de transmembrana altamente conservadas, una región conectora divergente y un dominio catalítico orientado hacia el citosol, muy conservado evolutivamente (Campos and Boronat, 1995; Denbow et al., 1996). En todas las especies de plantas estudiadas hasta ahora, la HMGR está codificada por una familia multigénica que da lugar a diferentes isoformas (Antolín-Llovera, 2005). En *A. thaliana*, existen dos genes (*AtHMG1* y *AtHMG2*) que codifican tres isoformas de HMGR (HMGR1S, HMGR1L y HMGR2) (Enjuto et al., 1994; Lumbreras et al., 1995). HMGR1S y HMGR1L derivan del gen *AtHMG1* y son idénticas en secuencia, sin embargo, la isoforma 1L tiene una extensión N-terminal de 50 aminoácidos.

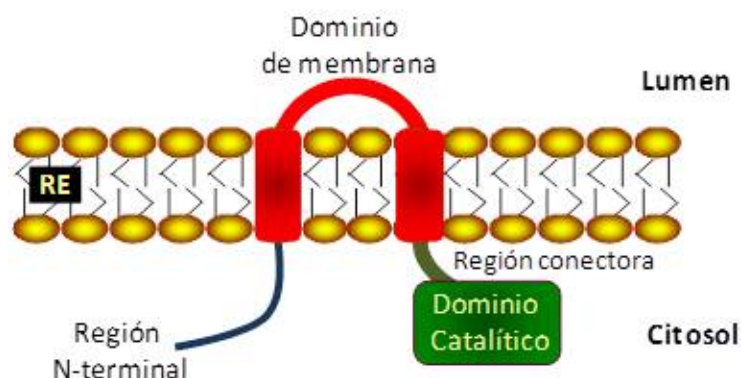


Figura 5. Esquema de la topología de la enzima HMGR. (Imagen adaptada de Campos and Boronat, 1995)

La regulación de la actividad HMGR de las plantas se ejerce a diferentes niveles, desde el transcripcional al postraducciona, en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales, metabólicos y de desarrollo (Stermer et al., 1994; Learned and Connolly, 1997; Manzano et al., 2004; Nieto et al., 2009; Leivar et al., 2011; Pollier et al., 2013; Doblaz et al., 2013). La HMGR tiene un papel regulador clave en la ruta de MVA, no sólo para el desarrollo normal de la planta, sino también para la adaptación de éstas a las condiciones ambientales cambiantes. Actualmente, se ha descrito que la HMGR puede ser modulada por innumerables señales endógenas y estímulos externos (Leivar et al., 2011). Entre estos se encuentra la luz (Wong et al., 1982; Ji et al., 1992) que ejerce una regulación negativa (Enjuto et al., 1994; Learned, 1996; Learned and Connolly, 1997) sobre la actividad HMGR (Moore and Oishi, 1993) que se acompaña de una reducción de los niveles de sitosterol y estigmasterol en plántulas etioladas de *Arabidopsis* (Ghassemian et al., 2006). Además, la actividad HMGR también puede ser regulada por fitohormonas, calcio, calmodulina, heridas, tratamiento con inductores, ataque de patógenos y señales derivadas del bloqueo de la síntesis de isoprenoides (Stermer et al., 1994; Rodríguez-Concepción et al., 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que la actividad HMGR se incrementa en respuesta al bloqueo genético (Babiychuk et al., 2008; Posé et al., 2009; Closa et al., 2010) y farmacológico (Wentzinger et al., 2002; Nieto et al., 2009) de la síntesis de esteroides.

Por otro lado, la regulación de la actividad HMGR en las plantas parece compartir mecanismos con los sistemas animales, como por ejemplo la regulación de la actividad por fosforilación y desfosforilación (Vranová et al., 2013). Las proteínas quinasas PK_I, PK_{II} y PK_{III} de espinaca y la quinasa HRK-A de coliflor, una proteína quinasa relacionada con las SNF1 (*sucrose non-fermenting-1-related protein kinases* (SnRK1), regulan negativamente la actividad de la HMGR en plantas fosforilando *in vitro* la Ser-577 de *AtHMGR1S* conservada en el dominio catalítico de las HMGR (Dale et al., 1995; Douglas et al., 1997). PRL1 (*Pleiotropic regulatory locus 1*) es una proteína que funciona como un regulador global de la respuesta a los niveles de azúcares, el estrés, y los niveles hormonales, en parte por la inhibición de la actividad SnRK1. En consonancia con la función de SnRK1 como regulador negativo de la vía del MVA, en plántulas mutantes de *A. thaliana* con pérdida de función PRL1, la actividad HMGR se reduce sin alterar los niveles de transcripción o de proteína HMGR, evidenciando una

regulación postraduccional de la HMGR (Flores-Pérez et al., 2010). En los últimos años se han obtenido evidencias de que tanto la transcripción de la HMGR como los niveles de actividad de la enzima son modulados por la proteína fosfatasa PP2A en *A. thaliana*, a través de la familia de proteínas B99, que son subunidades reguladoras de la PP2A y que interactúan con las isoenzimas HMGR1S y HMGR1L (Leivar et al., 2011).

En general, los cambios de actividad HMGR suelen reflejarse en cambios en el mismo sentido de los niveles de esteroides. Así, al sobreexpresar diferentes isoformas de HMGR en plantas de *A. thaliana*, se produce un aumento concomitante en los niveles de esteroides (Leivar et al., 2005; Manzano et al., 2004), mientras que la pérdida parcial de actividad HMGR causa el efecto contrario (Ohyama et al., 2007; Suzuki et al., 2004). Por otra parte, también se ha descrito, que la inhibición de la vía de síntesis de esfingolípidos, disminuye los niveles de esteroides totales en plantas de *A. thaliana*, así como también, los niveles de la actividad de la enzima HMGR (Nieto et al., 2009).

4. Farnesildifosfato sintasa: otra enzima clave de la biosíntesis de isoprenoides en plantas

La enzima FPS (EC 2.5.1.1/EC 2.5.1.1.0) pertenece a la familia de las *trans*-(*E*)-preniltransferasas de tipo I y cataliza la condensación de una molécula de IPP (C_5) con DMAPP (C_5) para obtener el intermediario GPP (C_{10}) y, seguidamente, la condensación del GPP con otra molécula de IPP para formar FPP (C_{15}) (Figura 6). El FPP es el precursor de una gran cantidad de productos isoprenoides, tanto del metabolismo primario (esteroides y brasinoesteroides, dolicoles, poliprenoles, ubiquinonas, proteínas preniladas) como del metabolismo especializado (sesquiterpenos y triterpenos) (Tholl and Lee, 2011).

Actualmente, se han caracterizado enzimas FPS de distintos organismos desde procariotas como *B. stearrowthermophilus* (Koyama et al., 1993), hasta eucariotas como levaduras (Eberhardt and Rilling, 1975; Anderson et al., 1989), aves (Tarshis et al., 1994), mamíferos (Barnard and Popják, 1981; Clarke et al., 1987; Wilkin et al., 1990) y de numerosas especies de plantas.

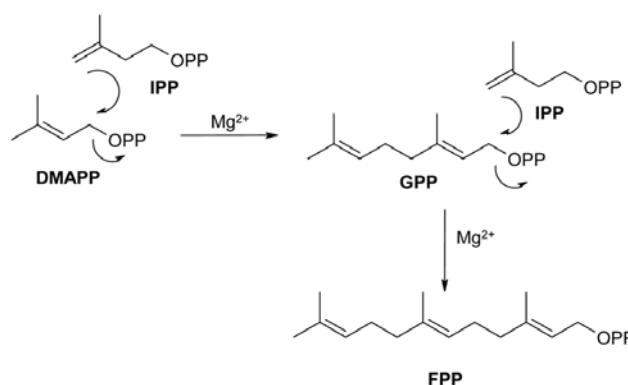


Figura 6. Esquema de la reacción catalizada por la enzima FPS. Reacción de condensación entre el IPP y el sustrato alílico DMAPP para formar GPP y su condensación con la segunda molécula de IPP que da lugar a una molécula de FPP. (Imagen obtenida de Szkopińska and Płochocka, 2005)

La mayoría de las FPS descritas poseen una masa molecular de aproximadamente 40kDa y actúan en forma de homodímero, dando lugar a un complejo de 80-84kDa. Al comparar las secuencias de las FPS de diferentes especies se han identificado 7 regiones conservadas (I a VII), entre las cuales, las regiones II y IV poseen dominios ricos en aspartato. El dominio II se llama FARM (*First Aspartate Rich Domain*) y el VI, SARM (*Second Aspartate Rich Domain*) (Szkopińska and Płochocka, 2005). Diferentes estudios de mutagénesis dirigida en aminoácidos de estos dominios determinaron que los aspartatos conservados en el dominio FARM y las argininas del dominio SARM son críticas para la eficiencia catalítica de la enzima FPS (Marrero et al., 1992; Joly and Edwards, 1993; Song and Poulter, 1994). Posteriormente se observó que estas regiones se encuentran en una cavidad central en el homodímero de FPS donde se localiza el centro activo de la enzima, por lo cual resultan indispensables para su actividad catalítica (Tarshis et al., 1996). Estas secuencias se encuentran conservadas en otras *E*-preniltransferasas como la GGPP, o las hexaprenil (C_{30}) y heptaprenil (C_{35}) difosfato sintasas (Chen et al., 1994).

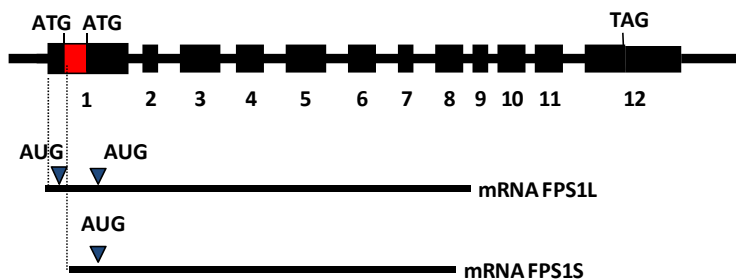
4.1. FPS en plantas

En las plantas, la primera secuencia de cDNA clonada de una FPS fue la de *A. thaliana* (Delourme et al., 1994) y a partir de aquí se fueron conociendo las de *Lupinus albus* (Attucci et al., 1995a, 1995b), *Zea mays* (Li and Larkins, 1996), *Parthenium*

argentatum (Pan et al., 1996), *Hevea brasiliensis* (Adiwilaga and Kush, 1996), *Capsicum annuum* (Huguenev et al., 1996), *Oryza sativa* (Sanmiya et al., 1997), *Solanum lycopersicum* (Gaffe et al., 2000), *Abies grandis* (Tholl et al., 2001), *Artemisia annua* (Souret et al., 2003), *Artemisia tridentata* (Hemmerlin et al., 2003b), *Gingko biloba* (Wang et al., 2004) *Centella asiatica* (Kim et al., 2005) y *C. roseus* (Thabet et al., 2011), entre otras.

A. thaliana posee dos genes que codifican FPS, *AtFPS1* (At5g47770) y *AtFPS2* (At4g17190) (Figura7). El gen *AtFPS2* da lugar a una única población de mRNA que codifica una proteína de 342 aa (FPS2), mientras que el gen *AtFPS1* es bifuncional ya que expresa dos mRNAs que codifican isoformas de 384 y 343 aa, FPS1L y FPS1S, respectivamente. Estas dos isoformas de FPS1, son idénticas excepto en el extremo N-terminal, donde FPS1L posee una extensión de 41 aa que dirige la proteína a las mitocondrias (Cunillera et al., 1997; Manzano et al., 2006). Las proteínas FPS1S y FPS2 presentan una identidad del 90,6% y una similitud del 94,5% (Cunillera et al., 1996) y se localizan exclusivamente en el citosol (Keim et al., 2012).

FPS1



FPS2

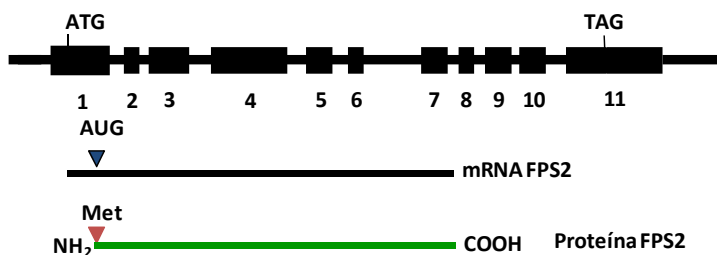


Figura 7. Estructura de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* de *A. thaliana*. Las cajas negras indican los exones. La caja roja en *FPS1*, representa la secuencia nucleotídica que codifica la extensión N-terminal de la isoforma FPS1L. Debajo de cada gen se indican el mRNA que expresa cada gen y las proteínas codificadas por cada uno.

4.2. Expresión temporal y espacial de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2*

La expresión de los genes *AtFPS* fue analizada en plantas de *A. thaliana* portadoras de los transgenes *FPS1S:GUS* y *FPS2:GUS*. Los resultados del estudio mostraron que el gen *AtFPS1* presenta una expresión generalizada e intensa durante todo el desarrollo de la planta, tanto en la fase vegetativa como reproductiva (Figura 8a), mientras que el gen *AtFPS2* presenta una expresión restringida a órganos florales, semillas y estadios tempranos de la germinación (Figura 8b) (Cunillera et al., 2000; Closa et al., 2010). Por otro lado, el estudio de la expresión de los genes *FPS1:GUS* y *FPS2:GUS* en semillas reveló la existencia de patrones de expresión mayoritariamente complementarios, particularmente a partir del estadio de torpedo en adelante, lo que sugiere que en las semillas de *Arabidopsis* el FPP tiene dos orígenes segregados espacial y temporalmente (Keim et al., 2012).

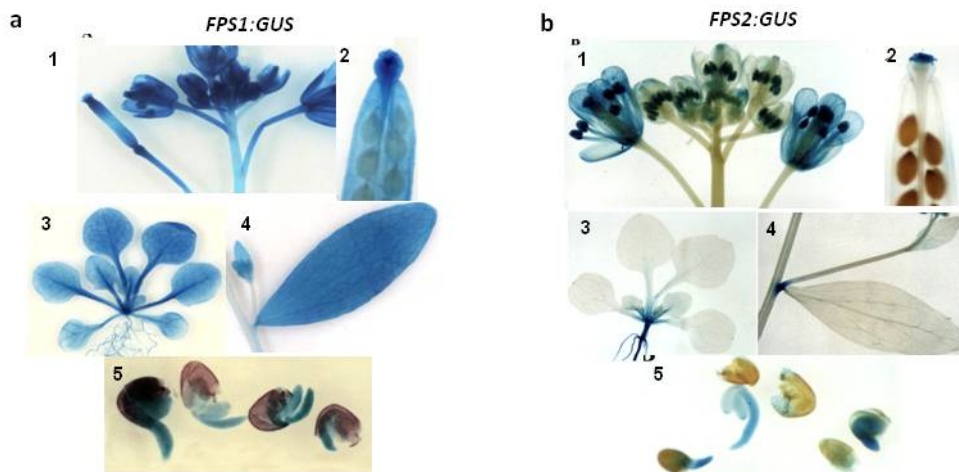


Figura 8. Patrones de expresión de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* en plantas de *A. thaliana* transformadas con los genes quiméricos *FPS1S:GUS* y *FPS2:GUS*. Las imágenes pertenecen a 1) Inflorescencias en distintos estadios de desarrollo, 2) detalle de la parte superior de las silicuas maduras, 3) plántulas de 15 días, 4) tallos secundarios con hojas caulinares y 5) plántulas de 24-48 h de germinación correspondientes a: *FPS1* (a) y *FPS2* (b) (Imagen adaptada de Cunillera et al., 2000).

4.3. Localización subcelular de las enzimas FPS

En las plantas se han descrito diferentes localizaciones subcelulares para la FPS. En *V. vinífera* se ha detectado actividad FPS en fracciones citosólicas (Feron et al., 1990); esta misma localización se observó en el fruto de *C. annuum* mediante anticuerpos anti-FPS (Hugueneu et al., 1996), y en tomate, en donde no se ha

identificado ningún tipo de señal en FPS1 que sugiera otra localización diferente a la citosólica (Gaffe et al., 2000). En un estudio con *P. argentatum* se ha establecido, mediante inmunodetección, la presencia de FPS en extractos proteicos de partículas de látex, las cuales se acumulan en el citosol y en vacuolas que poseen la capacidad de sintetizar FPP (Pan et al., 1996). En el caso del arroz, mediante inmunocitoquímica usando anticuerpos anti-FPS, se ha descrito que la isoforma FPPS1 se ubica en los cloroplastos, mientras que la FPP2 se localiza en el citosol (Sanmiya et al., 1999). Por otro lado, mediante *Western blot* usando los mismos anticuerpos, también se observó la presencia de FPS en fracciones plásticas de avena y tabaco. Recientemente, se ha descrito que una de las FPS de *C. roseus* se localiza en los peroxisomas y en el citosol (Thabet et al., 2011). En *Arabidopsis*, la localización mitocondrial de FPS1L se ha confirmado mediante inmunocitoquímica en plantas sobreexpresoras de esta enzima y se ha demostrado además, que la extensión N-terminal es capaz de dirigir de manera específica a la proteína GFP a mitocondrias en células epiteliales de hojas de *Arabidopsis* (Manzano et al., 2006). En cuanto a la localización de las isoformas FPS1 y FPS2, los primeros estudios realizados mediante técnicas de inmunocitoquímica en hojas de plantas sobreexpresoras de FPS1S (Manzano, 2004) o FPS2 (Closa, 2007), revelaron la presencia de ambas isoformas en el citosol. Muy recientemente, se ha confirmado la localización citosólica de ambas isoenzimas mediante la expresión transitoria en *N. benthamiana* de fusiones N- y C-terminales de FPS1S y FPS2 con GFP (Keim et al., 2012).

4.4. Las FPS y sus funciones en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.

Como se ha mencionado anteriormente la enzima HMGR desempeña una función clave en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en la vía del MVA. Sin embargo, se asume que otras enzimas también pueden estar implicadas en el control de la vía, como es el caso de la FPS. El papel regulador atribuido a la FPS se basa en que tanto los niveles intracelulares del producto de la reacción (FPP) como el de los sustratos (IPP y DMAPP) deben estar estrictamente controlados para evitar alteraciones en el flujo metabólico a través de las diferentes ramas de la vía que se

originan y compiten por estos compuestos intermediarios. Por ejemplo, diversos estudios sugieren que la FPS posee una función relevante en la regulación de la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas (Dudley et al., 1986; Hugueney et al., 1996; Ramos-Valdivia et al., 1997; Chen et al., 2000). Asimismo, en dos especies de algodón (*G. arboreum* y *G. australe*) se ha detectado un incremento en los niveles de mRNA de las FPS y la cadineno sintasa (sesquiterpeno sintasa) en respuesta al tratamiento con un elicitador fúngico (Liu et al., 1999). Una respuesta similar se ha observado en frutos de pimiento después del tratamiento con celulasa (Hugueney et al., 1996). Al comparar los niveles de expresión de los genes *HMGR*, *DXS*, *DXR* y *FPS* en la producción de artemisinina en cultivos de raíz se observó que sólo los niveles de *FPS* se incrementaron junto con el aumento de los niveles de artemisinina (Souret et al., 2003). Además, la sobreexpresión tanto de la FPS de *G. arboreum* en *A. annua* (Chen et al., 2000), así como su FPS endógena (Han et al., 2006), producen un incremento en el contenido de artemisinina. En un estudio usando metil jasmonato como elicitador en cultivos de *hairy roots* de *C. asiatica* que sobreexpresaban FPS, se evidenció la importancia de esta enzima en la síntesis de triterpenos (Kim et al., 2009).

En el caso de *A. thaliana*, la sobreexpresión de las isoformas FPS1S y FPS1L, a pesar de mostrar niveles de actividad hasta doce veces más que en las plantas control, no dio lugar a incrementos de los niveles de actividad HMGR ni de esteroides. Sin embargo, las plantas que sobreexpresan la isoforma FPS1S presentaron una reducción del tamaño de la roseta basal, lesiones necróticas en las hojas y senescencia prematura en hojas aisladas de la planta. La presencia de lesiones necróticas provocadas por la sobreexpresión de FPS1S, indujo una acumulación de H₂O₂ junto con un aumento de la expresión de los genes *PR-1* (*Pathogenesis Related-1*) y *AOX-1a* (*Alternative Oxidase-1a*) y una disminución de los niveles de citoquininas (Masferrer et al., 2002; Manzano et al., 2004).

Por su parte, las plantas sobreexpresoras de la isoforma FPS1L mostraron síntomas de clorosis y muerte celular en condiciones de día continuo. Además, presentaron una acumulación de H₂O₂ en las hojas, al igual que las sobreexpresoras de FPS1S, y manifestaron signos de senescencia prematura en hojas aisladas de la planta. En términos metabólicos mostraron una alteración del perfil de citoquininas, pero niveles normales de esteroides y actividad HMGR (Manzano et al., 2006).

Todas estas observaciones sugirieron que, en ambos casos, la sobreexpresión de FPS (FPS1S o FPS1L) sin una activación paralela de la HMGR, puede provocar una disminución de los niveles de IPP/DMAPP disponibles para la síntesis de citoquininas. Con respecto a la sobreexpresión de la isoforma FPS2 en plantas de *A. thaliana*, no se observó ninguna alteración visible del fenotipo, pese a que sí se detectó un aumento en la actividad enzimática equivalente al detectado en las plantas sobreexpresoras de FPS1S. Los niveles de esteroides tampoco resultaron afectados en estas plantas (Closa, 2007).

4.5. Mutantes de *A.thaliana* con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2*

La caracterización de mutantes simples con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* demostró que un único gen *AtFPS* funcional es suficiente para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, lo que indica que los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* desempeñan funciones esencialmente redundantes en *Arabidopsis*. En cambio, la pérdida de función simultánea de los genes *AtFPS* es letal para el embrión de *A. thaliana*, dado que su desarrollo se detiene en la etapa pre-globular, lo que demuestra que el metabolismo de isoprenoides derivados de FPP es esencial para el desarrollo embrionario. No obstante, las funciones de los genes *AtFPS* no son completamente redundantes. La actividad FPS1 desempeña un papel predominante durante la mayor parte del ciclo vital de la planta, mientras que FPS2 juega un papel prioritario en las semillas y durante las etapas iniciales de la germinación. El análisis de los niveles de actividad FPS de estos mutantes en semillas, reveló que el mutante *Atfps2* sólo posee el 20% de la actividad total de FPS, mientras que el mutante *Atfps1* mantiene el 80% de la actividad total, lo que indica que FPS2 es la enzima más abundante, y la principal responsable de la actividad FPS en semillas. De acuerdo con estas observaciones, la falta de FPS2, pero no la de FPS1, conduce a una marcada reducción del contenido de esteroides en las semillas maduras acompañada de una activación de la HMGR que es esencial para mantener un flujo de la vía del MVA suficientemente alto como para que las semillas sigan siendo viables. En estas condiciones, los intermediarios se canalizan a través de la isoenzima FPS1S, que aún siendo minoritaria en las semillas, es suficiente para garantizar su viabilidad (Closa et al., 2010).

Con posterioridad al estudio anterior se demostró que todos los fenotipos de las semillas del mutante *Atfps2* podían revertirse completamente al expresar en dicho mutante los genes quiméricos FPS2p:FPS1Smutdis, FPS2p:FPS1S, FPS1mutdisp:FPS2 y FPS1p:FPS2. Los resultados de este estudio de complementación fenotípica cruzada, demostraron que las isoenzimas FPS1S y FPS2 son funcionalmente intercambiables (Keim et al., 2012).

5. Compuestos volátiles vegetales de naturaleza isoprenoide

Las plantas producen miles de productos volátiles diferentes que son emitidos tanto por los tejidos aéreos como por los subterráneos (Vickers et al., 2014). Los productos volátiles pueden pertenecer a diversas clases de biomoléculas, incluyendo isoprenoides, derivados de ácidos grasos, fenilpropanoides/benzenoides y derivados de aminoácidos, que desempeñan funciones importantes en la ecofisiología vegetal. Pueden actuar como atrayentes de agentes polinizadores o diseminadores de semillas, en la defensa directa contra herbívoros o atrayendo antagonistas de enemigos naturales de las plantas, proporcionar protección contra patógenos, mediar en las interacciones planta-planta, protegerlas frente a distintos estreses abióticos, como la intensidad de la luz, la temperatura o el estrés oxidativo (Dudareva et al., 2006; Gershenzon and Dudareva, 2007; Vickers et al., 2009; Loreto and Schnitzler, 2010), o proteger frente a infecciones microbianas (Himejima et al., 1992; Huang et al., 2012).

Los isoprenoides volátiles representan el grupo más abundante de volátiles de las plantas. Para que un isoprenoide sea volátil debe tener propiedades químicas específicas, como ser moléculas lipofílicas, poseer un peso molecular relativamente bajo, un punto de ebullición bajo y una elevada capacidad para evaporarse a temperaturas fisiológicas normales (Dudareva et al., 2006). Estas propiedades les permiten pasar fácilmente a través de las membranas y liberarse al medio exterior. Los hemiterpenos y algunos mono, sesqui y diterpenos tienen estas propiedades. Por lo general, son componentes comunes del aroma de las flores y de las mezclas de volátiles inducidas por herbívoros (*HIPV*) (Pichersky and Gershenzon, 2002; Mumm and Dicke, 2010). Estas mezclas de compuestos volátiles pueden ser disuasivas para los insectos herbívoros, bien porque son poco atractivas para ellos o porque representan

una señal de peligro (Unsicker et al., 2009), o que atraen a los antagonistas de los enemigos naturales de las plantas, fenómeno conocido como "grito de ayuda" (Dicke and Baldwin, 2010). La composición de la *HIPV* es compleja y puede llegar a contener cientos de compuestos (Mumm and Dicke, 2010), la mayoría de los cuales en muchas especies de plantas son isoprenoides tales como, (3S)-(E)-nerolidol, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (E)- β -ocimeno y (E, E)- α -farneseno. Los volátiles son emitidos generalmente poco después de su síntesis, y sólo se almacenan si existen estructuras especializadas como los tricomas glandulares o los conductos de resina (Vickers et al., 2014).

En los últimos años, el conocimiento adquirido acerca de la biosíntesis de las *HIPVs* y de sus efectos atrayentes de artrópodos carnívoros y antagonistas naturales de insectos herbívoros, (Halitschke and Baldwin, 2003; Kessler and Baldwin, 2004; van Poecke and Dicke, 2004; Heil, 2008; Snoeren et al., 2010) ha permitido la modificación genética de plantas para la producción de estos compuestos, a fin de estudiar su efecto sobre el comportamiento de dichos insectos (Bouwmeester et al., 2003; Degenhardt et al., 2003; Aharoni et al., 2005; Kappers et al., 2005; Schnee et al., 2006; Tholl et al., 2005; Loivamäki et al., 2008; Kos et al., 2013; Houshyani et al., 2013).

5.1. Biosíntesis de isoprenoides volátiles

Como se ha indicado anteriormente (apartado 1.4.2), las TPS catalizan la formación de hemi, mono, sesqui y diterpenos a partir de DMAPP, GPP, FPP y GGPP respectivamente (Bohlmann et al., 1998). La mayoría de los productos sintetizados por las mono y sesquiterpeno sintasas son compuestos volátiles a la presión atmosférica, que se encuentran formando parte de las típicas mezclas de compuestos volátiles emitidos por las flores (Figura 9). En general, las monoterpeno sintasas se localizan en los plástidos, mientras que las sesquiterpeno sintasas se encuentran en el citosol (Chen et al., 2011). Sin embargo, existen excepciones a esta regla, en particular, la localización de monoterpeno sintasas en el citosol (Aharoni et al., 2003) y de sesquiterpeno sintasas en los plástidos (Sallaud et al., 2009).

Aunque las TPS suelen producir un compuesto mayoritario, muestran propensión a generar varios productos a partir de un único prenilpifosfato, resultado

del mecanismo catalítico que implica la formación de carbocationes intermediarios altamente reactivos (Degenhardt et al., 2009). Sin embargo, muchas TPSs aceptan más de un sustrato (Tholl, 2006; Chen et al., 2011), lo que aumenta la diversidad de terpenos producidos por estas enzimas (Aharoni et al., 2004; Nagegowda et al., 2008; Huang et al., 2012; Gutensohn et al., 2013).

Además de la amplia gama de terpenos volátiles formados directamente por las TPSs, la diversidad de terpenos se incrementa aún más por acción de otras enzimas que son capaces de modificar los productos de las TPS a través de reacciones de hidroxilación, deshidrogenación o acilación, entre otras, aumentando así su volatilidad y alterando sus propiedades olfativas (Dudareva et al., 2004). Las plantas también producen terpenos volátiles con esqueletos de carbono que van de C₈ a C₁₈. Los homoterpenos acíclicos C₁₁ y C₁₆, 4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno (DMNT) y 4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT), derivan del FPP y del GGPP, respectivamente. Su biosíntesis tiene lugar a través de dos pasos enzimáticos, la formación de los alcoholes C₁₅ y C₂₀, (*E*)-nerolidol y (*E,E*)-geranilinalol, respectivamente, seguido por una reacción de oxidación catalizada por una citocromo P450 monooxigenasa (Tholl and Lee, 2011).

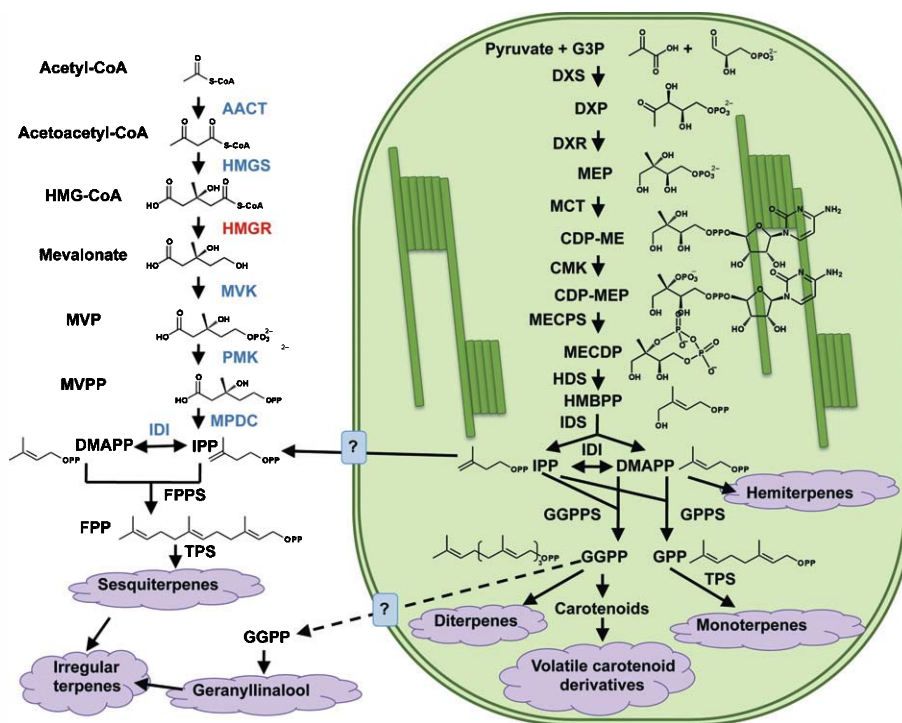


Figura 9. Síntesis de isoprenoides volátiles a partir de precursores producidos través de las vías del MVA y del MEP. (Dudareva et al., 2013).

5.2. Ingeniería metabólica de isoprenoides volátiles

Desde el punto de vista agronómico, las pérdidas de cosechas debido a plagas de insectos supone un problema importante (El-Wakeil et al., 2010). La aplicación de insecticidas es una estrategia común y eficaz para la eliminación de insectos, sin embargo, algunos de ellos también tienen efectos sobre los insectos beneficiosos y pueden representar un riesgo a largo plazo para el medio ambiente (Dedryver et al.). Las modificaciones cualitativas y cuantitativas de la composición de las mezclas de terpenos volátiles emitidos por las plantas mediante aproximaciones de ingeniería metabólica, tienen el potencial para permitir prácticas agrícolas más sostenibles mediante la reducción del uso de productos químicos. Además de su función en la fisiología y ecología vegetal, los isoprenoides volátiles también presentan un interés comercial, debido a que son usados como aromatizantes en productos alimentarios y cosméticos, como el mentol, o bien por su importancia en la calidad de los productos agrícolas, como es el sabor de los frutos y el olor de flores (Wagner and Elmadfa, 2003; Aharoni et al., 2004; Dudareva et al., 2006). La ingeniería metabólica de terpenos volátiles es importante no sólo para la mejora de un número considerable de rasgos en los cultivos, sino que también lo es para la comprensión de los aspectos fundamentales de la biosíntesis de terpenos en plantas (Nagegowda, 2010).

Debido al interés biotecnológico de los isoprenoides volátiles se han desarrollado diversas estrategias para incrementar su producción mediante la manipulación del metabolismo de isoprenoides en bacterias, levaduras y en plantas. Sin embargo, aunque se ha empezado a trabajar para producir terpenos específicos, no se ha tenido demasiado éxito en la obtención de plataformas para la producción eficiente de terpenos en plantas, debido a que la modificación de la emisión de volátiles requiere un conocimiento detallado de la biología, la bioquímica y la genética implicada en la producción de estos compuestos, así como también de la fisiología y la ecología de la función que cumplen.

La producción de isoprenoides volátiles en plantas puede manipularse ya sea mediante la modificación de las vías metabólicas existentes o a través de la introducción de nuevas etapas enzimáticas, lo que permite, aumentar, disminuir o introducir la producción de estos compuestos en las plantas (Vickers et al., 2014). Uno

de los factores limitantes en la producción de cualquier metabolito secundario isoprenoide mediante ingeniería metabólica es la disponibilidad y el acceso al sustrato de las TPS correspondientes. Una posible estrategia para aumentar la disponibilidad de precursores puede ser aumentar globalmente el flujo de las vías del MVA o del MEP actuando sobre las principales etapas limitantes de las mismas, como la actividad HMGR en la vía del MVA (Chappell, 1995a) y la actividad DXS en la vía del MEP (Estévez et al., 2001). La compartimentalización de la síntesis y almacenamiento de los diferentes terpenos también es un factor importante a tener en cuenta para su producción (Heinig et al., 2013). Normalmente la expresión y la localización de las TPS se limita a ciertos tipos de células o tejidos especializados (Chen et al., 2011), por lo que muchos de estos terpenos no se pueden acumular en las especies de plantas modelo de estudio.

En el ámbito específico de los sesquiterpenos, los intentos para producir este tipo de compuestos volátiles en plantas no han sido muy satisfactorios, pese a que los niveles de FPP disponibles en el citosol para la síntesis de sesquiterpenos son aparentemente elevados (Aharoni et al., 2005). Los primeros intentos de producción de sesquiterpenos en este compartimento, a través de la sobreexpresión de diversas sesquiterpeno sintasas en el citosol, dieron lugar a niveles indetectables (Sharon-Asa et al., 2003) o a pequeñas cantidades de los productos deseados (Hohn and Ohlrogge, 1991; Wallaart et al., 2001; Aharoni et al., 2003; Wu et al., 2006), presumiblemente porque las sesquiterpeno sintasas no pueden competir eficazmente con otras enzimas que también utilizan FPP como sustrato. Se ha sugerido que el FPP citosólico podría estar disponible exclusivamente para la síntesis de esteroides, aunque no se puede descartar que las sesquiterpeno sintasas utilizadas presenten diferentes afinidades por el FPP (Vickers et al., 2014), o incluso explicaciones más complejas, como la existencia de interacciones selectivas entre las sesquiterpeno sintasas y las FPS homólogas. A pesar de las limitaciones anteriores, en algunos casos se ha podido demostrar la eficacia de esta estrategia biotecnológica, como método potencialmente aplicable a la protección de las plantas frente al ataque por herbívoros. Uno de estos ejemplos es la expresión de la (*E*)- β -farneseno sintasa citosólica (E β f) de *Mentha piperita* en *A. thaliana*, que produjo la emisión de (*E*)- β -farneseno con la consiguiente disminución de la emisión del sesquiterpeno β -cariofileno. La colonización de las plantas por áfidos

disminuyó significativamente, mientras que los depredadores de áfidos fueron atraídos por la emisión de volátiles (Beale et al., 2006). También se observó la disminución de la colonización de áfidos y el aumento de la atracción de los depredadores de áfidos cuando un gen $E\beta f$ de *Artemisia annua* se expresó en *N. tabacum* (Yu et al., 2012).

Con el objetivo de superar las limitaciones en la producción de sesquiterpenos en el citosol, algunos estudios proponen la expresión de las sesquiterpeno sintasas de interés en una localización subcelular alternativa a la original. Uno de los estudios más completos sobre los efectos del direccionamiento de las sesquiterpeno sintasas a distintas localizaciones subcelulares sobre la producción de terpenos, se realizó con la patchoulol sintasa (PTS), una sesquiterpeno sintasa de *Pogostemon cabli* (Wu et al., 2006). Cuando esta enzima se dirigió al citosol en tabaco transgénico, sólo emitió pequeñas cantidades de patchoulol. Cuando el mismo gen se expresó coordinadamente con la FPS, la acumulación de patchoulol continuó siendo muy baja. Sin embargo, cuando ambas enzimas (PTS y FPS) se dirigieron a los plástidos, se reportó una acumulación importante de patchoulol de hasta el 0,003% de la biomasa en peso fresco. Además, en el estudio se demostró que la oruga del tabaco (*Manduca sexta*) tenía una menor preferencia por las hojas del tabaco transgénico que producía patchoulol, que por las del tabaco wt (Wu et al., 2006).

Por otro lado, la enzima FaNES1, una linalol/nerolidol sintasa, dirigida a los plástidos produce niveles elevados del monoterpeno linalol, así como diversos compuestos derivados del linalol y niveles detectables del sesquiterpeno nerolidol (Aharoni et al., 2003). Esta misma sesquiterpeno sintasa dirigida a la mitocondria produce nerolidol, glucósidos de nerolidol y el derivado del nerolidol 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) (Kappers et al., 2005; Houshyani et al., 2013). Ello sugiere que la mitocondria es una plataforma más eficiente para la síntesis de sesquiterpenos que el citosol o los cloroplastos. Otros ejemplos de relocalización de sesquiterpeno sintasas es la germacreno A sintasa que dirigida a la mitocondria aumenta unas 15 veces la producción de germacreno con respecto a la producción cuando se expresa en el citosol (Liu et al., 2011).

6. La Linalool/Nerolidol sintasa de *Fragaria ananassa* (FaNES1)

La variedad de fresa cultivada, *F. ananassa*, emite dos isoprenoides volátiles, linalool y nerolidol, que son producidos por la linalool/nerolidol sintasa FaNES1. Esta enzima es una mono/sesquiterpeno sintasa que puede utilizar GPP o FPP como sustratos para fabricar linalool o nerolidol, respectivamente. En cambio, la variedad de fresa silvestre, *F. vesca*, emite una mezcla de monoterpenos como α -pineno, β -mirceno, α -terpineol y β -fenandreno. Además del gen *FaNES1*, se han identificado otras dos secuencias génicas, *FaNES2* y *FvNES*, presentes en la fresa cultivada y en la salvaje, respectivamente, que presentan niveles de expresión prácticamente indetectables. FaNES1 tiene una localización citosólica, mientras que FaNES2 presenta una doble localización, en cloroplastos y mitocondrias, aunque de forma preferencial en cloroplastos, y FvNES1 se localiza en los cloroplastos. La secuencia del extremo N-terminal de las enzimas FaNES2 y FvNES1 codifica para un péptido de tránsito a mitocondrias y/o cloroplastos, y cloroplastos, respectivamente (Aharoni et al., 2003, 2004).

Plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan FaNES1 en los cloroplastos emiten niveles elevados de linalool, diversos compuestos derivados del linalool y sorprendentemente niveles detectables de nerolidol, debido a la actividad dual mono- y sesquiterpeno sintasa de la enzima. La detección de trazas de nerolidol en los plastos indica que en estos orgánulos, además de GPP, hay FPP disponible para la enzima. El linalool y el nerolidol se emitían tempranamente, en la fase de roseta basal, mientras que las plantas control (wt) solo lo emitían en la fase de floración (Aharoni et al., 2003).

En plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima FaNES1 en los plástidos se observó la disminución de la colonización de áfidos en ensayos de doble opción. Sin embargo, la expresión del transgen también dió lugar a un retraso grave en el crecimiento. Las plantas crecían de forma menos vigorosa, presentaban una apariencia más joven y las hojas verdes eran más brillantes, aunque producían inflorescencias y semillas viables. La severidad del fenotipo correlacionaba con una mayor emisión de linalool, lo que confirmó que existía una relación entre los niveles de expresión de FaNES1 y el retraso en el crecimiento. Los autores especularon que el retraso en el crecimiento de las plantas transgénicas puede deberse a una disponibilidad reducida

del GPP y el GGPP plastídicos disponibles para la síntesis de isoprenoides tales como las cadenas laterales de las clorofilas, los carotenoides e isoprenoides reguladores del crecimiento (Aharoni et al., 2003). La expresión de FaNES1 en los plástidos de patata también dio lugar a la síntesis de S-linalol y sus derivados hidroxilados y glicosilados (Aharoni et al., 2006). La enzima FaNES1 también se expresó en los plástidos de *A. thaliana* bajo el control del promotor *PI2* de patata inducible por herida, demostrándose la producción de linalol después de la inducción con jasmonato de metilo, aunque los autores no dan datos de su cuantificación. Las plantas transgénicas fueron fenotípicamente indistinguibles de las de tipo salvaje (Yang et al., 2008), lo cual es una ventaja frente a las transgénicas que expresaban el gen *FaNES1* bajo el control de un promotor constitutivo que se vieron seriamente afectadas en su crecimiento (Aharoni et al., 2003, 2006).

FaNES1 también se ha expresado en las mitocondrias de *A. thaliana*, observándose que las hojas de la roseta basal emiten de 20 a 30 veces más nerolidol que las plantas que sobreexpresan la enzima en los cloroplastos (Kappers et al., 2005). La expresión de FaNES1 en las mitocondrias no produjo niveles detectables de linalol. La mayor cantidad de nerolidol emitido por las mitocondrias de estas plantas se justificó en base a la existencia de la isoforma FPS1L mitocondrial (Cunillera et al., 1997), que permite la síntesis de FPP en dicho compartimento, el cual puede derivarse hacia la síntesis de sesquiterpenos volátiles. Estas observaciones indican que las mitocondrias son una plataforma más eficiente para producir sesquiterpenos que el propio citosol o los cloroplastos (Aharoni et al., 2003; Kappers et al., 2005).

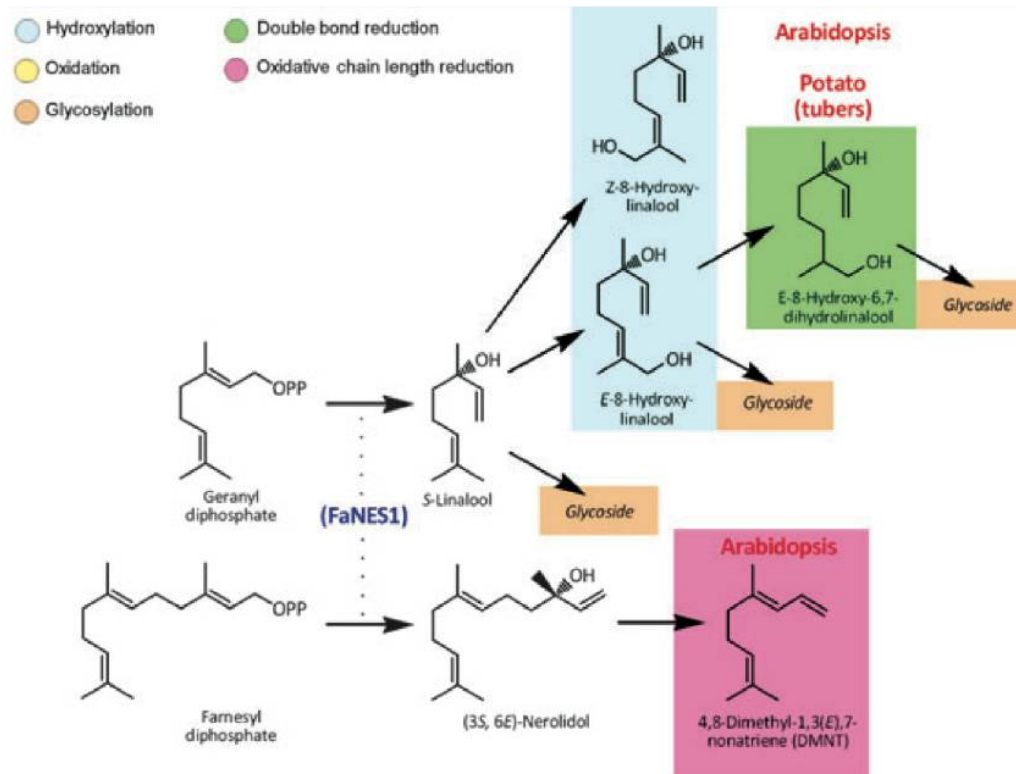


Figura 10. Metabolismo del S-linalol y 3S-(E)-nerolidol en plantas transgénicas. El S-linalol producido en las plantas de *A. thaliana* que expresan la linalol/nerolidol sintasa de *Fragaria ananassa* FaNES1 dirigida al cloroplasto se oxida a (Z)-8-hydroxylinalool, (E)-8-hydroxylinalool y (E)-8-hidroxi-6,7-dihidrolinalool, que luego se transforman en los glucósidos correspondientes. En tubérculos de patatas transgénicas transformadas con el gen *FaNES1* también se produce (3S, 6E)-nerolidol y se detectan metabolitos oxidados y glicosilados derivados del linalol. Cuando FaNES1 fue dirigida a las mitocondrias de plantas transgénicas de *A. thaliana*, el (3S, 6E)-nerolidol se transformó en 4,8-dimetil-1, 3(E),7-nonatrieno (Lange and Ahkami, 2013).

Estas plantas transgénicas de *A. thaliana* también emiten (E)-DMNT (Kappers et al., 2005), un compuesto que no se había detectado ni en la roseta basal (Van Poecke et al., 2001) ni en las flores (Chen et al., 2003) de *A. thaliana* atacadas por herbívoros. La síntesis de (E)-DMNT a partir del nerolidol (Figura 10), podría estar catalizada por la misma citocromo P450 monooxigenasa del RE responsable de la conversión de geranilinalool en (E)-TMTT (Lee et al., 2010). El TMTT es un compuesto volátil que producen las plantas de *A. thaliana* cuando son atacadas por herbívoros, y su emisión atrae a los depredadores de estos herbívoros, por lo que es un claro mecanismo de defensa indirecto. Las plantas que sobreexpresan FaNES1 en las mitocondrias emiten nerolidol y DMNT, y resultan más atractivas para ácaros carnívoros depredadores como *Phytoseiulus persimilis* (Kappers et al., 2005).

Sin embargo, estas plantas también presentan un ligero retraso en el crecimiento de la roseta basal que podría deberse a una mejor disponibilidad de FPP para la síntesis de compuestos mitocondriales, al igual que sucedía con las plantas que sobreexpresaban FaNES1 en el cloroplasto (Aharoni et al., 2003).

Para evitar los efectos secundarios no deseados y aumentar la producción de volátiles, se ha intentado incrementar los niveles de FPP en las mitocondrias, coexpresando FaNES1 en las mitocondrias con FPS1L y el dominio catalítico de la isoforma HMGR1S. La expresión de HMGR1-CD no incrementa significativamente la producción de nerolidol y linalool respecto a la que se consigue al coexpresar FaNES1 y FPS1L, sin embargo, se consigue aumentar la proporción de plantas que emiten niveles elevados del sesquiterpeno.

En cualquier caso, la cantidad de volátiles emitidos por ambos tipos de plantas es significativamente mayor que la emitida por las plantas que expresan únicamente FaNES1 en las mitocondrias. En las hojas de los tres tipos de plantas también se detectó la acumulación de derivados no volátiles, glucosilados (pentosas y hexosas), acetilados y malonilados de hidroxinerolidol pero no del linalool, observándose siempre una correlación directa entre el nivel de estos compuestos y la cantidad de nerolidol emitido. Las líneas transgénicas emisoras de nerolidol resultaron claramente más atractivas que las plantas control para la avispa parasitoide beneficiosa *Diadegma semiclausum*, uno de los principales depredadores de la polilla de las crucíferas *Plutella xylostella* (Houshyani et al., 2013). Plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan FaNES1 y la isoforma FPS2 de *Arabidopsis* en las mitocondrias también repelen el pulgón *Brevicoryne brassicae* y atraen al parasitoide de áfidos *Diaeretiella rapae* (Kos et al., 2013).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Capítulo I

La enzima FPS ocupa una posición clave en la vía del MVA ya que a partir de sus sustratos, IPP y DAMPP, y del producto de la reacción que cataliza, FPP, se sintetizan compuestos isoprenoides imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de las plantas, y para su relación con el entorno. En *A. thaliana* existe una pequeña familia multigénica constituida por dos genes FPS, *AtFPS1* y *AtFPS2*, que codifican tres isoenzimas, FPS1L, FPS1S y FPS2. La caracterización de mutantes de *A. thaliana* con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* demostró que la actividad FPS es esencial para el desarrollo de las plantas, ya que el doble mutante *Atfps1:Atfps2* presenta letalidad embrionaria. Sin embargo, mutantes simples *Atfps1* y *Atfps2* son viables y prácticamente indistinguibles de las plantas wt, lo que sugiere que basta un gen funcional *AtFPS* para producir los niveles de precursores de isoprenoides necesarios para el desarrollo normal de la planta. La letalidad embrionaria del doble mutante hace imposible estudiar en profundidad la función y los mecanismos de regulación en los que se encuentran implicadas las isoenzimas FPS en las plantas adultas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el primer capítulo de esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Obtener mutantes *fps* de *Arabidopsis* condicionales que permitan atenuar la expresión de los genes *AtFPS* empleando una estrategia de silenciamiento inducible basada en el uso de microRNAs artificiales (amiRNA)
2. Determinar los efectos fenotípicos, bioquímicos y moleculares causados por el silenciamiento de los genes *AtFPS*, a fin de comprender mejor la función biológica de la FPS en las plantas.

Capítulo II

En respuesta al ataque por herbívoros, las plantas emiten mezclas complejas de compuestos volátiles que pueden ser disuasivas para los insectos herbívoros o atraer depredadores de dichos insectos. Los isoprenoides volátiles representan el grupo más abundante de compuestos volátiles emitidos por las plantas. El sesquiterpeno nerolidol es un componente habitual de dichas mezclas, que en los últimos años ha sido objeto de atención por su interés biotecnológico y económico. Uno de los factores limitantes para incrementar la producción de este compuesto parece ser la disponibilidad del sustrato FPP para las sesquiterpeno sintasas que catalizan su síntesis. Trabajos previos apuntan a que una parte importante, probablemente mayoritaria, del FPP citosólico se reserva específicamente para sintetizar esteroides en condiciones normales y, por lo tanto, no se encuentra disponible para fabricar otros terpenos. Esto puede explicar el bajo rendimiento obtenido en diversos intentos realizados para producir sesquiterpenos en el citosol mediante la expresión de diferentes sesquiterpeno sintasas. En cambio, la expresión de sesquiterpeno sintasas en otros compartimientos celulares, como el cloroplasto y la mitocondria, ha permitido superar los mecanismos homeostáticos que limitan la disponibilidad del FPP citosólico, a pesar de que las sesquiterpeno sintasas son enzimas que habitualmente se encuentran en el citosol. En este contexto, en el segundo capítulo de esta tesis se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Investigar si la redirección de la nerolidol sintasa de fresa FaNES1 a las membranas del retículo endoplasmático permite incrementar la producción de nerolidol en el compartimento citosólico, al facilitar el acceso de la enzima al sustrato FPP normalmente disponible para la síntesis de esteroides.
2. Aumentar la eficiencia de la síntesis de nerolidol creando enzimas bifuncionales FPS1/FaNES1 que permitan canalizar el IPP y el DMAPP citosólicos directamente hacia la síntesis de nerolidol.
3. Determinar si la expresión transitoria de las diferentes versiones de la enzima FaNES1 en hojas de *N. benthamiana* constituye una plataforma eficaz para estudiar la producción de nerolidol.

CAPÍTULO I

Estudio del silenciamiento de los genes farnesildifosfato
sintasa en Arabidopsis

RESULTADOS I

RESULTADOS I

Silenciamiento inducible de la expresión de los genes *AtFPS* mediante amiRNA.

Tal y como se ha indicado en la Introducción de este trabajo, la caracterización de plantas mutantes con pérdida de función FPS mostró que los mutantes simples *Atfps1* y *Atfps2* son viables y no presentan alteraciones fenotípicas relevantes respecto a las plantas wild type. En cambio, el doble mutante nulo *Atfps1::Atfps2* presenta letalidad embrionaria (Closa et al., 2010), lo cual imposibilita estudiar los efectos causados por su inactivación en plantas adultas. Para superar este obstáculo, se planteó utilizar una estrategia experimental basada en el silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* empleando microRNAs artificiales (Schwab et al., 2005). La utilización de un sistema inducible permitió que la generación y la propagación del mutante no se viesen afectadas por el silenciamiento de los genes *AtFPS*, ya que éste sólo se produce cuando se induce la expresión del amiRNA.

Para diseñar la secuencia de los amiRNA se empleó la herramienta bioinformática WMD (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), que permite generar una serie de secuencias candidatas para ser utilizadas como amiRNA contra el gen o genes de interés. Esta herramienta tiene en cuenta no sólo la homología de secuencia contra el gen diana sino también diversos parámetros mecánicos conocidos acerca del funcionamiento de los miRNAs endógenos de plantas, como por ejemplo, el potencial de energía libre total del híbrido, la posición y número de *mismatch* permitidos, o el apareamiento de pares de bases en posiciones críticas (Schwab et al., 2005). A partir de la secuencia de los cDNAs *AtFPS1* y *AtFPS2* se obtuvo una lista de secuencias candidatas de entre las que se escogieron dos, denominadas amiRFPSa y amiRFPSb que permiten silenciar simultáneamente los dos genes *AtFPS*, hibridando en regiones diferentes de los mRNAs correspondientes (Tabla 2). El hecho de utilizar dos secuencias de miRNA independientes, se debió a dos motivos: por un lado, asegurar el éxito del sistema ante la posibilidad de que una de ellas no fuese lo suficientemente efectiva para silenciar los genes *AtFPS* y, por otro, identificar aquellos efectos fenotípicos específicos (debidos al silenciamiento de los genes *AtFPS*), y

diferenciarlos de posibles efectos no deseados debidos al silenciamiento inespecífico de otros genes (*off-targets*).

Nombre	Secuencia	Posición	
		<i>AtFPS1</i>	<i>AtFPS2</i>
amiRFPSa	5'-TATTGCGAAGTAGAATCGCGT-3'	612 - 632	409 - 429
amiRFPSb	5'-TAGGTCAACATAGTAAGCCTT-3'	668 - 688	465 - 485

Tabla 2. Secuencia de los amiRNAs utilizados para silenciar simultáneamente los genes *AtFPS1* y *AtFPS2*. Se muestra la secuencia de los amiRFPSa y amiRFPSb, y las posiciones de hibridación con respecto al inicio de transcripción de los genes diana *AtFPS1* y *AtFPS2*.

Para atenuar la expresión de los genes *AtFPS* se combinó la tecnología de amiRNA (Schwab et al., 2005) con un sistema de expresión inducible activable por la hormona de insectos, ecdisona (Padidam et al., 2003). Dicho sistema fue adaptado para el uso en plantas mediante su clonación en el plásmido binario pBin-2800B (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004; Martínez-Andújar et al., 2011), el cual fue modificado cambiando el gen de selección por un gen que expresa la proteína DsRed que permite seleccionar visualmente las semillas transgénicas mediante la detección de su fluorescencia roja. Este sistema evita las selecciones rutinarias de crecimiento que tradicionalmente se realizan en medio de cultivo en presencia de antibióticos o herbicidas. El plásmido resultante, pB110-Red-2844 (Figura 11), fue cedido por el Dr. Ming Chen y el Dr. Edgar B. Cahoon, del Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Missouri, USA). Para activarlo se utiliza un agonista no esteroideo de la ecdisona llamado metoxifenocida (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004; Martínez-Andújar et al., 2011), distribuido bajo el nombre comercial de Runner®, que presenta la ventaja de no ser tóxico para la planta y ser efectivo a muy bajas concentraciones (del orden de μM) (Dhadialla et al., 1998; Koo et al., 2004). En este sistema, el factor de transcripción híbrido VGE se expresa constitutivamente a partir del promotor del virus del mosaico de la nervadura de Cassava (CsMVpro). En presencia de metoxifenocida, el factor quimérico VGE dimeriza y se une a la secuencia promotora 5xGAL:M35S, activando así la expresión de los genes situados bajo su control, en nuestro caso, los que permitirán generar los amiRFPSa y amiRFPSb (Figura 11).

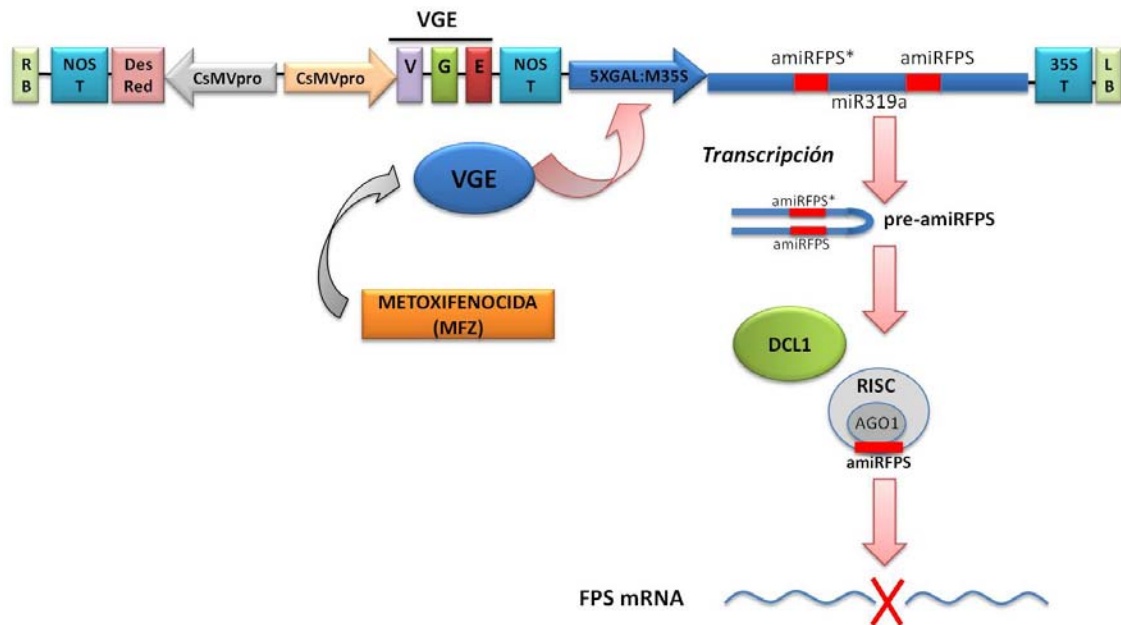


Figura 11. Diagrama esquemático de sistema inducible utilizado para silenciar la expresión de los genes *AtFPS* mediado por amiRNA. El cassette del vector expresa de forma constitutiva bajo el control del promotor *CsMVpro* (promotor del virus del mosaico de la nervadura de Cassava) un factor de transcripción híbrido inactivo (VGE) formado por tres dominios: el dominio de activación VP16AD (V), el dominio de unión a DNA GAL4DB (D), y el dominio del receptor de ecdisona EcR (E) (Dietrich et al., 2008). Los amiRNA diseñados se integran en el esqueleto del gen *miR319a*, que codifica para un precursor de miRNA (pre-miRNA) endógeno de *Arabidopsis*. En presencia del inductor químico metoxifenocida (Runner), el factor de transcripción dimeriza y se une al promotor diana *5xGAL:M35S* (que contiene 5 copias del elemento de respuesta a GAL4 fusionadas al promotor mínimo *CaMV35S*) activando la expresión del pre-miRNA bajo su control. Posteriormente, la maquinaria endógena de la planta, a través de las ribonucleasas de tipo *Dicer* (DCL1), produce amiRNAs específicos dirigidos para silenciar el gen diana a nivel post-transcripcional. La selección de plantas transgénicas se realiza mediante el marcador *DsRed*, que permite diferenciarlas por la fluorescencia roja de las semillas. Abreviaciones: RB, *right border*; Nos T, terminador del gen de la nopalina sintasa; 35S T, terminador 35S; LB, *left border*.

Las construcciones pre-amiRFPS a y b (que contienen los amiRFPSa y amiRFPSb integrados en el esqueleto del pre-amiRNA *miR319a*) se generaron mediante la técnica de PCR *overlap* y se clonaron en el plásmido pB110-Red-2844, dando origen a los plásmidos pB110Red-amiRFPSa y pB110Red-amiRFPSb. Con estos plásmidos se transformaron plantas de *A. thaliana*; ecotipo wt Col-0 y los mutantes *Atfps1-1* y *Atfps2-1* (Closa et al., 2010), a través de infiltración mediada por *Agrobacterium* (Clough and Bent, 1998). El objetivo de transformar las plantas de los fondos mutantes *Atfps*, además de las plantas wt Col-0, fue facilitar la obtención de líneas en las que el silenciamiento de la actividad FPS fuese más eficiente, ya que en estas plantas, sólo existe un gen *AtFPS* funcional. Además, los tres fondos mutantes fueron transformados

con el plásmido pB110-Red-2844 vacío, con la finalidad de generar líneas que pudieran ser utilizadas como controles negativos del sistema de silenciamiento inducible. Estas líneas se denominaron EV (*empty vector*).

Las semillas transgénicas resultantes se seleccionaron gracias a la detección de la fluorescencia roja (generación T1). Mediante el análisis de la segregación de la fluorescencia roja en las semillas de la generación T2 se seleccionaron líneas con una sola inserción del transgén que, posteriormente, se propagaron hasta obtener líneas T3 homocigotas. Finalmente, se seleccionó una línea de cada construcción en cada uno de los fondos genéticos para su posterior caracterización fenotípica y molecular.

1. Estudio de los efectos causados por el silenciamiento inducible de los genes *AtFPS*.

Para determinar los efectos del silenciamiento de los genes *AtFPS*, las plantas homocigotas portadoras de las construcciones amiRFPS a y b de los fondos genéticos wt Col-0, *Atfps1-1* y *Atfps2-1*, y sus respectivos controles EV, se sembraron en medio MS y MFZ (medio MS suplementado con metoxifenocida 30 μ M). Inicialmente, las semillas se germinaron en medio MS y MFZ, y las plántulas se dejaron crecer durante 10 días en condiciones de día largo (Figura 12). Las plántulas portadoras de los dos amiRNAs crecidas en medio MFZ mostraron un fenotipo similar, indicando que el efecto observado era específico del silenciamiento de los genes *AtFPS* y no de un artefacto (*off-target*). Este fenotipo estaba caracterizado por una reducción importante del tamaño de la planta y una clorosis en cotiledones y hojas. No obstante, se detectaron algunas diferencias a nivel cuantitativo entre los dos microRNAs. Así, las plantas portadoras de la construcción amiRFPSa mostraron un fenotipo más severo que las correspondientes líneas amiRFPSb. Por otro lado, también se observaron diferencias fenotípicas cuantitativas entre los diferentes fondos genéticos. Las plantas Col-0 amiRFPSa y Col-0 amiRFPSb mostraron un tamaño reducido y una clorosis generalizada, mientras que la reducción de tamaño y la clorosis en hojas y cotiledones de las plantas equivalentes en el fondo *Atfps1-1* fue menor. Por otro parte, el fenotipo en el fondo mutante *Atfps2-1* fue mucho más severo, con plántulas muy pequeñas, totalmente albinas y sin raíz, independientemente del amiRNA considerado.

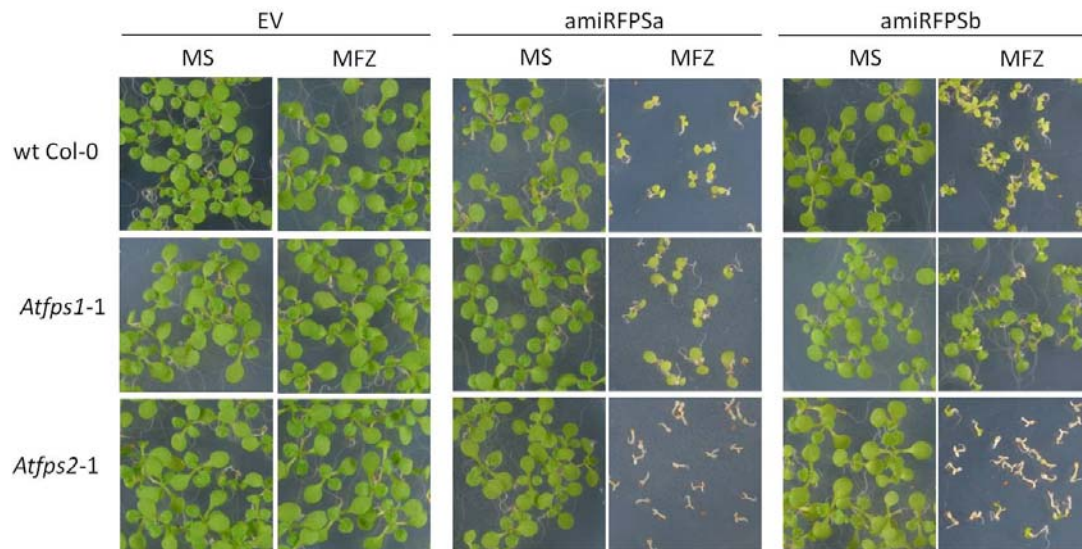


Figura 12. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* mediado por *amiRFPSa* y *amiRFPSb* sobre el fenotipo. Imágenes representativas de plántulas transgénicas de los fondos genéticos wt Col-0, *Atfps1-1* y *Atfps2-1*, portadoras de los *amiRFPS* a y b, crecidas desde la germinación en medios MS y MFZ (medio MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida) durante 10 días, en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad). EV indica las plántulas de los distintos fondos genéticos transformadas con el vector binario pB110-Red-2844 vacío. Imágenes obtenidas con una cámara Nikon D7000.

Al observar las raíces, también se detectó una reducción dramática de su crecimiento. Para inspeccionar mejor este fenotipo, las semillas de las mismas líneas se sembraron en placas de medio MS y MFZ y se dispusieron verticalmente. Las plántulas se dejaron crecer durante 7 días en condiciones de día largo. En la Figura 13 se muestran plántulas crecidas en MFZ de las líneas Col-0 portadoras de los *amiRFPS* a y b. A partir de este punto y para simplificar la nomenclatura, la línea Col-0 *amiRFPSa* se identificó con el nombre de “A”, y la línea Col-0 *amiRFPSb* con el nombre de “B”. Además también se analizaron las raíces de las plántulas de la línea Col-0 EV que se identifican en la figura como EV. Las plántulas de las líneas A y B mostraron una raíz mucho más corta que las plántulas control EV, además del fenotipo ya descrito en la parte aérea. En el caso de las plantas crecidas en medio MS no se observó ninguna alteración fenotípica (datos no mostrados).

En las condiciones experimentales descritas, el silenciamiento de la expresión de los genes *AtFPS* provocó un claro retraso en el crecimiento en todos los fondos genéticos (especialmente dramático en los mutantes *Atfps2*), que daba lugar a poblaciones de plantas cuyos estadios de desarrollo eran difícilmente comparables con los de las correspondientes plantas control. Este hecho dificultó enormemente la

obtención de datos fisiológicos comparables entre las plantas silenciadas y las no silenciadas. Frente a esta dificultad y con el objetivo de obtener muestras de plantas en un estadio de desarrollo parecido, las líneas transgénicas se hicieron germinar y crecer durante varios días en medio MS y luego se transfirieron al medio MFZ en el que se dejaron crecer durante algunos días más. Las plántulas se crecieron sobre discos de papel filtro, que permitían mantener la permeabilidad del medio sin interferir en el proceso de germinación y crecimiento, y transferirlas de forma rápida y sencilla al nuevo medio de crecimiento.



Figura 13. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre la longitud de las raíces. Comparación de la longitud de la raíz en plántulas de las líneas EV, A y B, crecidas durante 7 días en medio MFZ. Imágenes obtenidas con una cámara Nikon D7000. En el panel inferior se muestra una imagen ampliada de las mismas plántulas. Imagen obtenida con estereoscopio Olympus SZX16. Barra de escala 2 mm.

Para probar este nuevo diseño experimental y dado que en las plantas transgénicas del fondo wt Col-0 el sistema de silenciamiento resultaba suficientemente eficiente, se decidió empezar por la optimización de estas condiciones de crecimiento en las líneas del fondo Col-0 A y B, que portaban los amiRFPS a y b respectivamente.

Una vez determinadas las líneas a caracterizar se realizaron dos tratamientos con el fin de buscar unas condiciones que permitieran obtener plantas en un estadio de desarrollo comparable. El primer ensayo consistió en germinar las semillas en medio MS, crecerlas durante 7 días en condiciones de día largo y, a continuación, traspasarlas a medio MFZ manteniéndolas durante 7 días más en las mismas condiciones de régimen lumínico, temperatura y humedad. El segundo ensayo consistió en germinar las semillas y crecerlas durante 3 días en medio MS, para luego traspasarlas a medio MFZ y mantenerlas 5 días más en las mismas condiciones. En ambos ensayos se utilizaron las líneas transgénicas A y B del fondo Col-0 que portaban las construcciones *amiRFPS a* y *b* respectivamente, y la correspondiente línea control EV. En todos los casos se realizó también un experimento control en paralelo, en el que las mismas líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS, y luego transferidas nuevamente a medio MS durante los mismos intervalos de tiempo que las plantas transferidas a medio MFZ.

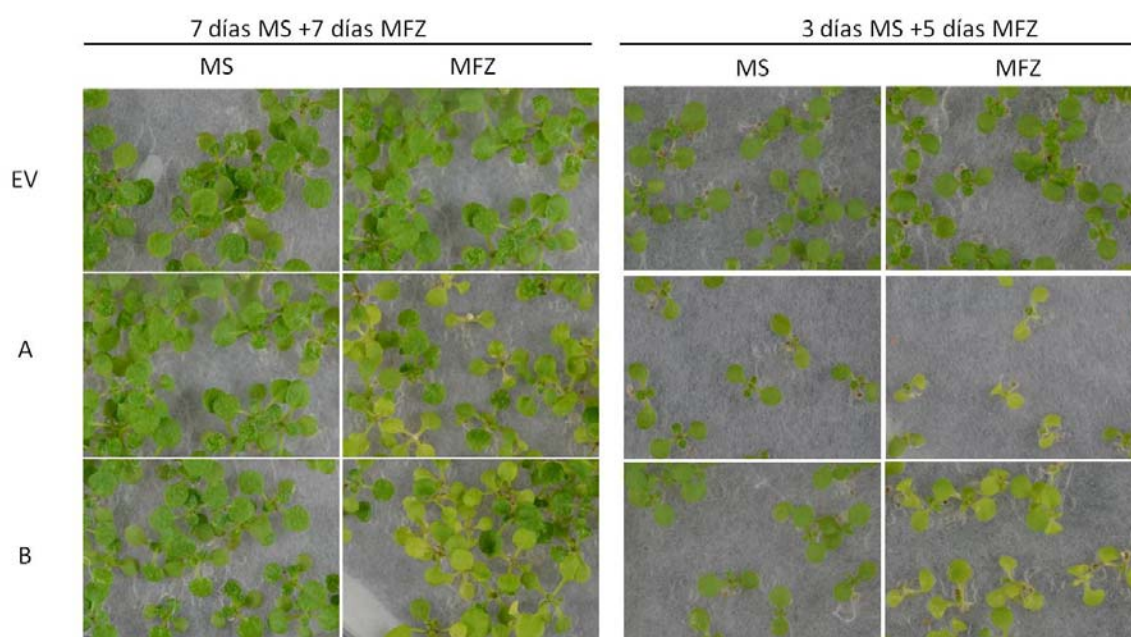


Figura 14. Efecto de las condiciones de tratamiento con metoxifenocida sobre el fenotipo causado por el silenciamiento de los genes *AtFPS*. Imágenes representativas de plántulas germinadas y crecidas sobre discos de papel de filtro en medio MS y traspasadas a MFZ (o MS como control). En los paneles de la izquierda se muestran las plantas crecidas durante 7 días en MS y 7 días en MFZ. Se observa la heterogeneidad en los fenotipos de reducción de tamaño y clorosis. En los paneles de la derecha se muestran las plantas crecidas durante 3 días en MS + 5 días en MFZ. En estas condiciones la población de plántulas muestra una respuesta más homogénea para ambos fenotipos. Los experimentos se realizaron en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad). Imágenes obtenidas con una cámara Nikon D7000.

En la Figura 14 se muestra el resultado de los ensayos descritos anteriormente. En el primer caso (7 días en MS + 7 días en MFZ) se observó que las plántulas presentaban un fenotipo de clorosis y una ligera disminución de tamaño. Sin embargo, la población se comportó de forma heterogénea, pudiéndose observar desde plantas muy cloróticas y pequeñas hasta plantas prácticamente verdes y del mismo tamaño que las plantas control. En el segundo caso (3 días en MS + 5 días en MFZ), la alteración del fenotipo fue más homogénea. La clorosis fue evidente en todas las plántulas y la etapa del desarrollo resultó suficientemente comparable con la de las plántulas control. Por lo tanto, estas condiciones experimentales fueron las elegidas para continuar caracterizando la respuesta al silenciamiento de los genes *AtFPS*.

2. Caracterización molecular de las líneas A y B.

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento e inducción, se procedió a la caracterización molecular de las líneas. En primer lugar se determinaron los niveles de mRNA de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* en plantas de las líneas A, B y EV mediante PCR semi-cuantitativa, utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen descritos previamente (Closa et al., 2010), así como oligonucleótidos específicos para el gen *AtPP2A*, comúnmente utilizado como *housekeeping* en Arabidopsis (Czechowski et al., 2005). En la Figura 15a se puede apreciar que los niveles de mRNA de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* se reducían drásticamente en las plantas de las líneas A y B crecidas en medio MFZ, con respecto a los niveles observados en plantas de las mismas líneas crecidas en medio MS, o con respecto a los de las plantas EV crecidas tanto en medio MS como MFZ, confirmando así que los dos amiRNAs son capaces de silenciar simultáneamente la expresión de ambos genes *AtFPS*.

Por último, se observó que las plantas de las líneas transgénicas A, B y EV, crecidas en medio MS, presentaban niveles de expresión de los genes *AtFPS* similares entre sí.

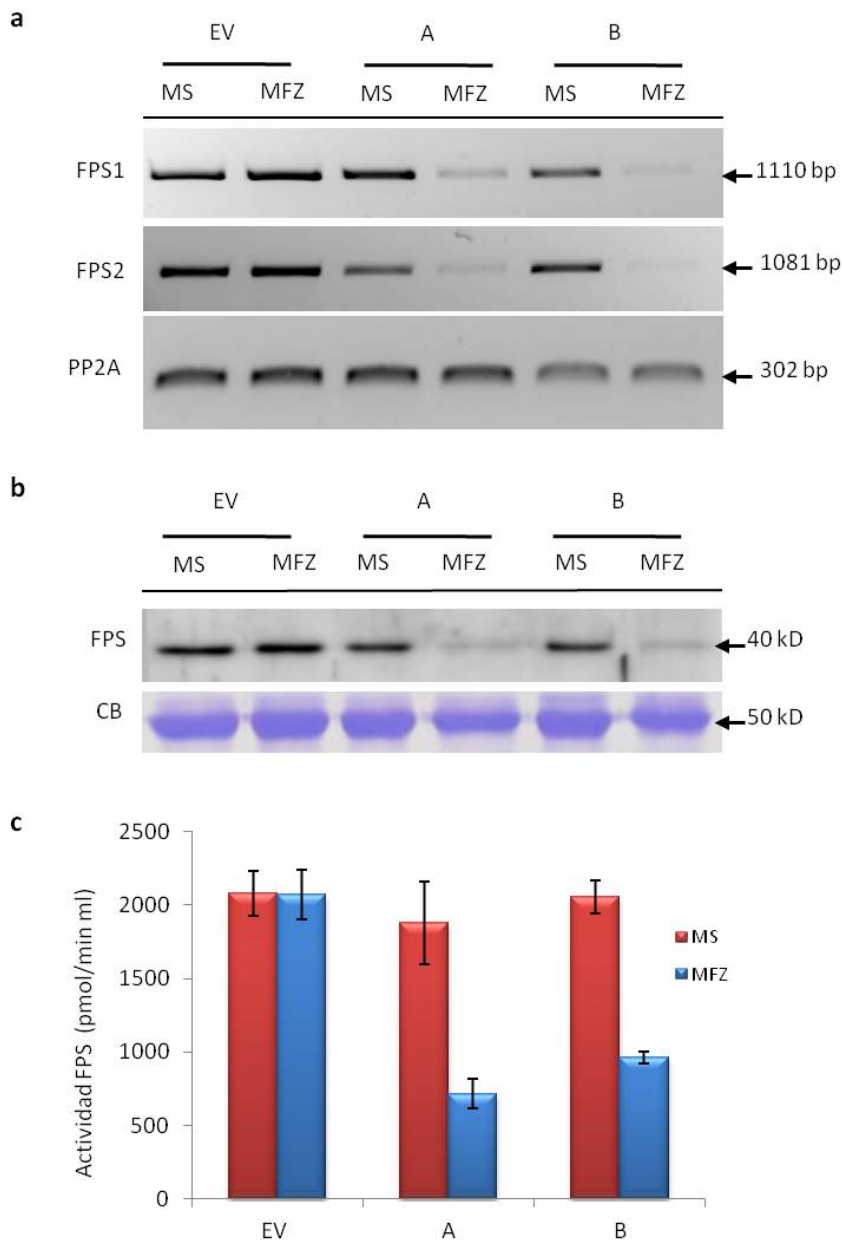


Figura 15. Análisis de los niveles de mRNA *AtFPS1* y *AtFPS2*, y de proteína FPS. (a) Amplificación por PCR de fragmentos de cDNA de 1110 pb del gen *AtFPS1*, 1081 pb del gen *AtFPS2* y 302 pb del gen de referencia *AtPP2A*, (*At1g13320*) obtenido a partir de RNA de plántulas de las líneas A, B y EV germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. **(b)** Niveles de proteína FPS en extractos proteicos de las mismas plántulas de las líneas A, B y EV. Los extractos proteicos (7 μ g del sobrenadante de 16000 x g) se fraccionaron en gel de SDS-PAGE al 9% de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-FPS a una dilución 1:8000 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:50000). El tamaño de la proteína FPS se indica a la derecha de la imagen. El panel inferior muestra la región de la membrana de PDVF donde se localiza la subunidad grande de la RuBisCo teñida con Coomassie blue. **(c)** Actividad FPS. Los niveles de actividad FPS se determinaron en el sobrenadante 16000 x g de extractos proteicos provenientes de plántulas de las líneas A, B y EV en MS y MFZ germinadas y crecidas según diseño experimental descrito (3 días MS + 5 días MFZ). Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

A continuación, se procedió a determinar los niveles de proteína FPS en extractos totales (sobrenadante de 16000 x g) de las mismas plantas anteriormente mencionadas, empleando los anticuerpos anti-FPS generados con anterioridad en nuestro laboratorio. Dichos anticuerpos reconocen simultáneamente las tres isoenzimas FPS de *Arabidopsis* (Masferrer et al., 2002). En la Figura 15b se observa que en los extractos proteicos de plántulas de las líneas A y B crecidas en medio MFZ, la cantidad de proteína FPS disminuía drásticamente en comparación con el nivel de proteína FPS detectado en extractos de plántulas de las mismas líneas crecidas en medio MS, o de plántulas de la línea EV crecidas en medio MS y MFZ.

Finalmente, se procedió a cuantificar los niveles de actividad FPS en las plántulas de todas estas mismas líneas crecidas en MS o en MFZ. En la Figura 15c se muestran los resultados, en donde se observa una importante disminución (entre el 60 y el 70%) de los niveles de actividad FPS en las plántulas de la línea A y B silenciadas (MFZ) respecto a los niveles detectados en las plantas control (MS).

En conjunto, los resultados demostraron que el sistema de silenciamiento inducible funciona de forma muy eficiente en ambas líneas transgénicas, ya que al activarse por efecto de la metoxifenocida se consigue una importante reducción de la expresión de los dos genes *AtFPS* de forma simultánea.

3. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre los niveles de esteroides

Como se ha mencionado en la Introducción, los productos finales mayoritarios derivados de la vía del MVA son los esteroides (Schaller, 2004), por lo que cabía esperar que una disminución de los niveles de FPS tan drástica como la observada al silenciar la expresión de los genes *AtFPS* fuese acompañada de una disminución del contenido de esteroides.

Para analizar el efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre el contenido de esteroides, los niveles de estos metabolitos se determinaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en plántulas de las líneas A, B y EV crecidas en papel de filtro en las condiciones descritas más arriba. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de los genes *AtFPS* provocó una reducción

significativa de los niveles de esteroides más abundantes (Figura 16). Así, los niveles de sitosterol y campesterol se redujeron entre un 20 y un 30% en las plántulas de las líneas A y B crecidas en medio MFZ, con respecto a las plántulas de las mismas líneas crecidas en medio MS. En el caso de los niveles de estigmasterol, la disminución fue aún más evidente, alrededor de 50 % en las plántulas crecidas en medio MFZ con respecto a las crecidas en medio MS. No se observó ningún efecto del tratamiento MFZ sobre los niveles de esteroides en la línea control EV. Estos resultados confirmaron que el silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una reducción del flujo de la vía del MVA y, en particular, de la síntesis de esteroides.

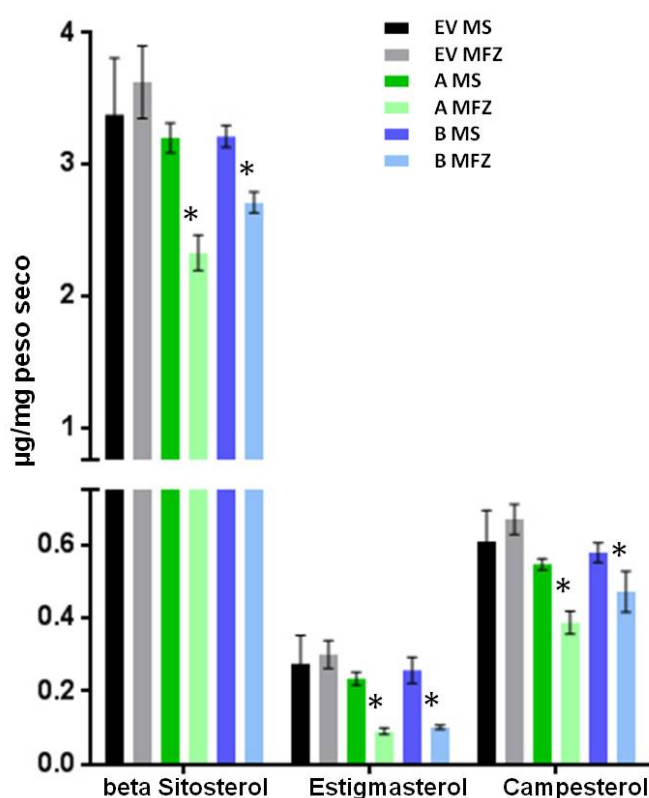


Figura 16. Análisis de los niveles de esteroides. Los niveles de sitosterol, estigmasterol y campesterol se determinaron mediante GC-MS en extractos de plántulas de las líneas A, B y EV germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar. El asterisco indica las diferencias significativas (t-test, $p < 0,05$)

4. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre la actividad HMGR

La HMGR cataliza la conversión del HMG-CoA en MVA y es la principal enzima reguladora del flujo de la vía del MVA. Trabajos recientes han demostrado que la actividad HMGR se incrementa en respuesta al bloqueo genético (Babiychuk et al., 2008; Posé and Botella, 2009) y farmacológico (Wentzinger et al., 2002; Nieto et al., 2009) de la síntesis de esteroides, y que esta activación se produce a nivel post-transcripcional (Nieto et al., 2009). En este contexto, se decidió analizar si la disminución de los niveles de actividad FPS y, en consecuencia, de los niveles de esteroides en las líneas transgénicas A y B crecidas en medio MFZ, también provocaba una activación de la HMGR. Para ello, se midieron los niveles de actividad HMGR en extractos totales (sobrenadante de 200 x g) de plántulas de las líneas A, B y EV germinadas y crecidas en las condiciones habituales. Los resultados en la Figura 17 confirmaron una fuerte inducción de la actividad HMGR en las plántulas de las líneas A y B crecidas en MFZ, con respecto a los niveles detectados en las mismas plántulas crecidas en medio MS y en las plántulas de la línea EV crecidas en medio MS o MFZ. La línea A mostró un aumento en los niveles de actividad HMGR de unas 5 veces respecto a su control, mientras que en la línea B este aumento fue de aproximadamente 3 veces. En paralelo, se analizaron los niveles de proteína HMGR por Western blot en los mismos extractos en los que se midió la actividad enzimática. Para ello, se utilizó un anticuerpo policlonal generado previamente en nuestro laboratorio (Manzano et al., 2004) contra el dominio catalítico de la isoenzima HMGR1S de *Arabidopsis* y que reconoce simultáneamente a las tres isoformas de HMGR (HMGR1S, HMGR1L, HMGR2) (Campos and Boronat, 1995).

Como se muestra en la Figura 18, los niveles de proteína HMGR de las líneas A y B crecidas en medio MFZ, no mostraron cambios significativos con respecto a los existentes en los extractos provenientes de estas mismas líneas crecidas en medio MS, ni con respecto a los extractos de la línea EV, utilizada como control.

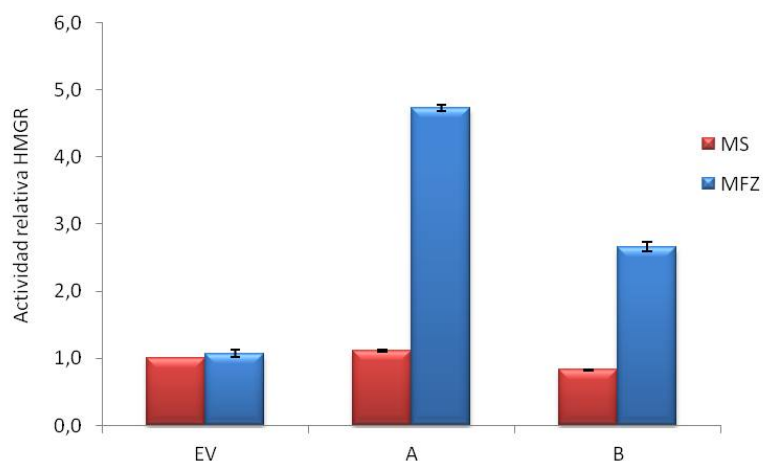


Figura 17. Análisis de los niveles de actividad HMGR. La actividad HMGR se midió en extractos totales (sobrenadante de 200 x g) de plántulas germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. Los resultados se expresan como valores de actividad relativa respecto a la actividad en la línea Col-0 EV crecida en MS, a la cual se le asignó un valor de 1. Los valores obtenidos son la media de 3 replicas técnicas.

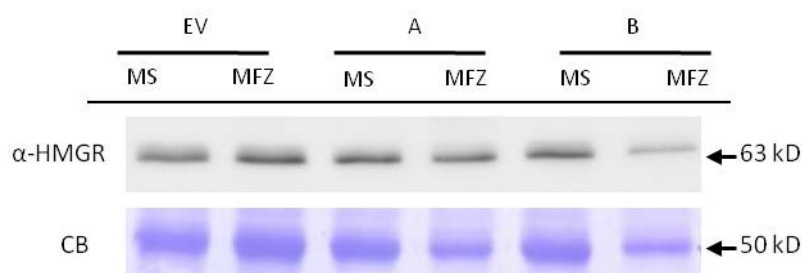


Figura 18. Análisis de los niveles de proteína HMGR. Niveles de proteína HMGR en extractos proteicos de plántulas germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. Los extractos proteicos (5µg del sobrenadante de 200 x g) se fraccionaron en gel de SDS-PAGE al 9% de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-HMGR a una dilución 1:20000 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:50000). El tamaño de la proteína FPS se indica a la derecha de la imagen. El panel inferior muestra la región de la membrana de PDVF donde se localiza la subunidad grande de la RuBisCo teñida con Coomassie blue.

Finalmente, se analizaron los niveles de mRNA de los dos genes que codifican HMGR en *A. thaliana* (*AtHMG1* y *AtHMG2*) mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) utilizando *primers* específicos para dichos genes (Nieto et al., 2009) y RNA extraído de plántulas de las mismas líneas transgénicas crecidas en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos demostraron que no hay cambios significativos en los niveles de mRNA de los genes HMGR en las plantas de las líneas A y B crecidas en medio MFZ, con

respecto a los niveles detectados en las plantas de éstas mismas líneas crecidas en medio MS o en plantas de la línea EV, utilizada como control (Figura 19). Por lo tanto, a partir del conjunto de resultados obtenidos al analizar los niveles de actividad, proteína y mRNA de HMGR en las plántulas en las que se ha silenciado la expresión de los genes *AtFPS*, se puede concluir que se produce un aumento de la actividad HMGR a través de mecanismos que operan a nivel post-traduccional.

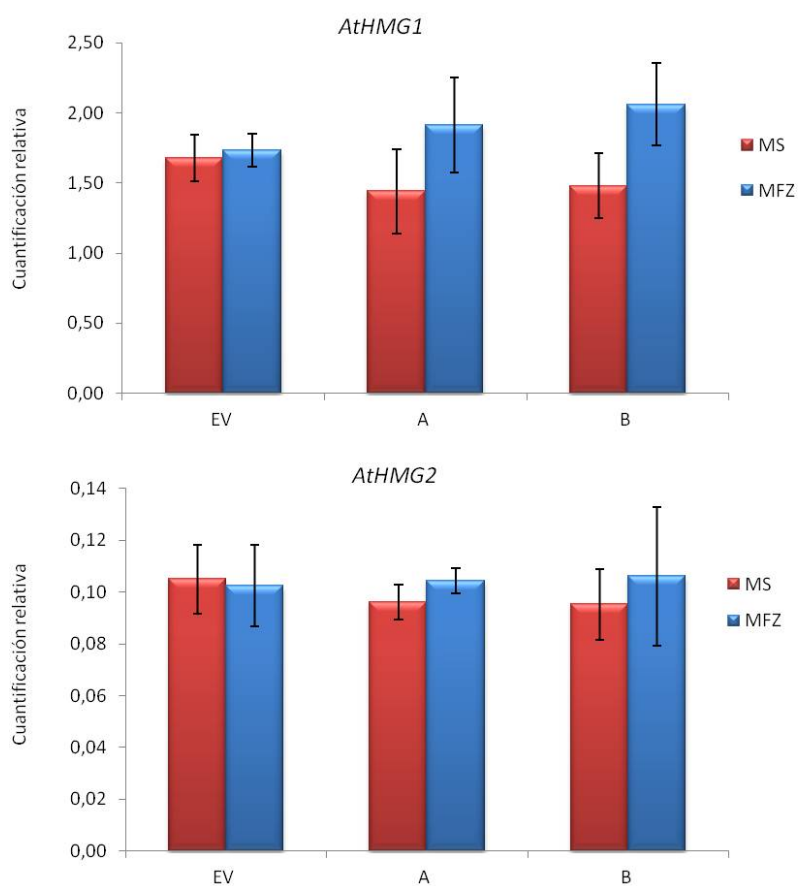


Figura 19. Análisis de los niveles de mRNA de los genes *AtHMG*. Niveles de mRNA de (a) *AtHMG1* y (b) *AtHMG2* en plántulas de las líneas A, B y EV germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. La cuantificación relativa de los niveles de mRNA de los genes *AtHMG1* (a) y *AtHMG2* (b) se llevó a cabo mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001), empleando como referencia los niveles de mRNA del gen housekeeping *AtPP2AA3* (*At1g13320*). Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos \pm la desviación estándar. El análisis estadístico (t-test, $p < 0,05$) no mostró cambios significativos.

5. El silenciamiento de los genes *AtFPS* altera la estructura de los cloroplastos.

El fenotipo provocado por el silenciamiento de los genes *AtFPS* se caracteriza por una fuerte clorosis en cotiledones y hojas verdaderas, lo cual sugiere que la función cloroplastídica podría estar afectada. Un primer análisis mediante microscopía láser confocal, puso de manifiesto una marcada reducción en el número y el tamaño de los cloroplastos en las hojas de las plántulas de las líneas A y B en medio MFZ con respecto a las plántulas de las mismas líneas crecidas en medio MS o las plántulas de la línea EV crecidas en medio MS o MFZ (Figura 20a).

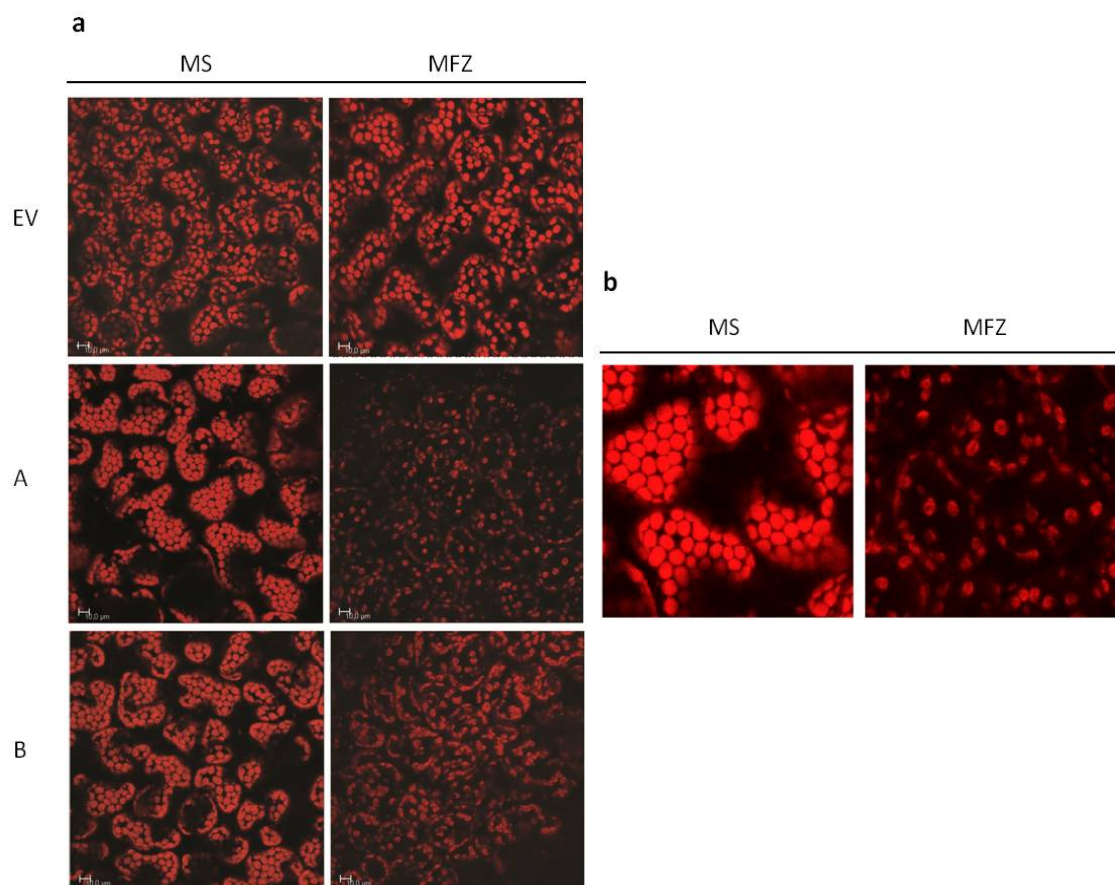


Figura 20. Análisis de los cloroplastos en hojas de plántulas de las líneas A, B y EV. (a) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal de cloroplastos de hojas de plántulas germinadas y crecidas sobre papel del filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ. **(b)** Ampliación de la imagen correspondiente a los cloroplastos de hojas de plántulas de la línea A. Las imágenes son una proyección tridimensional entre secciones de 1,5 μm cada una. Las barras blancas indican una escala de 10 μm . Imágenes obtenidas con TCS SP5 confocal II (Leica).

Un análisis más detallado permitió ver, además, que los cloroplastos de las plantas en las que se había silenciado la expresión de los genes *AtFPS* presentaban una

fluorescencia menos intensa y zonas más oscuras que sugerían la existencia de alteraciones estructurales en estos orgánulos (Figura 20b).

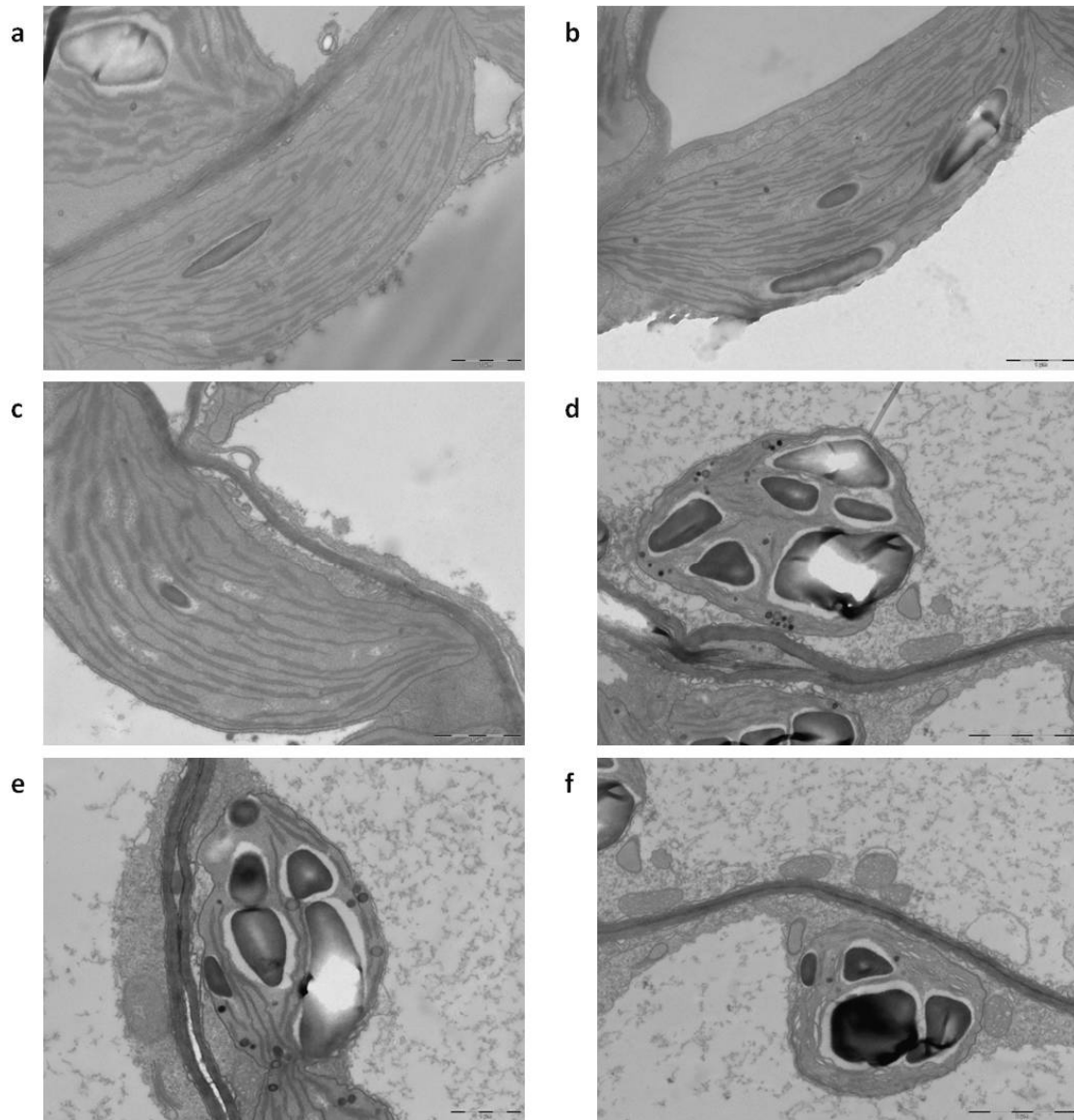


Figura 21. Análisis de la ultraestructura de los cloroplastos en hojas de plántulas de las líneas A y EV. (a y b) Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de cloroplastos de hojas de plántulas de la línea EV crecidas en MS y MFZ, respectivamente (escala 1 μ m), (c) de la línea A crecidas en MS (escala 1 μ m), y (d, e y f) de la línea A crecidas en MFZ (escala 2 μ m). Las plántulas fueron germinadas y crecidas durante 3 días en MS y 5 días más en MS o en MFZ. Las imágenes fueron registradas con una cámara CCD Megaview III.

Con el objetivo de investigar más detalladamente este aspecto, se procedió a analizar la ultraestructura de los cloroplastos mediante microscopía electrónica de transmisión. Como se muestra en la Figura 21, los cloroplastos de hojas de plántulas de

la línea A crecidas en medio MFZ presentaron una serie de alteraciones ultraestructurales evidentes en comparación con los de las hojas de las mismas plantas crecidas en medio MS. Por un lado se observó la presencia de partículas de gran tamaño que ocupan gran parte del orgánulo y que corresponden, muy probablemente, a gránulos de almidón y, por otro, un aumento en el número de pequeñas vesículas electrodensas que pueden corresponder a plastoglóbulos. Además, los tilacoides se encuentran enormemente reducidos y de manera desorganizada. En cambio, estas alteraciones no se observaron en las plántulas de la línea EV en ninguna de las condiciones de crecimiento (MS o MFZ) (Figura 21).

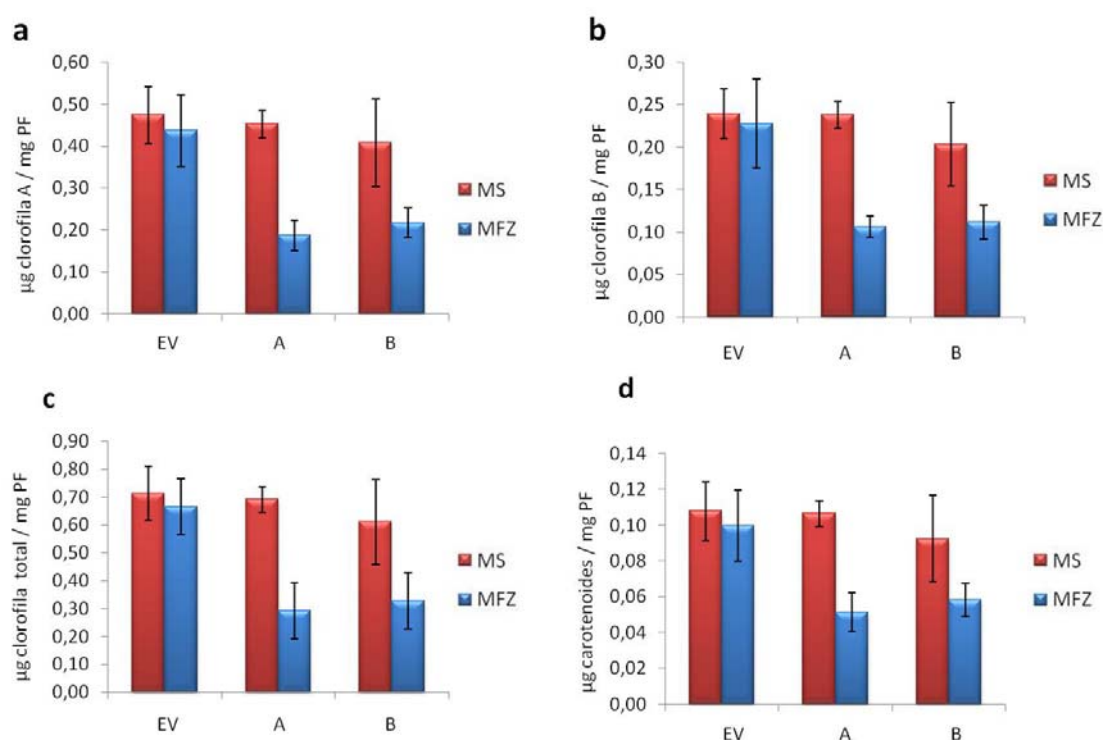


Figura 22. Análisis de los niveles de clorofilas y carotenoides. Los niveles de clorofila a (a), clorofila b (b), clorofilas totales (c) y carotenoides totales (d) se determinaron mediante espectrofotometría en extractos acetónicos de plántulas de las líneas A, B y EV, crecidas durante 3 días en MS y 5 días más en MS o MFZ

A de fin de averiguar, si la alteración de la estructura de los cloroplastos se acompañaba de una disminución de los niveles de clorofilas y carotenoides, se cuantificaron espectrofotométricamente los niveles de estos pigmentos en extractos acetónicos (Fraser et al., 2000) de plantas de las líneas A, B y EV crecidas en medio MS o MFZ según el diseño experimental habitual. En la Figura 22 se puede observar que

los niveles de estos metabolitos se redujeron drásticamente cuando las plantas de las líneas A y B fueron crecidas en medio MFZ, en comparación con las plantas de las mismas líneas crecidas en MS. La reducción de los niveles de la clorofila a, b y de carotenoides totales fue superior al 50 %, mientras en la línea EV no se observó ninguna variación de los niveles de estos metabolitos entre las plantas crecidas en medio MFZ o MS.

6. Efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre la expresión génica global

Con el fin de conocer y analizar la respuesta en la expresión génica de la planta frente al silenciamiento de los genes *AtFPS* se realizó un análisis transcriptómico mediante la tecnología conocida como RNA-seq. Esta tecnología permite obtener una caracterización exhaustiva de la expresión génica en una etapa específica del desarrollo o condiciones fisiológicas determinadas (Wang et al., 2009; Garber et al., 2011; Egan et al., 2012; Ward et al., 2012). El objetivo principal de esta aproximación es, por lo tanto, buscar genes expresados diferencialmente en respuesta al silenciamiento inducible de los genes *AtFPS*. Los resultados de este estudio pretenden obtener mayor información sobre la función de los genes *AtFPS* y sus isoenzimas en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides, así como detectar la posible interacción de esta vía con otras rutas metabólicas o de señalización. Para ello, se utilizó como modelo experimental la línea A (Col-0 amiRFPSa) crecida en medio MS (situación control) y en medio MFZ (inducción del silenciamiento) según el diseño experimental habitual. El análisis se realizó mediante la plataforma de secuenciación masiva *Illumina*. Ésta plataforma se presentó como la mejor opción, en términos económicos para la secuenciación.

6.1. Extracción, cuantificación y control de calidad del RNA

Un paso importante para el éxito del análisis mediante RNA-seq es la obtención de un RNA de buena calidad que represente a todos los transcritos. Es por ello que la integridad de las moléculas de RNA de la muestra es un parámetro de suma importancia para los experimentos que tratan de reflejar la expresión génica al

momento de la extracción del RNA (Schroeder et al., 2006). Para el análisis de RNA-seq se generaron dos muestras de RNA (AMS y AMFZ). Cada una de ellas corresponde a una mezcla de RNA provenientes de tres réplicas biológicas de plántulas de la línea A, germinadas y crecidas en MS o en MFZ, según diseño experimental utilizado habitualmente. Para evaluar la calidad y la integridad del RNA, todas las muestras fueron analizadas mediante la plataforma de *Bionalyzer Expert 2100* (Agilent Technologies). El análisis individual de cada una de las replicas utilizadas mostró un alto nivel de calidad e integridad del RNA (datos no mostrados). A continuación, se obtuvo la mezcla de RNAs, por cada tratamiento, y las muestras resultantes fueron analizadas nuevamente. En la Figura 23 se observan los electroferogramas correspondientes a las muestras destinadas a secuenciar por cada tratamiento (AMS y AMFZ). En el resultado no se observó ninguna alteración en la relación entre los RNA 18S y 28S ribosomales, ni degradación evidente en ninguna de estas bandas. Por otro lado, el *RIN* (parámetro basado en el rastro electroforético del RNA al completo y no sólo de los rRNAs) de la muestra AMS fue de 9,2, mientras para la muestra AMFZ fue de 9,4. Estos valores implican una alta calidad e integridad de la muestra de RNA, por encima del umbral requerido para el análisis de RNA-seq.

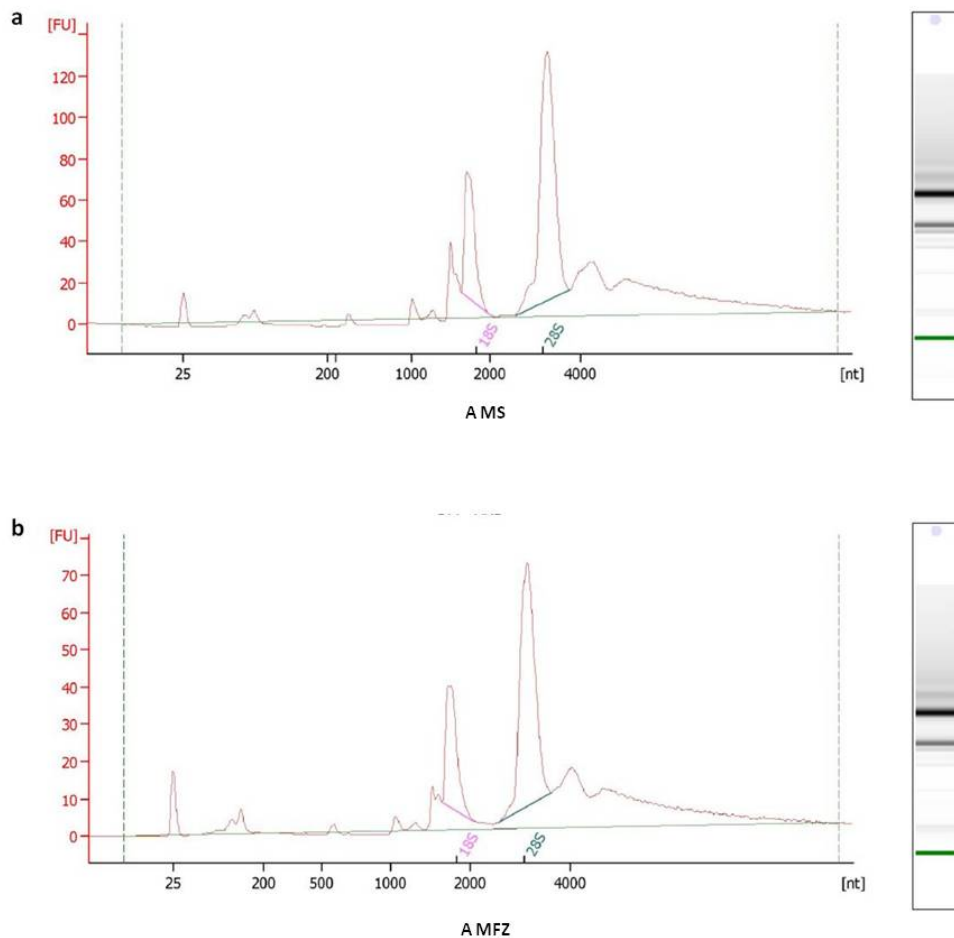


Figura 23. Análisis de la integridad del RNA de plántulas de la línea A en MS y MFZ. Electroferograma obtenido mediante *Bionalyzer Expert 2100* (Agilent Technologies). **(a) AMS:** Muestra de RNA proveniente de la mezcla de RNA de tres muestras biológicas independientes de plántulas de la línea A germinadas y posteriormente crecidas en papel de filtro durante 8 días en MS. *RIN*=9.2. **(b) AMFZ:** Muestra de RNA proveniente de la mezcla de RNA de tres muestras biológicas independientes de plántulas de la línea A germinadas y posteriormente crecidas en papel de filtro durante 3 días en MS y 5 días más en MFZ. *RIN*=9.4. La valoración numérica a través de *RIN* sugiere que las muestras de RNA presentaban una alta calidad e integridad.

6.2. Secuenciación masiva mediante la tecnología de RNA-seq

Para el análisis de secuenciación masiva, el RNA total (3 μ g) se fragmentó y se convirtió en una librería de cDNA. La librería se generó a partir de *HiSeq2000 Library Preparation TrueSeq mRNA Sample*.

Como ya se ha mencionado, se seleccionó la plataforma *Illumina*, la cual se basa en el principio de amplificación en puente y el uso de marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores reversibles (Metzker, 2010). El modelo

de plataforma utilizada para secuenciar los RNA de plántulas de la línea A fue *HiSeq2000 Sequencing 2x 100bp*. La longitud de las lecturas fue del rango de 90 a 100 nucleótidos, las cuales corresponden a lecturas obtenidas desde ambos extremos PE (*paired-end reads*). El alto número de lecturas generadas se almacenó y se analizó mediante diversos programas bioinformáticos que permitieron definir el grado de calidad global del proceso de secuenciación (apartado 7.5 de Materiales y métodos). A continuación, se llevó a cabo el pre-procesado de datos, y finalmente las lecturas obtenidas que superaron los filtros de calidad, fueron mapeadas y alineadas con un genoma de referencia. En este caso se utilizó el genoma de *A. thaliana* TAIR10, disponible en la red <http://www.arabidopsis.org>.

6.3. Selección y Expresión diferencial (DE) de los genes

Uno de los objetivos al emplear la tecnología de RNA-seq no es sólo identificar la presencia de transcritos, sino la de cuantificar el nivel de expresión de cada uno de ellos. En este sentido aquellos mRNAs cuyas lecturas se encuentren en alta proporción representarán niveles altos de expresión de un determinado gen y aquellos transcritos ausentes, o con un bajo número de lecturas, representarán genes que no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos (Schenk et al., 2012). La medida de abundancia de transcripción utilizada fue el *FPKM* (*fragments per kilobase of exon per million reads mapped*) (Trapnell et al., 2010). *FPKM* es parámetro que permite calcular la abundancia relativa de transcritos a partir de PE (*paired-end reads*) y es análoga a *RPKM* que sirve para cuantificar abundancias de SE (*single-end reads*) (Mortazavi et al., 2008). Los parámetros para la selección de genes expresados diferencialmente se fijaron en *fold_change* > 2 y < -2 y *q_value* < 0,05. El parámetro de *fold change*, corresponde a la división entre los valores de *FPKM* de la muestra AMFZ y la muestra AMS y se expresa en escala logarítmica negativa. Este valor permite correlacionar la expresión de un gen en dos condiciones distintas. Los datos se ordenan de mayor a menor según su valor de expresión diferencial.

6.4. Análisis de significación biológica. Enriquecimiento funcional de genes expresados diferencialmente

La comparación de los valores de expresión génica de las muestras AMS y AMFZ mediante la aplicación de estos parámetros, permitió generar una lista de 168 genes que se expresan diferencialmente como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS* (Anexo 1). Del total de genes expresados diferencialmente, 116 de ellos se identificaron como genes inducidos, mientras que sólo 16 genes se vieron reprimidos. Además se identificaron 36 genes con un *fold change* infinito. El *fold change* infinito indica que al comparar los resultados de los dos tratamientos analizados, algunos de los genes no se expresaban en uno de ellos (ya sea MS o MFZ), pero si se presentaban expresados de forma mínima o muy abundantemente en el otro. Una vez obtenida la selección de genes diferencialmente expresados, se procedió a identificar los procesos biológicos en los cuales se encuentran implicados. El objetivo de este análisis es establecer la relación que tienen estos procesos con el silenciamiento de los genes *AtFPS* y, por lo tanto, con el metabolismo de los isoprenoides. La implicación y la significancia biológica de los genes expresados diferencialmente se estudió agrupándolos en funciones y/o procesos biológicos similares mediante su proyección en términos de *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org/>) (Ashburner et al., 2000). GO es una base de datos que contiene anotaciones genéricas (independientes de especie) que describen procesos biológicos (BP), funciones moleculares (MF), y componentes celulares (CC) asociados con cada gen (Blake and Harris, 2008). Existen varios métodos y cada vez más herramientas para realizar análisis GO aunque se pueden reducir a unas pocas categorías (Mosquera and Sánchez-Pla, 2008). Los análisis GO para la selección de genes diferencialmente expresados se realizaron mediante el uso de la herramienta bioinformática *GeneCodis*. En la Figura 24 se observa un diagrama de sectores GO el cual muestra el número de genes agrupados según su implicación en diversos procesos biológicos.

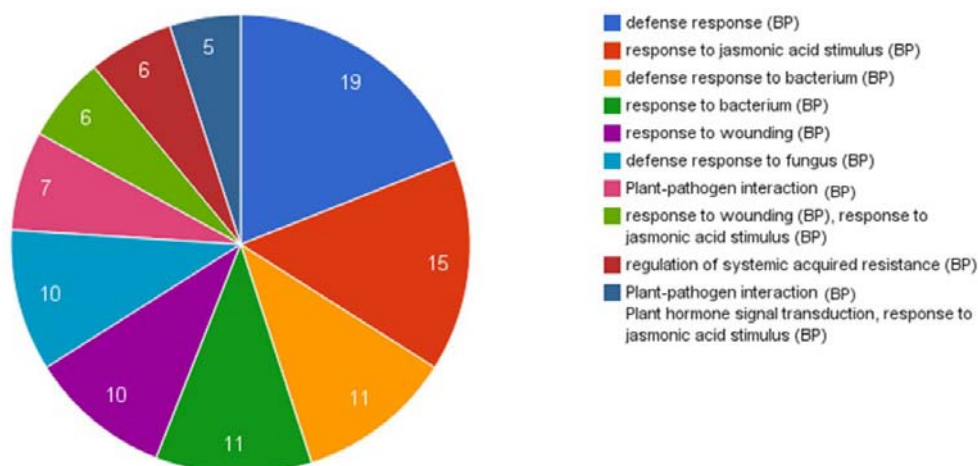


Figura 24. Diagrama de sectores con los términos GO de procesos biológicos (BP) enriquecidos. Análisis realizado mediante *GeneCodis* (Nogales-Cadenas et al., 2009; Carmona-Saez et al., 2007), a partir de la selección de genes expresados diferencialmente como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*. Los sectores corresponden a números de genes clasificados en cada categoría.

El análisis de enriquecimiento funcional de procesos biológicos (BP) mediante *GeneCodis* reveló que del total de 168 genes expresados diferencialmente, 69 de ellos (lo que representa el 41,1% del total) se encontraban implicados en procesos biológicos relacionados con respuestas de defensa de la planta. En coherencia con este resultado, también se detectaron 31 genes asociados a la ruta del ácido jasmónico y/o a la respuesta de la planta frente al daño mecánico (18,5% del total de genes expresados diferencialmente) (Figura 24). A continuación se realizó un análisis de enriquecimiento funcional por funciones moleculares (MF) (Figura 25). El resultado mostró que, del total de 168 genes expresados diferencialmente, 46 genes (27,4% del total) estaban asociados a diferentes categorías de funciones moleculares. De ellos, 15 genes (8,9% del total) se encontraban relacionados con la unión a metales, entre ellos varios genes relacionados con el metabolismo del hierro. Además se observó un total de 8 genes (4,8% del total) asociados al metabolismo antioxidante, de los cuales 6 de ellos (3,57% del total) corresponden a genes GST (glutación S-transferasa), relacionados con el estrés oxidativo (Figura 25).

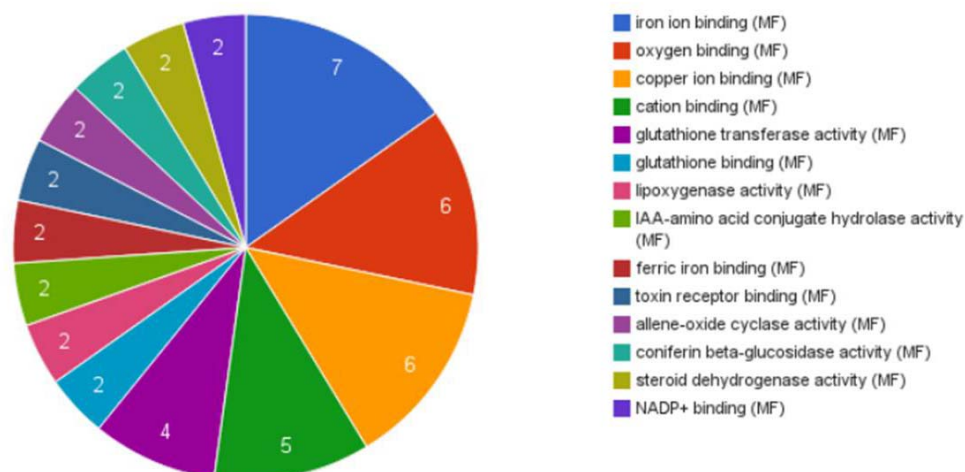


Figura 25. Diagrama de sectores con los términos GO de funciones moleculares (MF) enriquecidos. Análisis realizado con *GeneCodis* (Nogales-Cadenas et al., 2009; Carmona-Saez et al., 2007), a partir de la lista de genes expresados diferencialmente como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*. Los sectores corresponden a números de genes clasificados en cada categoría.

A continuación, se detallan algunos de los genes implicados en las respuestas biológicas o moleculares más importantes detectadas en el análisis mediante RNA-seq y su posterior proyección en términos de GO. En primer lugar, la Tabla 3 muestra una selección de algunos de los genes asociados a la respuesta provocada por ácido jasmónico. Entre ellos se encuentran genes relacionados con su síntesis, homeostasis y señalización, así como dos ejemplos significativos de genes diana de esta ruta. Los valores *fold change* de estos genes muestran que se encuentran fuertemente inducidos como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*. La respuesta mimetiza el perfil de expresión descrito como consecuencia de una activación de la señalización de esta ruta hormonal (Jung et al., 2007; Wasternack, 2013).

Por otro lado, y como ya se ha mencionado, entre los genes asociados a funciones moleculares, se identificaron 9 genes relacionados con el metabolismo del hierro y 8 genes asociados a estrés oxidativo, los cuales representan un 5,3 y 4,8% respectivamente del total de genes expresados diferencialmente. Curiosamente en ésta categoría GO, se identificó el gen *ABCG40* (un transportador de ABA y de otros isoprenoides), el cual se muestra altamente inducido.

Gen	AGI código	Fold change	Descripción
Síntesis			
<i>LOX4</i>	<i>At1g72520</i>	10,55	PLAT/LH2 domain-containing lipoxygenase family protein
<i>AOC1</i>	<i>At3g25760</i>	7,46	allene oxide cyclase 1
<i>JAR1</i>	<i>At5g13320</i>	24,25	<i>AtGH3.12</i>
Homeostasis			
<i>CYP94B</i>	<i>At3g48520</i>	25,99	cytochrome <i>P450</i> , family 94, subfamily B, polypeptide 3
<i>ST2a</i>	<i>At5g07010</i>	7,46	sulfotransferase 2
Señalización			
<i>JAZ1</i>	<i>At1g19180</i>	12,12	Jasmonate-ZIM-Domain protein 1
<i>JAZ5</i>	<i>At1g17380</i>	22,63	Jasmonate-ZIM-Domain protein 5
<i>JAZ6</i>	<i>At1g72450</i>	4,92	Jasmonate-ZIM-Domain protein 6
<i>JAZ9</i>	<i>At1g70700</i>	6,06	Jasmonate-ZIM-Domain protein 9
<i>JAZ10</i>	<i>At5g13220</i>	12,13	Jasmonate-ZIM-Domain protein 10
Targets			
<i>ATCLH1</i>	<i>At1g19670</i>	6,96	chlorophyllase 1
<i>VSP1</i>	<i>At5g24780</i>	42,22	vegetative storage protein 1

Tabla 3. Selección de genes relacionados con la ruta del JA. La tabla muestra una selección de genes que se encuentran asociados a la ruta del ácido jasmónico expresados diferencialmente como consecuencia del silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* en plántulas de la línea A. En concreto se muestran genes relacionados con la síntesis, homeostasis, y señalización de esta hormona así como alguno de sus genes diana. El parámetro *fold change* se transformó de escala logarítmica a escala lineal.

En la Tabla 4 se observa una selección de genes asociados al metabolismo del hierro, a estrés oxidativo y el gen *ABCG40*. Además se incluye el gen *AtFPS1* de la vía de isoprenoides. Cabe destacar que el resultado de este último gen es muy importante ya que demuestra, no sólo que el gen *AtFPS1* está siendo efectivamente silenciado, sino que la metodología aplicada es lo suficientemente fiable como para detectar los cambios más importantes en los niveles de expresión global.

Gen	AGI code	Fold change	Description
Metabolismo del Hierro			
<i>At-NEET</i>	<i>At5g51720</i>	-16	NEET family protein
<i>BHLH038</i>	<i>At3g56970</i>	16	(bHLH) DNA-binding superfamily protein 38
<i>BHLH39</i>	<i>At3g56980</i>	11,3	(bHLH) DNA-binding superfamily protein 39
<i>BHLH100</i>	<i>At2g41240</i>	13,93	(bHLH) DNA-binding superfamily protein 100
<i>ATFER1</i>	<i>At5g01600</i>	-6,1	ferritin1
<i>ATFER4</i>	<i>At2g40300</i>	-5,3	ferritin 4
Metabolismo antioxidante			
<i>ATGSTF6</i>	<i>At1g02930</i>	13	glutathione S-transferase 6
<i>GST22</i>	<i>At2g29460</i>	18,4	glutathione S-transferase tau 4
<i>GST7</i>	<i>At1g02920</i>	8	glutathione S-transferase 7
<i>ATGSTF12</i>	<i>At5g17220</i>	6,5	glutathione S-transferase phi 12
Transportador de ABA			
<i>ABCG40</i>	<i>At1g15520</i>	73,52	<i>ABA transporter and resistance to lead</i>
Isoprenoides			
<i>FPS1</i>	<i>At5g47770</i>	-5,7	<i>Farnesyl diphosphate synthase</i>

Tabla 4. Selección de genes asociados a diferentes funciones moleculares (MF). La tabla muestra una selección de genes desregulados significativamente por efecto del silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* en plántulas de la línea A, implicados en funciones moleculares asociadas al metabolismo del hierro, estrés oxidativo, transportadores de ABA e isoprenoides. El parámetro *fold change* se transformó de escala logarítmica a escala lineal.

6.5. Validación mediante RT-PCR de los resultados obtenidos a partir del estudio transcriptómico (RNA-seq).

Con la finalidad de validar y determinar la fiabilidad de los datos obtenidos a través del análisis transcriptómico RNA-seq, se realizó una caracterización molecular de plántulas de la línea A crecidas en MS y MFZ. En primer lugar se seleccionaron algunos genes candidatos a partir de los resultados obtenidos de la expresión diferencial y de significancia biológica relevante. A continuación se comprobaron los niveles de mRNA mediante RT-PCR semi cuantitativa, utilizando oligonucleótidos específicos (ver materiales y métodos) de los genes *AOC1*, *JAZ5*, *ATCLH1* y *VSP1* (Stenzel et al., 2012; Chung et al., 2008; Schenk et al., 2007; Hossain et al., 2011) (Tabla

3), todos ellos involucrados en la vía del jasmónico. También se comprobaron los genes *BHLH100* y *At-NEET* (Wang et al., 2007; Nechushtai et al., 2012), implicados en el metabolismo del hierro y el gen *ABCG40* descrito como un transportador de ABA (Kang et al., 2010) (Tabla 4). Se utilizó como control el gen *AtPP2A*, comúnmente utilizado como *housekeeping* en *Arabidopsis* (Czechowski et al., 2005). Este estudio se realizó utilizando RNA extraído de plántulas de la línea A y de la línea control (EV), que fueron germinadas y crecidas en MS y MFZ, según diseño experimental descrito en los apartados anteriores.

En la Figura 26 se puede apreciar que los niveles de mRNA de los genes seleccionados como candidatos para validar los resultados del análisis transcriptómico, correlacionan con los datos obtenidos mediante el estudio de expresión diferencial realizado mediante RNA-seq. Los genes que se encontraban inducidos como *AOC1*, *JAZ5*, *ATCLH1*, *VSP1*, *BHLH100*, *ABCG40* presentaron un aumento en los niveles de mRNA en las plántulas de las líneas A crecidas en MFZ, con respecto a los niveles observados en plantas de las mismas líneas crecidas en MS, o con respecto a los niveles de las plantas de la línea EV (vector vacío) crecida tanto en MS como en MFZ. De la misma manera, los niveles de expresión del gen *At-NEET*, asociado al metabolismo del hierro y que se encontraba reprimido en el análisis de expresión diferencial por RNA-seq, presentó una disminución en los niveles de mRNA en las plantas de las líneas A crecidas en MFZ, con respecto a los niveles observados en plantas de las mismas líneas crecidas en MS, o bien a los de las plantas de la línea EV (vector vacío) crecida tanto en MS como en MFZ.

El conjunto de estos resultados muestra que los datos de expresión génica obtenidos a través de la técnica de RNA-seq son absolutamente reproducibles, lo que permite planificar una serie de estrategias a seguir para diseccionar las diferentes respuestas observadas como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*. De esta manera se podrá obtener mayor información sobre la implicación de estos genes en una serie de procesos de la planta que hasta ahora eran desconocidos.

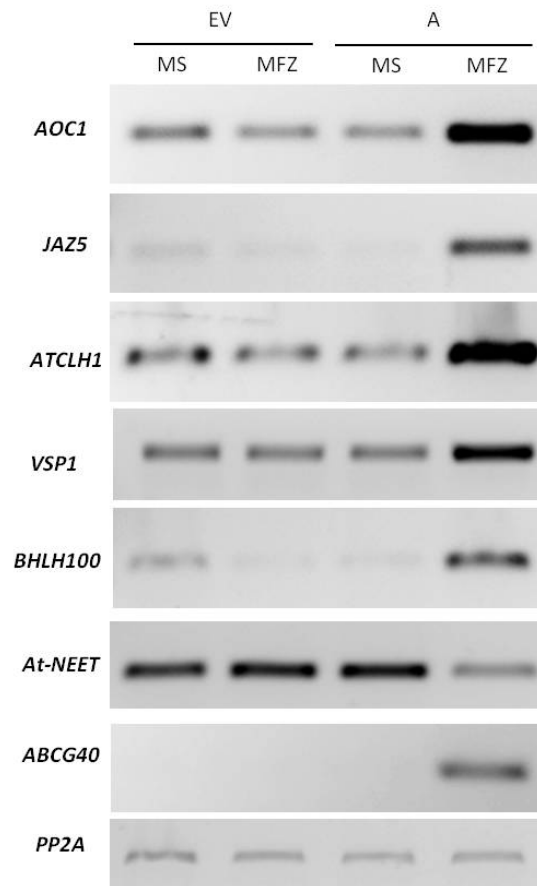


Figura 26. Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-PCR de genes candidatos diferencialmente expresados. Genes involucrados en la vía del jasmónico *AOC1* fc: 7,46; *JAZ5*, fc:22,63; *ATCLH1*, fc: 6,96; *VSP1*, fc: 42,22; (Stenzel et al., 2012; Chung et al., 2008; Schenk et al., 2007; Hossain et al., 2011). Genes involucrados en el metabolismo del hierro *BHLH100*, fc: 13,93; *At-NEET*, fc:-16 (Wang et al., 2007; Nechushtai et al., 2012). Gen asociado a transporte de ABA *ABCG40*, fc: 73.52 (Kang et al., 2010). Gen *housekeeping AtPP2A* (Czechowski et al., 2005). RNA extraído de plántulas de las líneas A, y EV (vector vacío), germinadas y crecidas en sistema de papel de filtro (3 días en MS + 5 días en MS en plantas control y MFZ en plantas silenciadas). Se utilizaron *primers* específicos para cada gen (ver materiales y métodos). fc: *fold change* detectado mediante la aproximación de RNA-seq expresado en escala lineal.

DISCUSIÓN I

DISCUSION I

Como se ha mencionado en la introducción, la enzima FPS juega un papel fundamental en la vía del MVA ya que a partir de IPP y DAMPP sintetiza FPP, precursor de diversos isoprenoides de suma importancia que participan en funciones esenciales en las plantas (Figura 3). Tanto los substratos de la reacción catalizada por esta enzima (IPP y DMAPP), como el producto de la reacción (FPP), ocupan un lugar central en la vía de síntesis de isoprenoides, ya que suponen puntos de ramificación de la misma dando lugar a una gran cantidad de compuestos finales como los esteroides, brasinosteroides, sesquiterpenos, triperpenos, dolicoles, poliprenoles, grupos farnesilo y cadenas laterales de la ubiquinona y las citoquininas. Por lo tanto, los cambios en los niveles de FPP podrían alterar el flujo de los compuestos isoprenoides a través de las diversas ramas de la vía y afectar a varias funciones esenciales de la planta. Esta propuesta sugiere que es imprescindible una estricta regulación de la actividad FPS, tanto espacial como temporal, que permita cumplir con todos los requerimientos metabólicos de la planta. Es por ello que muchos autores proponen que la enzima FPS ejerce un papel regulador en la síntesis de isoprenoides en diferentes especies vegetales (Hugueney et al., 1996; Liu et al., 1999; Chen et al., 2000; Souret et al., 2003; Han et al., 2006).

A. thaliana posee dos genes que codifican FPS, *AtFPS1* y *AtFPS2* (Figura 7) que codifican tres isoenzimas, FPS1L, FPS1S y FPS2 (Cunillera et al., 1996, 1997). El patrón de expresión de estos genes fue analizado mediante el gen reportero *GUS*, y se observó que el gen *AtFPS1* presenta una expresión generalizada e intensa durante todo el desarrollo de la planta tanto en la fase vegetativa como reproductiva, mientras que el gen *AtFPS2* presenta una expresión restringida a órganos florales, semillas y estadios tempranos de la germinación (Cunillera et al., 2000; Closa et al., 2010). Por otra parte, durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*, los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* tienen un patrón de expresión complementario. Mientras que el gen *AtFPS2* se expresa en todo el endospermo a partir del estadio torpedo y en el embrión a partir del estadio corazón, el gen *AtFPS1*, sólo se expresa puntualmente en la cubierta chalazal durante los diferentes estadios de desarrollo de la semilla. Estas

observaciones sugirieron que el FPP tiene dos orígenes segregados espacial y temporalmente en las semillas de *Arabidopsis* (Keim et al., 2012).

Con el objetivo de comprender mejor la función de los genes *AtFPS* y sus isoenzimas, e investigar la contribución de la actividad FPS en el control general de la ruta de isoprenoides en plantas, se han realizado diversos estudios. Un ejemplo de ellos es la sobreexpresión de las isoenzimas FPS1S y FPS1L en *A.thaliana* (Masferrer et al., 2002; Manzano et al., 2004, 2006). La caracterización de plantas transgénicas con altos niveles de actividad FPS1S mostró un fenotipo de lesiones necróticas en hojas, senescencia prematura en hojas aisladas y reducción en los niveles de citoquininas del tipo zeatinas. Por otra parte la sobreexpresión de la isoforma FPS1S induce la expresión de marcadores característicos de la respuesta hipersensible (como el gen *PR-1* y la acumulación de H_2O_2) relacionados con la patogénesis, y un aumento de la expresión del gen *AOX-1a* (Alternative Oxidase 1a) (Masferrer et al., 2002; Manzano et al., 2004). Características similares presentaron las plántulas sobreexpresoras de la isoforma FPS1L, las cuales mostraron un fenotipo clorótico en presencia de luz continua que se correlacionó con la acumulación de H_2O_2 . Además, se observaron signos de senescencia prematura en hojas aisladas. En ambas plántulas sobreexpresoras (FPS1S y FPS1L) no se presentaron alteraciones en los niveles de esteroides y los niveles de actividad HMGR fueron similares a los de las plantas wt (Manzano et al., 2006; Busquets, 2008).

A partir de los resultados obtenidos, se propuso un modelo de desequilibrio metabólico según el cual, el consumo de IPP producido por la sobreexpresión de las isoformas FPS1S y FPS1L, sin un aumento concomitante en los niveles de actividad HMGR (enzima que controla el flujo de la síntesis de MVA y por lo tanto, de IPP / DMAPP) provoca una disminución de los niveles de IPP/DMAPP disponibles para la síntesis de citoquininas (Masferrer et al., 2002; Manzano et al., 2004).

Todos estos antecedentes indican que los niveles de actividad FPS deben estar estrictamente regulados para asegurar la correcta repartición de los sustratos entre las diferentes ramificaciones de la vía. Además, ponen de manifiesto que la enzima FPS no parece ser limitante para la producción de compuestos finales, al menos en el caso de los esteroides (compuestos finales mayoritarios). Esto contrasta con los resultados obtenidos cuando se sobreexpresa HMGR, principal enzima reguladora de la vía, en los

que se observa un importante aumento en los niveles de estos compuestos (Stermer et al., 1994; Schaller et al., 1995; Bach et al., 1999; Manzano et al., 2004).

Para profundizar en el estudio de los genes *AtFPS*, nuestro grupo de investigación caracterizó mutantes de *A.thaliana* con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* (Closa et al., 2010). Los resultados mostraron que los mutantes simples *Atfps1* y *Atfps2* son viables y muy parecidos a las plantas wt ecotipo Col-0, lo que sugiere que basta sólo un gen funcional *AtFPS* para producir los niveles de isoprenoides necesarios para el desarrollo normal de la planta. Sin embargo, las funciones de *AtFPS1* y *AtFPS2* durante el desarrollo de la planta no son completamente redundantes. Así, en el caso de las semillas se han detectado indicios de una posible especialización funcional. En este tejido, FPS2 aporta hasta el 80% de la actividad FPS total. A medida que la semilla germina, la actividad de FPS2 decae rápidamente y aumenta la actividad de FPS1; es decir, que FPS1 sustituye progresivamente la función de FPS2 durante los primeros estadios de desarrollo de las plántulas de *A. thaliana* (Closa et al., 2010). De esta manera, la actividad residual de FPS1 en semillas del mutante *Atfps2* no es capaz de proporcionar cantidades suficientes de FPP para sintetizar los niveles normales de esteroides requeridos. Por consiguiente, la falta de FPS2, pero no de FPS1, conduce a una marcada reducción de los niveles de sitosterol en semillas maduras, concomitantemente a una respuesta de regulación de retroalimentación positiva de HMGR. Éste aumento en la actividad HMGR se presenta como un mecanismo de compensación, imprescindible para el proceso de germinación (Closa et al., 2010). Por lo tanto, las semillas de los mutantes *Atfps2*, poseen un conjunto de características alteradas que no se producen en el caso de las semillas de los mutantes *Atfps1* (Closa et al., 2010). Estos datos correlacionan con el patrón de expresión que presenta el gen *AtFPS2* en este tejido (Keim et al., 2012).

Sin embargo, el papel esencial que juegan las enzimas FPS en el desarrollo vegetal, se demostró mediante la generación del doble mutante homocigoto nulo *Atfps1::Atfps2*. Este doble mutante presentó letalidad embrionaria en la etapa pre-globular demostrando que el metabolismo de isoprenoides derivados de FPP es fundamental en las primeras etapas de desarrollo. Además, la falta de actividad de la enzima FPS perjudica gravemente la transmisión genética masculina (Closa et al., 2010). Esta letalidad hace imposible estudiar en profundidad la función y los

mecanismos de regulación en los que se encuentran implicadas las isoenzimas FPS en plantas adultas.

En un intento de superar ésta limitación se planteó silenciar la expresión de los genes *AtFPS* en plantas adultas mediante la combinación de la tecnología de *artificial microRNA* (amiRNA) (Schwab et al., 2005) con un sistema de expresión inducible por ecdisona (Padidam et al., 2003). El uso de un sistema inducible es una aproximación experimental especialmente adecuada para analizar la función de genes esenciales cuya inactivación resulta letal para la planta, como es el caso del doble mutante de los genes *AtFPS* y algunos mutantes de *A. thaliana*, como por ejemplo los de la biosíntesis de esteroides (Clouse, 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller, 2004; Kim et al., 2005). Además y a diferencia de otras estrategias el sistema inducible escogido resulta ser sumamente efectivo para el silenciamiento de genes en plantas (Dietrich et al., 2008).

La tecnología de *artificial microRNA* (amiRNA) es una técnica de ingeniería genética que aprovecha la maquinaria endógena de la planta para producir miRNAs (microRNAs) específicos contra un gen o una familia de genes diana. Los miRNAs constituyen un gran grupo de pequeños RNAs endógenos de cadena sencilla (19 -24 nucleótidos), que tienen una función reguladora en la expresión génica de eucariotas, afectando a multitud de procesos y modificando programas de desarrollo (Bartel, 2004). En plantas se han descrito miRNAs que regulan procesos tan importantes como el desarrollo, el metabolismo y la respuesta a estrés (Chen, 2005).

Los miRNAs se pueden manipular genéticamente para silenciar de forma específica genes de interés mediante la tecnología de *artificial microRNA* (amiRNA). El amiRNA diseñado contra el gen que se pretende silenciar, se manipula para integrarlo dentro del esqueleto del gen miR319a, que codifica para un precursor de miRNA (pre-miRNA) natural de *A. thaliana*. De esta forma se consigue que la maquinaria endógena de la planta genere un único amiRNA diseñado para silenciar específicamente su gen diana (Schwab et al., 2005). Así, en comparación con otras estrategias de silenciamiento basadas en el uso de *hairpins* y RNA *antisense* que generan poblaciones heterogéneas de pequeños RNAs, la tecnología de amiRNA minimiza el silenciamiento de posibles genes diana inespecíficos (*off-targets*).

El sistema inducible permite la activación de los amiRNA una vez que la planta ha germinado, posibilitando así que la generación y propagación del mutante no se vea

afectada por el silenciamiento de los genes *AtFPS*. Este sistema inducible, basado en el receptor de la hormona de la ecdisona (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004), ha demostrado que la activación puede controlarse muy estrictamente mediante agonistas sintéticos de la ecdisona. Una sustitución en el aminoácido 110 del receptor de la ecdisona (Ala Pro) de *Choristoneura fumífera* conlleva la pérdida de la capacidad de respuesta a las hormonas ecdisteroideas, sin embargo, no altera el reconocimiento de compuestos no esteroideos sintéticos como la metoxifenocida (Kumar et al., 2002), comercializado por la empresa Bayer bajo el nombre comercial de Runner®.

Para desarrollar la estrategia de silenciamiento de los genes *AtFPS*, se generaron dos secuencias candidatas amiRNA (denominadas amiRFPSa y amiRFPSb) que hibridan en zonas distintas del mRNA de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* (Tabla 2). Estas secuencias fueron clonadas en el plásmido pB110-Red-2844, bajo el control del promotor del sistema inducible que responde a ecdisona y posteriormente fueron transformadas en plantas de *A. thaliana* ecotipo wt Col-0 y en plantas con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* (mutantes simples *Atfps1-1* y *Atfps2-1*). El objetivo de transformar las dos construcciones en todos los fondos mutantes mencionados, fue facilitar la obtención de líneas transgénicas en las que el silenciamiento de la actividad FPS fuese más eficiente, especialmente en los mutantes simples, en donde sólo existe un gen *AtFPS* funcional.

Por otra parte, diseñar y utilizar dos secuencias de amiRNA (amiRFPS a y b), obedeció a dos objetivos principales. En primer lugar, asegurar el éxito del sistema, ante la posibilidad de que una de ellas no fuese lo suficientemente efectiva para silenciar los genes *AtFPS*. En segundo lugar, identificar los fenotipos específicamente asociados al silenciamiento de los genes FPS, debido a la posibilidad de que alguno de los amiRNA silenciara también otro gen o genes de forma inespecífica (*off-target*). Los resultados mostraron que en ambos casos el silenciamiento de los genes *AtFPS* fue exitoso, reproduciendo además el mismo fenotipo en las plántulas portadoras de los dos amiRFPS (Figura 12), lo que indica que el efecto observado es específico del silenciamiento de los genes *AtFPS* y no de un artefacto. Al igual que en el caso de los amiRFPS, también se transformaron plantas de los tres fondos genéticos con el plásmido pB110-Red-2844 vacío, con el objetivo de generar líneas control del sistema

de silenciamiento inducible. Estas líneas permitieron comparar el efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* a nivel fenotípico, molecular y metabólico.

1. El silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* provoca una alteración del fenotipo y una reducción importante de los niveles de expresión de mRNA, proteína y actividad FPS

Hasta ahora no se ha aislado ningún mutante con pérdida total de función de la ruta del MVA, debido a la letalidad gametofítico masculina (Suzuki et al., 2009; Ishiguro et al., 2010) o embrionaria (Jin et al., 2012) de estas plantas. De la misma manera, el doble mutante *Atfps1::Atfps2*, (afectado en las primeras etapas de la síntesis de isoprenoides en el citosol), también presenta letalidad embrionaria (Closa et al., 2010). Esta letalidad no permite estudiar los efectos de la pérdida de función de los genes *AtFPS* en plantas adultas. En este contexto se diseñó una estrategia de silenciamiento inducible, mediante el uso de amiRNA, que permitió atenuar conjuntamente la expresión de los genes *AtFPS* y por consiguiente las 3 isoformas de estos genes (FPS1S, FPS1L y FPS2) en plantas adultas.

En una primera observación del fenotipo de las plántulas germinadas y crecidas durante 10 días en medio MS y MFZ en condiciones de día largo (Figura 12), las plántulas de las líneas portadoras de los amiRFPS (a y b) crecidas en MFZ presentaron una reducción en el tamaño en todos los fondos genéticos. Además, se observaron cotiledones y hojas verdaderas cloróticas con un ligero enroscamiento en los bordes hacia el interior de la cara abaxial de la hoja. Asimismo, se observaron diferencias cuantitativas entre las plántulas de los diferentes amiRFPS utilizados. Así, en las plantas portadoras de la construcción amiRFPSa el fenotipo fue más severo al presentado por las plantas de las de las líneas portadoras de la construcción amiRFPSb en los mismos fondos genéticos. Los resultados obtenidos muestran que los dos amiRFPS (a y b) son efectivos en todos los fondos mutantes utilizados, pese a que en un principio se pensó que podrían ser más efectivos en los mutantes simples al presentar sólo un gen funcional.

Entre los fondos genéticos analizados también se observaron diferencias importantes. Las plántulas del fondo genético wt Col-0, portadoras de las

construcciones amiRFPS a y b, (denominadas líneas A y B respectivamente), mostraron un tamaño reducido y una clorosis generalizada, mientras que en las plantas del mutante simple *Atfps1-1* se observó una menor reducción en el tamaño y cotiledones con un menor grado de clorosis, en comparación con las del fondo genético wt Col-0. En cambio, las hojas verdaderas de las plantas del fondo *Atfps1-1*, portadoras de ambos amiRFPS, fueron cloróticas, al igual que en las plantas del fondo wt Col-0 (Figura 12). Por su parte, el fenotipo de las plantas del fondo genético *Atfps2-1* fue mucho más severo, manifestándose con la presencia de plantas muy pequeñas que no llegan a desarrollar hojas verdaderas y que son totalmente albinas.

En este sentido es tentador especular que las diferencias fenotípicas observadas entre los fondos genéticos utilizados son debidas a características específicas de cada fondo mutante, sugiriendo una cierta especialización funcional de cada uno de los genes *AtFPS*. Sin embargo, tampoco puede descartarse que sean debidas a diferentes grados de expresión de los amiRNA en cada una de las líneas utilizadas. De ser así, la severidad del fenotipo dependería de los diferentes grados de silenciamiento de los genes *AtFPS*, y por lo tanto, de la actividad total FPS de cada una de estas líneas y no del fondo genético utilizado. De acuerdo con esta última hipótesis, en las plantas del fondo *Atfps1-1* los niveles de expresión del amiRNA serían menores, mientras que en las del fondo *Atfps2-1*, serían mucho mayores. Sin embargo, el hecho de que ambos amiRFPS (a y b) produzcan un fenotipo similar en los diferentes fondos mutantes (por ejemplo el efecto letal que provocan los dos amiRNA en el fondo *Atfps2-1* ya en las primeras etapas del desarrollo) apoyaría la hipótesis de una especialización funcional. Como se ha mencionado anteriormente en las primeras etapas de desarrollo de la planta, el gen *AtFPS2* aporta gran parte de la actividad FPS (Closa et al., 2010) lo que justificaría que el efecto de ambos amiRNAs sea tan drástico en los mutantes *Atfps2-1* (donde la mayoría de la actividad FPS ya está bloqueada). Finalmente, tampoco puede descartarse la posibilidad de que los dos amiRNAs (a y b) sean más efectivos contra el gen *AtFPS1* que contra el gen *AtFPS2*, produciendo así fenotipos diferentes en función de la isoforma que quede activa en cada mutante (FPS1 para el mutante *Atfps2-2* y FPS2 para el mutante *Atfps1-1*).

En un futuro y para contrastar estas hipótesis es necesario caracterizar molecularmente las plantas de cada uno de los fondos genéticos portadores de los

amiRFPS y determinar los niveles de expresión de los amiRNAs y de los genes *AtFPS* (mediante qPCR), e incluso de su actividad FPS total. Este resultado permitiría explicar las diferencias observadas entre los diferentes fondos genéticos utilizados y determinar, si procede, que el fenotipo es dependiente del fondo genético o de los niveles de expresión/eficiencia selectiva de los amiRNAs utilizados. En cualquier caso, y para simplificar la interpretación de los resultados, se decidió proseguir la caracterización del efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* en las líneas del fondo wt Col-0, ya que en estas líneas se observó un fenotipo severo que indicaba que el sistema utilizado estaba siendo efectivo. De hecho, la posterior caracterización molecular de las plantas de estas líneas reveló una disminución muy significativa de los niveles de mRNA de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2*, proteína y actividad FPS total (Figura 15a, b y c).

Con respecto a las raíces (Figura 13) también se evidenció una reducción dramática del crecimiento por efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS*. Un caso similar se registró en un estudio realizado en el mutante deficiente en esteroides *dry2/sqe1-5* de *A.thaliana*, el cual mostró una reducción en el tamaño de la raíz, con una alteración en los pelos radiculares. La causa de este fenotipo es una mutación puntual en el gen escualeno epoxidasa 1 (*SQE1*) que probablemente produce una enzima con actividad reducida (Posé et al., 2009). Otro ejemplo, es el mutante de la biosíntesis de esteroides en *A.thaliana cyp51A2*, que presenta una mutación en el paso de la 14 α -desmetilación de la vía de esteroides, lo que provoca alteraciones en el fenotipo observándose raíces más cortas en las plántulas de estos mutantes (Kim et al., 2005).

Como ya se ha mencionado anteriormente, entre las alteraciones fenotípicas que presentaron las plántulas de las líneas silenciadas también se evidenció un importante retraso en el crecimiento que generó poblaciones de plantas cuyo estadio de desarrollo fue difícil de comparar con el de las correspondientes plantas control. Este hecho dificultaba enormemente la obtención de datos fisiológicos comparables entre las poblaciones de plantas silenciadas y no silenciadas. Esta limitación fue superada con un nuevo diseño experimental que permitió obtener plantas en un estadio de desarrollo parecido. El diseño consistió en el uso de discos de papel filtro en las placas de cultivo, lo que permitió germinar las semillas de las líneas transgénicas

portadoras de los amiRFPS en medio MS durante varios días y luego transferirlas al medio MFZ en el que se dejaron crecer durante algunos días más. Para ello, y por los motivos mencionados más arriba, se utilizaron las líneas transgénicas A y B del fondo wt Col-0 que portaban las construcciones amiRFPSa y amiRFPSb, respectivamente, y la correspondiente línea EV (vector vacío).

Seleccionadas las líneas, se decidió ensayar dos condiciones experimentales con el sistema de papel de filtro, siendo la opción de germinar las semillas y crecerlas durante 3 días en medio MS, para luego traspasarlas a MFZ y mantenerlas 5 días más en día largo, la mejor de ellas (Figura 14). Efectivamente, en estas condiciones el fenotipo clorótico se presentó de forma homogénea en todas las plántulas, que además presentaban un estadio de desarrollo parecido al de las plantas control (EV). En cambio, en las condiciones de 7 días en MS + 7 días en MFZ, la población de plántulas mostró un fenotipo heterogéneo, pudiéndose apreciar desde plantas muy cloróticas y pequeñas hasta plantas prácticamente verdes y del mismo tamaño que las plantas control.

Determinado el sistema experimental se realizó la caracterización molecular de las plántulas de las líneas A y B silenciadas (Figura 15a, b y c). En los resultados se observó una importante reducción de los niveles de FPS. Los niveles de mRNA de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* presentaron una dramática disminución en las plantas de las líneas A y B, crecidas en MFZ, con respecto a los niveles de expresión observados en plantas de las mismas líneas crecidas en MS, o con respecto a los de las plantas de la línea control EV crecida tanto en MS como en MFZ (Figura 15a). En cuanto a los niveles de proteína FPS (detectados mediante el uso del anticuerpo anti-FPS; Masferrer et al., 2002), también se observó una disminución drástica en las plántulas A y B crecidas en MFZ con respecto a los niveles detectados en plántulas de las mismas líneas crecidas en MS, o de plántulas portadoras de la construcción EV crecidas en MS o en MFZ (Figura 15b). Este resultado indica que el sistema de silenciamiento inducible es altamente eficiente atenuando la expresión de los dos genes *AtFPS* en ambas líneas transgénicas. Sin embargo, el silenciamiento no es total, por lo que no resulta letal para la planta, como en el caso del doble mutante homocigoto *Atfps1::Atfps2* que presenta letalidad embrionaria (Closa et al., 2010) o como en algunos mutantes de la biosíntesis de esteroides de *A. thaliana* que presentan un fenotipo letal en plántulas

(Clouse, 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller, 2004; Kim et al., 2005). Esta hipótesis se ve apoyada con los resultados de actividad FPS (Figura 15c) que muestran una disminución de entre el 60 y el 70% en los niveles de actividad FPS en las plántulas de la línea A y B silenciadas, con respecto a los niveles detectados en las plántulas control. Esta reducción, aunque muy marcada, no es absoluta, permitiendo que las plántulas superen el umbral de letalidad. Así pues, este fenotipo posibilita estudiar en mayor profundidad la función y los mecanismos de regulación en los que se encuentran implicadas las isoenzimas FPS en plantas adultas.

En conjunto, el resultado de la caracterización fenotípica y molecular (Figuras 12, 13, 14 y 15) de las plántulas de las líneas portadoras de las construcciones *amiRFPSa* y *b*, sugiere que la estrategia utilizada para silenciar los genes *AtFPS* es muy eficiente. Por lo tanto, es razonable especular que en estas plantas los niveles de FPP disponibles para la síntesis de diversos compuestos esenciales para el crecimiento y el desarrollo sean menores que en las plantas *wt*. El FPP sirve como sustrato para la síntesis de compuestos tan importantes como esteroides (estructura y función de la membrana), brasinoesteroides (reguladores de crecimiento), dolicoles (glicosilación de proteínas), ubiquinonas y grupos hemo (transporte de electrones), o compuestos requeridos para las reacciones de defensa de las plantas, tales como fitoalexinas sesquiterpénicas y triterpénicas (Lange and Ghassemian, 2003; Bouvier et al., 2005). Además el FPP es un donante prenil en la prenilación de proteínas, mecanismo que está implicado en la transducción de señales y modula varios procesos fisiológicos y de desarrollo en las plantas (Galichet and Gruissem, 2003; Crowell and Huizinga, 2009). Por lo tanto, los cambios en los niveles de FPP podrían alterar el flujo de los compuestos isoprenoides a través de las diversas ramas de la vía y afectar a una o varias funciones esenciales en las plantas.

En este contexto es importante destacar que el bloqueo de la síntesis de FPP en las plántulas silenciadas de las líneas A y B provocó una reducción significativa en los niveles de esteroides (Figura 16). La principal función de los esteroides en las células vegetales es la formación y modulación de la fluidez de las membranas (Hartmann, 1998). Además, se ha demostrado que modificaciones en el contenido de esteroides de la membrana plasmática alteran las funciones y la distribución de proteínas unidas a membranas (enzimas, canales, receptores o componentes de vías de transducción de

señal) como por ejemplo la H+ATPasa del maíz (Grandmougin-Ferjani et al., 1997), la NADPH oxidasa y PIN2 en *Arabidopsis*, y la respuesta al etileno (Souter et al., 2002). Por lo tanto, cambios en la composición en los esteroides de las membranas celulares podrían provocar defectos estructurales y funcionales, y finalmente, alterar la morfología de la planta.

En este sentido, algunos estudios realizados en mutantes de *A. thaliana* relacionan la biosíntesis y la homeostasis de esteroides con la aparición de alteraciones fenotípicas similares a las observadas en las plantas en las que los genes *AtFPS* se han silenciado, como la reducción en el tamaño de la parte aérea y la raíz y la aparición de clorosis. Es el caso de los mutantes de la biosíntesis de esteroides *dry2* (Posé et al., 2009), *cas1* (Babiychuk et al., 2008b), y *cyp51A2* (Kim et al., 2005). Cabe destacar que en los dos últimos casos, se observaron además serias alteraciones en la estructura y biogénesis de los cloroplastos (Babiychuk et al., 2008b; Kim et al., 2005). Todos estos antecedentes sugieren que las alteraciones fenotípicas observadas, pueden ser en parte consecuencia de la disminución de los niveles de esteroides (Figura 16) que desencadenaría una serie de alteraciones en las membranas, que en última instancia provocarían una disminución en el tamaño de las plántulas y la dramática reducción de la raíz, así como la aparición de clorosis en hojas y cotiledones (Figura 12, 13 y 14).

Como se ha mencionado anteriormente el bloqueo de la síntesis de FPP no sólo puede afectar los niveles de esteroides, por lo cual no se puede descartar que el fenotipo observado también atienda a la alteración en los niveles de otros compuestos derivados de FPP, como por ejemplo los isoprenoides mitocondriales u otros compuestos. Cabe señalar que en las mitocondrias se aloja la isoforma FPS1L (Cunillera et al., 1997; Manzano et al., 2006) y en ellas se lleva a cabo la biosíntesis de ubiquinona, responsable del transporte electrónico (Lange and Ghassemian, 2003; Okada et al., 2004). FPS1L ha sido propuesta como la enzima encargada de producir moléculas de FPP precursoras de la síntesis de la cadena lateral de prenilo ubiquinona y otros compuestos isoprenoides en las mitocondrias. También se ha informado de la posibilidad de que el FPP sea importado desde el citosol hacia las mitocondrias donde se realizaría la síntesis de ubiquinona (Hartmann and Bach, 2001) y, por otro lado, el FPP citosólico también se utilizaría para la síntesis de solanesil difosfato (SPS; cadena lateral de prenilo ubiquinona en *Arabidopsis*) en el citosol. El SPS podría ser

transportado, por un mecanismo aún desconocido, hacia la mitocondria para la biosíntesis de ubiquinona (Hirooka et al., 2003, 2005). En cualquier caso, la disminución en los niveles de FPP citosólicos y/o mitocondriales podría provocar una disminución en los niveles de ubiquinona, y en consecuencia, un bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial. Para comprobar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo una cuantificación de los niveles de ubiquinona (trabajo que está en progreso actualmente). En este contexto también sería interesante analizar mediante qPCR la expresión de genes marcadores de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial como los genes AOX (Wagner 1995; Vanlerberghe and McIntosh 1996). Sin embargo los resultados de RNA-seq no han identificado la expresión diferencial de estos genes (Anexo 1), sugiriendo que los niveles de ubiquinona no estarían afectados en estas plantas.

Finalmente no se puede descartar que otras moléculas dependientes de FPP como los poliprenoles, los dolicoles y los grupos prenilo (importantes para la modificación post-traducciona de las proteínas) o los brasinosteroides (reguladores del desarrollo) puedan contribuir en mayor o menor medida a la aparición de los fenotipos observados. Tampoco es descartable totalmente el hecho de que el MVA o algún producto anterior a FPS se acumulen por efecto del bloqueo en la síntesis de FPP con alguna consecuencia tóxica para las células. En este sentido, actualmente se están realizando diferentes aproximaciones de suplementación del medio de cultivo de las plantas con diferentes moléculas como MVA, brasinosteroides, y esteroides que nos permitan arrojar algo de luz sobre este aspecto.

En conjunto, estos resultados demuestran la importancia del FPP en la síntesis de compuestos finales que están involucrados en una serie de funciones esenciales para las plantas. Así, el bloqueo en la síntesis de FPP produce alteraciones en los niveles de estos compuestos finales, causando graves consecuencias fenotípicas y metabólicas en las plantas.

2. El bloqueo de la síntesis de FPP provoca un aumento de la actividad HMGR a través de un mecanismo post-traducciona.

La HMGR es la principal enzima reguladora del flujo de la vía del MVA en plantas. Como ya se ha comentado, esta vía opera en el citosol-RE y suministra precursores para la síntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales (Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Kasahara et al., 2004; Leivar et al., 2005; Vranová et al., 2013).

En plantas, la regulación de la actividad HMGR se ejerce a diferentes niveles, desde el transcripcional al postraducciona, y en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales, innumerables señales endógenas, metabólicas, estadios de desarrollo de la planta, heridas, tratamientos con inductores, y ataque de patógenos (Stermer et al., 1994; Learned and Connolly, 1997; Manzano et al., 2004; Nieto et al., 2009; Leivar et al., 2011; Rodríguez-Concepción et al., 2013). Una de las señales que induce un aumento en la actividad HMGR es el bloqueo genético o farmacológico de la síntesis de esteroides (Nieto et al., 2009; Wentzinger et al., 2002).

En este contexto, y a la vista de los resultados obtenidos en las líneas transgénicas A y B crecidas en MFZ, en donde se observó una disminución en los niveles de actividad FPS así como en los niveles de esteroides, se analizó la respuesta de la actividad HMGR frente a las alteraciones del flujo de la vía del MVA. Los resultados mostraron que el silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca un aumento de 5 y 3 veces en los niveles de actividad HMGR (Figura 17) de las plántulas de las líneas A y B respectivamente, crecidas en MFZ con respecto a su control crecido en MS. Sin embargo, las plántulas de la línea EV (línea control), no presentaron variaciones en los niveles de la actividad HMGR por efecto del tratamiento con MFZ. A continuación se analizaron los niveles de proteína HMGR mediante el anticuerpo policlona generado contra el dominio catalítico común de las isoenzimas HMGR1 de *A. thaliana* (Manzano et al., 2004) y que reconoce simultáneamente a las tres isoformas de HMGR (HMGR1S, HMGR1L, HMGR2). Los resultados mostraron que los niveles de proteína HMGR de las plántulas de las líneas A y B crecidas en MFZ, no cambian con respecto a los niveles detectados en plántulas de las mismas líneas crecidas en MS ni con respecto a los niveles de las plántulas de la línea EV, utilizada como control (Figura 18). Por último en

los resultados de los análisis cuantitativos de los niveles de mRNA de los genes que codifican HMGR en *A. thaliana* (*AtHMG1* y *AtHMG2*) realizados mediante RT-qPCR no se observaron cambios significativos (prueba de T de student) en los niveles de mRNA de los genes *AtHMG* en las plantas de ninguna de las líneas y condiciones analizadas. (Figura 19).

El conjunto de los resultados de los análisis de proteína HMGR y de los niveles de mRNA de los genes *AtHMG* mediante qPCR, sugieren que los cambios observados de la actividad HMGR en respuesta a las alteraciones de los niveles de actividad FPS y, en consecuencia, del flujo de la vía de síntesis de esteroides, posiblemente son debidos a mecanismos que operan a nivel post traduccional.

Esta hipótesis se ve apoyada gracias a diversos estudios que sostienen la existencia de una regulación postraduccional de la actividad HMGR. Por ejemplo se ha descrito que el tratamiento con lovastatina, un inhibidor de la HMGR, provoca un incremento de la actividad HMGR sin que varíen los niveles de mRNA HMGR en *A. thaliana* (Kobayashi et al., 2007). En un estudio más reciente, los resultados de cuantificación de actividad, proteína y mRNA de HMGR en muestras de *A.thaliana* tratadas de forma simultánea con lovastatina y antimicina A o rotenona (inhibidores de la cadena respiratoria de electrones), sugirieron que defectos en la cadena de transporte de electrones afectan a la biosíntesis de isoprenoides mediante una sobre-regulación post traduccional de la actividad HMGR (Tang et al., 2010).

Por otro lado, las perturbaciones internas del flujo de la vía de los esteroides desencadenan una respuesta compensatoria por parte de la actividad HMGR. Se ha descrito que en células en cultivo de tabaco BY-2, la inhibición de la escualeno sintasa (SQS) y la escualeno epoxidasa (SQE) mediante tratamientos con escualestatina (Sq) y terbinafina (Tb) respectivamente, provoca un incremento de la actividad HMGR, muy probablemente como consecuencia de la disminución de los esteroides endógenos (Wentzinger et al., 2002). Por otro lado, otro estudio en *A. thaliana*, reveló que la inhibición de la vía de la síntesis de esteroides mediante el uso de los inhibidores Sq y Tb, provoca una retroalimentación positiva por parte de la actividad HMGR como respuesta compensatoria frente al bloqueo de la síntesis de esteroides. Sin embargo estos inhibidores no provocan un aumento en los niveles de mRNA o proteína HMGR

sugiriendo que la perturbación metabólica del flujo de la vía en la síntesis de esteroides provoca una regulación a nivel post traduccional (Nieto et al., 2009).

En resumen los resultados obtenidos y los datos recogidos desde otros autores (Wentzinger et al., 2002; Kobayashi et al., 2007; Nieto et al., 2009; Tang et al., 2010) sugieren que el silenciamiento de los genes *AtFPS* desencadena una regulación post traduccional en la enzima HMGR (enzima reguladora del flujo de la vía) muy probablemente debida a la perturbación metabólica de la vía de síntesis de esteroides.

3. El silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una reducción significativa en los niveles de los esteroides mayoritarios.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en las plántulas de las líneas silenciadas se observó una reducción significativa de los niveles de esteroides considerados mayoritarios como el sitosterol, el estigmasterol y el campesterol (Figura 16) (Piironen et al., 2000; Benveniste, 2002). Los niveles de sitosterol y campesterol presentaron una disminución de entre el 20 al 30%, en las plántulas de las líneas A y B crecidas en MFZ, con respecto a las plántulas de las mismas líneas crecidas en medio MS. En el caso de los niveles de estigmasterol, la disminución fue mucho más evidente, del orden de un 50 % de reducción en las plántulas crecidas en MFZ con respecto a las crecidas en MS. Este resultado correlaciona con estudios anteriores, en los que la caracterización de mutantes con pérdida de función de los genes *AtFPS1* y *AtFPS2* reveló una disminución en los niveles de esteroides, de no más del 30% en el contenido total de estos metabolitos (Closa et al., 2010). Estos resultados sugieren que el silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* bloquea la disponibilidad del FPP en el citosol para la síntesis de diversos compuestos isoprenoides finales, entre ellos los esteroides, provocando una reducción en los niveles de estos compuestos en las plántulas. Esta reducción es especialmente importante en el caso del estigmasterol.

Los esteroides son uno de los productos finales mayoritarios derivados de la vía del MVA en el citosol (Schaller, 2004). Son triterpenos que se sintetizan a partir de FPP (Tholl and Lee, 2011) y son compuestos estructurales que forman parte de las membranas, donde interaccionan con las cadenas laterales de los fosfolípidos, reduciendo la permeabilidad y la fluidez de las bicapas lipídicas (Schaller, 2003). En los

últimos años, el análisis de mutantes de la parte troncal de la vía de síntesis de esteroides sugiere un papel esencial de estos compuestos en procesos importantes para el desarrollo de las plantas, como por ejemplo, la embriogénesis, la elongación celular, la diferenciación vascular y la señalización hormonal (Clouse, 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller, 2004). Así pues, la caracterización de diferentes mutaciones en genes que codifican enzimas estructurales de la biosíntesis de esteroides ha revelado diversas alteraciones en el crecimiento y desarrollo de plantas en *A.thaliana*.

En términos de fenotipo, los mutantes deficientes en esteroides se pueden dividir en tres grupos. En el primer grupo se encuentran los mutantes letales. Ejemplo de ellos son los mutantes deficientes en las actividades escualeno sintasa, que canaliza el FPP hacia la producción de triterpenos (Busquets et al., 2008) y cicloartenol ciclasa (CAS1), la primera actividad específica de la biosíntesis de esteroides (Babiychuk et al., 2008b). Así, en estos mutantes letales no se obtuvieron plántulas homocigotas y además en el caso de los mutantes deficientes en CAS1 se observó letalidad del gametofito masculino en los alelos *cas1-2* y *cas1-3* (Babiychuk et al., 2008b).

En el segundo y tercer grupo se encuentran los mutantes específicos de la biosíntesis de esteroides, que sin ser letales, presentan defectos en el desarrollo y el crecimiento. Por ejemplo, los mutantes defectuosos en las etapas previas del intermediario 24-metilenlofenol, como *smt1*, *hyd1* y *hyd2* (Diener et al., 2000; Schrick et al., 2000; Souter et al., 2002) pertenecientes al segundo grupo, se caracterizan por presentar defectos en la embriogénesis, así como también un patrón vascular alterado. Por último, en el tercer grupo se encuentran los mutantes defectuosos en la vía dependiente de brasinosteroides (BR) (desde 24-metilenlofenol hasta los productos finales de la vía como el campesterol), entre ellos se encuentran *dwf7*, *dwf5* y *dwf1* (Klahre et al., 1998; Choe et al., 1999b, 1999a, 2000) que corresponden a las tres últimas actividades para la producción de sitoesterol y campesterol, éste último precursor de los brasinosteroides. Estos mutantes muestran un fenotipo similar al de los mutantes enanos deficientes en las actividades por debajo del campesterol (Yokota, 1997), no tienen defectos en el desarrollo embrionario y pueden ser rescatados por la aplicación externa de brasinosteroides.

Como ya se ha mencionado, el silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una serie de alteraciones particulares en el fenotipo, como una marcada clorosis y una reducción dramática en el crecimiento de la parte aérea y de la raíz. Algunas de estas alteraciones, también se han observado en algunos mutantes de la vía de síntesis de esteroides en *A. thaliana*. Es el caso del mutante *dry2/sqe1-5* (*drought hypersensitive 2, dry2*) que fue identificado en la búsqueda de mutantes hipersensibles a estrés osmótico. Este mutante posee una mutación puntual en la escualeno epoxidasa1 (SQE1) que cataliza la conversión estereo-específica de escualeno en (3S)-2,3-óxido escualeno en presencia de oxígeno molecular. Este es el primer paso en la síntesis de esteroides que requiere oxígeno y se ha demostrado que la alteración en este punto de la vía provoca defectos pleiotrópicos sobre el desarrollo de la planta, incluyendo clorosis, disminución de su tamaño (tanto en la parte aérea y como en la raíz) y alteraciones en el desarrollo de los pelos radiculares. Además, a nivel metabólico, esta mutación provoca cambios en la composición de esteroides en la raíz (Posé et al., 2009).

En las plantas, la biosíntesis de esteroides continúa mediante la conversión enzimática de 2,3-oxidoescualeno a cicloartenol. Esta reacción es catalizada por la enzima cicloartenol sintasa 1 (CAS1). En el estudio realizado por Babiychuk et al., 2008, se caracterizó una serie de alelos mutantes *cas1*, deficientes en la expresión de la cicloartenol sintasa1 (CAS1) de *A. thaliana*. En el análisis de estos mutantes knockout, se observó que las plantas del alelo mutante débil *cas1-1* eran viables pero desarrollaban brotes e inflorescencia albinas por efecto de la foto-oxidación de los plástidos. Además en los tallos se observaron bajas cantidades de carotenoides y clorofilas. Por otro lado, los alelos mutantes fuertes *cas1-2* y *cas1-3*, letales en plántulas, no fueron transmisibles a través de los gametos masculinos, lo que sugirió que la enzima CAS1 cumple un papel importante en la función gametofito masculino. Para caracterizar la función de CAS1 en el desarrollo de la planta postgametofito, se utilizó el método CRE/loxP en el mutante *cas1-2*. Poco después de inducida la maquinaria de CRE/loxP iniciando la pérdida de la función CAS1, se observó un fenotipo albino en las plántulas del mutante *cas1-2*, e incluso se observaron fenotipos terminales que detuvieron la actividad meristemática, seguida de la muerte necrótica. Los tejidos del mutante *cas1-2* que presentaban un fenotipo albino acumularon 2,3-oxidoescualeno y además presentaban una disminución en los niveles de esteroides,

como por ejemplo el sitoesterol (Babiychuk et al., 2008a, 2008b). El estudio sugiere que estos fenotipos son probablemente una consecuencia del agotamiento en los niveles de esteroides, lo que causa defectos estructurales en las membranas celulares. Los autores también sugieren que el fenotipo causado por la deficiencia de CAS-1 provocaría una señalización al cloroplasto afectando su biogénesis (Babiychuk et al., 2008a, 2008b).

Además de los mutantes de esteroides *dry2* y *cas1*, que presentan fenotipos cloróticos similares a los que presentan las plántulas de las líneas A y B silenciadas, también se han descrito una serie de mutantes de *A. thaliana* como *chs1* (Hugly et al., 1990), *hmg1* (Suzuki et al 2004), *smt1* (Diener et al., 2000), *cyp51A2* (Kim et al., 2005-2010), *psat1-1* y *psat1-2* (Bouvier-Navé et al., 2010), que están relacionados con la biosíntesis y la homeostasis de esteroides y que presentan alteraciones fenotípicas de tipo clorótico y / o de senescencia prematura. Todos estos antecedentes en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis de que el bloqueo de la síntesis de esteroides puede desencadenar serias alteraciones a nivel fenotípico y metabólico en las plantas y ponen de manifiesto la relación existente entre la biosíntesis de esteroides y la aparición de clorosis.

4. El silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una importante reducción en los niveles de isoprenoides plastídicos como clorofilas y carotenoides y afecta al desarrollo de los cloroplastos.

La presencia de una fuerte clorosis en cotiledones y hojas verdaderas de las plantas debido al silenciamiento de los genes *AtFPS*, sugirió la existencia de una alteración en los niveles de algunos isoprenoides plastídicos como las clorofilas y los carotenoides. Se trata de compuestos sintetizados a través de la vía del MEP, y que pertenecen al grupo de metabolitos primarios que desempeñan funciones en procesos esenciales de las plantas, tales como la fotosíntesis y la fotoprotección (Croteau et al., 2000; Lindsey et al., 2003). Una alteración en la biosíntesis de estos compuestos, como la que ocurre, por ejemplo, en plantas con mutaciones *knock-down* en los genes para las enzimas de la ruta de MEP provoca fenotipos cloróticos y detención del crecimiento en las primeras etapas del desarrollo (Phillips et al., 2008). Por otro lado los mutantes

nulos de la vía del MEP de *A. thaliana* presentan un fenotipo albino en plántulas y sólo pueden crecer en medios suplementados con sacarosa. Sin embargo, estas plantas son estériles. Además el desarrollo del cloroplasto es detenido en una etapa temprana porque no se producen clorofilas y carotenoides (Vranová et al., 2013).

Los análisis de cuantificación de estos isoprenoides plastídicos en las plantas afectadas por el silenciamiento de los genes *AtFPS* mostraron una clara alteración en el metabolismo de estos compuestos. Así, se detectó una reducción de los niveles de las clorofilas a y b y carotenoides totales de alrededor del 50% en las plantas de las líneas A y B crecidas en MFZ, con respecto a los niveles de las plantas de la línea control EV crecidas en MS (Figura 22). En este análisis también se cuantificaron los niveles de estos metabolitos en plantas de la línea EV, portadora del vector vacío, en la que no se observó ningún tipo de alteración de los niveles de estos compuestos por efecto del tratamiento con MFZ.

Debido a que los niveles de clorofilas y carotenoides se ven claramente afectados (Figura 22) se planteó la interrogante de cómo el silenciamiento de los genes *AtFPS* (cuyas enzimas utilizan sustratos de la vía del MVA en el citosol y la mitocondria), es capaz de afectar el metabolismo de estos compuestos (sintetizados a través de la vía del MEP y localizados en el cloroplasto). Con el objetivo de obtener información que ayudara a elucidar el mecanismo que causa éste efecto, se analizaron, en primer lugar, los cloroplastos de estas plántulas. El objetivo de este experimento era comprobar si la disminución en los niveles de clorofilas y carotenoides es consecuencia de una alteración en la estructura y/o el número de estos orgánulos. En una primera aproximación para analizar la estructura de los cloroplastos, se observaron hojas de plántulas en las que los genes *AtFPS* se encontraban silenciados mediante microscopia láser confocal. El resultado reveló una fuerte reducción en el número y el tamaño de los cloroplastos en las plántulas de las líneas A y B crecidas en MFZ con respecto a plántulas de las mismas líneas crecidas en MS o de plántulas de la línea EV (vector vacío) crecidas en MS y MFZ (Figura 20 a y b). Esta observación sugiere que silenciamiento de los genes *AtFPS* repercute en la organización estructural y en el desarrollo de los cloroplastos, provocando una alteración sobre los niveles de algunos isoprenoides plastídicos, como clorofilas y carotenoides.

Las alteraciones en la estructura y en la organización de los cloroplastos detectadas mediante esta primera aproximación, motivaron a realizar un análisis más detallado de la ultraestructura de las hojas a través de microscopía electrónica de transmisión. Las observaciones se realizaron en plántulas de las líneas A y EV germinadas y crecidas en MS y MFZ, según diseño experimental previamente establecido. Las imágenes revelaron (Figura 21) una serie de alteraciones ultraestructurales en los cloroplastos de las hojas de las plántulas de la línea A crecidas en MFZ (Figura 21 d, e, f) con respecto a las plántulas de la misma línea crecidas en MS (Figura 21c). En primer lugar se observó una profunda desorganización y reducción de las estructuras de las membranas de los tilacoides. Además se observó una acumulación de pequeñas vesículas que de acuerdo a su aspecto y morfología aparentemente corresponden a vesículas de lípidos electro-densos llamadas plastoglóbulos (Biswal et al., 2003). Por otro lado se observó la presencia de partículas de gran tamaño que ocupan gran parte del orgánulo que pueden corresponder a gránulos de acumulación de almidón (Streb and Zeeman, 2012).

Es interesante destacar que algunos mutantes de la vía de síntesis de esteroides presentan defectos en los cloroplastos, similares a los observados en las plántulas en las que los genes *AtFPS* se encuentran silenciados. Un ejemplo de ello es el mutante *cas1* de *A.thaliana*, mencionado anteriormente, en donde el análisis de los alelos mutantes *cas1-1* y *cas1-2* reveló que CAS1 tiene un papel importante en la biogénesis de los plástidos. Los autores sugieren que los fenotipos albinos observados en estas plantas pueden ser causados tanto por un aborto en la biogénesis de las membranas tilacoides plastidiales, en donde se acumulan los complejos de clorofilas, como por un daño foto-oxidativo en el desarrollo de membranas tilacoides debido a la producción subóptima de carotenoides fotoprotectores (Babiychuk et al., 2008b). En cualquier caso, los cloroplastos de estos mutantes presentan una desintegración casi total de estructuras como los tilacoides, y una acumulación de plastoglóbulos, características muy similares a las observadas en las hojas de plántulas de la línea A crecidas en MFZ (Figura 21 d, e, f).

En un estudio más reciente realizado con el mutante *cyp51A2* de *A.thaliana*, que presenta una mutación en el paso de la 14 α -desmetilación de la vía de esteroides, se describió un fenotipo letal que fue atribuido en parte a una actividad fotosintética

muy reducida en el mutante en comparación con las plantas wt (Kim et al., 2010). Se identificaron 3 alelos mutantes por inserción de T-DNA; *cyp51A2-1*, *cyp51A2-2* y *cyp51A2-3*. Las plántulas de *cyp51A2-2* y *cyp51A2-3* presentaron un fenotipo más severo en comparación con las plántulas del alelo *cyp51A2-1* que no presentó diferencias morfológicas con respecto a las plántulas wt. Las plántulas de los alelos *cyp51A2-2* y *cyp51A2-3* presentaron una inhibición del desarrollo de la raíz, reducción en el alargamiento de pecíolo cotiledonario y en el alargamiento del hipocotilo, defectos que fueron más importantes en el alelo *cyp51A2-3* que en el alelo *cyp51A2-2* (Kim et al., 2005). El análisis por microscopía electrónica reveló que el mutante *cyp51A2* muestra un patrón de desarrollo de los plástidos aberrante en comparación con el observado en las plantas wt. En el alelo mutante *cyp51A2-2* se observó que el número de estructuras de la membrana de los tilacoides se redujo aunque dichas estructuras presentaban una disposición similar a la de las plantas wt. Sin embargo, los cloroplastos del alelo mutante *cyp51A2-3* carecían de estructuras intactas de membranas tilacoidales, presentaban un alto número de plastoglobulos (Biswal et al., 2003) que además eran más grandes que los observados en el mutante *cyp51A2-2*. El conjunto de resultados obtenidos (Kim et al., 2010) sugirieron que los cambios en el contenido de esteroides y en la composición en la membrana del mutante *cyp51A2* disparan la generación de ROS y de etileno que finalmente inducen la senescencia prematura de las plántulas. La consiguiente transformación de los cloroplastos en gerontoplastos explicaría la reducción de los niveles de clorofilas y la actividad fotosintética de estas plantas. Todas estas alteraciones observadas en el mutante *cyp51A2-3*, también fueron detectadas en los cloroplastos del alelo mutante *cas1-1* (Babiychuk et al., 2008b) y en los cloroplastos de las plántulas de la línea A, en donde los genes *AtFPS* han sido silenciados.

La biogénesis de los tilacoides, donde se acumulan los complejos de proteína de la clorofila, requiere del llamado tráfico de lípidos, el cual consiste en un amplio intercambio de precursores de lípidos, entre el cloroplasto y RE (Wang and Benning, 2012). Además se ha demostrado que la estabilidad de los complejos de clorofilas depende de la disponibilidad de estos lípidos (Awai et al., 2006). Sin embargo, no se ha reportado que los esteroides conformen parte de las membranas de los plástidos (Melkonian et al., 1981) mientras que si se ha demostrado que la biosíntesis de

esteroles se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE) mediante estudios de fraccionamientos bioquímicos (Hartmann, 1998) estudios *in situ* y de localización subcelular (Men et al., 2008; Busquets et al., 2008; Leivar et al., 2005). Así pues, se ha planteado la posibilidad de que el cloroplasto y el retículo endoplásmico establezcan sitios de contacto para el tráfico de lípidos entre la envoltura exterior del plástido y las membranas del RE ricas en esteroides (Andersson et al., 2007; Wang and Benning, 2012). Un desequilibrio y agotamiento en los niveles de esteroides como el que se ha identificado en mutantes como *cas1* podría comprometer estos sitios de contactos físicos entre los cloroplastos y el RE alterando su estructura y función (Babiychuk et al., 2008b). Una situación similar a la descrita podría estar sucediendo en las plántulas de las líneas en donde los genes *AtFPS* se encuentran silenciados, en las cuales se observó una disminución en los niveles de esteroides (Figura 16), y una alteración en la ultraestructura de los cloroplastos (Figura 21 d, e, f), lo que sugiere que los sitios de contactos físicos entre cloroplastos y RE en estas plántulas también podrían estar afectados.

5. El análisis transcriptómico mediante RNA-seq revela un grupo importante de genes desregulados como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*.

Para comprender de mejor manera los resultados anteriormente descritos y obtener mayor información del alcance del silenciamiento de los genes *AtFPS* sobre la expresión génica de la planta, se realizó un análisis transcriptómico basado en la técnica de RNA-seq. Este análisis permitió cuantificar transcritos de RNA, y obtener un perfil de los genes expresados diferencialmente. El experimento se llevó a cabo comparando RNA obtenido de plántulas de la línea A, portadora del amiRFPSa crecidas en MS y en MFZ.

El análisis comparativo de los datos obtenidos y el uso de diversas plataformas bioinformáticas posibilitaron normalizar los niveles de transcripción de los genes a través del parámetro *FPKM*, el cual permitió calcular la abundancia relativa de transcritos (Trapnell et al., 2010). Todos los genes reportados en el estudio fueron analizados de acuerdo a su significación biológica y estadística. Mediante el uso de *Cuffdiff* (Trapnell et al., 2013), se determinaron los valores de la expresión diferencial

en función de la magnitud del cambio registrado ($\lg FC > 2$) y la fiabilidad estadística de éste ($q < 0,05$). Así, se identificaron un total de 168 genes que se expresan diferencialmente como consecuencia del silenciamiento los genes *AtFPS* (Anexo 1). De los genes seleccionados como diferencialmente expresados se encontraron 116 genes desregulados al alza, 16 genes reprimidos y un total de 36 genes con un *fold change* infinito. Este resultado indica que el silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una respuesta mayoritaria de inducción en los genes desregulados. No obstante, es interesante destacar que entre los genes desregulados a la baja, se encontró el gen *AtFPS1* (*At5g47770*) con un *fold change* de -5,7 (Tabla 4), lo que indica claramente que el sistema utilizado para el silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* es efectivo y reprime su expresión, y que la metodología empleada identifica adecuadamente los genes expresados diferencialmente.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de significación biológica y enriquecimiento funcional de genes expresados diferencialmente, el cual fue basado en la ontología de genes (Ashburner et al., 2000) proyectando los genes seleccionados en términos de Gene Ontology (GO) (Blake and Harris, 2008) (Figuras 24 y 25).

Los resultados de este estudio permitieron identificar grupos de genes implicados en procesos biológicos y funciones moleculares diversos. Entre estos grupos se encontró una serie de genes relacionados con la homeostasis del metabolismo del hierro (Fe). Entre ellos se encontraban los factores de transcripción de la familia *Ib bHLH* (*AtBHLH038*, *AtBHLH039* y *AtBHLH100*) (Tabla 4), que estaban fuertemente inducidos. Diversos estudios han demostrado que frente a la deficiencia de Fe estos tres genes se inducen fuertemente en raíces y hojas de *A. thaliana* (Vorwieger et al., 2007; Wang et al., 2007; Aksoy et al., 2013). En esta misma línea de la homeostasis del Fe se identificó el gen *At-NEET* (*At5g5172*) que mostró valores de regulación a la baja con un *fold change* de -16 (Tabla 4). En un estudio realizado recientemente, se observó que el gen *At-NEET* es regulado dramáticamente a la baja (40 veces) en hojas de plantas de *Arabidopsis* deficientes en Fe, y además es identificado como un gen candidato que une la fotosíntesis, el metabolismo de ROS y Fe (Rodríguez-Celma et al., 2013). Por otro parte, la caracterización fenotípica de las plantas de las líneas mutantes *knockdown* y de RNA de interferencia (RNAi) reveló que *At-NEET* tiene un papel clave en el desarrollo de la planta, la senescencia, y la

homeostasis y metabolismo de Fe-ROS (Nechushtai et al., 2012). Por otro lado se identificaron los genes *AtFER1* y *AtFER4* desregulados a la baja (Tabla 4). Estos genes pertenecen a la familia de las ferritinas y están asociadas al mantenimiento de la homeostasis del Fe. Las ferritinas son una gran trampa de Fe, que almacenan el hierro lábil libre en la célula, y por lo tanto evitan que se induzca la formación de ROS a través de la reacción de Fenton (Ravet et al., 2009).

El Fe es un elemento de metal esencial para casi todos los organismos. En las plantas, el Fe está presente como un cofactor y se encuentra en los sitios activos de las agrupaciones fotosintéticas y respiratorias. Tanto la fotosíntesis como la respiración se basan en cadenas de transporte de electrones mediadas por metales como el Fe. Además el Fe también se requiere para la fijación de nitrógeno, la asimilación del sulfato, y la biosíntesis de la clorofila (Broadley et al., 2012). El hecho de que el Fe esté involucrado directamente en la producción de clorofila, hace que su deficiencia afecte al fotosistema de los cloroplastos, causando clorosis en las plantas (Nouet et al., 2011). Una alteración en la homeostasis del Fe como la deficiencia severa del nutriente, provoca que las hojas se tornen completamente amarillas o casi blancas, afectando fuertemente al crecimiento de las plantas y conduciendo a grandes pérdidas de rendimiento (Guerinot and Yi, 1994; Abadía et al., 2011; Benke and Stich, 2011). El efecto fenotípico de clorosis fue observado en las plántulas de las líneas en donde los genes *AtFPS* se encontraban silenciados (Figuras 12 y 14) lo que estaría de acuerdo con el hecho de que el silenciamiento de los genes *AtFPS* posiblemente esté afectando a la homeostasis del Fe. Es importante destacar que el cloroplasto es uno de los orgánulos que exige la mayor demanda Fe a nivel celular debido a su papel crucial en la cadena fotosintética de transportadores de electrones (Nishio and Terry, 1983; Jeong and Guerinot, 2009). Por lo general las plántulas con deficiencia de Fe presentan una clorosis y reducción de tamaño evidente y sus cloroplastos presentan un número reducido de laminillas granal y estromal, con una disminución en los componentes de la membrana de los tilacoides, incluyendo proteínas, transportadores de electrones y lípidos, lo cual es consistente con una marcada disminución de las tasas fotosintéticas (Terry, 1980; Terry and Abadia, 1986; Morales et al., 1990). Esta característica también fue observada en los cloroplastos de las plántulas silenciadas (Figura 21), en donde

claramente se aprecia una alteración estructural del orgánulo y una reducción en los niveles de clorofilas y carotenoides (Figura 22).

Todos estos antecedentes, en conjunto con los fenotipos provocados por el silenciamiento de los genes *AtFPS* (clorosis, disminución del tamaño, alteración en la estructura del cloroplasto, disminución de los niveles de clorofilas y carotenoides) y los datos recogidos en el análisis de RNA-seq, sugieren que el bloqueo en la síntesis de FPP, desencadena una respuesta que afecta a la homeostasis del metabolismo del Fe, a través de mecanismos aún desconocidos. La búsqueda de estos mecanismos supone un desafío futuro que permitirá dilucidar como se interconectan la vía de isoprenoides, ubicada en el citosol, con el metabolismo del hierro presente en el cloroplasto. En particular sería interesante identificar qué molécula o moléculas derivadas de FPP son las causantes de esta respuesta. En este contexto, es importante destacar una serie de trabajos en los que se ha relacionado la homeostasis del Fe con la vía de síntesis de esteroides.

En un estudio en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que la regulación de la homeostasis del hierro puede ser mediada por DAP1, (proteína de resistencia a daños 1) a través la proteína P450 Erg11/Cyp51 que cataliza un paso crítico en la síntesis de ergosterol (Craven et al., 2007; Hosogaya et al., 2013) y que está relacionada filogenéticamente con el citocromo b5, una proteína de unión al grupo hemo que activa reacciones P450 (Mifsud and Bateman, 2002). Debido a la estrecha relación entre el metabolismo del hierro y la síntesis del grupo hemo y ergosterol, la unión por DAP1 a hemo es crucial para la actividad ERG11 (Craven et al., 2007; Hosogaya et al., 2013). Por otra parte se ha sugerido que DAP1 también está implicado en la regulación de las estructuras de vacuolas que podrían ser importantes para el almacenamiento de hierro. Con lo cual DAP1 presenta un fuerte vínculo funcional entre la homeostasis del hierro y el metabolismo de esteroides (Craven et al., 2007; Hosogaya et al., 2013).

La síntesis de esteroides es la principal vía de estudio para los fármacos antifúngicos como el grupo de los azoles, que incluye el fluconazol, el itraconazol y el miconazol (Craven et al., 2007). La aparición cepas de *Candida spp* resistentes a los azoles se ha transformado en un problema significativo. Varios mecanismos pueden causar esta resistencia entre ellas las alteraciones en la ruta de biosíntesis de esteroides

(Kakeya et al., 2003). Dada la estrecha relación que existe entre el metabolismo de esteroides y de Fe se ha iniciado la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento antifúngico, proponiendo al sistema de absorción de Fe como una nueva alternativa de tratamiento. Esta hipótesis se ve apoyada con el análisis del transcriptoma en mutantes de *Cryptococcus neoformans* que sugirió que la absorción de hierro y su homeostasis juegan un papel clave en la susceptibilidad antifúngica y podrían ser utilizados como nuevas dianas para el tratamiento de la criptococosis. El estudio también reveló que la quelación de Fe en combinación con el tratamiento con fluconazol sinérgicamente, inhibe el crecimiento de *C. neoformans* (Kim et al., 2012).

Por otro lado, en *Candida albicans* el factor de transcripción Upc2 es esencial para la regulación de la biosíntesis de ergosterol y fue relacionado con la susceptibilidad a fluconazol en cepas resistentes a los azoles. El análisis de microarray en mutantes *upc2*, tratados con fluconazol, reveló una inducción atenuada en los genes implicados en la biosíntesis de ergosterol, así como el transporte de hierro y su homeostasis (Vasicek et al., 2014), datos que hacen patente la relación que existe entre esteroides y metabolismo del Fe. En esta misma línea se encuentra Srba, de *Aspergillus fumigatus*, una proteína de unión a un elemento regulador de esteroides (SREBPs), que pertenece a una clase de factores básicos de transcripción y que se activa en respuesta a la limitación de hierro, siendo crítico para la coordinación de los genes implicados en la adquisición de hierro y la biosíntesis de ergosterol en condiciones de hipoxia y condiciones de déficit de hierro (Blatzer et al., 2011).

Por último un estudio realizado en maíz sometido a diferentes regímenes de Fe, puso de manifiesto que la deficiencia de Fe está asociada a una clorosis diferencial entre las líneas estudiadas (B73 y Mo17). El estudio transcriptómico identificó dos factores de transcripción bHLH, como así también una fuerte diferencia de expresión de obtusifoliol 14 α -demetilasa (GRMZM2G096029), gen que está implicado en la biosíntesis de esteroides y que se encuentra reprimido en B73 frente al déficit de Fe. Los autores proponen al metabolismo de esteroides, entre otros, como la base de la deficiencia de hierro relacionada con la clorosis (Urbany et al., 2013). Los antecedentes descritos, en conjunto con los resultados presentados en esta tesis sugieren que existe una estrecha relación entre la homeostasis de esteroides y la del Fe. Por el momento, se han confirmado los datos de desregulación de algunos de los genes relacionados con la

homeostasis de Fe identificados en el análisis mediante RNA-seq a través de RT PCR (Figura 26). Sin embargo, en un futuro también sería interesante cuantificar los niveles de Fe para verificar la deficiencia de este metal como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS* y determinar, mediante experimentos de tipo *time course*, si se trata de una respuesta primaria o secundaria.

Otro grupo de genes que se observaron inducidos en el análisis transcriptómico fueron los genes de la familia glutathion S-transferasa (GST) *AtGSTF12*, *AtGST22*, *AtGST7* y *AtGSTF6* (Tabla 4), los cuales se encuentran asociados al metabolismo antioxidante. Se trata de genes ubicuos en las plantas a los que se les han asignado diversos roles, como por ejemplo en la desintoxicación y protección frente al estrés oxidativo (Wagner et al., 2002). Las plantas poseen una maquinaria de defensa antioxidante que las protege contra los daños provocados por el estrés oxidativo. Son sistemas enzimáticos de defensa muy eficientes que trabajan en concierto para controlar las cascadas de oxidación incontrolada y proteger a las células vegetales del daño oxidativo provocado por ROS. Evidencias sobre esta función se encontraron en el mutante defectuoso en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de esteroides *cyp51A2* mencionado anteriormente (Kim et al., 2005), y que presenta un fenotipo de letalidad en plántulas de *A. thaliana*. Para dilucidar el mecanismo subyacente de la letalidad, se analizaron los perfiles del transcriptoma y proteoma del mutante. Entre los genes identificados se encontró una fuerte inducción de genes implicados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así, genes como *AtGST22*, *AtGST7* se encontraron inducidos al igual que sucede en las plántulas de la línea A en donde los genes *AtFPS* se habían silenciado. Los resultados del estudio (Kim et al., 2010) sugieren que los cambios en el contenido y en la composición de esteroides de la membrana en el mutante *cyp51A2* disparan la generación de ROS y de etileno y, finalmente, inducen la senescencia prematura de las plántulas (Kim et al., 2010).

La producción de ROS y los niveles de esteroides también se han relacionado en otros estudios. Diversos informes han demostrado que los esteroides modulan la actividad o la distribución asimétrica de las proteínas unidas a la membrana, (Grandmougin-Ferjani et al., 1997; Souter et al., 2002; Men et al., 2008) y entre los diversos lugares de producción de ROS se encuentra la membrana plasmática, lugar donde se localizan las NADPH oxidasas responsables la generación de ROS en el

espacio apoplástico. En el mutante *dry2/sqe1-5* defectuoso en la biosíntesis de esteroides de *A. thaliana*, la deslocalización de una NADPH oxidasa se tradujo en una acumulación de ROS. Los resultados obtenidos indicaron que los esteroides juegan un papel esencial en la localización de las NADPH oxidasas sugiriendo que cambios en la composición de esteroides pueden modificar el entorno de la membrana plasmática y por lo tanto alterar la estabilidad o actividad de NADPH oxidasas localizadas en la misma, interrumpiendo el estricto control de ROS en el mutante (Posé et al., 2009). En este contexto es muy importante señalar que el silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una reducción en los niveles de esteroides (Figura 16) en plántulas de las líneas silenciadas, razón por la cual no se puede descartar que un cambio en la composición de la membrana afecte a la generación de ROS y por consiguiente se induzcan los genes GST asociados a la desintoxicación por estrés oxidativo. En un futuro y para determinar si las plántulas silenciadas se encuentran bajo un estrés oxidativo debido a la acumulación de ROS, es conveniente realizar una tinción con nitroazul de tetrazolio o DAB (Thordal-Christensen et al., 1997) permitiendo comprobar la hipótesis de acumulación de ROS como posible causa de la inducción de los genes GST.

Por otro lado el metabolismo del Fe está íntimamente ligado a la homeostasis de ROS y a la fotosíntesis en las células (Asada, 2006). En los cloroplastos, las cadenas de transporte de electrones se basan en el uso de metales y de oxígeno, y son una fuente de ROS. Por ejemplo plantas con niveles reducidos de *AtNEET* acumulan mayores niveles de ROS en comparación con el tipo salvaje (Nechushtai et al., 2012). En *Arabidopsis*, los genes *AtFER1* y *AtFER4* se expresan en las hojas y protegen a éstas del estrés oxidativo mediado por hierro libre de la célula (Ravet et al., 2009). En el análisis transcriptómico sobre la respuesta que provoca el silenciamiento de los genes *AtFPS* se indicó que los genes *AtNEET*, *AtFER1* y *AtFER4* presentaban una desregulación a la baja, lo que lleva a considerar la posibilidad que la inducción de los genes GST es a consecuencia de una acumulación de ROS en los cloroplastos, a causa de la desregulación de genes implicados en la homeostasis del Fe (*At-NEET*, *AtFER1* y *AtFER4*), sin necesariamente descartar la posibilidad que la inducción de los genes GST también pueda ser un efecto de una acumulación de ROS causada por la reducción de los niveles de esteroides en la membrana plasmática.

Una inducción importante por efecto del silenciamiento de los genes *AtFPS* se encontró también en el gen *AtABCG40* que pertenece a la familia ABC. Se trata de una familia de proteínas que en su mayoría son integrales de membrana y actúan como transportadores dependientes de ATP para una muy amplia gama de sustratos, incluyendo lípidos, medicamentos, metales pesados, y auxinas (Rea, 2007). El gen *AtABCG40/AtPDR12 (At1g15520)* es un transportador/importador de ABA y de otros isoprenoides. Gracias a análisis genéticos se ha demostrado su importancia para las respuestas al ABA incluyendo la regulación de los estomas, la regulación génica, la inhibición de la germinación y la tolerancia al estrés (Kang et al., 2010; Kuromori and Shinozaki, 2010). Por otro lado se ha sugerido que éste transportador participa en el transporte de diterpenoides asociados con la defensa de la planta. Esta hipótesis se ha visto apoyada por la fuerte inducción que presenta el gen frente a la respuesta por infección a patógenos y debido a que su secuencia de aminoácidos es similar a los de otros transportadores de diterpenoides tales como *NpABC1* y *SpTUR2* (Campbell et al., 2003; van den Brûle and Smart, 2002). Además el ABA es un sesquiterpenoide, y cada vez existen más evidencias de que desempeña un papel importante en las respuestas planta-patógeno (Zhao et al., 2008; Zhang et al., 2008). Estos antecedentes sugieren que el silenciamiento de los genes *AtFPS* posiblemente desencadena una respuesta de tipo planta-patógeno, lo que hace que el gen *AtABCG40* se encuentre altamente inducido. De hecho, se ha descrito que este gen es inducido por JAs y SA (ácido salicílico) (Campbell et al., 2003). Esta hipótesis se ve de alguna manera respaldada con los datos referentes a la inducción de un gran grupo de genes relacionados con vía del Jasmonato observados en los datos de RNA-seq (Tabla 3).

La inducción de los genes observada en el análisis transcriptómico del silenciamiento de los genes *AtFPS* reproduce el perfil de expresión génica provocado por la activación de la vía del JA. El ácido jasmónico y sus derivados, denominados colectivamente como jasmonatos, son hormonas vegetales derivadas de lípidos y son ubicuas en el reino vegetal (Hyun and Lee, 2008). Los jasmonatos (JAs) y sus derivados bioactivos, controlan muchos aspectos de la protección de las plantas frente al estrés biótico y abiótico. Efectivamente, los JAs juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune a los herbívoros y patógenos artrópodos necrotróficos, así como las respuestas frente al estrés de luz, UV y el ozono (Glazebrook, 2005; Wasternack, 2007;

Balbi and Devoto, 2008; Browse and Howe, 2008; Howe and Jander, 2008). Además, los JAs participan en procesos de desarrollo de las plantas, regulando procesos como el desarrollo de flores, la embriogénesis, la germinación de semillas, la maduración de los frutos y la senescencia foliar (Reinbothe et al., 2009). La biosíntesis de jasmonatos se lleva a cabo en dos orgánulos subcelulares, los cloroplastos y los peroxisomas, y los enzimas implicados en esta ruta biosintética se han caracterizado en varios estudios (Turner et al., 2002).

Como se ha mencionado, el JA es una hormona vegetal derivada de lípidos, y el primer paso de la vía JA consiste en la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados 18:03 o 16:03 (PUFAs) por la actividad de LOX (LOX2/3/4) (Wasternack and Kombrink, 2010). En los cloroplastos, estos PUFAs derivan de la bicapa de la membrana tilacoide través de la descomposición de los lípidos por la acción de las lipasas DAD y DGL (Hyun and Lee, 2008; Wasternack and Kombrink, 2010; Seo et al., 2009). Cabe señalar que la membrana tilacoide de los cloroplastos está compuesta de lípidos y que a diferencia de las membranas plasmáticas, compuestas principalmente por fosfolípidos, el componente principal de la membrana tilacoide es galactolípido; aproximadamente 80 % de galactolípido, 10 % de diacilfosfatidilglicerol y una cantidad insignificante de fosfolípidos (Douce and Joyard, 1990). Los PUFAs derivan principalmente de los galactolípidos, y una vez oxidados se convierten posteriormente, a través de dos pasos mediados por AOS y AOC (alene óxido sintasa y alene óxido ciclasa), en OPDA (ácido oxo-fitodienoico). OPDA se transporta desde el plástido al peroxisoma donde se reduce por OPDA reductasa, seguido por tres rondas de β -oxidación para generar JA (Gfeller et al., 2010).

En un estudio realizado sobre dos quinasas de plastoglóbulos (ABC1K1 y ABC1K3) de *A. thaliana*, que están implicadas en la adaptación de Arabidopsis a mayores intensidades de luz durante el crecimiento, los mutantes nulos para ambos genes (*abc1k1* y *abc1k3*) y el doble mutante (*k3::k1*) mostraron una clorosis rápida frente a una alta intensidad de luz. Además, *k3::k1* mostró un fenotipo de senescencia y una activación de las enzimas plastídicas de la biosíntesis de jasmonato unidas a los plastoglóbulos. Este doble mutante presenta un enriquecimiento de las proteínas LOX localizadas en el plástido las cuales están involucradas en la síntesis de la hormona

vegetal jasmonato (JA), lo que sugirió una mayor removilización de lípidos para la producción de JA (Lundquist et al., 2013).

Las plantas del mutante *k3::k1*, además de presentar clorosis, mostraron un fenotipo de senescencia irreversible durante el estrés de luz y las observaciones de microscopía electrónica mostraron un aumento en el volumen total de plastoglóbulos en plantas sometidas a este estrés. Por otro lado es importante destacar que durante la senescencia natural y/o inducida, los JAs se acumulan, sin embargo, un aumento de estos compuestos no es esencial para la iniciación o progresión de los procesos de senescencia (Zhang and Zhou, 2013). De hecho, la producción JA durante la senescencia se ha sugerido que es una consecuencia de un aumento del recambio en la membrana tilacoide (Seltmann et al., 2010). Por lo tanto los autores de este estudio sugieren que la activación de las enzimas biosintéticas plastídicas de JA unidas a los plastoglóbulos de los mutantes *k3::k1* es una consecuencia del proceso de clorosis de la planta, facilitando de esta manera la removilización de lípidos de los tilacoides y exportación fuera del cloroplasto.

Características similares, a nivel de fenotipo y celular se pueden observar en las plántulas de las líneas de en donde los genes *AtFPS* se encuentran silenciados. En ambos casos se observa clorosis en las plántulas, una alteración en la estructura de las membranas tilacoides y un aumento de plastoglóbulos (Figura 14 y 21) lo que sugiere la posibilidad de que en las plantas silenciadas exista un mecanismo parecido de activación de la síntesis y señalización de JA. Esta hipótesis se ve apoyada con los resultados del análisis transcriptómico en donde se encuentran inducidos los genes *LOX4* y *AOC1* (Tabla 3) que participan en los primeros pasos de la biosíntesis de JA ubicada en los cloroplastos y que son los encargados de la oxidación de los PUFAs y de mediar el paso a la obtención de OPDA, precursor del ácido jasmónico.

Por otro lado diversos estudios realizados en mutantes *knockout* de *Arabidopsis*, deficientes en varios componentes clave del sistema fotoprotección del cloroplasto, han mostrado mayores concentraciones de la hormona ácido jasmónico o su precursor OPDA, sugiriendo una relación mecanicista entre fotoprotección planta y la síntesis de estas hormonas reguladoras del desarrollo y la defensa (Demmig-Adams et al., 2013). Estos antecedentes y el hecho de que en las plántulas de las líneas en donde los genes *AtFPS* se encuentran silenciados, exista una disminución en los niveles

de carotenoides (Figura 22), compuestos antioxidantes y que ejercen funciones de fotoprotección en la planta, permiten especular sobre la existencia de un estrés fotooxidativo en estas plántulas, razón por la cual se encuentre alterada la función del cloroplasto y se active la vía del JA.

Además, trabajos recientes han demostrado que JA también se sintetiza en respuesta a oxígeno singlete. El oxígeno singlete es una forma prominente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se genera durante la fotosíntesis oxigénica (Mühlenbock et al., 2008; Krieger-Liszkay and Trebst, 2006). Estos antecedentes en conjunto con los resultados de RNA-seq en donde se observan genes del metabolismo antioxidante altamente inducidos (GST, Tabla 4), sugiriendo la posibilidad de una desintoxicación y protección frente a una acumulación de ROS en los cloroplastos, abre la posibilidad de que la inducción de los genes de la vía del JA, sea una consecuencia del estrés oxidativo provocado por brotes incontrolados de ROS.

En resumen los resultados del análisis transcriptómico del efecto que causa el silenciamiento de los genes *AtFPS* abren un mundo de posibilidades que hasta ahora han sido desconocidas y se requiere de diferentes tipos de abordajes para la disección de las respuestas. En primer lugar sería interesante diferenciar estas respuestas en función del tiempo, ya que esto permitirá averiguar el orden de los eventos que provocan la aparición de los fenotipos moleculares y macroscópicos. Esta información sería muy valiosa a la hora de desarrollar estrategias que permitan dilucidar los mecanismos por los cuales se generan estas respuestas que comunican la biosíntesis de isoprenoides citosólicos, con el metabolismo de Fe, el desarrollo del cloroplasto y la vía del JA. Cabe señalar, como ya se ha mencionado anteriormente, que en las mitocondrias se aloja FPS1L (Cunillera et al., 1997) y el que el silenciamiento del gen puede estar afectando también a los compuestos dependientes del FPP mitocondrial.

Este trabajo representa la primera aproximación transcriptómica sobre la función de los genes *AtFPS*, la cual entrega datos relevantes acerca de su efecto sobre la expresión génica global y por lo tanto, sobre su interacción en otros procesos esenciales para la planta que hasta ahora no han sido descritos en la literatura.

CONCLUSIONES I

CONCLUSIONES I

1. El silenciamiento de los genes *AtFPS* provoca una importante reducción en los niveles de mRNA, proteína y actividad FPS, lo que demuestra la alta eficiencia que presenta la estrategia inducible utilizada, en combinación con el uso de amiRNAs. El uso de esta estrategia permite además, obtener líneas perfectamente viables y fértiles en condiciones no inductivas, pudiendo así propagar los mutantes obtenidos.
2. Como consecuencia del silenciamiento de los genes *AtFPS*, las plántulas transgénicas presentaron un fenotipo de clorosis y una reducción importante del tamaño, tanto en la parte aérea como en la raíz.
3. Al silenciar los genes *AtFPS*, se produce un bloqueo en la actividad FPS lo que provoca una reducción significativa en los niveles de los esteroides mayoritarios como el sitoesterol, el campesterol y el estigmasterol.
4. El bloqueo de la síntesis de FPP provoca, además, un aumento de la actividad HMGR a través de un mecanismo de regulación que opera a nivel post-traducciona.
5. El análisis de los cloroplastos de las plántulas silenciadas reveló una disminución en el número y el tamaño de estos orgánulos, lo que justifica la importante reducción detectada en los niveles de clorofilas y carotenoides. A nivel de ultraestructura, se observó una dramática alteración en la organización del cloroplasto.
6. El análisis transcriptómico de expresión diferencial realizado a través de la tecnología de RNA-seq, en plántulas silenciadas y no silenciadas, permitió identificar importantes grupos de genes desregulados como consecuencia del silenciamiento de *AtFPS*.
7. Entre los genes identificados se encontraron genes relacionados con la homeostasis de Fe. El perfil de expresión detectado sugiere que el silenciamiento de los genes *AtFPS* desencadena una respuesta génica que mimetiza la descrita en respuesta a un

déficit de Fe. Los mecanismos por los cuales se produce esta respuesta aún son desconocidos.

8. Los resultados de expresión diferencial génica revelaron que el silenciamiento de los genes *AtFPS* produce, además, una respuesta en los niveles de expresión de otros grupos de genes. Entre ellos, se observa la inducción de los genes de la familia GST (asociados a respuestas de desintoxicación), así como una fuerte inducción del gen *ABCG40* (un transportador de ABA y otros isoprenoides).

9. Asimismo se ha detectado una respuesta transcriptómica relacionada con la vía de señalización del JA. En concreto, se ha detectado, la inducción de una serie de genes relacionados con la biosíntesis y homeostasis de JA, con su vía de señalización, así como varios genes diana. El conjunto de resultados reproduce el perfil de expresión génica provocado por la aplicación de JA.

CAPÍTULO II

Ingeniería Metabólica para la producción de
sesquiterpenos en Arabidopsis

RESULTADOS II

RESULTADOS II

Ingeniería metabólica para la producción de sesquiterpenos en el citosol-RE

1. Versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE para la redirección del FPP citosólico hacia la síntesis de sesquiterpenos.

Los resultados en el campo de la producción de sesquiterpenos mediante biotecnología no han sido del todo satisfactorios, a pesar de que los niveles de FPP disponibles en el citosol para la síntesis de estos compuestos son, aparentemente, elevados (Aharoni et al., 2005). Así, la expresión de distintas sesquiterpeno sintasas en este compartimento celular no se ha traducido en la síntesis de sesquiterpenos (Sharon-Asa et al., 2003) o bien ha dado lugar a niveles muy bajos de los productos esperados (Wallaart et al., 2001; Wu et al., 2006). Por lo tanto, el FPP citosólico, parece estar disponible para la síntesis de esteroides pero no así para la síntesis de sesquiterpenos. En cambio, la expresión de sesquiterpeno sintasas en otros compartimientos celulares, como en la mitocondria, ha permitido superar los mecanismos homeostáticos que aparentemente limitan la disponibilidad del FPP citosólico (Kappers et al., 2005; Houshyani et al., 2013).

A fin de investigar si el FPP disponible en el citosol podía desviarse hacia la síntesis de sesquiterpenos, y partiendo de la hipótesis de que la localización de la SQS en el RE (Busquets et al., 2008) le permite acceder libremente al FPP producido en el citosol para transformarlo en el escualeno precursor de los esteroides, se diseñó una estrategia para anclar la sesquiterpeno sintasa FaNES1 (Aharoni et al., 2003, 2004) a las membranas del RE. Concretamente, se diseñaron dos versiones quiméricas de FaNES1 que se denominaron dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS1. La quimera dmHMGR1S-FaNES1-3HA estaba formada por los 178 aminoácidos del dominio N-terminal de membrana de la isoenzima HMGR1S de *A. thaliana* (Campos and Boronat, 1995), fusionados al extremo N-terminal de FaNES1, mientras que la quimera 3HA-FaNES1-dmSQS1 contenía los 66 aminoácidos del dominio C-terminal de membrana de la enzima SQS1 de *A. thaliana* (Kribii et al., 1997), fusionados al extremo C-terminal de FaNES1, (Figuras 27 y 28).

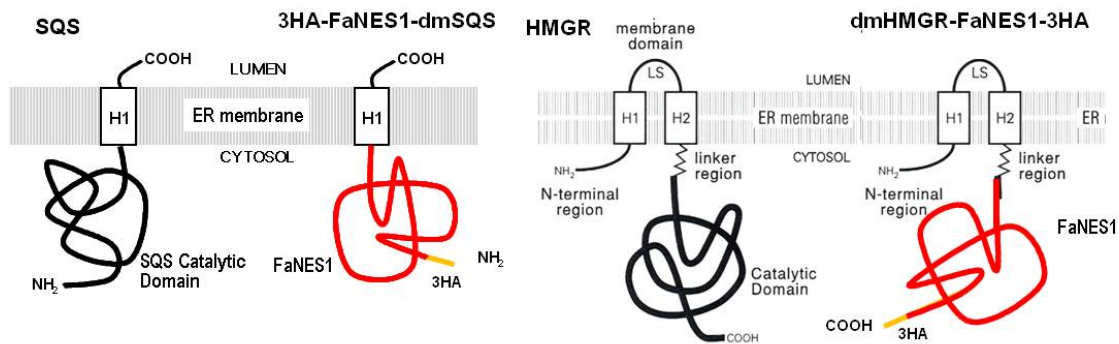


Figura 27. Topología de las fusiones quiméricas 3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA en la membrana del RE. Esquema de las quimeras de FaNES1 diseñadas para anclar la enzima en la membrana del RE y desviar el FPP citosólico hacia la síntesis de sesquiterpenos. Se muestran también los modelos topológicos de la SQS y la HMGR nativas. H1 y H2 representan las secuencias hidrofóbicas de transmembrana de los dominios de anclaje al RE de la SQS y la HMGR. El dominio FaNES1 de las quimeras 3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA se representa en rojo y en amarillo se indica el triple epítipo HA. El dominio FaNES1 queda orientado hacia el citosol, como ocurre con los dominios catalíticos de las enzimas SQS y HMGR.

Además de las versiones quiméricas ancladas al RE se diseñó una versión soluble de FaNES1 que fue sobreexpresada en el citosol y que permite establecer un parámetro comparativo entre la sobreexpresión de las versiones ancladas al RE y la versión citosólica. En los tres casos a las proteínas quiméricas se les incorporaron tres copias del epítipo HA para poder detectar los niveles de expresión de cada proteína mediante *Western blot* utilizando anticuerpos anti HA.

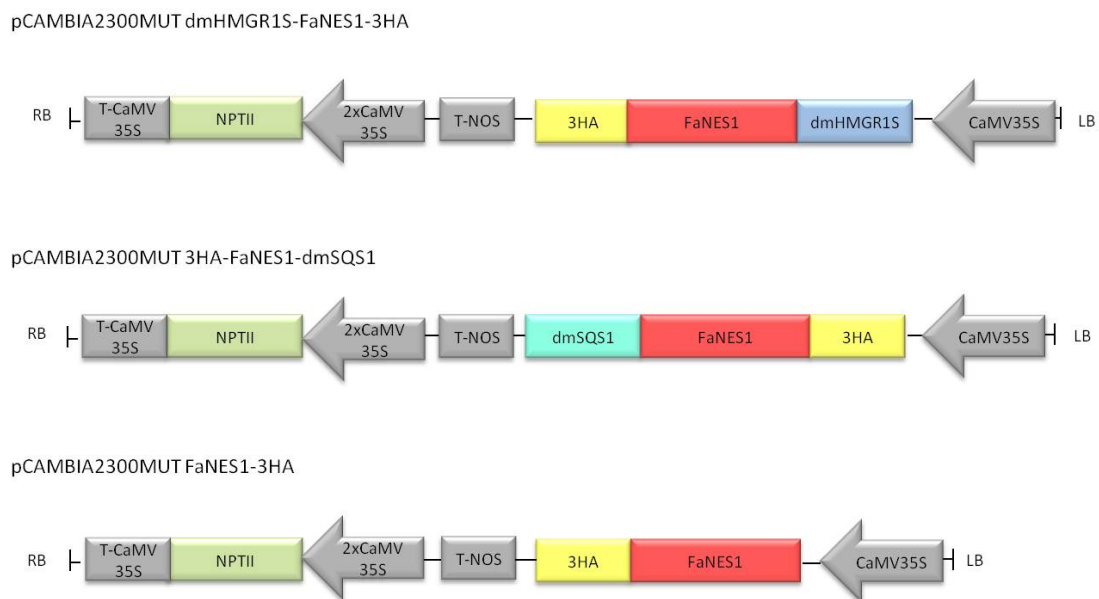


Figura 28. Esquema de la región del T-DNA del vector pCAMBIA2300MUT que incluye las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, y FaNES1-3HA. Las flechas en gris claro representan el promotor constitutivo *CaMV35S*. Las cajas representan: en azul claro la secuencia que codifica para los 178 aminoácidos del dominio de membrana de la HMGR1S; en turquesa la secuencia que codifica para los 66 aminoácidos del dominio de membrana de la SQS1; en rojo la secuencia codificante completa de FaNES1 y en amarillo la secuencia que codifica para el triple epítipo 3HA. Las cajas grises T-NOS corresponden al terminador del gen de la *nopalina sintasa*; las cajas verde claro *NPTII* corresponden al gen de resistencia a la kanamicina; las cajas grises *T-CaMV35S* corresponden al terminador del virus del mosaico de la coliflor; LB: left border; RB: right border.

1.1. Localización subcelular de las versiones quiméricas, dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA fusionadas a la GFP en hojas de *N. benthamiana*.

Antes de proceder a la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* para sobreexpresar, dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA, se procedió a comprobar su correcta ubicación en el RE y en el citosol, respectivamente. Para ello, se prepararon construcciones que expresaban transitoriamente las versiones quiméricas de FaNES1 fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP (Figura 29). La GFP se fusionó, según el caso, en el extremo N o C-terminal opuesto al dominio de membrana de la SQS1 o de la HMGR1S para evitar que la fusión interfiriera en la inserción de las quimeras en las membranas del RE y pudiera alterar su localización subcelular.

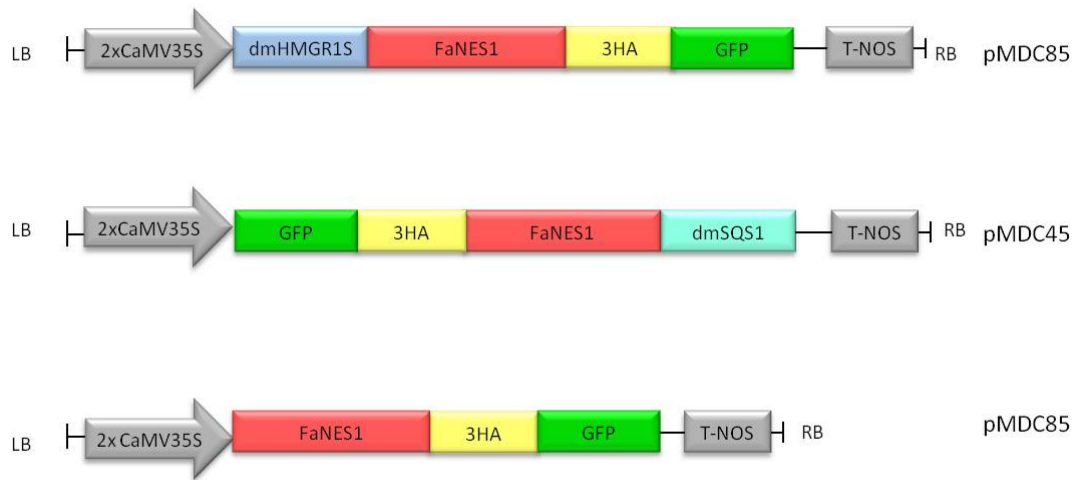


Figura 29. Esquema de la región del T-DNA de los vectores utilizados para la localización subcelular de las construcciones químicas dmHMGR1S-FaNES1,-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA en *N. benthamiana*. Las flechas en gris claro 2xCaMV35S representan el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. Las cajas representan: en azul claro la secuencia que codifica para los 178 aminoácidos del dominio de membrana de la HMGR1S; en turquesa la secuencia que codifica para los 66 aminoácidos del dominio de membrana de la SQS1; en rojo la secuencia codificante completa de FaNES1 y en amarillo la secuencia que codifica para el triple epítipo 3HA. Las cajas verdes representan la GFP y las cajas grises T-NOS corresponden al terminador del gen de la nopalina sintasa; LB: left border; RB: right border.

Las fusiones FaNES1-3HA-GFP, dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP y GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 se expresaron de forma transitoria en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas y los patrones de fluorescencia se analizaron mediante microscopía láser confocal (Figura 30).

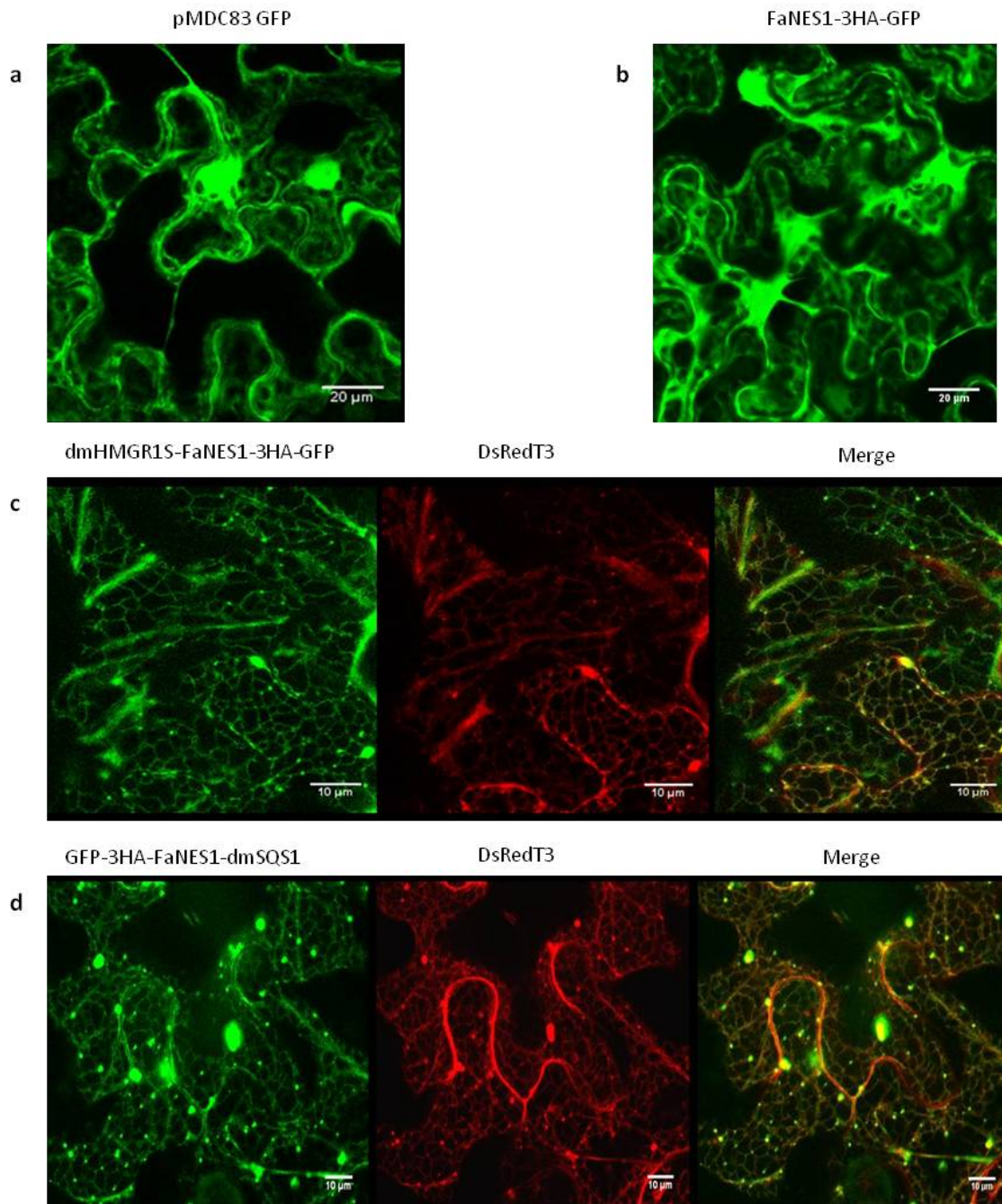


Figura 30. Localización subcelular de las construcciones quiméricas de FaNES1 expresadas *N. benthamiana*. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal de células de hojas de *N. benthamiana* que muestran la fluorescencia proveniente de la expresión de las proteínas FaNES1-3HA-GFP (b), dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP (c), GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 (d) y GFP (a) usada como control de localización citosólica. DsRedT3 corresponde a la proteína fluorescente roja usada como control de localización en el retículo. Las imágenes son una proyección tridimensional de entre 11 y 18 secciones de 1,5 μm cada una. Las barras blancas indican una escala de 10 y 20 μm. Imágenes de expresión transitoria obtenidas a los 3 días post-infiltración.

Como puede observarse en la Figura 30, la proteína FaNES1-3HA-GFP presenta un patrón de fluorescencia idéntico al de la proteína GFP usada como control de localización citosólica, excepto por la presencia de fluorescencia en el núcleo de las células, que sólo se detectó en el caso de la GFP. Esto se debe a que la GFP es suficientemente pequeña para atravesar la membrana del núcleo, mientras que el mayor tamaño de FaNES1-3HA-GFP le impide entrar en él. Estos resultados pusieron de manifiesto la localización citosólica de FaNES1 unida al triple epítipo. En cambio, las proteínas quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP y GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 dieron lugar a un patrón de fluorescencia reticular que colocaliza con el patrón de fluorescencia emitido por el marcador de RE DsRed T3. Los resultados indican que dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP y GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 se localizan correctamente en el RE.

1.2. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* para sobreexpresar las versiones de la enzima FaNES1 en el RE y en el citosol.

Confirmada la correcta localización de las distintas versiones quiméricas de FaNES1, se procedió a la obtención de líneas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresoras de las distintas versiones de la enzima, incluyendo las ancladas al RE y la versión citosólica, para evaluar y comparar la producción de sesquiterpenos.

Para la obtención de las plantas transgénicas se utilizó en todos los casos un vector pCAMBIA2300 modificado en el que se introdujo el promotor *CaMV35S* para dirigir la expresión de los genes quiméricos. Este vector se renombró pCAMBIA2300MUT (Figura 28). Se obtuvieron varias líneas transgénicas sobreexpresoras de cada proteína, tal y como demostraron los análisis por *Western blot* usando anticuerpos anti-HA realizados en plantas de las generaciones T1 y T2. Sin embargo, al analizar la generación T3 se observó que la mayoría de las líneas que en generaciones anteriores presentaban niveles elevados de las distintas proteínas, habían perdido de forma parcial o incluso total la expresión de los correspondientes transgenes (resultados no mostrados). El silenciamiento se hizo más evidente en aquellas líneas que habían presentado mayores niveles de proteína en generaciones previas. En algunos casos también se perdió parcialmente la resistencia a la

kanamicina, lo que se hizo más patente en aquellas líneas que habían perdido totalmente la expresión de las distintas versiones de FaNES1.

El problema del silenciamiento observado en la mayoría de las líneas transgénicas de *A. thaliana* en las que se pretendía sobreexpresar las quimeras dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA, pudo deberse a la existencia de 3 copias del promotor *CaMV35S* en el vector pCAMBIA2300MUT; dos copias para dirigir la expresión del gen de resistencia a la kanamicina y una copia para dirigir la expresión de las distintas quimeras de FaNES1. Por lo tanto, se procedió a modificar la estructura del vector pCAMBIA2300MUT, sustituyendo las dos copias del promotor *CaMV35S* que dirigen la expresión del gen de resistencia a la kanamicina por el promotor del gen de la *nopalina sintasa*. Al vector resultante se le dió el nombre de pCAMBIA2300MUTPA.

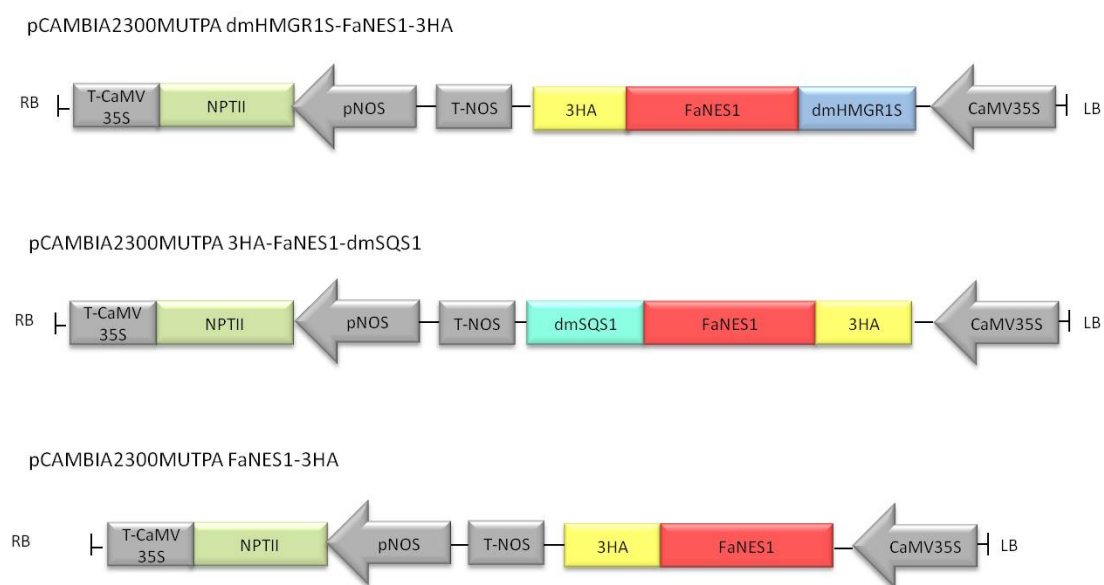


Figura 31. Región del T-DNA del vector pCAMBIA2300MUTPA que incluye las construcciones para expresar las proteínas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA. Las flechas en gris claro *CaMV35S* representan el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. Las cajas en azul claro representan la secuencia que codifica para los 178 aminoácidos del dominio de membrana de la HMGR1S; en turquesa la secuencia que codifica para los 66 aminoácidos del dominio de membrana de la SQS1; en rojo la secuencia codificante completa de FaNES1 y en amarillo la secuencia que codifica para el triple epítipo 3HA. Las cajas grises T-NOS corresponden al terminador del gen de la *nopalina sintasa* y las flechas grises pNOS el promotor *pNOS* de la *nopalina sintasa*. Las cajas verde claro corresponden al gen de resistencia a la kanamicina y las cajas grises T-CaMV35S corresponden al terminador del virus del mosaico de la coliflor; LB: left border; RB: right border.

Las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, y FaNES1-3HA se trasladaron al nuevo vector pCAMBIA2300MUTPA (Figura 31), y se procedió a la obtención de nuevas plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaran las distintas versiones de FaNES1.

Se obtuvieron varias líneas transgénicas para cada construcción que fueron analizadas en las generaciones T1 y T2 mediante *Western blot* empleando anticuerpos anti-HA. En la generación T2 se escogieron las líneas transgénicas sobreexpresoras que presentaron un porcentaje de segregación del carácter de resistencia al antibiótico aceptable, las cuales se llevaron a homocigosis. En homocigosis se seleccionaron entre 4 y 5 líneas de cada una de las versiones de FaNES1 para su posterior caracterización molecular y análisis de la producción de sesquiterpenos volátiles.

1.3. Caracterización molecular de líneas transgénicas sobreexpresoras de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE y citosólica.

Los niveles de mRNA en las líneas sobreexpresoras de las versiones quiméricas ancladas al RE y de la versión citosólica de FaNES1 se analizaron por RT-PCR en líneas homocigotas para los transgenes. Como control negativo se usó RNA total de plantas wt de *A.thaliana* del mismo fondo genético. Cabe señalar que las plantas wt de *A.thaliana* se consideran control negativo ya que la FaNES1 es una sesquiterpeno sintasa de fresa que no se encuentra presente en *A. thaliana*, con lo cual en las plantas wt no deben detectarse ni el mensajero ni la proteína FaNES1.

Como puede observarse en la Figura 32, en la mayoría de las líneas de la quimera dmHMGR1S-FaNES1-3HA se confirmó la expresión del mRNA, siendo la línea H12-1 la que presentó los niveles más elevados de mensajero en comparación con el resto de líneas analizadas. Mientras que en las Figuras 33 y 34 puede observarse que en todas las líneas transgénicas analizadas se confirmó la expresión del mRNA correspondiente a las quimeras 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA, observándose que los niveles de expresión de los mensajeros eran diferentes entre las líneas analizadas. Se observa que la línea S11-8 de la versión quimérica 3HA-FaNES1-dmSQS1 (Figura 33) y la línea F2-1 de la versión citosólica FaNES1-3HA (Figura 34), son las que presentaron un mayor nivel de expresión de mensajero en comparación con el resto

de líneas analizadas. Como era de esperar, en las plantas wt no se detectó expresión alguna del mensajero correspondiente a FaNES1.

Una vez analizados los niveles de mRNA de los distintos transgenes, se analizaron los niveles de proteína mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-HA en extractos proteicos de las mismas líneas analizadas por RT-PCR. Como se observa en la Figura 35, en todas las líneas portadoras de los transgenes que codifican las versiones de retículo de FaNES1 se detectó la expresión de las proteínas, aunque se observaron variaciones muy sustanciales entre las distintas líneas transgénicas, tanto en las que expresan dmHMGR1S-FaNES1-3HA como las que expresan 3HA-FaNES1-dmSQS1. Las líneas H8-7 y H12-1 (dmHMGR1S-FaNES1-3HA) y las líneas S11-8 y S12-4 (3HA-FaNES1-dmSQS1) son las que expresaban los niveles más altos de las enzimas.

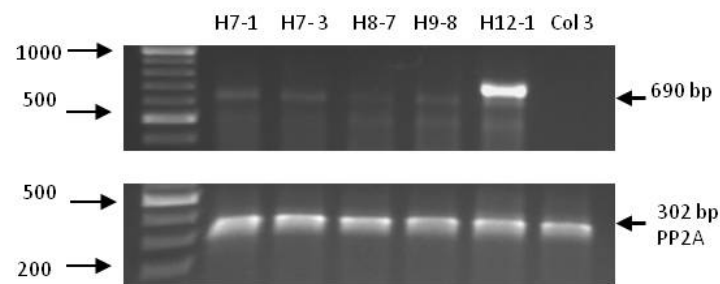


Figura 32. Determinación de los niveles de mRNA dmHMGR1S-FaNES1-3HA mediante RT-PCR. Mediante RT-PCR se amplificó un fragmento de 690 pb del mensajero de FaNES1 a partir de RNA obtenido de plántulas de 12 días de edad sobreexpresoras de la versión química dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Se analizaron 5 líneas homocigotas para el transgén: H7-1, H7-3, H8-7, H9-8 y H12-1. En la parte inferior de la figura se muestra la normalización de las muestras de RNA a través de la amplificación de un fragmento de 302 pb del mensajero del gen *AtPP2A* (*At1g13320*).

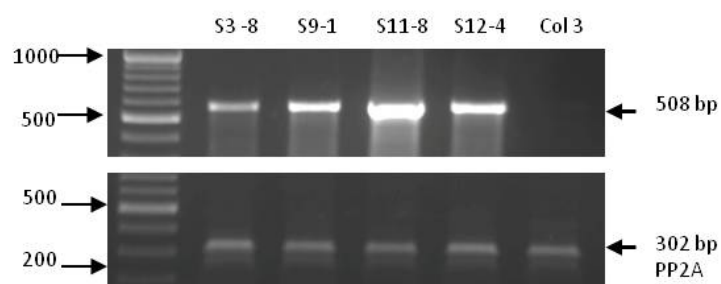


Figura 33. Determinación de los niveles de mRNA 3HA-FaNES1-dmSQS1 mediante RT-PCR. Mediante RT-PCR se amplificó un fragmento de 508 pb del mensajero de FaNES1 a partir de RNA obtenido de plántulas sobreexpresoras de 12 días de edad de la versión química 3HA-FaNES1-dmSQS1. Se analizaron 4 líneas homocigotas para el transgén: S3-8, S9-1, S11-8 y S12-4. En la parte inferior de la figura se observa la normalización de las muestras de RNA a través de la amplificación de un fragmento de 302 pb del mensajero del gen *AtPP2A* (*At1g13320*).

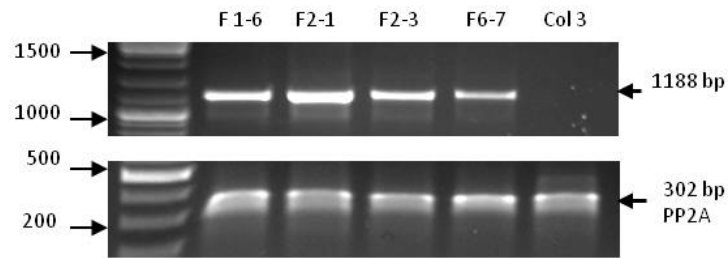


Figura 34. Determinación de los niveles de mRNA FaNES1-3HA mediante RT-PCR. Mediante RT-PCR se amplificó un fragmento de 1188 pb del mensajero de FaNES1 a partir de RNA obtenido de plántulas sobreexpresoras de 12 días de edad de la versión quimérica FaNES1-3HA. Se analizaron 4 líneas homocigotas para el transgén: F1-6, F 2-1, F 2-3 y F 6-7. En la parte inferior de la figura se observa la normalización de las muestras de RNA a través de la amplificación de un fragmento de 302 pb del mensajero del gen *AtPP2A* (*At1g13320*).

Por el contrario, no se detectó expresión de la proteína FaNES1-3HA en ninguna de las 4 líneas seleccionadas pese a detectarse la expresión del correspondiente mRNA (Figura 34). A la vista de este resultado, se analizaron por *Western blot* hasta un total de 30 nuevas líneas de las generaciones T1 y T2, no detectándose expresión de la proteína en ninguna de ellas. Ello lleva a concluir que si la proteína FaNES1-3HA se está expresando, los niveles están por debajo del umbral de detección del anticuerpo anti

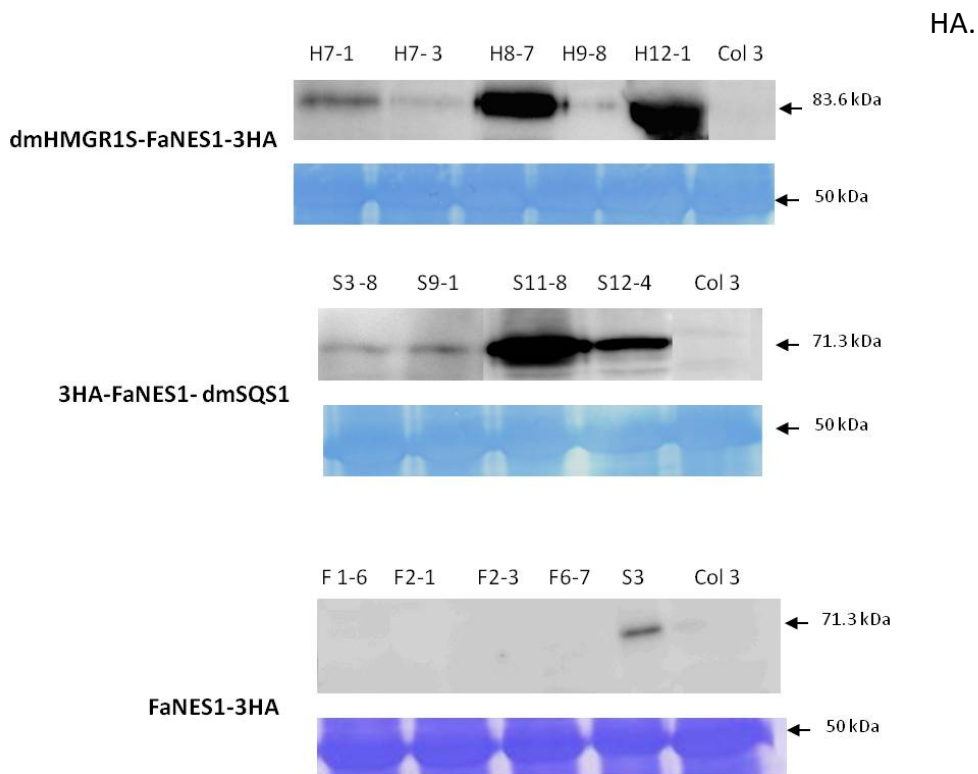


Figura 35. Análisis de los niveles de proteína de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE y citosólica mediante Western blot. Extractos proteicos (30 µg de proteína total del sobrenadante de 200 x g) de plántulas de 12 días de edad de las líneas indicadas en la parte superior de cada imagen, los

cuales se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 9% y se transfirieron a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo primario anti-HA (dilución 1:500) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:5000). La masa molecular de las proteínas quiméricas se indica a la derecha de la imagen. En todos los análisis se utilizaron como controles negativos extractos proteicos de plantas wt de *A. thaliana*. En la figura inferior, el carril S3 corresponde a 30 µg de proteína total de la línea S3 (generación T2) que expresa 3HA-FaNES1-dmSQS1, que se utilizó como control positivo. A efectos de normalización, debajo de cada *Western blot* se muestra la región de la membrana de PDVF que contiene la subunidad grande de la RuBisCo (50kDa) teñida con Coomassie blue.

En resumen, los resultados del análisis por *Western blot* confirmaron la expresión de la proteína en los extractos proteicos correspondientes a las líneas que expresan las quimeras de FaNES1 ancladas a la membrana del RE, mientras que no fue posible detectar la expresión de la proteína en la versión citosólica de FaNES1.

Para descartar que la falta de expresión de FaNES1-3HA fuese a causa de la existencia de alguna mutación en el transgén que codifica la enzima, se procedió a amplificar, clonar y secuenciar el correspondiente cDNA a partir de RNA de la línea F2-1. El análisis de la secuencia reveló que la única diferencia entre la secuencia de cDNA recuperada de la línea y la secuencia original de FaNES1-3HA era un cambio de C por T en la posición 876 del cDNA. No obstante, esta mutación es silenciosa ya que, independientemente de cuál sea la base en la tercera posición del triplete afectado (CTC→CTT), el aminoácido codificado es siempre valina. El hecho de que la secuencia del mensajero correspondiente al transgen para expresar FaNES1-3HA fuera correcta, indica que o bien el mensajero se traduce con poca eficiencia o bien la proteína FaNES1 dirigida al citosol es poco estable y se degrada rápidamente. A la vista de este resultado negativo, se decidió expresar las mismas versiones de la proteína en otro sistema, concretamente, en hojas de *N. benthamiana*, para analizar si se conseguía detectar la expresión de la proteína de FaNES1 citosólica.

1.4. Expresión transitoria de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas RE y citosólica en hojas de *N. benthamiana*.

A partir de los resultados anteriores, y en particular del resultado negativo obtenido al intentar sobreexpresar FaNES1 en el citosol, se decidió expresar transitoriamente las versiones ancladas al RE y la versión citosólica de FaNES1 en hojas

de plantas de *N. benthamiana*. Para ello, plantas de *N. benthamiana* de 5-6 semanas de edad se agroinfiltraron con suspensiones de *A. tumefaciens* portadoras de las construcciones para expresar dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA, así como el vector pCAMBIA2300MUTPA vacío que se usó como control negativo.

Con el objetivo de establecer el momento de máxima expresión de las distintas proteínas, se obtuvieron extractos proteicos de hojas recogidas a intervalos de tres días después de la infiltración, en los que se analizó la presencia de las diferentes versiones de la proteína mediante *Western blot* con anticuerpos anti-HA. En la Figura 36, se observa que el anticuerpo detecta la presencia de las proteínas 3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA en todos los extractos analizados, observándose la mayor expresión en ambos casos a los 3 días post-infiltración y siendo la quimera dmHMGR1S-FaNES1-3HA la que se producía en mayor cantidad. Sin embargo, al igual que ocurría en *A. thaliana*, tampoco fue posible detectar la presencia de la versión citosólica de FaNES1-3HA en ninguno de los extractos proteicos analizados.

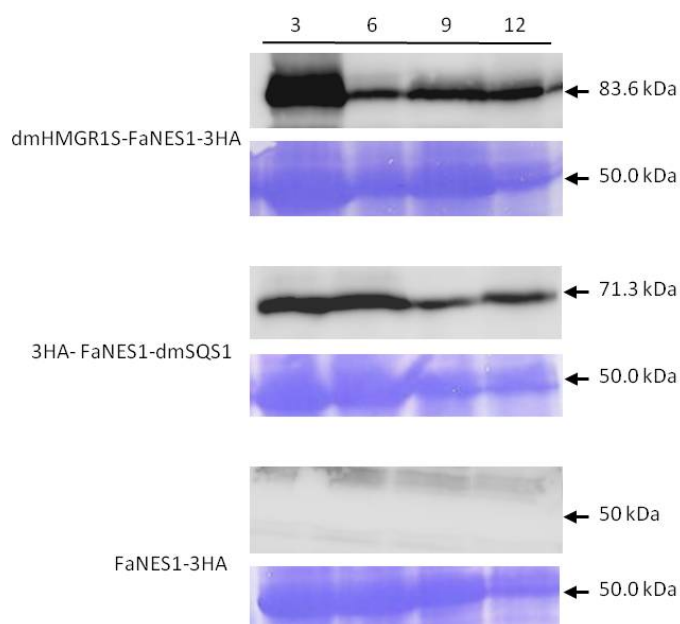


Figura 36. Cinética de expresión de las diferentes versiones quiméricas de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*. Extractos proteicos (30 μ g de proteína total del sobrenadante de 16.000 x g) de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones para expresar las proteínas indicadas a la izquierda de las imágenes, los cuales se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 9% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las muestras de hojas se recolectaron a los 3, 6, 9 y 12 días post-infiltración. Las condiciones para la inmunodetección se han descrito en la Figura 35. La masa molecular de las proteínas quiméricas se indica a la derecha de la imagen. El panel inferior de cada *Western blot* muestra la región de la membrana de PVDF que contiene la subunidad grande de la RuBisCo (50kDa) teñida con Coomassie blue.

Para analizar si a tiempos más cortos se producían cantidades todavía mayores de las proteínas ancladas al RE, y observar si a menos días era posible detectar la presencia de la proteína FaNES1-3HA citosólica, se realizó una nueva cinética, esta vez incluyendo un tiempo más corto e infiltrando 3 plantas por cada versión quimérica de FaNES1.

Como se observa en la Figura 37, los niveles de expresión de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE a los dos días post infiltración, son muy similares a los obtenidos al cabo de 4 días. Por otro lado, tal y como ya se había observado (Figura 36), los niveles de dmHMGR1S-FaNES1-3HA son mayores que los de 3HA-FaNES1-dmSQS1.

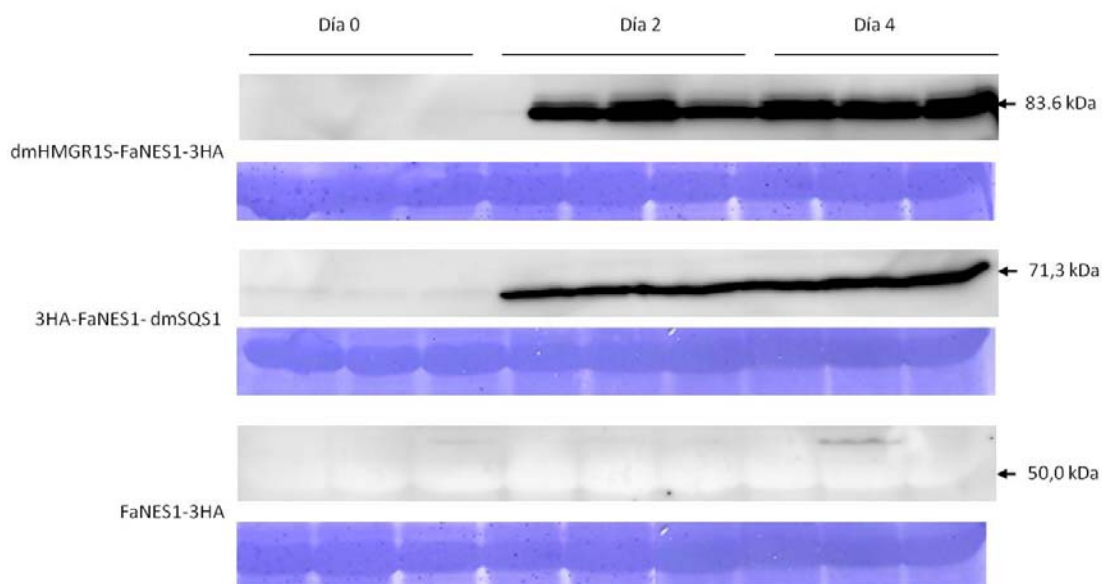


Figura 37. Cinética de expresión de las diferentes versiones quiméricas de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*. Extractos proteicos (40 μ g del sobrenadante de 16.000 x g) de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones para expresar las proteínas indicadas a la izquierda de las imágenes, los cuales se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 9% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las condiciones para la inmunodetección se encuentran descritas en la Figura 35. Las muestras de hojas se recolectaron a los 0, 2 y 4 días post-infiltración. La masa molecular de las proteínas quiméricas se indica a la derecha de la imagen. El panel inferior de cada *Western blot* se muestra la región de la membrana de PDVF que contiene la subunidad grande de la RuBisCo (50kDa) teñida con Coomassie blue.

Respecto a la versión citosólica de FaNES1, a tiempos más cortos tampoco se detectó la expresión de la proteína (Figura 37). Se repitió el *Western blot* con otros stocks de anticuerpos anti-HA sin mayor éxito. En este contexto y ante la imposibilidad de detectar la expresión de la proteína FaNES1 citosólica, se procedió a agroinfiltrar las plantas con la misma construcción que se había utilizado para confirmar la localización citosólica de FaNES1-3HA (FaNES1-3HA-GFP) (Figura 30), puesto que los experimentos de localización subcelular habían demostrado que en hojas de *N. benthamiana* era posible detectar la expresión de esta versión soluble de FaNES1. Se obtuvieron extractos a los dos días después de la infiltración y se analizaron por *Western blot*. Los resultados confirmaron no sólo la expresión de FaNES1-3HA-GFP, sino que los niveles de la proteína FaNES1-3HA-GFP eran incluso superiores a los de dmHMGR1S-FaNES1-3HA (Figura 38a).

La cuantificación de las bandas detectadas por el anticuerpo en las tres réplicas del *Western blot* permitió establecer que la versión citosólica unida a la GFP presenta niveles de 1,5 y 3 veces superiores a los observados en las versiones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS1, respectivamente (Figura 38b). A partir de estos resultados se decidió seguir con la caracterización de las versiones de FaNES1 ancladas al retículo, y las dos versiones citosólicas en términos de niveles de mRNA y de producción de sesquiterpenos volátiles con muestras recogidas a los dos días post-infiltración.

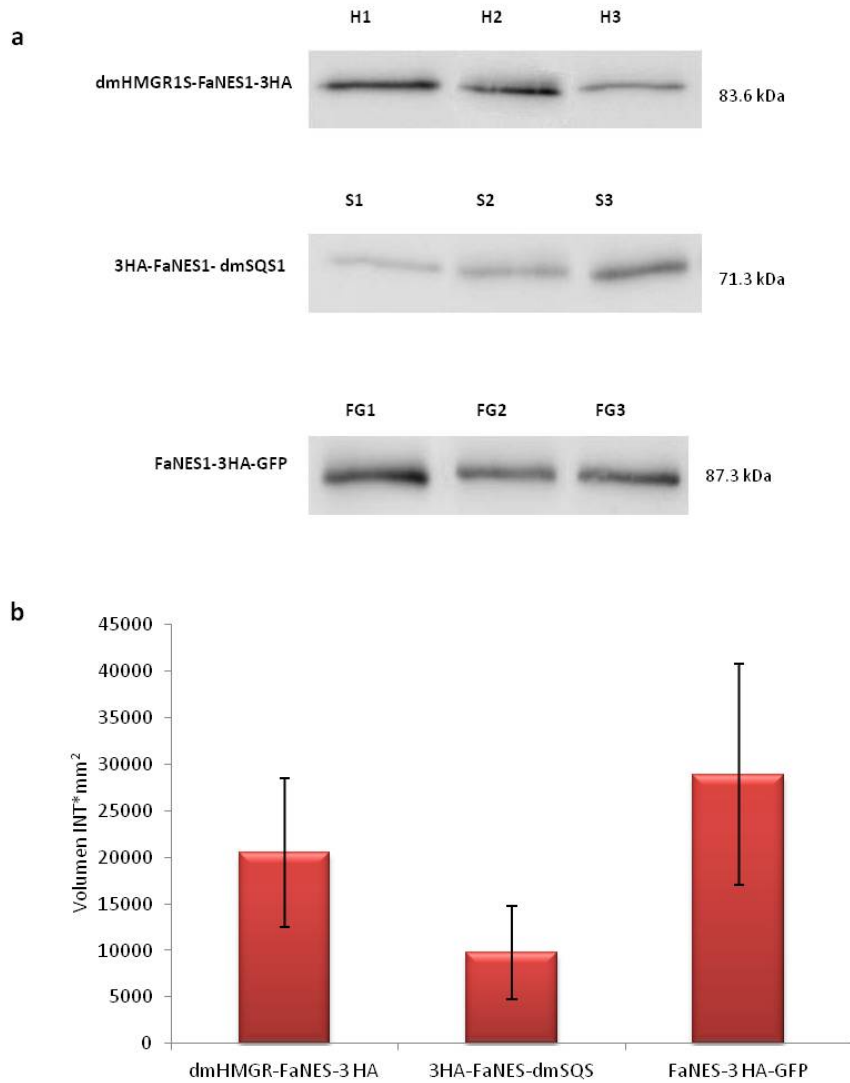


Figura 38. Cuantificación de los niveles de proteína dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA-GFP en hojas de *N. benthamiana*. (a) Extractos proteicos (2,5 μ g de proteína total del sobrenadante de 16.000 x g) de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones para expresar las proteínas indicadas a la izquierda de las imágenes. Las hojas fueron recolectadas a 2 días post-infiltración y los extractos proteicos se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 9% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las condiciones para la inmunodetección se encuentran descritas en la Figura 35. La masa molecular de las proteínas quiméricas se indica a la derecha de la imagen. (b) En el gráfico se muestra la cuantificación de las bandas de proteína detectadas por el anticuerpo mediante el programa *Quantityone* (BIO-RAD), expresado en Unidades de Intensidad (INT) por mm². Los valores obtenidos son la media de la cuantificación de 3 réplicas biológicas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

2. Enzimas bifuncionales FPS1S/FaNES1 para la redirección del FPP citosólico hacia la síntesis de sesquiterpenos.

En paralelo a la expresión de FaNES1 en la membrana del RE, se abordó una estrategia alternativa consistente en expresar dos versiones quiméricas de FaNES1 fusionadas a la isoenzima FPS1S, tanto a N- como a C-terminal, con el objetivo de investigar si las enzimas bifuncionales resultantes, FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 (Figura 39), eran capaces de sintetizar nerolidol directamente a partir de IPP y DMAPP en el citoplasma. La unión de ambas enzimas FaNES1 y FPS1S se realizó a través de un oligopéptido de 5 aminoácidos (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln) que previamente se había demostrado que funcionaba en la enzima bifuncional fructosa-1,6 bisfosfato aldolasa/dihidroxiacetona quinasa (Iturrate et al., 2010).

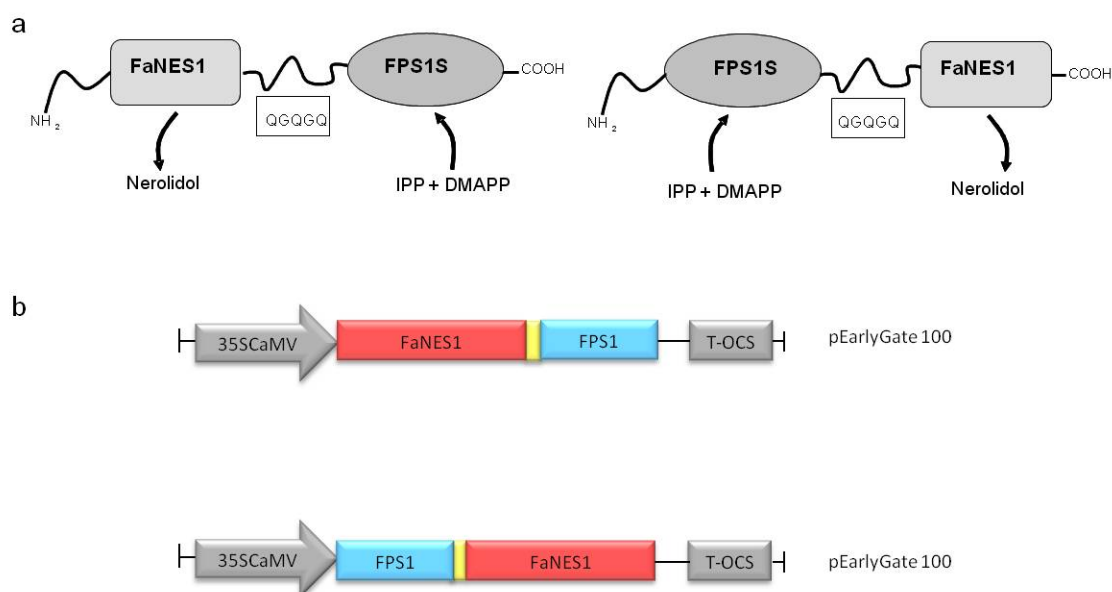


Figura 39. Esquema de las enzimas bifuncionales FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1. (a) Modelos de las fusiones quiméricas FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 diseñadas para canalizar el IPP y el DMAPP citosólicos directamente hacia la síntesis de nerolidol. La secuencia de aminoácidos QGQGQ corresponde al péptido empleado para unir ambas enzimas FaNES1 y FPS1S. (b). Esquema de los genes quiméricos para expresar las enzimas bifuncionales mostradas en (a) en hojas de *N. benthamiana*. En azul se indica la secuencia codificante de FPS1S, en rojo la secuencia codificante de FaNES1 y en amarillo la secuencia correspondiente al péptido de enlace entre ambas.

2.1. Expresión transitoria de las fusiones quiméricas FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*.

Las construcciones que codifican para las enzimas bifuncionales FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* y a los dos días post-infiltración, se prepararon extractos proteicos que se analizaron mediante *Western blot*, utilizando el anticuerpo anti-FPS disponible en nuestro laboratorio (Masferrer et al., 2002).

En ambos casos el anticuerpo detectó una banda correspondiente a una masa molecular de 99.0 kDa que era la esperada para las fusiones FPS1S/FaNES1, observándose que el nivel de expresión de FaNES1-FPS1S fue mucho mayor que el de FPS1S-FaNES1 (Figura 40).

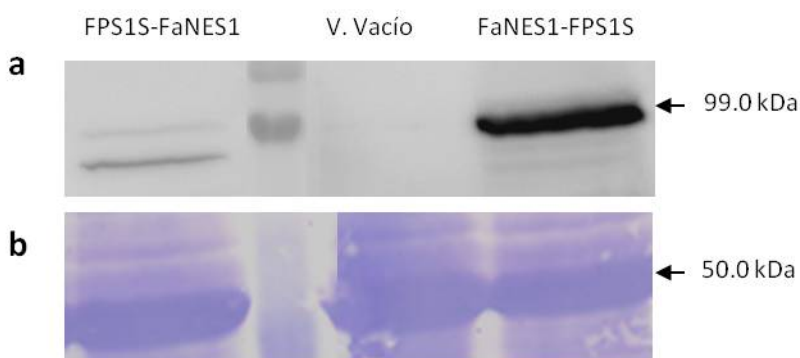


Figura 40. Análisis de la expresión de fusiones quiméricas FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*. (a) Extractos proteicos (40µg de proteína total del sobrenadante de 16.000 x g) de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones para expresar las proteínas indicadas y el vector vacío en la parte superior de las imágenes. Las hojas fueron recolectadas a los 2 días post-infiltración y los extractos proteicos se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE al 9% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-FPS (dilución 1:8000) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:50000). La masa molecular de las enzimas bifuncionales y de la FPS se indica a la derecha de la imagen. (b). El panel inferior muestra la región de la membrana de PDVF que contiene la subunidad grande de la RuBisCo (50kDa) teñida con Coomassie blue.

2.2. Determinación de los niveles de mRNA de las distintas versiones de FaNES1 expresadas en hojas de *N. benthamiana*.

Para averiguar si los niveles de proteína de las distintas versiones de FaNES1 expresadas en *N. benthamiana* se correspondían o no con los niveles de mensajero, se analizaron por PCR cuantitativa (qRT-PCR) los niveles de los correspondientes mRNAs en extractos de las mismas hojas recogidas a los 2 días de la agroinfiltración que se emplearon para determinar los niveles de proteína. En la Figura 41 se observa que se detecta la expresión de todos los transgenes agroinfiltrados y, en particular, que los niveles de mRNA de FaNES1-3HA y FPS1S-FaNES1 son muy similares entre sí, aunque considerando el número de copias por transgen (Figura 41b) fueron sensiblemente inferiores (entre 3.6 y 6.4 veces) a los de las demás versiones de FaNES1. Entre estas últimas, los niveles de mRNA dmHMGR1S-FaNES1-3HA son los más elevados.

La comparación de los niveles de expresión de los distintos mRNAs con los de las correspondientes proteínas puso de manifiesto la ausencia de correlación entre ambos parámetros. Los transgenes que codifican FaNES1-3HA y FPS1S-FaNES1 presentan niveles de expresión de mensajero muy similares entre sí y, sin embargo, no fue posible detectar la expresión de la proteína FaNES1-3HA, a diferencia de la proteína de fusión FPS1S-FaNES1 en donde sí se detectó la expresión. Por otro lado, los niveles de proteína dmHMGR1S-FaNES1-3HA detectados son inferiores a los de FaNES1-3HA-GFP y, en cambio, la expresión del mensajero dmHMGR1S-FaNES1-3HA es claramente superior a la del mensajero que codifica FaNES1-3HA-GFP. De hecho, la construcción para expresar dmHMGR1S-FaNES1-3HA es la que presenta los mayores niveles de mensajero entre todas. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que los niveles de las proteínas expresadas no dependen exclusivamente de los niveles de sus mensajeros, sino que la estabilidad de las proteínas codificadas también influye de forma importante.

A la vista de que todos los transgenes agroinfiltrados en las hojas de *N. benthamiana* se expresaban, y a pesar de que en alguno de los casos no era posible detectar la expresión de la proteína correspondiente, se decidió continuar con la determinación de sesquiterpenos volátiles en todos los casos.

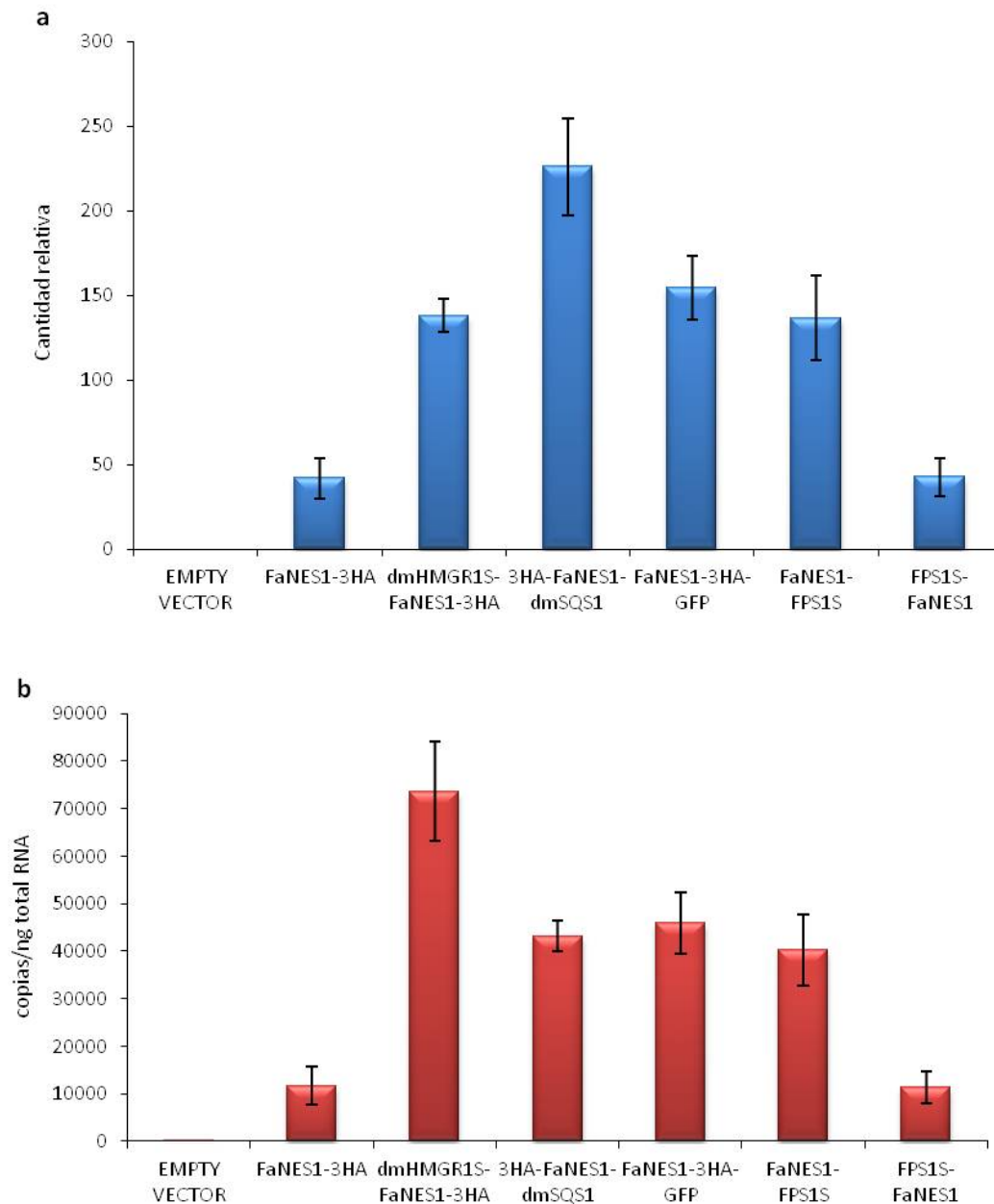


Figura 41. Determinación de los niveles de mRNA de las distintas versiones de FaNES1 en hojas de *N. benthamiana*. Los niveles de mRNA de los transgenes que codifican FaNES1-3HA, dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, FaNES1-GFP, FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 se midieron mediante qRT-PCR en hojas de *N. benthamiana* a los 2 días post-infiltración. La expresión de los transgenes se normalizó en relación a los niveles de expresión del gen *PP2A* (*TC21939*). Los resultados se expresan en valores relativos de cada mRNA respecto a la muestra correspondiente al vector vacío (a) y en valores absolutos de número de copias de cada mRNA por ng de RNA total (b). En el primer caso los valores se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_t$ y en el segundo mediante la ecuación de Pfaff. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos. Las barras corresponden a la desviación estándar.

3. Determinación de los niveles de nerolidol en hojas de *N. benthamiana* que expresan las distintas versiones de FaNES1.

Para captar, retener, identificar y cuantificar el nerolidol emitido por las muestras de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas que expresaban las distintas versiones de FaNES1 fue necesario implementar un método eficiente para la extracción del nerolidol desde tejido vegetal, para ello se contó con la colaboración del Dr. Michael Phillips, investigador en el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG). En una primera etapa se intentó detectar nerolidol directamente desde las hojas agroinfiltradas. Para ello, el material vegetal fue colocado en un vial cerrado y se intentó detectar el nerolidol emitido directamente en la atmósfera del vial (*head space*), mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados no fueron los esperados ya que el GC-MS no fue capaz de detectar el nerolidol. En una segunda etapa se intentó retener el nerolidol producido mediante la extracción del tejido vegetal con solventes orgánicos (pentano:dietileter), pero al igual que con la técnica de *head space* no fue posible detectarlo. Por último, la aproximación que tuvo éxito fue la utilización de la técnica de microextracción en fase sólida (fibra SPME) que permitió captar y retener el nerolidol emitido, para luego continuar con la cuantificación del compuesto mediante GC-MS. La fibra SPME permite captar moléculas volátiles directamente a partir del tejido vegetal contenido en un vial cerrado de forma rápida y sencilla, y con un alto rendimiento. Los compuestos retenidos en la fibra SPME se inyectan directamente en el puerto del cromatógrafo de gases para proceder a su desorción térmica e ingreso directo en la columna.

3.1. Optimización de las condiciones de retención de nerolidol en la fibra de SPME.

Antes de proceder a cuantificar los niveles de nerolidol emitidos por las muestras vegetales fue necesario poner a punto las condiciones de trabajo con la fibra SPME. Para ello se empleó fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) y patrón *trans*-nerolidol comercial. Concretamente, se fijaron varios parámetros para que la determinación mediante HS-SPME seguida de GC-MS fuese cuantitativa.

3.1.1. Determinación del umbral de captación y detección de nerolidol en el sistema HS-SPME.

La primera etapa consistió en determinar la cantidad mínima de nerolidol captado por la fibra SPME que podía ser identificada y cuantificada de forma inequívoca mediante GC-MS. Para ello, se utilizaron diferentes cantidades del patrón de *trans*-nerolidol comprendidas entre 0,5 y 100 ng, que se incubaron a una temperatura de extracción de 30°C en un vial cerrado de 5 ml, en presencia de la fibra SPME, durante un tiempo de extracción de 30 minutos. A continuación, la fibra se colocó en el puerto de inyección del equipo de GC-MS para la desorción y análisis del nerolidol retenido, usando las condiciones cromatográficas descritas en Materiales y Métodos. En la Figura 42 se puede observar que el nerolidol es captado de forma cuantitativa, al menos hasta cantidades de 100 ng.

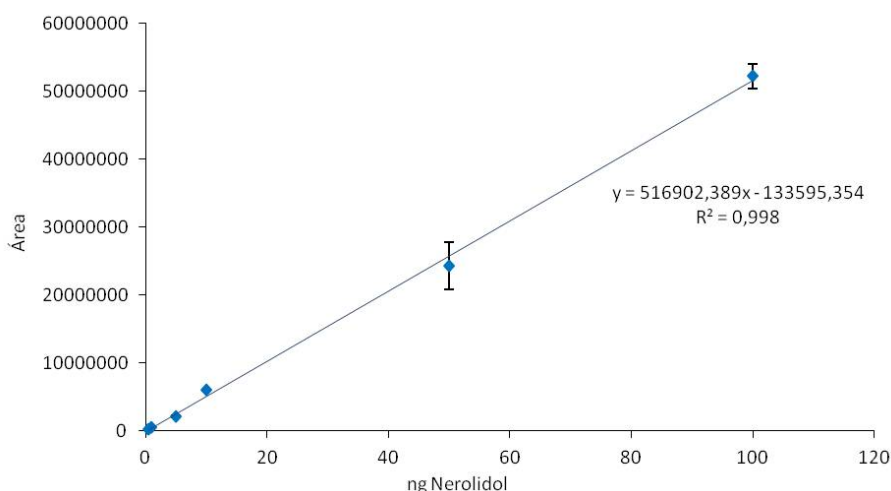


Figura 42. Retención de nerolidol en el sistema HS-SPME. En la gráfica se representan las áreas de los picos, correspondientes a cantidades crecientes de *trans*-nerolidol comprendidas entre 0,5 y 100 ng que se incubaron a 30°C durante 30 minutos en presencia de la fibra SPME. A continuación, la fibra SPME se insertó en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción y cuantificación del nerolidol atrapado. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas técnicas +/- la desviación estándar. Se incluye la recta de regresión y el correspondiente coeficiente de correlación.

En cuanto al umbral de detección, se estableció en 5 ng porque por debajo de esta cantidad se detectaban picos pequeños en la región del cromatograma

correspondiente al tiempo de retención del nerolidol cuyos espectros de fragmentación de masas no se correspondían con el del nerolidol.

Sólo a partir de 5 ng fue posible identificar inequívocamente el pico de nerolidol. En el panel superior de la Figura 43, se puede observar un ejemplo de los cromatogramas obtenidos al analizar el patrón de nerolidol comercial, en el que se observa un pico mayoritario que eluye con un tiempo de retención de 25 minutos y cuyo espectro de masas se corresponde exactamente con el espectro de masas del nerolidol disponible en la librería del equipo. A partir de este conjunto de datos, se decidió trabajar con la cantidad de 5 ng de nerolidol para la optimización de los demás parámetros.

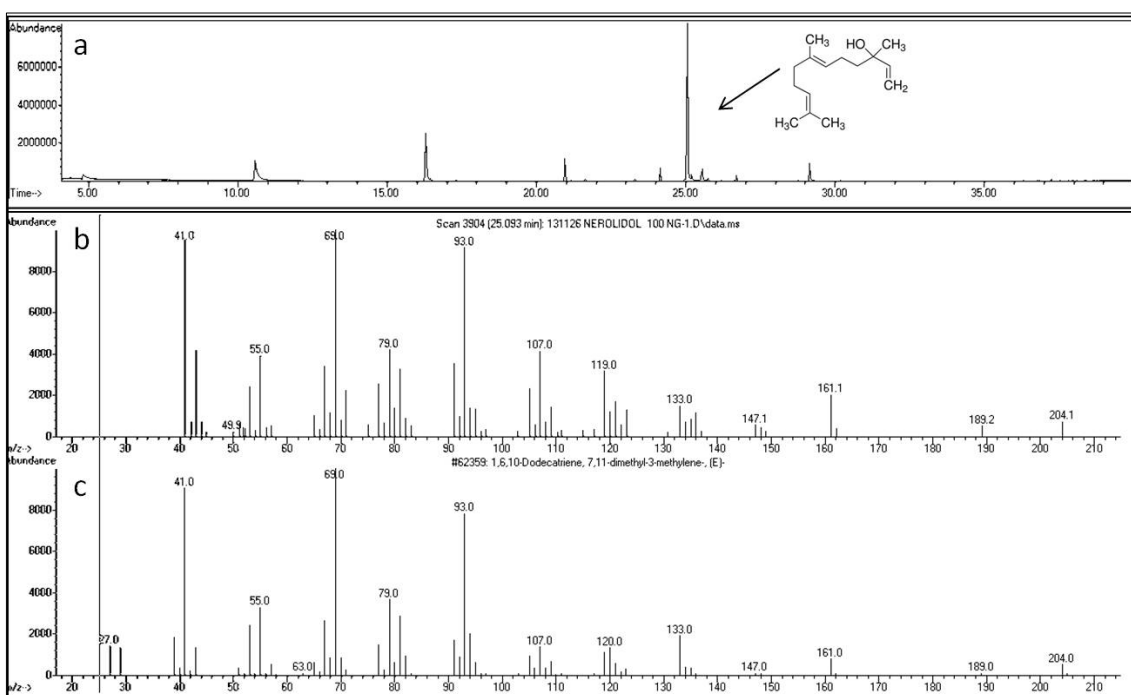


Figura 43. Cromatograma y espectro de masas del patrón de *trans*-nerolidol comercial. (a) Cromatograma de nerolidol obtenido a partir de una muestra de 100 ng del estándar comercial captado mediante el sistema HS-SPME. (b) Espectro de masas de la fragmentación del pico de nerolidol obtenido a los 25 min. (c) Espectro de fragmentación de masas del nerolidol en la librería del equipo de GC-MS.

3.1.2. Determinación de la temperatura óptima de captación de nerolidol por la fibra SPME.

A continuación se determinó la temperatura más adecuada para la correcta volatilización y captación del nerolidol por la fibra SPME, con la finalidad de extrapolarla a la extracción y captación del nerolidol producido en el tejido vegetal. Para ello, se incubaron alícuotas de 5 ng de nerolidol en viales cerrados de 5 ml, a cuatro temperaturas distintas comprendidas entre 30 y 60°C, durante 30 minutos, en presencia de la fibra SPME. El nerolidol retenido en la fibra SPME se analizó mediante GC-MS en las mismas condiciones anteriores.

Como puede observarse en la Figura 44, la temperatura óptima de incubación fue de 40°C, ya que a esta temperatura se consigue la mayor recuperación de nerolidol, mientras que a temperaturas superiores (50°C y 60°C) o inferiores (30°C) la cantidad de nerolidol retenido se reduce a la mitad. Por ello, se decidió continuar los análisis a la temperatura de 40°C.

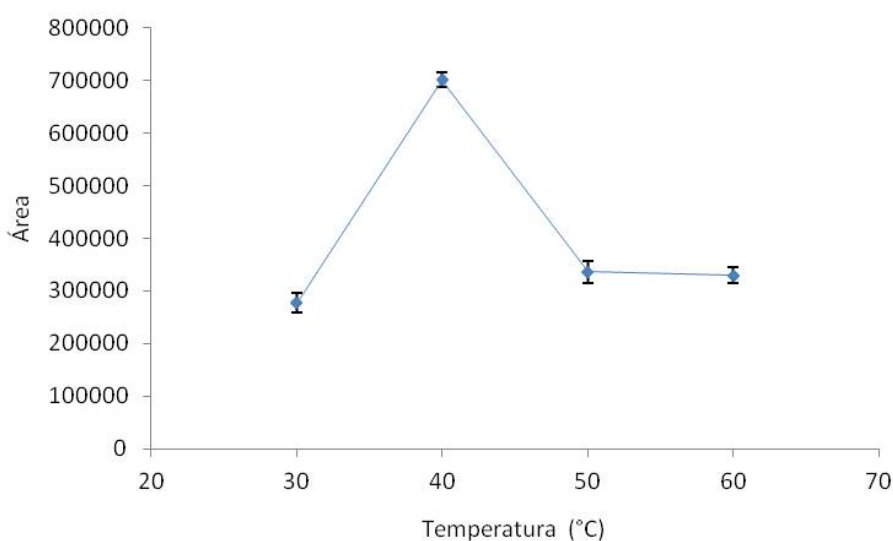


Figura 44. Efecto de la temperatura de incubación sobre la captación de nerolidol por el sistema HS-SPME. En la gráfica se representan las áreas de los picos correspondientes a 5 ng de *trans*-nerolidol incubados en presencia de la fibra SPME durante 30 minutos a temperaturas comprendidas entre 30°C y 60°C. La fibra SPME se insertó en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción y cuantificación del nerolidol atrapado. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas técnicas +/- la desviación estándar.

3.1.3. Determinación del tiempo óptimo de captación de nerolidol por la fibra SPME.

La captación de nerolidol por la fibra SPME aumenta linealmente a medida que avanza el tiempo de exposición hasta alcanzar la fase estacionaria en la que se establece un equilibrio entre el nerolidol captado por la fibra SPME y el liberado de nuevo a la atmósfera del vial. Por ello, es necesario determinar el tiempo óptimo de incubación de la muestra con la fibra SPME para alcanzar la máxima retención de nerolidol antes de entrar en la fase estacionaria. Para ello, se incubaron alícuotas de 5 ng del patrón de nerolidol en viales cerrados de 5 ml, a 40°C durante diferentes tiempos (15, 30 y 45 minutos), en presencia de la fibra SPME. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 45, en la que se aprecia que el tiempo de incubación adecuado para continuar trabajando es el de 30 minutos, ya que en este punto es cuando la fibra SPME presenta la mayor retención de nerolidol. A partir de este momento se decidió seguir trabajando durante 30 minutos a 40°C.

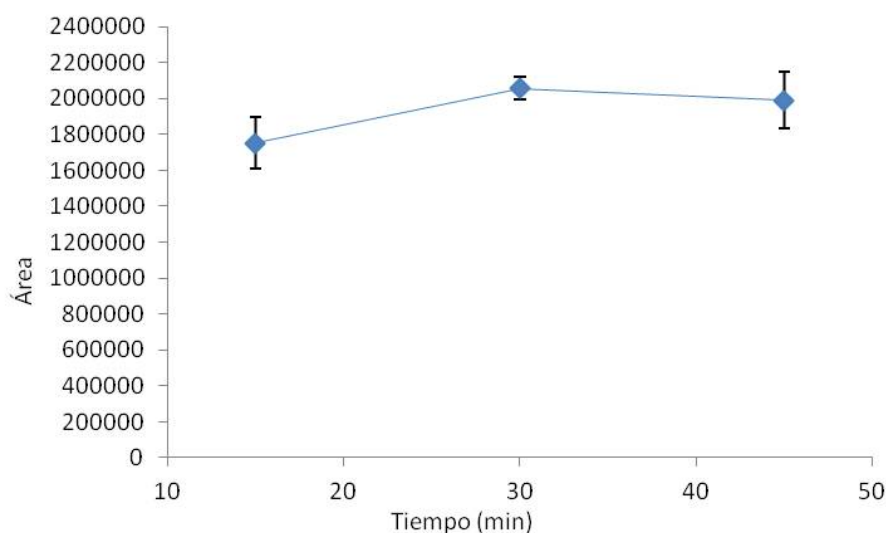


Figura 45. Efecto del tiempo de incubación sobre la captación de nerolidol por el sistema HS-SPME. En la gráfica se representan las áreas de los picos correspondientes a 5 ng de *trans*-nerolidol incubados a 40°C durante los tiempos indicados en presencia de la fibra SPME. La fibra SPME se insertó en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción y cuantificación del nerolidol atrapado. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas técnicas +/- la desviación estándar.

3.1.4. Determinación de la cantidad óptima de tejido vegetal para la determinación de nerolidol.

Una vez establecidas las condiciones de temperatura y tiempo adecuadas para la retención de nerolidol en la fibra SPME, se procedió a optimizar la cantidad de tejido vegetal a emplear para la cuantificación de los niveles de nerolidol. Para ello, se utilizaron muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresaban dmHMGR1S-FaNES1-3HA, puesto que ésta era una de las quimeras que se expresaba de forma más eficiente (Figura 36). Las zonas de las hojas de tabaco agroinfiltradas con el transgén para expresar dicha construcción se trituraron en presencia de nitrógeno líquido y se repartieron en alícuotas de 25, 50, 100, 200 y 500 mg que se expusieron a la fibra SPME durante 30 minutos a 40°C. Finalmente, se analizó el contenido de nerolidol captado en cada caso por la fibra SPME mediante GC-MS.

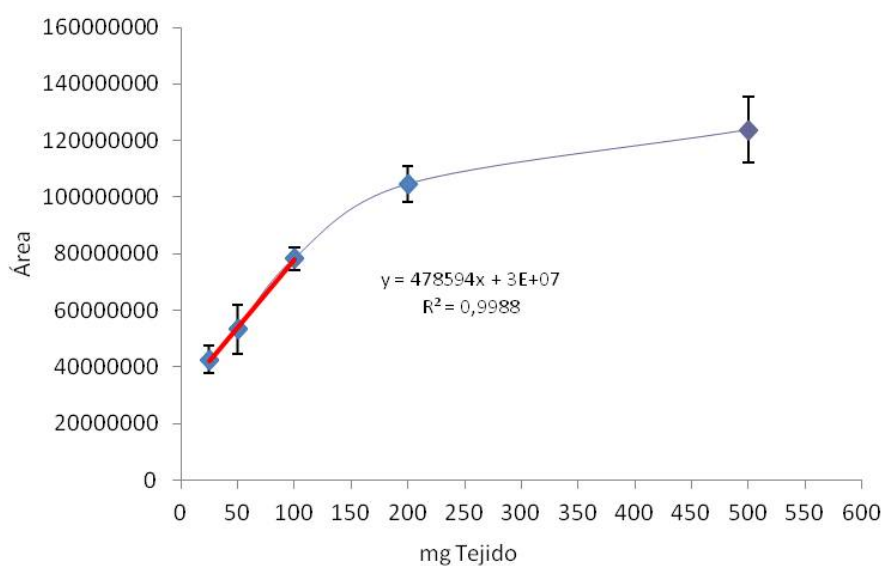


Figura 46. Optimización de la cantidad de muestra de hojas de *N. benthamiana* requerida para la cuantificación de nerolidol. Análisis mediante GC-MS del nerolidol emitido por cantidades de tejido triturado comprendidas entre 25 y 500 mg. Las muestras se incubaron en presencia de la fibra SPME durante 30 minutos a 40°C. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas técnicas +/- la desviación estándar. Se incluye la recta de regresión definida por los tres primeros puntos (en color rojo) y el correspondiente coeficiente de correlación.

Los resultados se muestran en la Figura 46, en la que se observa que la captación de nerolidol sigue una cinética de tipo hiperbólico. La captación de nerolidol es lineal para cantidades de tejido comprendidas entre 25 y 100 mg de tejido y, a partir

de esta cantidad, la fibra se satura progresivamente perdiéndose la linealidad. Por ello, para analizar la cantidad de nerolidol producido en las hojas que expresan las diferentes versiones de FaNES1, se optó por emplear 80 mg de tejido.

3.2. Recta patrón para la cuantificación del nerolidol.

Una vez establecidas las condiciones para la extracción i retención del nerolidol en la fibra SPME, se pasó a realizar una nueva recta patrón de nerolidol, para usarla posteriormente en la cuantificación del área de los picos obtenidos al analizar la producción de nerolidol por las distintas versiones de FaNES1 expresadas en hojas de *N. benthamiana*. En este caso se usaron cantidades de *trans*-nerolidol comprendidas entre 5 ng y 1 µg que se incubaron a 40°C durante 30 min en presencia de la fibra SPME y se analizaron mediante GC-MS. Como se observa en la Figura 47, la captación de nerolidol es completamente lineal al menos hasta la cantidad de un microgramo.

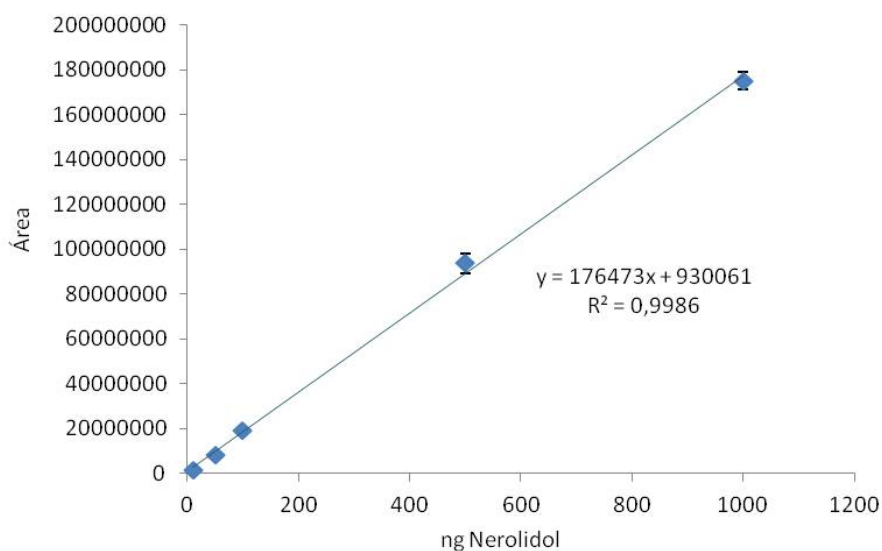


Figura 47. Recta patrón de nerolidol. En la gráfica se representan las áreas de los picos correspondientes a cantidades crecientes de *trans*-nerolidol comprendidas entre 0,5 ng y 1 µg, que se incubaron a 40°C durante 30 minutos en presencia de la fibra SPME. A continuación, la fibra SPME se insertó en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción y cuantificación del nerolidol atrapado. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas +/- la desviación estándar. Se incluye la recta de regresión y el correspondiente coeficiente de correlación.

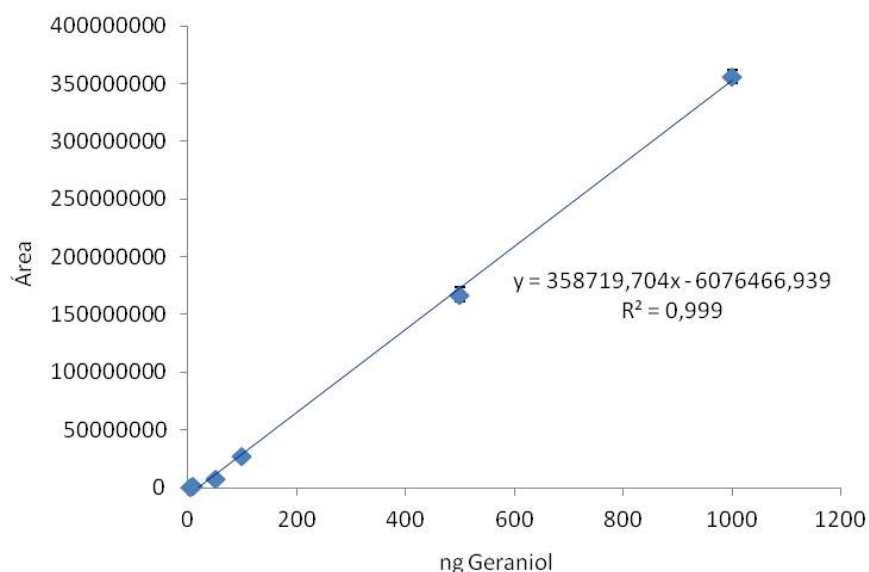


Figura 48. Recta patrón de geraniol. En la gráfica se representan las áreas de los picos correspondientes a cantidades crecientes de geraniol comprendidas entre 0,5 ng y 1 µg, que se incubaron a 40°C durante 30 minutos en presencia de la fibra SPME. A continuación, la fibra SPME se insertó en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción y cuantificación del geraniol retenido en la fibra. Los valores obtenidos son la media de 2 réplicas +/- la desviación estándar. Se incluye la recta de regresión y el correspondiente coeficiente de correlación.

Paralelamente, se realizó una recta patrón para la determinación de geraniol (Figura 48), que se utilizó como estándar interno añadido a cada una de las muestras problema para normalizar la cuantificación de nerolidol. Se utilizaron diferentes cantidades de geraniol comercial comprendidas entre 5 ng y 1 µg que se incubaron, como en el caso del nerolidol, a 40°C durante 30 min, en presencia de la fibra SPME, y posteriormente se analizaron mediante GC-MS.

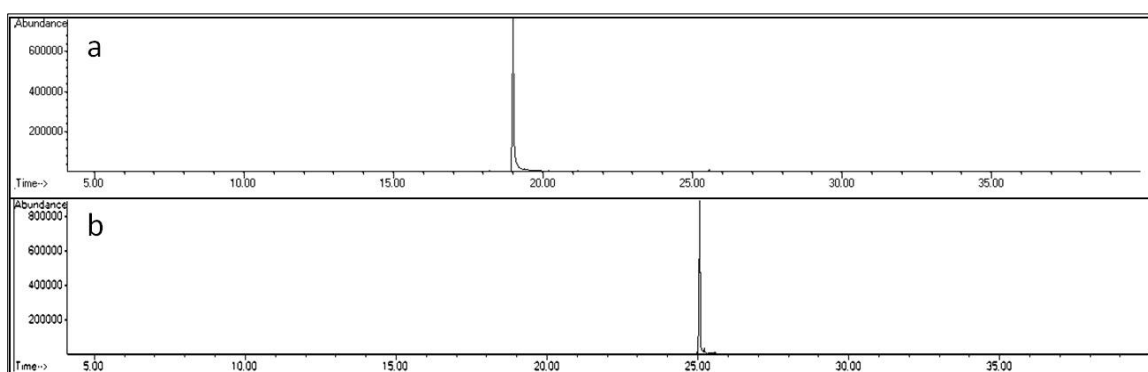


Figura 49. Cromatogramas de los patrones comerciales de *trans*-nerolidol y geraniol. (a) El pico de geraniol (100 ng) eluye con un tiempo de retención de 18.97 min. (b) El pico de nerolidol (100 ng) eluye con un tiempo de retención de 25.03 min.

El pico correspondiente al geraniol, cuya identidad se confirmó en base al espectro de masas, eluyó con un tiempo de retención de 18.97 min (Figura 49). Como se observa en la Figura 48, la captación de geraniol es completamente lineal al menos hasta un microgramo de producto. Por lo tanto, en todas las determinaciones de nerolidol se decidió añadir a la muestra vegetal la cantidad de 100 ng de geraniol como patrón interno.

3.3. Determinación de nerolidol mediante HS-SPME-GC-MS en hojas de *N. benthamiana* que expresan las diferentes versiones de FaNES1.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la cuantificación del nerolidol en muestras de tejido vegetal mediante el sistema HS-SPME-GC-MS, se procedió a determinar la producción de nerolidol en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresaban las distintas versiones de FaNES1 ancladas al RE y citosólicas (dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, FaNES1-3HA, FaNES1-3HA-GFP) así como las fusiones FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1. En todos los casos se empleó como control negativo tejido infiltrado con el vector vacío pCAMBIAMUTPA2300.

Como se observa en los cromatogramas de la Figura 50, en las muestras provenientes de plantas que expresan las construcciones ancladas al RE, dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, y la fusión citosólica FaNES1-3HA-GFP se detectó un pico a los 25 min que corresponde al nerolidol, tal y como se demostró al analizar su espectro de fragmentación de masas. En cambio, en las muestras que expresan la versión citosólica FaNES1-3HA no fue posible detectar la emisión de nerolidol.

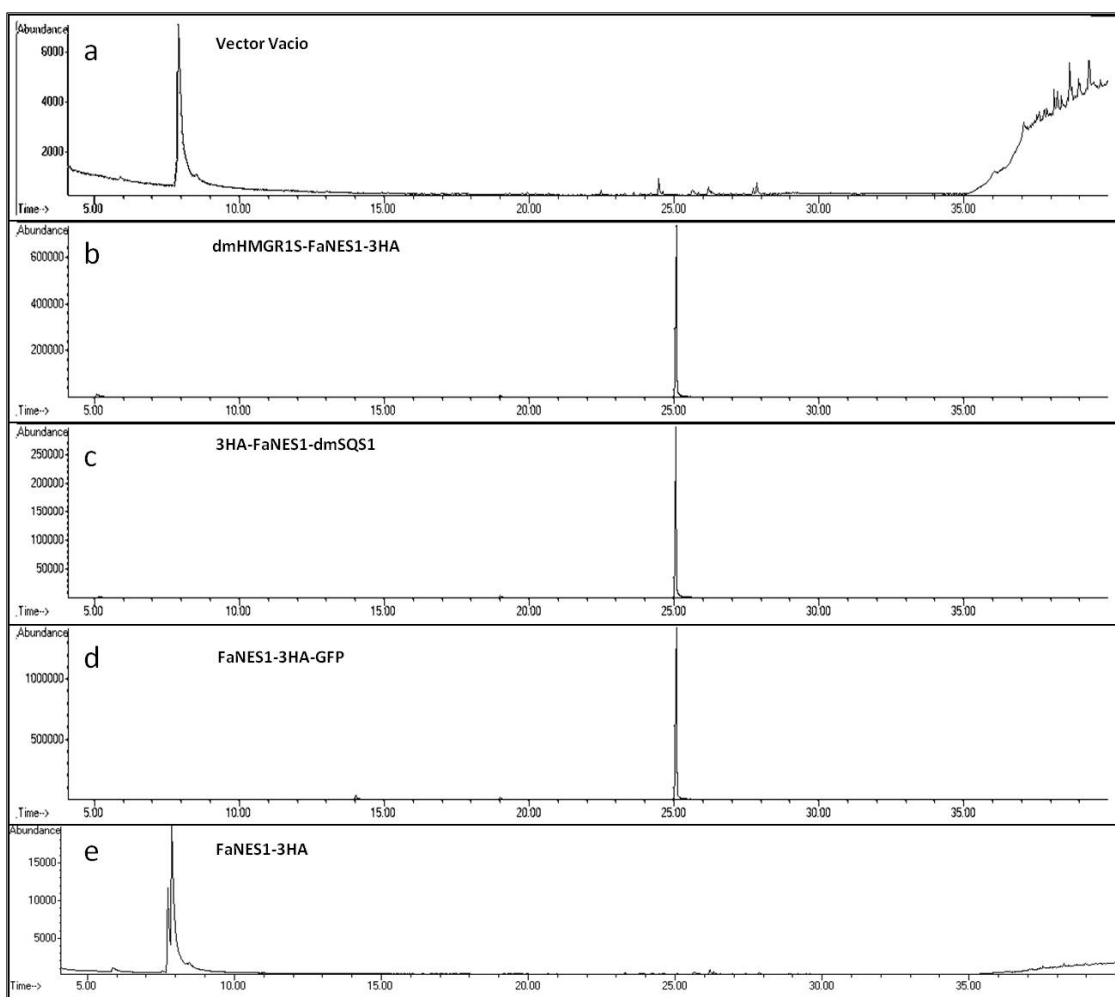


Figura 50. Emisión de nerolidol en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan versiones de FaNES1 citosólicas y ancladas al RE. Cromatogramas m/z 69 procedentes de muestras agroinfiltradas con el vector pCAMBIA23000MUTPA vacío (a) y los vectores para expresar dmHMGR1S-FaNES1-3HA (b), 3HA-FaNES1-dmSQS1 (c), FaNES1-3HA-GFP (d) y FaNES1-3HA (e). El pico de nerolidol eluye con un tiempo de retención de 25,08 min.

En cuanto a las enzimas bifuncionales FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1, los cromatogramas mostrados en la Figura 51 indican que la enzima bifuncional FaNES1-FPS1S es activa, ya que produce nerolidol, mientras que la fusión contraria FPS1S-FaNES1 produce solamente trazas de nerolidol. Todos estos resultados están en concordancia con los niveles de las correspondientes proteínas detectadas por *Western blot* en las mismas muestras (Figura 40).

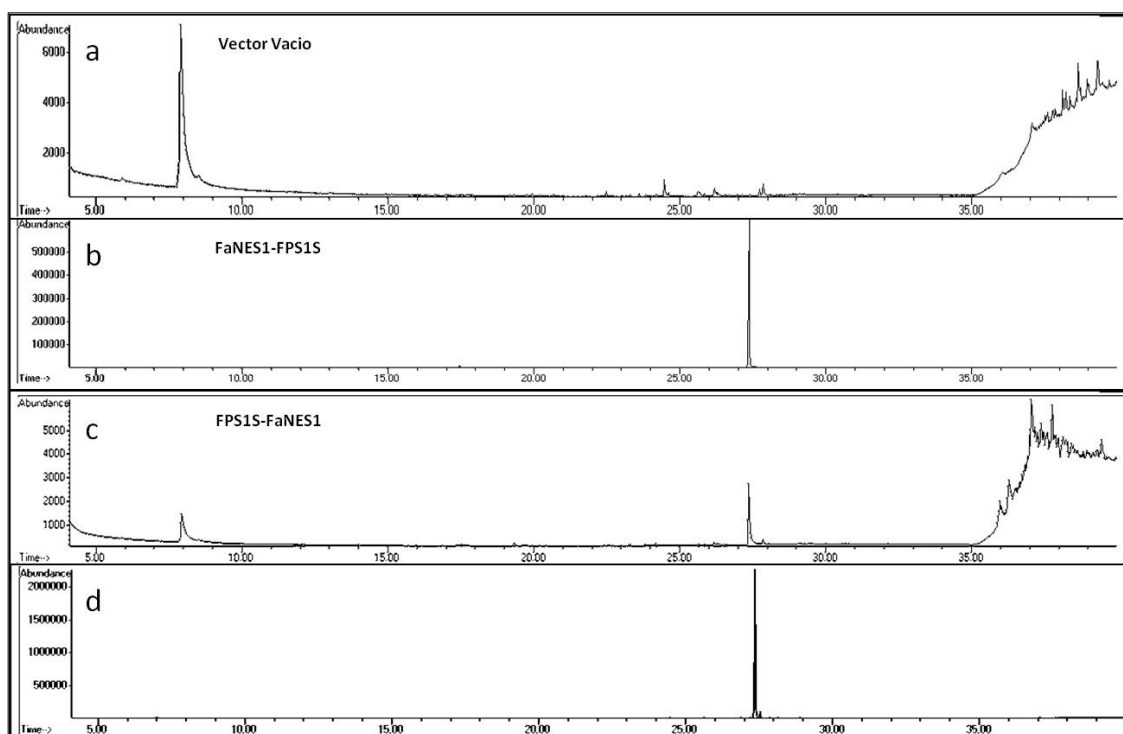


Figura 51. Emisión de nerolidol en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan versiones de FaNES1 fusionada a la FPS. Cromatogramas m/z 69 procedentes de muestras agrofiltradas con el vector pCAMBIAMUTPA2300 vacío (a) y los vectores para expresar FaNES1-FPS1S (b) y FPS1S-FaNES1 (c). Se muestra también el cromatograma obtenido al analizar 100 ng del patrón de nerolidol. El pico de nerolidol eluye con un tiempo de retención de 27,357 min (d).

A continuación, se procedió a cuantificar el nerolidol emitido a partir de las áreas de los picos correspondientes. Solamente se pudo calcular la producción de nerolidol en las muestras que expresaban dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1, FaNES1-3HA-GFP y FaNES1-FPS1S (Figura 52), ya que en la muestra correspondiente a FaNES1-3HA no se detectó la presencia de nerolidol y mientras que la muestra correspondiente a FPS1S-FaNES1 solo presentó trazas de este compuesto, por lo que no fue posible cuantificar de manera fiable la cantidad producida. La versión FaNES1-3HA-GFP, alojada en el citosol, es la que mayor tasa de producción de nerolidol mostró, $56,6 \mu\text{g.gPF}^{-1}$, seguida de las versiones ancladas al RE dmHMGR1S-FaNES1-3HA, con una emisión de $38,1 \mu\text{g.gPF}^{-1}$, y 3HA-FaNES1-dmSQS1, con una producción de $13,5 \mu\text{g.gPF}^{-1}$. Por otro lado, la fusión FaNES1-FPS1S produjo $26,3 \mu\text{g.gPF}^{-1}$, un valor intermedio al obtenido con las versiones ancladas al RE.

Respecto a las versiones citosólicas, la producción de nerolidol de FaNES1-FPS1S fue inferior a la de FaNES1-3HA-GFP. Así pues, esta enzima bifuncional soluble produce nerolidol, a diferencia de la enzima FaNES1-3HA soluble, sin embargo, no produce mayor cantidad de nerolidol que la FaNES1 citosólica unida a la GFP.

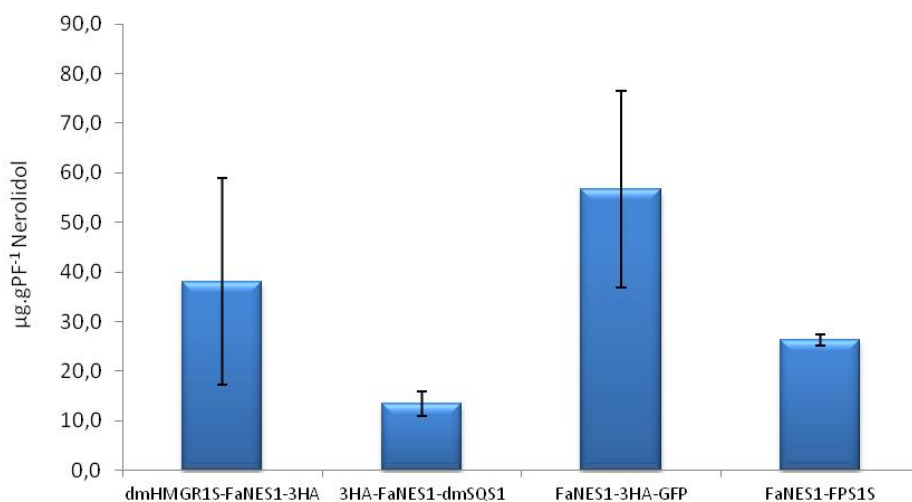


Figura 52. Tasa de emisión de nerolidol de muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan distintas versiones de FaNES1. Los valores corresponden a las medias de los valores obtenidos en tres réplicas biológicas, cada una con 2 réplicas técnicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

Cuando se normalizó la producción de nerolidol de las enzimas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA-GFP respecto a la cantidad de proteína (Figura 53) determinada mediante *Western blot* (Figura 38), se observó que los niveles de producción de nerolidol son muy similares en los tres casos. En esta comparación no se incluyó la enzima bifuncional FaNES1-FPS porque la cuantificación de la proteína se había realizado con un anticuerpo distinto (anti-FPS) al empleado para detectar las otras tres proteínas (anti-HA). Los resultados indican que la cantidad de nerolidol producido por las diferentes versiones de FaNES1 analizadas en este trabajo depende esencialmente de la cantidad de proteína presente y no de la accesibilidad al sustrato FPP.

Por último, en las muestras que expresaban las versiones citosólicas FaNES1-3HA-GFP, FaNES1-FPS1S, FPS1S-FaNES1 también se detectaron trazas de linalool. Esta observación no resultó del todo inesperada puesto que se ha descrito que FaNES1 es capaz de sintetizar este monoterpene a partir de GPP (Aharoni et al., 2003). Sin

embargo, sólo se pudo determinar su presencia pero no cuantificarlo, ya que la cantidad detectada corresponde a trazas del producto.

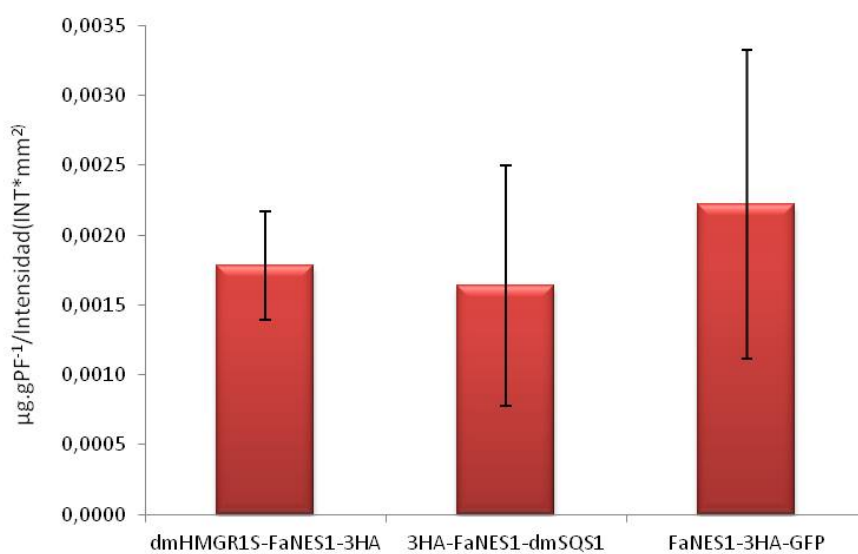


Figura 53. Tasa de emisión de nerolidol normalizada respecto a la cantidad de proteína en muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresan las distintas versiones de FaNES1. La producción de nerolidol se expresa en µg de producto por gramo de peso fresco y por unidad de cuantificación de la proteína (volumen de intensidad de banda expresado en unidad de intensidad (INT)*mm²).

DISCUSIÓN II

DISCUSION II

La sobreexpresión de distintas versiones de FaNES1 produce nerolidol en el citosol

Hasta la fecha de inicio de esta tesis doctoral, los intentos para producir sesquiterpenos mediante la expresión en plantas de distintas sesquiterpeno sintasas citosólicas habían resultado, en general, fallidos (Hohn and Ohlrogge, 1991; Wallaart et al., 2001; Aharoni et al., 2003; Sharon-Asa et al., 2003; Wu et al., 2006). Estos resultados resultaban un tanto inesperados puesto que el citosol es la localización subcelular natural de la mayoría de sesquiterpeno sintasas de plantas (Aharoni et al., 2004; Chen et al., 2011; Lange and Ahkami, 2013) y en este compartimento los niveles de FPP para la síntesis de sesquiterpenos son aparentemente elevados y, en principio, accesibles para dichas enzimas (Aharoni et al., 2005). Entre las sesquiterpeno sintasas cuya expresión en el citosol no dio lugar a resultados satisfactorios se encuentra la nerolidol/linalol sintasa FaNES1 aislada de la variedad de fresa cultivada *Fragaria x ananassa* (Aharoni et al., 2003, 2005). En cambio, la expresión de FaNES1 y otras sesquiterpeno sintasas en compartimientos como los plástidos o las mitocondrias, sí permitió producir sesquiterpenos de forma eficiente y, en consecuencia, eludir los posibles mecanismos homeostáticos que estarían limitando la disponibilidad del FPP citosólico (Aharoni et al., 2003, 2006; Kappers et al., 2005; Wu et al., 2006; Liu et al., 2011; Houshyani et al., 2013).

La enzima FaNES1 produce linalol o nerolidol dependiendo de si el sustrato es GPP o FPP, respectivamente (Aharoni et al., 2003). El nerolidol es un componente de la *HIVPs* y es considerado uno de los volátiles de interés ecológico y económico, por su capacidad para atraer insectos carnívoros, por ejemplo *Phytoseiulus persicae*, que contribuyen a la defensa de las plantas frente a insectos herbívoros (Kappers et al., 2005). Estudios previos de nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Prof. Bouwmeester (Laboratory for Plant Physiology of the University of Wageningen, Wageningen, Holanda), demostraron que el nerolidol atrae a la avispa parasitoide beneficiosa *Diadegma semiclausum*, para el control biológico de insectos herbívoros (Houshyani et al., 2013). Teniendo en cuenta la importancia e interés biotecnológico que presenta este compuesto, se decidió emplear FaNES1 en este

estudio, a fin de investigar si la producción de nerolidol se podía optimizar en el citosol y, de esta forma, contribuir a mejorar la capacidad de las plantas para defenderse frente al ataque de insectos herbívoros.

En este contexto, al iniciar este trabajo se diseñaron dos estrategias distintas de ingeniería metabólica orientadas a incrementar la producción de nerolidol en el citosol, que consistían en expresar, por un lado, versiones modificadas de FaNES1 que se localizaran en las membranas del RE, y por otro, quimeras bifuncionales resultantes de fusionar en una única cadena polipeptídica las actividades FPS1S de *Arabidopsis* y FaNES1 de fresa. En el primer caso se pretendía reproducir la situación de la SQS, que se encuentra anclada en las membranas del RE y parece tener libre acceso al FPP citosólico que utiliza para sintetizar esteroides, que son los productos isoprenoides finales más abundantes derivados de la vía del MVA. En el segundo caso, se trataba de construir un pequeño canal metabólico capaz de dirigir parte del IPP y el DAMPP citosólicos hacia la síntesis de un pool de FPP segregado al que FaNES1 tendría acceso exclusivo para producir nerolidol.

1. Localización subcelular de las versiones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE en hojas de *N. benthamiana*.

Antes de proceder a la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresasen las versiones de FaNES1 citadas antes, se comprobó la correcta localización subcelular en las membranas del RE de las versiones quiméricas de FaNES1, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que el dominio N-terminal de la isoforma HMGR1S de *Arabidopsis*, que incluye dos secuencias hidrofóbicas de transmembrana, y el dominio C-terminal de la SQS1 también de *Arabidopsis*, que contiene una única secuencia de transmembrana, son responsables del anclaje de ambas enzimas a las membranas del RE (Campos and Boronat, 1995; Kribii et al., 1997; Busquets et al., 2008). A pesar de ello, se consideró necesario confirmar que ambos dominios de anclaje al RE, los 178 aminoácidos del extremo N-terminal de la HMGR1S y los 66 aminoácidos del dominio C-terminal de la SQS1, seguían siendo funcionales después de fusionarlos a FaNES1. Para ello, las correspondientes versiones quiméricas de FaNES1 fusionadas a la GFP

(GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1, dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP) y la forma soluble de FaNES1 fusionada también a la GFP (FaNES1-3HA-GFP) se expresaron de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana*. En los dos primeros casos, la GFP y el triple epitopo HA se fusionaron en el extremo opuesto al ocupado por los dominios de membrana añadidos a FaNES1 (Figura 29) para evitar posibles interferencias que pudieran alterar la localización subcelular en el RE.

La observación mediante microscopía confocal de los patrones de fluorescencia generados por las construcciones GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 y dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP, demostró que ambas se localizaban correctamente en las membranas del RE, tal y como se esperaba (Figuras 30 c y d). Además del patrón reticulado característico del RE, las células que expresaban estas dos proteínas mostraban pequeñas vesículas fluorescentes de identidad desconocida que en el caso de 3HA-FaNES1-dmSQS1 eran de mayor tamaño que las observadas en las células que expresaban dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP. Estas vesículas probablemente corresponden a acúmulos de las proteínas expresadas que se concentran en estructuras derivadas de la membrana del RE similares a las observadas al sobreexpresar en *Arabidopsis* el dominio de membrana de la HMGR1S fusionado a la GFP (Leivar et al., 2005). En paralelo, se confirmó la localización citosólica de la versión FaNES1-3HA-GFP (Figura 30 a y b), que es coherente con la localización citosólica de la FaNES1 unida a la GFP descrita en protoplastos de tabaco (Aharoni et al., 2004).

2. Expresión estable de FaNES1 soluble y anclada al RE en *A. thaliana*.

La sobreexpresión en *Arabidopsis* de las tres versiones de FaNES1 se llevó a cabo mediante transformación de las plantas con construcciones realizadas en el vector binario pCAMBIA2300MUT. Se obtuvieron varias líneas transgénicas y se confirmó que expresaban niveles elevados de las proteínas en las generaciones T1 y T2. Sin embargo, se observó que las líneas que expresaban niveles elevados de las proteínas en estas generaciones perdían total o parcialmente la expresión de la proteína en la generación T3. El silenciamiento fue más acusado en aquellas líneas que habían expresado mayores niveles de proteína en generaciones anteriores e iba acompañado de la pérdida de la resistencia al antibiótico empleado para la selección

de las plantas transgénicas. Esto llevó a pensar que el silenciamiento podía deberse a la presencia en el vector pCAMBIA2300MUT de 3 copias del promotor *CaMV35S* orientadas en la misma dirección. La expresión de los transgenes puede reducirse, como resultado de la existencia de una homología de los transgenes o bien por metilación del DNA, lo cual puede desencadenar en silenciamiento a nivel transcripcional (TGS) y/o post-transcripcional (PTGS) (Baulcombe, 2004; Wang and Metzlauff, 2005; Eamens et al., 2008; Marjanac et al., 2009). Ante esta posibilidad, se procedió a modificar la estructura del vector pCAMBIA2300MUT, sustituyendo las dos copias en tándem del promotor *CaMV35S* que dirigían la expresión del gen marcador *NPTII* por el promotor *pNOS* del gen de la *nopalina sintasa*, de tal manera que en el vector resultante quedaría una sola copia del promotor *CaMV35S* que dirigiría la expresión de los distintos transgenes *FaNES1* (Figura 31). Se ha demostrado que el promotor *pNOS* es menos susceptible a la metilación que el promotor *CaMV35S* (Mishiba et al., 2005, 2010; Yamasaki et al., 2011). El nuevo vector binario, pCAMBIA2300MUTPA, se empleó para volver a generar las construcciones con las que se obtuvieron nuevas líneas transgénicas de *Arabidopsis*, en las que ya no se observó el silenciamiento de los transgenes.

En las nuevas líneas transgénicas correspondientes a dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA se detectó la expresión de los transgenes, aunque los niveles de RNA mensajero y de proteína fueron sensiblemente diferentes entre las distintas líneas (Figuras 32, 33 y 34). En las líneas que expresaban 3HA-FaNES1-dmSQS1 se observó una correlación bastante buena entre los niveles de mRNA y de proteína. En cambio, en las líneas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, y muy especialmente en las líneas FaNES1-3HA, dicha correlación no se observó. De hecho, en este último caso no se consiguió detectar la presencia de la proteína en ninguna de las líneas caracterizadas, aunque en todas ellas se detectó la expresión del correspondiente mRNA (Figura 35). La ausencia de proteína FaNES1 en el citosol puede guardar relación con los resultados obtenidos por Aharoni et al. (2003), que tampoco consiguieron sobreexpresar FaNES1 en el citosol en plantas de *A.thaliana*, aunque en este caso por la imposibilidad de obtener cepas de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido binario para expresar la versión citosólica de FaNES1. Los autores sugieren que esto se debe a la toxicidad del nerolidol sintetizado por la enzima FaNES1. Ante la

imposibilidad de obtener líneas de *A. thaliana* sobreexpresoras de FaNES1, los autores optaron por sobreexpresar una sesquiterpeno sintasa diferente, la germacreno A sintasa de *Cichorium intybus*, que produce un sesquiterpeno menos tóxico que el nerolidol (Bouwmeester et al., 2002). En definitiva, los datos obtenidos a partir de la caracterización molecular de las líneas transgénicas anteriores sugerían que la expresión de FaNES1 anclada al RE presenta ventajas sobre la expresión de la forma nativa soluble de la enzima ya que, si bien todavía no se había demostrado que FaNES1 mantuviese la actividad sesquiterpeno sintasa, sí se había puesto de manifiesto que la proteína podía expresarse de forma eficiente en el citosol-ER, sumándose así a los resultados positivos obtenidos al dirigir la enzima a otras localizaciones como los plástidos y las mitocondrias (Aharoni et al., 2003, 2006; Kappers et al., 2005). Sin embargo, a pesar de haber obtenido resultados positivos al expresar las proteínas ancladas al RE, al no disponer de un control de expresión de FaNES1 en el citosol, se optó por buscar un sistema alternativo de expresión en plantas que permitiera la expresión soluble de la enzima.

3. Expresión transitoria de FaNES1 soluble y anclada al RE en *N. benthamiana*

La imposibilidad de expresar FaNES1-3HA de forma estable en *A. thaliana*, planteó la necesidad de buscar otro sistema biológico que permitiera obtener resultados satisfactorios al expresar FaNES1 en el citosol. Por ello, se decidió expresar la versión soluble de la enzima y las versiones ancladas al RE en hojas de *N. benthamiana*. Esta plataforma de expresión transitoria se emplea, cada vez con mayor frecuencia para evaluar de forma rápida nuevas estrategias de ingeniería metabólica, incluyendo las relacionadas con la producción de isoprenoides volátiles, puesto que permite expresar numerosas proteínas heterólogas diferentes, hacerlo de forma simultánea, y sin la necesidad de generar plantas transgénicas (van Herpen et al., 2010). *N. benthamiana* es, además, una alternativa ventajosa debido a su bajo coste de producción, una tasa de crecimiento rápida con un elevado rendimiento de biomasa, una alta eficiencia en la transformación genética, y facilidad en la purificación de las proteínas recombinantes. Todo ello la convierte en una planta huésped atractiva para la expresión y la producción a gran escala de proteínas recombinantes (D'Aoust et

al., 2008; Goodin et al., 2008; Sainsbury et al., 2009).

Los resultados obtenidos empleando esta nueva plataforma de expresión volvieron a poner de manifiesto que las proteínas dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS1 se expresan de forma muy eficiente. La presencia de ambas proteínas ya se detectó a los dos días post-infiltración, siendo la quimera dmHMGR1S-FaNES1-3HA la que presentaba los niveles más altos de proteína (Figura 37). Los niveles de proteína dmHMGR1S-FaNES1-3HA disminuyeron drásticamente a partir del sexto día y los de 3HA-FaNES1-dmSQS1 a partir del noveno día (Figura 36), posiblemente debido a que a partir del sexto día las hojas de tabaco mostraban los primeros síntomas de clorosis y al cabo de 12 días las plantas ya presentaban clorosis y necrosis foliar bastante severa en los puntos de inyección de la suspensión de *A. tumefaciens*. Con respecto a la versión citosólica de FaNES1-3HA, tampoco fue posible detectar la presencia de la proteína, ni siquiera a los tiempos más largos de expresión, igual que había ocurrido en las líneas transgénicas de Arabidopsis.

La cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de mRNA de los distintos transgenes demostró que la ausencia de FaNES1-3HA en las hojas de tabaco agroinfiltradas tampoco se debía a la falta de expresión del trasgén, aunque su nivel de expresión era entre 3 y 7 veces inferior al nivel de expresión de los transgenes que codifican dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS (Figura 41). De nuevo, los resultados concordaban con los obtenidos en Arabidopsis. En ambos sistemas se detectaba claramente la expresión del trasgén que codifica FaNES1-3HA, pero no la proteína. Ante esta situación, se optó por expresar en este mismo sistema la proteína de fusión FaNES1-3HA-GFP, la cual ya se había expresado con éxito para confirmar la localización citosólica de FaNES1 (Figura 30). De hecho, la cuantificación de los niveles de proteína de esta nueva versión citosólica de FaNES1 reveló que eran incluso superiores, entre 1,5 y 3 veces, a los de las versiones dirigidas al RE, dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS1, respectivamente (Figura 38). En cuanto a los niveles de mRNA del trasgén, también eran muy elevados, aunque estaban ligeramente por debajo de los del trasgén que codifica dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Estas observaciones demostraron que era posible expresar niveles elevados de una versión soluble de proteína FaNES1 en el citosol e indicaban que la presencia de la GFP influye muy positivamente en la expresión de la forma soluble de FaNES1,

posiblemente aumentando la estabilidad de la proteína. Sin embargo, la falta de correlación entre los niveles de mensajero y de proteína indica que los niveles de las proteínas expresadas posiblemente no dependen de forma exclusiva de los niveles de su mensajero, sino que también influye la estabilidad de las proteínas.

3.1. Enzimas bifuncionales de FaNES1/FPS1S

Como una estrategia alternativa a la expresión de las versiones citosólicas o ancladas al RE de FaNES1 para producir nerolidol en el citosol, se prepararon construcciones para expresar dos enzimas bifuncionales en las que se fusionaron en una única cadena polipeptídica FaNES1 y la isoforma FPS1S de *A. thaliana* (Figura 39). La fusión de actividades enzimáticas que de forma natural se encuentran en cadenas polipeptídicas independientes se presenta como una alternativa para aumentar la eficiencia de los procesos metabólicos. La canalización del sustrato por las enzimas bifuncionales aumenta la eficiencia de las reacciones individuales por la proximidad del sustrato canalizado (Orita et al., 2007), y además presenta varias ventajas, ya que permite mantener concentraciones bajas de los intermediarios, lo cual es especialmente relevante en el caso de intermediarios tóxicos o inestables (Meynial Salles et al., 2007; Kristensen et al., 2005; Conrado et al., 2007), y además evita que estos sean metabolizados en las distintas vías que pueden utilizarlo (Kholodenko et al., 1996). Se han descrito enzimas multifuncionales naturales como la monoacilglicerol aciltransferasa/acil hidrolasa de lípidos (Vijayaraj et al., 2012), la ácido graso sintasa en el metabolismo de ácidos grasos (Smith, 1994), la triptófano sintasa en el metabolismo de aminoácidos (Hyde et al., 1988), y la timidilato sintasa/dihidrofolato reductasa en el metabolismo de nucleótidos (Knighton et al., 1994). Un ejemplo de enzima multifuncional que se encuentra en el propio metabolismo de los terpenoides, es una fusicoccadieno sintasa fúngica, que presenta actividad GGPS y actividad diterpeno sintasa, lo que le permite fabricar el diterpeno cíclico fusicoccadieno directamente a partir de IPP y DAMPP, via GGPP (Toyomasu et al., 2007). Dado que la canalización de sustratos es un sistema eficiente en la naturaleza, se han creado enzimas multifuncionales artificiales mediante ingeniería metabólica, con el objetivo de imitar la organización natural de las enzimas y optimizar así la producción de metabolitos de

importancia industrial o médica (Conrado et al., 2008). La mayoría de las fusiones se han expresado en microorganismos, como por ejemplo la quimera formada por una FPS de *Artemisia annua* fusionada a una *epi*-aristolóqueno sintasa de tabaco que produce *epi*-aristolóqueno a partir de IPP y DMAPP de forma más eficiente que ambas enzimas por separado (Brodellius et al., 2002). La fusión de la FPS de *S.cerevisiae* y la patchoulol sintasa (PTS) de la planta *Pogostemon cablin* para la producción de patchoulol (Albertsen et al., 2011), o la fusión de la FPS de *S.cerevisiae* y de la amorfadieno sintasa (ADS) de *Artemisia annua* para la producción de amorfadieno (Baadhe et al., 2013). A pesar de su potencial utilidad, las fusiones enzimáticas artificiales se han usado relativamente poco en ingeniería metabólica de plantas. Uno de los escasos ejemplos es la fusión de la trealosa-6-fosfato sintasa y la trealosa-6-P-fosfatasa de *E. coli* en plantas transgénicas de arroz, en donde la trealosa actúa como un protector global, obteniéndose plantas más resistentes al estrés abiótico (Jang et al., 2003).

Las dos versiones quiméricas se prepararon fusionando FaNES1 tanto a N- como a C-terminal de FPS1S, dando lugar a FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1, a través de un oligopéptido de 5 aminoácidos (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln) (Figura 39), cuya funcionalidad se había demostrado previamente en la enzima bifuncional fructosa-1,6 bisfosfato aldolasa/dihidroxiacetona quinasa expresada en *E.coli* (Iturrate et al., 2010). Esta quimera se construyó a partir de las enzimas fructosa-1,6 bisfosfato aldolasa de *Staphylococcus carnosus* y la dihidroxiacetona quinasa de *Citrobacter freundii*, dando lugar a una enzima bifuncional que retenía las dos actividades, pero con un incremento de 20 veces de la actividad aldolasa. La longitud y la secuencia del péptido linker son dos parámetros importantes a tener en cuenta porque debe tener la necesaria flexibilidad para el correcto plegamiento de las enzimas que enlaza. Diversos estudios han demostrado que aumentando la longitud del linker se consigue una mayor eficiencia en la canalización de los sustratos (Argos, 1990; Carlsson et al., 1996), aunque linkers muy largos son más susceptibles a la acción de las proteasas y dan lugar a proteínas poco estables (Bülow, 1987). Un péptido linker de 8 aminoácidos empleado para unir la trealosa-6-fosfato sintasa y la trealosa-6-fosfato fosfatasa de *E. coli* dió lugar a una enzima bifuncional con una actividad 4 veces superior a la de las enzimas independientes, mientras que un linker de 17 aminoácidos dió lugar a la

degradación rápida de la proteína de fusión (Seo et al., 2000; Jang et al., 2003). No obstante, también se han obtenido resultados satisfactorios empleando péptidos más cortos como, por ejemplo, el tripéptido G-S-G que se empleó con éxito para fusionar una FPS de *Artemisia annua* a la *epi*-aristolóqueno sintasa de tabaco (Brodelius et al., 2002).

Dado que la expresión transitoria en *N. benthamiana* había demostrado ser un sistema altamente eficiente y rápido para la expresión de las versiones de FaNES1 dirigidas al RE y al citosol, se optó por expresar directamente las enzimas bifuncionales FPS1S-FaNES1 y FaNES1-FPS1S en este sistema. Los niveles de la proteína de la fusión FaNES1-FPS1S fueron claramente superiores a los de la fusión FPS1S-FaNES1 (Figura 40). En este caso, las proteínas no estaban etiquetadas con el epítipo 3HA, porque en nuestro laboratorio se disponía de un anticuerpo específico anti-FPS (Masferrer et al., 2002) que permitía detectarlas sin necesidad de incorporar ningún epítipo adicional. Las diferencias observadas en los niveles de expresión de las proteínas se correlacionaban con las observadas al analizar los niveles de los correspondientes mRNAs (Figura 41). Los niveles de mensajero FPS1S-FaNES1 eran similares a los de la versión citosólica FaNES1-3HA y considerablemente inferiores a los de las proteínas FaNES1 ancladas al RE y a los de FaNES1 fusionada a GFP. Aunque se encontraron niveles muy similares de los mensajeros FPS1S-FaNES1 y FaNES1-3HA, sólo fue posible detectar la presencia de la proteína FPS1S-FaNES1, lo que de nuevo avala la hipótesis de que la fusión de FaNES1 a otra proteína, en este caso a FPS1S, contribuye a estabilizarla en el citosol.

4. Producción de nerolidol en hojas de *N. benthamiana* que expresan distintas versiones de FaNES1.

Al iniciar este trabajo no existía ningún método implementado en nuestro laboratorio para el análisis cuantitativo del nerolidol en muestras de tejido vegetal, lo que obligó a poner a punto una metodología para la extracción y la determinación cuantitativa de este compuesto. En una primera aproximación se intentó detectar directamente el nerolidol emitido por las hojas de *N. benthamiana* a la atmósfera del vial o *headspace* (HE) (Kappers et al., 2005; Beale et al., 2006). Alternativamente, se

probó la extracción del nerolidol mediante tratamiento de las muestras de tejido con solventes orgánicos, un método ampliamente utilizado en numerosos trabajos (Wallaart et al., 2001; Wu et al., 2006). Sin embargo, ninguno de estos dos sistemas fue suficientemente sensible para identificar y cuantificar el nerolidol emitido mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), por lo que se procedió a probar un tercer método que combina la técnica del HE con la microextracción en fase sólida (SPME) del nerolidol. Se escogió la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 micras por ser la más adecuada para la captación de compuestos volátiles. La fibra SPME permite realizar mediciones en HE de forma rápida y con un alto rendimiento de trazas de compuestos volátiles en muestras relativamente pequeñas de tejido vegetal (Aharoni et al., 2003; Kappers et al., 2005; Köllner et al., 2013; Szmigielski et al., 2011). Mediante esta técnica acoplada al análisis de los compuestos volátiles retenidos en la fibra SPME por GC-MS se consiguió extraer, identificar y cuantificar de forma satisfactoria el nerolidol emitido. Cabe señalar que el nerolidol puede conjugarse dando lugar a distintos derivados que no son volátiles, por hidroxilación, glucosilación y/o acilación, que facilitan su almacenamiento o transporte (Houshyani et al., 2013), por lo que asume que la cuantificación de la fracción de nerolidol emitido es un reflejo del total producido en el tejido.

Para optimizar las condiciones de extracción cuantitativa de nerolidol se empleó un patrón de nerolidol comercial (Figura 43) y muestras de hojas de *N. benthamiana* que expresaban la proteína dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Concretamente, el umbral de detección de nerolidol del método se estableció en 5 ng (Figura 42), el tiempo de exposición a la fibra SPME en 30 min (Figura 45) y la temperatura de incubación del tejido vegetal infiltrado en 40°C (Figura 44). La cantidad de muestra vegetal adecuada para llevar a cabo las determinaciones de nerolidol emitido se fijó en 80 mg de tejido (Figura 46). También se optimizó la metodología para cuantificar el monoterpeno geraniol, que se empleó como patrón interno para normalizar los valores de nerolidol (Figuras 48-49).

Las proteínas dirigidas a la membrana del RE, dmHMGR1S-FaNES1-3HA y 3HA-FaNES1-dmSQS1, demostraron ser funcionales (Figura 50), ya que se obtuvieron valores de nerolidol emitido de aproximadamente 38 y 13,5 µg por gramo de peso fresco de tejido agroinfiltrado, respectivamente (Figura 52). Este resultado demostró

que el anclaje de FaNES1 a la membrana del RE le permite acceder al pool de FPP citosólico desviando una parte hacia la síntesis de nerolidol, y que ello ocurre tanto si la FaNES1 se dirige a la membrana del RE a través del dominio de membrana de la SQS1 como si lo hace a través del de la HMGR1S. Si bien los resultados de producción de nerolidol parecían indicar que la unión de FaNES1 al dominio de membrana de la HMGR1S genera una enzima más eficiente que cuando se une al de la SQS1, la normalización de la producción de nerolidol en base a la cantidad de proteína expresada reveló que en realidad la tasa de producción de nerolidol es muy similar en ambos casos (Figura 53), lo que sugiere que la producción de nerolidol está directamente relacionada con la cantidad de proteína presente.

Las cantidades de nerolidol emitido por las proteínas dmHMGR1S-FaNES1-3HA y la 3HA-FaNES1-dmSQS1 dirigidas al RE fueron muy superiores a los 1,5 µg por gramo de peso fresco de tejido obtenidos cuando FaNES1 se dirigía a los plástidos en hojas de *A. thaliana* (Aharoni et al., 2003) y similares a los valores que se obtuvieron cuando la enzima se dirigía a las mitocondrias, en donde los niveles de nerolidol emitidos fueron entre 20 y 30 veces superiores a los niveles reportados en los plástidos (Kappers et al., 2005). No obstante, al valorar estas diferencias hay que considerar que la disponibilidad de FPP en los plástidos es muy limitada, al contrario de lo que ocurre en las mitocondrias (Cunillera et al., 1997, 2000; Kappers et al., 2005; van Herpen et al., 2010; Houshyani et al., 2013). En ambos casos, Aharoni et al., (2003) y Kappers et al., (2005), usaron el mismo sistema de captación y cuantificación de volátiles empleado en este trabajo.

Estos resultados también confirman que *N. benthamiana* es un buen sistema para la expresión de sesquiterpeno sintasas. Previamente se había usado este sistema para la expresión transitoria de sesquiterpenos sintasas como, por ejemplo, una germacreno A sintasa dirigida a la mitocondria, que aumentó la producción de germacreno unas 15 veces respecto a su localización citosólica (Liu et al., 2011), o el aumento de la producción de amorfadieno obtenido combinando la coexpresión de la amorfadieno sintasa con la FPS en la mitocondria y la HMGR en el citosol (van Herpen et al., 2010). Además, se ha demostrado que *N. benthamiana* es una buena plataforma para la expresión, purificación y caracterización de las sesquiterpeno sintasas de *Artemisia annua* (Kanagarajan et al., 2012).

Respecto a la proteína FaNES1-3HA citosólica, no se detectó la presencia de nerolidol, resultado que correlaciona con la ausencia de expresión de la proteína, aunque no se puede descartar completamente que los niveles de proteína y nerolidol producidos fueran inferiores a los umbrales de detección de las técnicas empleadas en cada caso. En cambio, la versión citosólica de FaNES1 fusionada a la GFP, FaNES1-3HA-GFP, no sólo dio lugar a la producción de nerolidol, sino que los valores alcanzados fueron los más elevados entre todas las versiones de FaNES1 ensayadas, incluyendo las versiones de RE dmHMGR1S-FaNES1-3HA y la 3HA-FaNES1-dmSQS1; concretamente se obtuvieron valores en torno a los 56 μg de nerolidol por gramo de peso fresco de tejido (Figura 52). Este resultado parece descartar la posibilidad de que las dificultades para expresar FaNES1-3HA deriven de la toxicidad del nerolidol producido y, junto con los obtenidos al expresar las versiones de FaNES1 ancladas al RE, confirma que en las hojas de *N. benthamiana* el FPP citosólico se encuentra disponible para la producción de nerolidol. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha descrito la producción de nerolidol en el compartimento citosólico. En ambos casos, queda por establecer si la redirección de una parte del FPP citosólico hacia la síntesis de nerolidol tiene algún efecto sobre los niveles de otros isoprenoides que también se sintetizan a partir de FPP como, por ejemplo, los esteroides. Se acepta que los niveles intracelulares de FPP y sus precursores IPP y DAMPP deben estar estrictamente controlados para evitar efectos nocivos sobre el flujo metabólico a través de las ramas de la vía que compiten con estos intermediarios (Crowell and Salaz, 1992). De hecho, la sobreexpresión de FPS en *Arabidopsis* (Masferrer et al., 2002; Manzano et al., 2004, 2006) y la de la fitoeno sintasa de tomate (Fray et al., 1995), disminuyen los niveles de IPP/DAMPP disponibles para la síntesis de citoquininas y los de geranilgeranilo disponibles para la síntesis de giberilinas, respectivamente.

Las enzimas bifuncionales FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1 dirigidas al citosol y diseñadas para canalizar directamente el IPP y el DAMPP a nerolidol, emitieron valores bastante diferentes de nerolidol (Figura 51). La proteína FaNES1-FPS1S producía emisiones de 26.3 μg de nerolidol por gramo de peso fresco. Este valor era intermedio a los valores obtenidos al expresar dmHMGR1S-FaNES1-3HA y la 3HA-FaNES1-dmSQS1 ancladas al RE (38 y 13 μg , respectivamente) e inferior a los obtenidos con la versión citosólica FaNES1-3HA-GFP (56 μg). Mientras que la versión FPS1S-FaNES1, dio lugar

sólo trazas de nerolidol (Figura 51). Ésta diferencia entre las dos enzimas bifuncionales puede deberse al distinto plegamiento cuaternario que pueden adquirir las dos proteínas fusionadas. Las sesquiterpeno sintasas normalmente son proteínas monoméricas (Tholl and Lee, 2011) e inusualmente diméricas como la trichodieno sintasa (Rynkiewicz et al., 2001), y las FPS son enzimas diméricas (Tarshis et al., 1994; Keim et al., 2012). Se ha propuesto que las estructuras cuaternarias adoptadas por las fusiones entre un enzima monomérica y una dimérica constan de dos subunidades de la proteína de fusión que se mantienen unidas a través de la enzima dimérica de cada subunidad (Iturrate et al., 2010). Esto abre la posibilidad de que el plegamiento sea distinto en cada una de las dos fusiones de FaNES1 y FPS1S, y que, en particular en el caso de FPS1S-FaNES1, se afecte la funcionalidad de la enzima, dado que es posible que no se pliegue correctamente y sea más susceptible a la degradación, o bien que se pliegue en una estructura cuaternaria que podría estar bloqueando el centro activo de FPS1S y/o de FaNES1 interrumpiendo de este modo el libre acceso al sustrato, lo que justificaría la baja producción a nivel de proteína y de nerolidol. No obstante, a pesar de que la FPS es un dímero, se han obtenido fusiones funcionales de la FPS con sesquiterpeno sintasas, independientemente de la posición relativa de ambas enzimas en la fusión. Por ejemplo, una *epi*-aristolobeno sintasa de tabaco fusionada tanto a N- como a C-terminal de la FPS de *Artemisa annua* produce *epi*-aristolobeno de forma más eficiente que ambas enzimas por separado, demostrando que en *E.coli* no hay diferencias entre las actividades de las dos enzimas (Brodelius et al., 2002). Sin embargo, hasta ahora no se han evaluado fusiones de FPS y sesquiterpeno sintasas en plantas. Por lo tanto cabe la posibilidad, de que este tipo de enzimas se comporten de forma distinta dependiendo del sistema biológico en el que se expresan, en microorganismos o en plantas.

El conjunto de resultados obtenidos en este capítulo de la tesis apoyan la hipótesis de que los niveles de proteína de las distintas versiones de FaNES1, expresadas en *N. benthamiana*, son el factor del que realmente depende la producción de nerolidol. En cualquier caso, todos los resultados obtenidos apuntan a que si existen niveles elevados de la proteína FaNES1, ésta puede acceder al pool de FPP citosólico y lo transforma en nerolidol, independientemente de que la enzima se encuentre unida a la membrana del RE o en forma soluble. Ello indica que la

producción de nerolidol en *N. benthamiana* no depende de la accesibilidad al sustrato FPP como se había sugerido por algunos investigadores (Hohn and Ohlrogge, 1991; Aharoni et al., 2003), sino de la estabilidad de la sesquiterpeno sintasa responsable de su síntesis.

CONCLUSIONES II

CONCLUSIONES II

1. No ha sido posible detectar la expresión de la enzima citosólica FaNES1-3HA ni en *A. thaliana* ni en hojas de *N. benthamiana*, pese a que en ambos casos se detecta la expresión del correspondiente transgén. Ello sugiere que la proteína es muy inestable en este compartimento.
2. Tanto el anclaje de FaNES1 a las membranas del RE a través de los dominios de membrana de las enzimas HMGR1S y SQS1, como la expresión en el citosol en forma de fusión con proteínas como la GFP o la isoforma FPS1S, aumentan muy significativamente la estabilidad de la enzima y dan lugar a la producción de nerolidol.
3. La posición relativa de la isoenzima FPS1S fusionada a FaNES1 condiciona la estabilidad de la proteína de fusión resultante y la consiguiente producción de nerolidol, siendo mucho más efectiva la unión de FPS1S al extremo N-terminal de FaNES1 que la fusión contraria. En cualquier caso, la fusión de ambas enzimas no parece aumentar la eficiencia de síntesis de nerolidol más allá del efecto estabilizador que tiene sobre FaNES1.
4. La tasa de síntesis de nerolidol depende esencialmente de los niveles de proteína FaNES1 que se producen, ya sea en el RE o en el citosol, lo que indica que el FPP del citosol puede desviarse hacia la síntesis de sesquiterpenos y que la limitación para la producción de sesquiterpenos en este compartimento es un problema de estabilidad de la proteína y no de disponibilidad de sustrato.
5. La expresión de FaNES1 en las membranas del RE se presenta como una alternativa a la expresión en las mitocondrias para la producción eficiente de nerolidol.
6. Se ha puesto a punto un método de captación del nerolidol volátil mediante HS SPME seguido de la identificación y cuantificación del mismo mediante GC-MS que permite determinar la producción del nerolidol emitido por muestras de tejido vegetal

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material Vegetal

Los experimentos que se presentan en esta tesis se han llevado a cabo utilizando como material vegetal la especie *A. thaliana*, concretamente, el ecotipo wt Columbia 0 (Col-0) en los experimentos de silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* y el ecotipo wt Columbia 3 (Col-3) en los experimentos de sesquiterpenos volátiles. En los experimentos de silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* se trabajó con mutantes simples de pérdida de función de los genes *AtFPS* por inserción de T-DNA, *Atfps1-1* (SAIL_310-D07) y *Atfps2-1* (SAIL_328-G06) (Sessions et al., 2002; Alonso et al., 2003). También se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de 6 a 8 semanas, crecidas en invernadero, bajo condiciones controladas de temperatura, las cuales fueron aportadas por el Servicio de Invernaderos del CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica).

1.1.1. Condiciones de cultivo del invernadero y cámaras visitables.

El crecimiento y desarrollo de las plantas se realizó según el caso, bajo las siguientes condiciones ambientales controladas:

- Invernadero de *A.thaliana*: a la temperatura de 21-24°C (día) y 20°C (noche). fotoperiodo de 14h de luz y 10h de oscuridad aproximadamente, condiciones lumínicas de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y humedad ambiental del 55%.
- Invernadero de *N.benthamiana*: a la temperatura de 25-27°C (día) 22°C (noche), fotoperiodo de 14h de luz y 10h de oscuridad aproximadamente, condiciones lumínicas de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y humedad ambiental del 60%.
- Cámara de cultivo *in vitro* en condiciones de día largo (LD): 22°C de temperatura, y fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, y humedad ambiental del 94%.

Las características del sustrato y la solución de fertirrigación empleadas fueron las siguientes:

- Sustrato nº5: Sustrato Klasman ST 2, turba de torberas altas, pH 5.5-6.5. Para rellenar macetas se añadió perlita y vermiculita en la misma proporción, pero en menor grado a la del sustrato.

- Solución de fertirrigación: Solución de Hoagland y Arnon (1938), modificada por Johnson y colaboradores (1957): KNO_3 8.4mM, NH_4NO_3 1.2 mM, K_2HPO_4 1.2mM, KH_2PO_4 3.6 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mM, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6mM. Esta solución se complementó cuando fue necesario con el quelante de hierro Kelamix (35 mg/L) y con una mezcla de microelementos (B, Cu, Mn, Fe, Mo y Zn, 0.4 g/L).

1.1.2. Condiciones de cultivo in vitro

Las plántulas de *A. thaliana* se crecieron en placa utilizando el medio *Murashige y Skoog* (MS) en la cámara de cultivo *in vitro* de día largo (LD).

El medio MS (MS 1) fue preparado con agua destilada y posteriormente autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Previo al autoclavado se añadió agar para plantas al 0.8% (p/v). En algunos casos en donde se utilizaron inductores, inhibidores, antibióticos o herbicidas, estos fueron añadidos en las concentraciones correspondientes (Tabla 5), en el medio autoclavado y en condiciones estériles a una temperatura no superior a 50°C, con el fin de evitar la degradación de la molécula añadida, debido a las altas temperaturas a la cual fue sometido el medio durante el proceso de autoclavado.

Medio Murashige y Skoog (MS 1) - 1 L			
Murashige & Skoog con vitaminas			4,4 g
MES (Sigma)			0,5 g
Sacarosa			10 g
Agar para plantas			0,8 g
Ajustar el pH a 5,7 con KOH.			
Nombre	Solvente	Stock	Conc. Final
Basta	Agua	5 mg/ml	10 µg/ml
Cefotaxine	Agua	25 mg/ml	25 µg/ml
Kanamicina	Agua	100 mg/ml	50 µg/ml
Metoxifenocida	--	0,227	30 µM

Tabla 5. Composición del medio MS 1 con vitaminas y concentraciones de los antibióticos e inductores utilizados en plantas.

1.2. Material bacteriológico

1.2.1. Cepas bacterianas

Para los diferentes experimentos desarrollados durante la tesis doctoral, se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* DH5 α : *sup* E44 Δ *lac* U169 (80 *lacZ* Δ M15) *hsd* R17 *rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi*-1 *rel* A1.
- *Escherichia coli* One Shot® TOP10: *hsdR*, *mcrA*, *lacZ* Δ M15.
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90): Resistencia a gentamicina y rifampicina.
- *Agrobacterium tumefaciens* EHA105: Resistencia a rifampicina.

1.2.2. Medios de cultivo

Se ha utilizado el medio LB para el cultivo de diferentes cepas de *E. coli* y el medio YEB para el cultivo de *A. tumefaciens*.

Medio Luria-Bertani* (LB) - 1litro		YEB* – 1litro	
NaCl	5 g	Extracto de levadura	1 g
Extracto de levadura	5 g	Extracto de carne	5 g
Triptona	10 g	Peptona	5 g
Agar bacteriológico	15 g	Sacarosa	5 g
Ajustar el pH a 7.4 con NaOH		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
		Agar bacteriológico	15 g
		Ajustar el pH a 7 con NaOH	

Nombre	Solvente	Stock	Conc. Final
Rifampicina	Metanol	25 mg/ml	150 μ g/ml
Gentamicina	Agua	100 mg/ml	50 μ g/ml
X-Gal	DMF	20 mg/ml	64 μ g/ml
IPTG	Agua	1M	1 mM
Kanamicina	Agua	100 mg/ml	50 μ g/ml
Ampicilina	Agua	100 mg/ml	100 μ g/ml
Cloranfenicol	Etanol	25 μ g/mL	25 μ g/mL

Tabla 6. Medios y antibióticos utilizados para cultivo de bacterias.

El medio fue preparado con agua destilada y posteriormente autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Previo al autoclavado se añadió agar bacteriológico para la preparación de medio sólido. En algunos casos en donde se utilizaron inductores y antibióticos, estos fueron añadidos en las concentraciones correspondientes (Tabla 6), en el medio autoclavado y en condiciones estériles a una temperatura no mayor de 50°C, con el fin de evitar la degradación de la molécula añadida, debido a las altas temperaturas a la cual fue sometido el medio durante el proceso de autoclavado. Por último y para llegar a la fase de crecimiento estacionario, las cepas bacterianas fueron crecidas a 37°C *E. coli* y 28°C *A. tumefaciens*, durante 18 horas a 250 y 180 rpm respectivamente.

2. Vectores y construcciones

2.1. Vectores para subclonaje.

Para la obtención de las diferentes construcciones descritas en esta tesis, se utilizaron vectores intermediarios para el subclonaje como el pBluescript (*Stratagene*), el pGEM-T easy® (*Promega*®) y el pBI221 MUT (5667 pb). La replicación de estos vectores se realizó en la cepa DH5α de *E. coli*. Las células de la cepa DH5α competentes fueron obtenidas en nuestro laboratorio mediante el método del cloruro cálcico descrito por Seidman et al. (1997). Además también se utilizaron los vectores Gateway®, concretamente el pENTR3C y el pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Life technologies). Para la replicación de estos vectores se utilizó la cepa One Shot® TOP10.

2.2. Vectores y construcciones para la expresión en plantas de *A. thaliana*

En la expresión estable en plantas de *A. thaliana* se utilizaron plásmidos que contenían las secuencias necesarias para la transferencia del DNA al genoma de la planta. Para la transferencia del DNA se ha usado la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 (pMMP90) con el fin de obtener plantas transgénicas.

2.2.1. Generación del sistema de silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* mediante amiRNAs

Para generar los dos miRNAs inducibles de los genes *AtFPS*, el amiRFPSa y el amiRFPSb, se siguió la estrategia de clonaje diseñada en el laboratorio del Dr. Detlef Weigel (Ossowski, 2008). En ella el primer paso fue diseñar las secuencias de los dos amiRNAs con la herramienta bioinformática WMD <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>, en el esqueleto del pre-miRNA miR319, precursor endógeno de microRNA en *A.thaliana* del plásmido pRS300 (Figura 54a). El pre-miRNA miR319 se utilizó como molde para integrar los amiRNA de FPS, que fueron obtenidos e integrados a través de PCRs solapantes (Figura 54b).

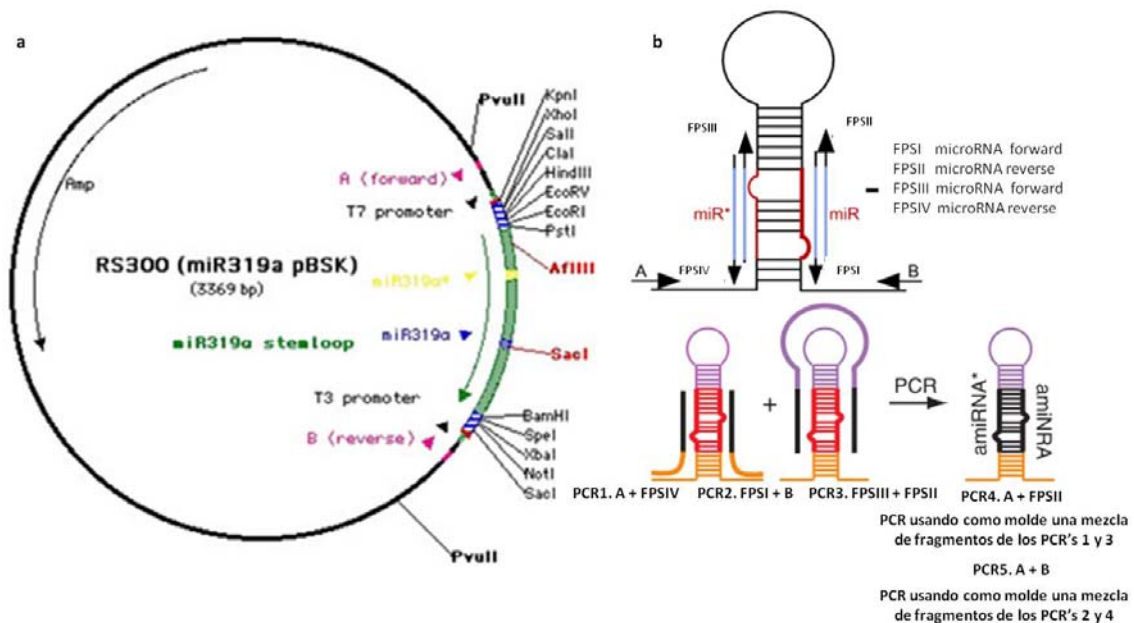


Figura 54. Estrategia de clonaje de amiRNA en un pre-miRNA (Ossowski et al., 2008). **(a)** Plásmido RS300 se usa como molde para integrar los amiRNAs diseñados por la herramienta bioinformática WMD en el esqueleto del pre-miRNA miR319. El plásmido contiene una región con dianas de restricción únicas (sitio de clonaje múltiple) en cada extremo del pre-miRNA. Los *primers* A y B hibridan en el plásmido RS300 a cada lado del pre-miRNA y fuera de los sitios de clonaje múltiple. **(b)** Estrategia de clonaje diseñada en el laboratorio del Dr. Detlef Weigel. La herramienta bioinformática WMD diseña los *primers* I a IV de posición, orientación y secuencia concreta para que, en las PCRs en las que se usa el plásmido RS300 como molde, se obtenga el fragmento del PCR2 (FPSI+B) que hibrida por cada extremo con los fragmentos del PCR1 (A+FPSIV) y 3 (FPSIII+FPSII), dejando algunas posiciones específicas sin hibridar (mutagénesis dirigida). Las PCRs solapantes, la PCR4 (A+FPSII) y la PCR5 (A+B), usan como molde una mezcla de los productos obtenidos en las PCR's 1+3 y 2+4, respectivamente, obteniéndose la construcción final del pre-miRNA de forma de horquilla con el amiRNA y su complemento amiRNA* integrados.

La herramienta bioinformática WMD diseñó los *primers* I a IV de posición, orientación y secuencia necesarias para generar la estructura en forma de horquilla mediante la hibridación del amiRNA y su complementario amiRNA, dejando algunas posiciones específicas sin hibridar (mutagénesis dirigida) (Figura 54b). En la Tabla 7 se muestra la secuencia de los primers A y B, que hibridan en el plásmido RS300 a cada lado del pre-miRNA, y los primers I a IV empleados para integrar cada amiRNA de *FPS*, y en la Tabla 8, las condiciones empleadas en las amplificaciones de los distintos fragmentos. Las construcciones de los pre-miRNA con los amiRFPSa y amiRFPSb se clonaron en primer lugar en el plásmido pGEM-T Easy y secuenciaron.

Nombre	SECUENCIA 5'	3'	Orientación
A	CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C		Forward
B	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G		Reverse
<i>amiRFPSa</i>			
FPSa I	GATATTGCGAAGTAGAATCGCGTTCTCTCTTTTGTATTCC		Forward
FPSa II	GAACGCGATTCTACTTCGCAATATCAAAGAGAATCAATGA		Reverse
FPSa III	GAACACGATTCTACTACGCAATTTACAGGTCGTGATATG		Forward
FPSa IV	GAAATTGCGTAGTAGAATCGTGTCTACATATATATTCT		Reverse
<i>amiRFPSb</i>			
FPSb I	GATAGGTCAACATAGTAAGCCTTTCTCTCTTTTGTATTCC		Forward
FPSb II	GAAAGGCTTACTATGTTGACCTATCAAAGAGAATCAATGA		Reverse
FPSb III	GAAAAGCTTACTATGATGACCTTTACAGGTCGTGATATG		Forward
FPSb IV	GAAAGGTCATCATAGTAAGCCTTTCTACATATATATTCT		Reverse

Tabla 7. Listado de *primers* utilizados para la generación de amiRNAs.

Reacción PCR (a), (b), (c):		
Buffer 10xPCR	Mg ⁺⁺	5µl
dNTPs	2mM	5µl
primers	10µM	2µl
plásmido DNA	(1:100)	2µl
Taq Expand High Fidelity PCR System (Roche)		0,5µl
Agua MQ estéril		33,5 µl
Volumen Final		50µl

Tabla 8. Reacción PCR para la generación de amiRNAs. Temperatura de hidridación a 55°C durante 24 ciclos. Los fragmentos amplificados fueron verificados mediante gel de agarosa al 1%, cortados, purificados con Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System*, PROMEGA® y resuspendidos en 20µl de agua MQ estéril.

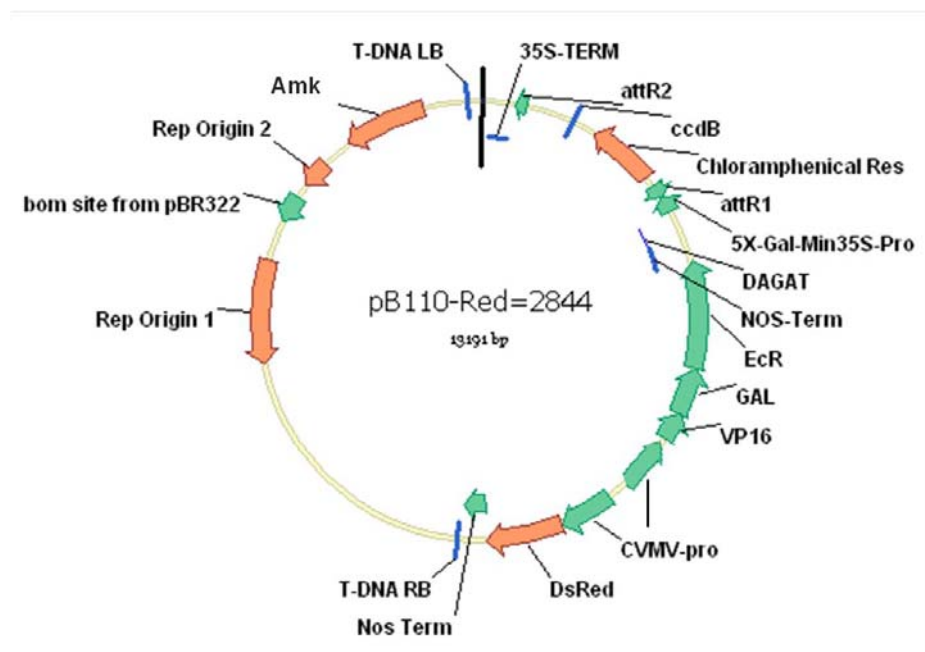


Figura 55. Esquema del plásmido pB110-Red-2844 con el promotor inducible basado en el receptor de ecdisona. Bajo el control del promotor constitutivo CVMV-pro (promotor del virus del mosaico de la nervadura de Cassava), se expresa el factor de transcripción híbrido formado por un dominio de activación (VP16), un dominio de unión a DNA (GAL) y un dominio receptor de ecdisona (EcR). En presencia del inductor metoxifenocida, el factor de transcripción dimeriza y se une al promotor mínimo 5X-Gal-Min35S-Pro (que contiene 5 copias del elemento de respuesta a GAL4 fusionado al promotor mínimo CaMV35S), haciendo que se transcriba aquello que se halla a continuación del promotor. *attR1* y *attR2* son los sitios de recombinación empleados por el sistema *Gateway*. El plásmido confiere resistencia a amikacina, sistema de selección en las bacterias transformadas. La selección de plantas transgénicas se realiza mediante la proteína marcadora DsRed, que permite identificar las semillas transgénicas por la fluorescencia roja que emiten. Abreviaciones: RB, *right border*; LB, *left border*; Nos Term, terminador del gen de la nopalina sintasa; 35S Ter, terminador del gen 35S.

Una vez confirmada la secuencia correcta de los dos premiRNA, estos se transfirieron a un plásmido binario pB110-Red-2844 (Figura 55) para generar líneas transgénicas de *A. thaliana* de silenciamiento inducible de los genes *AtFPS*. El plásmido pB100-Red-2844, fue cedido por el Dr. Edgar B. Cahoon del Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Missouri, USA). Posee una promotor inducible basado en el receptor de la hormona ecdisona de insectos, que se activa empleando un agonista no esteroideo de la ecdisona llamado metoxifenocida. El plásmido posee, bajo el control del promotor constitutivo CVMV-pro, un factor de transcripción híbrido formado por un dominio de activación (VP16), un dominio de unión a DNA (GAL) y un dominio receptor de ecdisona (EcR). En presencia del inductor metoxifenocida, el factor de transcripción híbrido dimeriza y se une al promotor mínimo 5X-Gal-Min35S-Pro,

provocando que se transcriba la secuencia que se encuentra a continuación del promotor.

Las construcciones de los pre-miRNA con los amiRFPSa y amiRFPSb se transfirieron del plásmido pGEM-T Easy y luego al plásmido pENTR3C a través de las dianas de restricción *Sall* y *NotI*. Finalmente las construcciones se clonaron en el plásmido pB110-Red-284 mediante recombinación homóloga del sistema *Gateway*.

2.2.2. Modificación del vector pCAMBIA2300 para generar construcciones quiméricas de FaNES1 ancladas al RE.

Para la obtención del vector modificado pCAMBIA2300, se sustituyó el sitio de clonaje múltiple desde la diana *HindIII* a *EcoRI* por un cassette que contenía el promotor *CaMV35S*, un sitio de clonaje múltiple diseñado a medida que contenía las dianas para las enzimas de restricción *XbaI*, *Sall*, *KpnI*, *StuI*, *SpeI*, *BamHI*, *SacI* y un codón de parada (STOP) entre *BamHI* y *SacI*. Además el cassette contenía el terminador T-NOS. La construcción de este cassette se realizó en el vector pBI221-MUT, un derivado del vector pBI221 (Clontech) generado previamente en nuestro laboratorio (Figura 56). El primer paso consistió en aumentar el número de dianas de restricción existentes en el vector pBI221-MUT mediante la introducción de las nuevas dianas anteriormente mencionadas, dando lugar a un nuevo sitio de clonaje múltiple (Figura 56) Para ello se emplearon dos oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5', el pBI221-MUT-MUT-FOR(5'-CTAGAGTCGACGGTACCAGGCCTACTAGTGGATCCT**AGAGAGCT**-3') y el pBI221-MUT-MUT-REV (5'-**CCT AGGATCCACAGTAGGCCTGGTACCGTCGACT**-3'), el codón de parada añadido a continuación de la diana *BamHI* esta resaltado en negrita. Los dos oligonucleótidos complementarios se usaron para clonar el fragmento del nuevo sitio de clonaje múltiple entre las dianas *XbaI* y *SacI* del vector pBI221-MUT, para dar lugar al vector pBI221-MUT-MUT (Figura 56).

Una vez clonado el fragmento del nuevo sitio de clonaje múltiple y comprobado mediante secuenciación se trasladó el cassette completo (promotor *CaMV35S*, sitio de clonaje múltiple y terminador T-NOS), desde vector pBI221-MUT-MUT hacia el vector pCAMBIA 2300 usando las dianas de restricción *HindIII* y *EcoRI*, obteniéndose el vector pCAMBIA2300MUT.

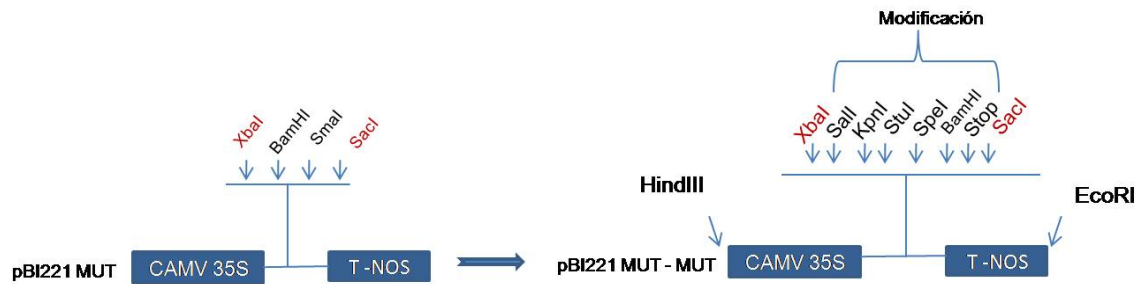


Figura 56. Modificación del sitio de clonaje múltiple del pBI221MUT. Generación del vector pBI221MUT-MUT que contiene el sitio de clonaje múltiple comprendido por las dianas; *XbaI*, *Sall*, *KpnI*, *StuI*, *SpeI*, *BamHI*, *STOP*, *SacI*.

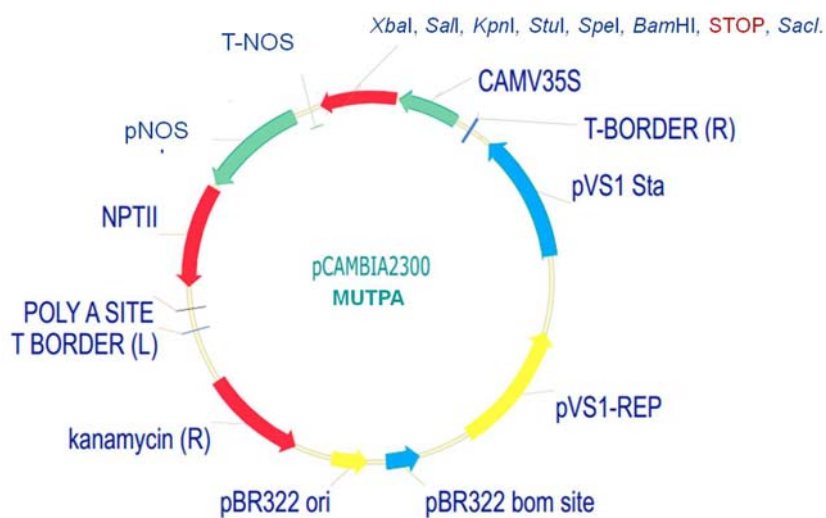


Figura 57. Esquema del vector pCAMBIA2300MUTPA. Vector binario utilizado para la obtención de plantas transgénicas de *A.thaliana* de las construcciones quiméricas de FaNES1

Debido a un problema de silenciamiento de los transgenes correspondientes a las construcciones de FaNES1 dirigidas al RE en la generación T3 de las plantas transgénicas obtenidas en *A.thaliana*, se realizó una segunda modificación del vector pCAMBIA2300MUT que consistió en sustituir el promotor 2xCaMV35S que dirige la expresión del gen *NptII*, que confiere resistencia a kanamicina por el promotor *pNOS* de la *Nopalina sintasa*. Para ello se amplificó mediante PCR el cassette de 1155 bp desde la diana de restricción *BstXI* a la *XhoI* del vector pBI121, que contenía el promotor *pNOS* (*Nopalina sintasa*) y el gen *NptII* con los primers *FOR-NOS-BstXI* (5'-**CCACCATGTTGGGACAATCTGATCATGAGCGG**-3') y *REV-NptIIXhoI* (5'**CTCGAGCTTGTCGATCGACTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG**-3'), con la Taq polimerasa Expand High

Fidelity PCR System (Roche). El fragmento fue clonado y secuenciado en pGEM-T Easy, y desde ahí recuperado con los enzimas *Bst*xl y *Xho*l, y clonado en el vector pCAMBIA2300MUT, dando lugar al vector pCAMBIA2300MUTPA (Figura 57).

2.2.3. Construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA para la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Para la obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras de FaNES1 en plantas de *A. thaliana*, se diseñaron dos versiones de FaNES1 ancladas al RE y una versión citosólica de FaNES1, con la finalidad de evaluar y comparar su potencial de producir y emitir nerolidol.

2.2.3.1. Obtención de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA

La secuencia codificante del cDNA de la enzima FaNES1 sin el codón de parada se obtuvo a partir de la construcción pCAMBIA3300-CoxIV-FaNES1, obtenida con anterioridad en nuestro laboratorio, mediante amplificación por PCR con los siguientes *primers*: FaNES1-For-*Sall* (5'-**GTCGACATGAACGTTGAAACCAAGCATAC**-3') y FaNES1-Rev-*Sall* (5'- **GTCGA CCATTGA TACAGTCTCATACAAC**- 3'). Se agregó al extremo 5' de los *primers* la diana *Sall* indicada en negrita. El fragmento amplificado de 1557 pb, correspondiente al cDNA de FaNES1 fue purificado en un gel de agarosa al 1% mediante el Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System*, PROMEGA®, y clonado en el vector pGEM-T Easy obteniéndose el plásmido pGEMT-FaNES1 *Sall*.

Al mismo tiempo se amplificó la secuencia que codifica el dominio de membrana de la isoenzima HMGR1S con los *primers* HMGR1S-For-*Kpn*l (5'-**GGTACCATGGATCTCCGTCGGAGGCCTC**-3') y HMGR1S-dm-Rev-*Sall* (5'-**GTCGACC GATTT CACAATCTCCTCGTCTTC**-3'). Se agregó al extremo 5' de los *primers* las dianas *Kpn*l y *Sall* (negrita). El fragmento amplificado de 561 pb, al igual que el de FaNES1, fue purificado en un gel de agarosa (1%) y clonado en pGEM[®]-T Easy, dando lugar al plásmido pGEMT-dmHMGR1S. En todas las ligaciones (vector e inserto) se empleó la enzima *T4 DNA Ligase* (Roche), y las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa *DH5α* empleando el método de *heat shock*.

El ensamblaje de las distintas piezas de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA se realizó en el vector pBS-SK⁺. En primer lugar se clonó el fragmento

correspondiente al dominio de membrana de HMGR1S, derivado del plásmido pGEMT-dmHMGR1S, previamente cortado con las enzimas *KpnI* y *Sall*, obteniéndose el plásmido pBS-dmHMGR1S. A continuación, se procedió a clonar las tres copias del epítipo HA, entre las dianas *Sall* y *BamHI*, en el extremo 3' de la secuencia que codifica el dominio de membrana de HMGR1S. Seguidamente, se procedió a clonar entre las dianas *Sall* y *BamHI* el epitopo 3HA de 123 pb, que se obtuvo mediante digestión con las enzimas *Sall* y *BamHI* desde el vector pE2n (Dubin et al., 2008), adquirido en el banco de plásmidos *Adgene*, (GenBank: EU334817). De esta forma se obtuvo el plásmido pBS-dmHMGR1S-3HA. Finalmente, se procedió a añadir la secuencia codificante del cDNA de FaNES1 en el cassette del plásmido pBS-dmHMGR1S-3HA. El fragmento de FaNES1 fue previamente obtenido por digestión con *Sall* desde el plásmido pGEMT-FaNES1 *Sall*, obteniéndose así el plásmido pBS-dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Por último la secuencia del cassette dmHMGR1S-FaNES1-3HA (2241pb), sin codón de parada, se clonó entre las dianas *KpnI* y *BamHI* de los vectores binarios pCAMBIA2300MUT y pCAMBIA2300MUTPA previamente modificados (apartado 2.2.2). Todos los fragmentos amplificados por PCR fueron obtenidos con Taq polimerasa *Expand High Fidelity PCR System* (Roche).

2.2.3.2. Obtención de la construcción quimérica 3HA-FaNES1-dmSQS1

La secuencia codificante del cDNA de la enzima FaNES1 sin codon de parada y con dianas de restricción distintas en los extremos, se obtuvo a partir del mismo plásmido citado en el apartado anterior, el pCAMBIA3300-CoxIV-FaNES1, mediante amplificación por PCR con los siguientes *primers*: FaNES1-For-*BamHI* (5'-**GGATCCATGAACGTTGAAACCAAGCATAC**-3'), y FaNES1-Rev-*XbaI* (5'-**TCTAGACATTGATA CAGTCTCATACAA** C-3'). Se añadió a los *primers* las dianas *BamHI* y *XbaI*, respectivamente (negrita). La secuencia amplificada, 1557 pb, se clonó en el vector pGEM-T Easy, generando el plásmido pGEMT-FaNES1*BamHI*.

Paralelamente, se amplificó la secuencia que codifica el dominio de membrana de la enzima SQS1 con los siguientes *primers*: SQS1-dm-For-*XbaI* (5'-**TCTAGAAAGACAAAGTTGACAAGAAC**-3'), y SQS1-dm-Rev-*NotI-SpeI* (5'-**GCGGCCGCA CTAGTTCAGTTTGCTCTGAGATAT** GC-3'). Las secuencias en negrita corresponden a las dianas de restricción *XbaI*, *NotI* y *SpeI* (negrita) necesarias para el correcto ensamble

del cassette. El fragmento amplificado de 201 pb, correspondiente al dominio de membrana de SQS1, fue clonado en pGEM-T Easy, generando el plásmido pGEMT-dmSQS1. El primer paso para ensamblar el cassette no fue posible de realizarlo en el pBS-SK⁺ directamente, ya que el orden previsto era en primer lugar la introducción del triple epítipo 3HA, sin embargo, éste resultó tóxico para las bacterias, por lo cual se optó por clonar la secuencia de FaNES1 en el vector pE2n que contenía las tres copias en tándem del epítipo HA. La secuencia FaNES1 se aisló a partir del plásmido pGEMT-FaNES1 usando las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, y se clonó en pE2n, dando lugar al plásmido pE2n-FaNES1. Por otro lado para ensamblar el cassette en el pBS-SK⁺, mediante la digestión con las enzimas *Xba*I y *Not*I, se clonó el fragmento correspondiente al dmSQS1 procedente del plásmido pGEMT-dmSQS1, produciendo el plásmido pBS-dmSQS1. A continuación, en el pBS-dmSQS1 se introdujo el cassette 3HA-FaNES1 procedente del plásmido pE2n-FaNES1 mediante las enzimas *Sal*I y *Xba*I, dando origen al plásmido pBS-3HA-FaNES1-dmSQS1. Finalmente se clonó el cassette 3HA-FaNES1-dmSQS1 (1881pb) entre las dianas *Sal*I y *Spe*I en los vectores binarios pCAMBIA2300MUT y pCAMBIA2300MUTPA. Todos los fragmentos amplificados por PCR fueron obtenidos con Taq polimerasa *Expand High Fidelity PCR System* (Roche).

2.2.3.3. Obtención de la construcción quimérica FaNES1-3HA

La secuencia codificante del cDNA de la enzima FaNES1 sin el codón de parada se obtuvo a partir de la construcción pCAMBIA3300-CoxIV-FaNES1 mediante amplificación por PCR con los siguientes *primers*: FaNES1-For-*Kpn*I (5'-**GGTACCATGAACGTTGAAACCAAGC** ATAC- 3') y FaNES1-Rev-*Sal*I (5'-**GTCGACCATTGA** TACAGTCTCATACAAC- 3'). Se agregó al extremo 5' de los *primers* la diana *Kpn*I y *Sal*I indicadas en negrita. El fragmento amplificado de FaNES1 fue purificado en un gel de agarosa al 1% mediante el Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System*, PROMEGA® y clonado en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-FaNES1 *Kpn*I.

El ensamblaje del cassette de la construcción FaNES1-3HA se realizó en pBS-SK⁺. En primer lugar se clonó el fragmento correspondiente a FaNES1 (1557pb) entre las dianas *Kpn*I y *Sal*I, obteniéndose el plásmido pBS-FaNES1. A continuación, se procedió a clonar el triple epítipo 3HA, entre las dianas *Sal*I y *Bam*HI del plásmido pBS-FaNES1, en el extremo 3' de la secuencia que codifica FaNES1. El triple epítipo 3HA de 123 pb,

se obtuvo mediante digestión con las mismas enzimas *Sall* y *BamHI*, desde el vector pE2n (Dubin et al., 2008), adquirido en el banco de plásmidos *Adgene*, (GenBank: EU334817). Finalmente se clonó el cassette FaNES1-3HA (1680pb), entre las dianas *KpnI* y *BamHI*, de los vectores binarios pCAMBIA2300MUT y pCAMBIA2300MUTPA. Todos los fragmentos amplificados por PCR fueron obtenidos con Taq polimerasa *Expand High Fidelity PCR System* (Roche).

2.3. Vectores y construcciones quiméricas utilizados para la expresión transitoria en *N. benthamiana*

2.3.1. Vectores y construcciones utilizados en la localización subcelular de las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA, 3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA fusionadas a GFP

Para llevar a cabo el estudio de localización subcelular se utilizaron plásmidos comerciales pMDC, *Gateway® Technology* (Invitrogen), que contienen la secuencia que codifica la proteína GFP, ubicada, según el vector, en el extremo 5' o 3' de las secuencias *attR* de recombinación. Los vectores pMDC45 poseen la secuencia del gen que codifica la GFP en el extremo 5' mientras que el vector pMDC85 posee la secuencia que codifica la GFP en el extremo 3' (Figura 58). Los plásmidos pMDC actúan bajo el control del promotor *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor, poseen dos sitios de recombinación homóloga (los cuales permiten el subclonaje de la secuencia de interés), un gen que confiere resistencia a la kanamicina para selección bacteriana y un gen de resistencia a higromicina para la selección en plantas. Además contiene el gen *ccdB* entre los dos sitios de recombinación, *attR1* y *attR2*, que facilita la selección de los plásmidos recombinantes en bacterias, impidiendo el crecimiento de aquellas que contienen el gen *ccdB*. Con el fin de determinar la correcta localización subcelular de las construcciones quiméricas se prepararon construcciones para expresar transitoriamente las versiones quiméricas de FaNES1 fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*), tanto en el extremo C-terminal de la GFP en los casos de las proteínas dmHMGR1S-FaNES1-3HA y FaNES1-3HA, como en el N-terminal en el caso de 3HA-FaNES1-dmSQS1. Posteriormente, cada una de estas construcciones fueron expresadas transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*

mediante agroinfiltración y posteriormente visualizadas en microscopio confocal. La obtención de las construcciones quiméricas fusionadas a GFP, se realizó mediante el uso de vectores de expresión pMDC (*Gateway*[®]-Invitrogen).

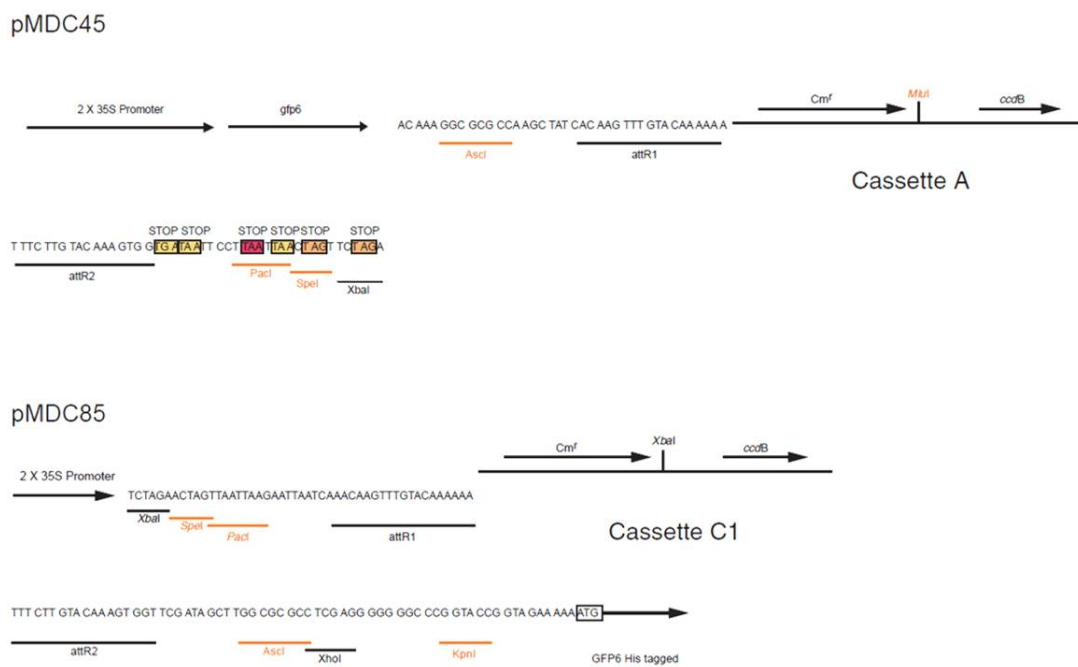


Figura 58. Esquema de los plásmidos pMDC. Se muestra el promotor *CaMV35S*, los sitios de clonaje por recombinación (*attR1* y *attR2*) y la secuencia que codifica GFP en 5' en pMDC45 y en 3' en pMDC85

2.3.1.1. Generación de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP

Para comprobar la correcta localización subcelular de la construcción quimérica dmHMGR1S-FaNES1-3HA, se procedió a fusionar la quimera a la GFP. La obtención de la construcción quimérica fusionada a GFP, se realizó a través de recombinación homóloga del transgén dmHMGR1S-FaNES1-3HA, desde el vector pENTR3C al vector de expresión pMDC85 (*Gateway*[®]-Invitrogen). En primer lugar, se construyó el plásmido pENTR3C-dmHMGR1S-FaNES1-3HA. Para ello, desde el plásmido pBS-dmHMGR1S-FaNES1-3HA se obtuvo el fragmento de 2241pb, dmHMGR1S-FaNES1-3HA. La digestión del fragmento se realizó en una primera etapa en el extremo 3' con la enzima *SpeI* (Promega[®]), dando origen en 3' a un extremo protuberante, el cual fue necesario tratar con la enzima *Klenow* (Roche) que tiene una actividad exonucleasa 3' a 5', la cual permite obtener un extremo romo, eliminando la secuencia protuberante de la diana *SpeI*. La obtención del extremo romo se realizó en condiciones controladas,

el primer paso consistió en digerir 5 μ g del plásmido con la enzima *SpeI* durante 30 minutos a 37°C y luego se añadió 1 μ l de *dNTP's* 2 mM y 0,5 μ l de *Klenow* (Roche) y se incubó 15 minutos a 30°C, para luego desactivar la enzima a 75°C durante 20 minutos. Una vez verificado el corte mediante electroforesis de agarosa, se añadió a la reacción, 10% de AcNa 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto en frío, y a continuación se centrifugó 20 min a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió etanol al 70% para lavar el DNA precipitado. Nuevamente se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm y se dejó secar al aire en el mismo tubo eppendorf. Finalmente se añadió agua bidestilada estéril para resuspender el fragmento dmHMGR1S-FaNES1-3HA con el extremo romo. A continuación, se realizó una segunda digestión con la enzima *KpnI* para digerir el extremo 5'. La digestión se verificó mediante gel de agarosa al 1% y el fragmento se purificó mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System*, Promega®.

El vector utilizado fue el pENTR3C, que posee dos secuencias flanqueantes al fragmento clonado (*attL1* y *attL2*), que permiten pasar en un paso la secuencia introducida en el pENTR3C a los vectores finales de expresión pMDC mediante recombinación homóloga. Este vector fue digerido con las dianas *KpnI* y *EcoRV*, esta última ubicada en 3' originando un extremo romo. Finalmente, el fragmento de 2241pb dmHMGR1S-FaNES1-3HA se clonó en el vector pENTR3C (vector que pertenece a la familia de vectores de entrada del sistema *Gateway*®) entre las dianas *KpnI* y *EcoRV* (extremo romo), dando origen al plásmido pENTR-dmHMGR1S-FaNES1-3HA. El fragmento de 2241pb de dmHMGR1S-FaNES1-3HA presente en el plásmido pENTR3C se recombinó vía *Gateway*® en el vector de destino pMDC85 mediante una reacción LR. La construcción, fue completamente secuenciada para comprobar el correcto marco de lectura de la fusión con la GFP.

2.3.1.2. Generación de la construcción quimérica GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1

Para comprobar la correcta localización subcelular de la construcción quimérica 3HA-FaNES1-dmSQS, se procedió a fusionarla a la GFP. La obtención de la construcción quimérica fusionada a GFP, se llevó a cabo mediante la recombinación homóloga del transgén 3HA-FaNES1-dmSQS desde el vector pENTR3C al vector de expresión pMDC45 (*Gateway*®-Invitrogen).

En este caso la obtención del correspondiente pENTR3C se realizó desde el plásmido pBS-3HA-FaNES1-dmSQS, desde él cual fue obtenido el fragmento 3HA-FaNES1-dmSQS mediante la digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI*. La correcta digestión se verificó mediante gel de agarosa al 1% y el fragmento se purificó mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System, Promega*[®]. El fragmento obtenido se clonó entre las dianas *Sall* y *NotI* en el vector pENTR3C. Finalmente el fragmento 3HA-FaNES1-dmSQS del plásmido pENTR3C se recombinó en el vector de destino pMDC45 mediante una reacción LR. La construcción, fue completamente secuenciada para comprobar el correcto marco de lectura de la fusión con la GFP.

2.3.1.3. Generación de la construcción quimérica FaNES1-3HA-GFP

La correcta localización subcelular de la construcción quimérica FaNES1-3HA, se comprobó mediante la fusión a GFP. La obtención de la construcción quimérica fusionada a GFP, se llevó a cabo mediante la recombinación del transgen *FaNES1-3HA* desde el vector pENTR3C al vector de expresión pMDC85 (*Gateway*[®]-Invitrogen). Para la obtención de la construcción quimérica en el pENTR3C, desde el plásmido pBS-FaNES1-3HA se obtuvo el fragmento de 1680pb de FaNES1-3HA, 5' cortado con *KpnI* y el extremo 3' romo. Para esto fue necesario realizar primero el extremo romo, se cortó con la enzima *SpeI* (Promega[®]), y al igual que la construcción con el dominio de membrana de HMGR1S fue necesario digerir el extremo 3' con la enzima *Klenow*, y el extremo 5' con la enzima *KpnI*. Las digestiones se verificaron mediante gel de agarosa al 1% y el fragmento se purificó mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System, Promega*[®]. El fragmento de 1680pb de FaNES1-3HA se clonó en el vector pENTR3C entre las dianas *KpnI* y *EcoRV*, ésta última ubicada en 3' y de extremo romo, dando origen al plásmido pENTR-FaNES1-3HA que se recombinó mediante una reacción LR al vector de destino pMDC85.

2.3.2. Obtención de fusiones de las enzimas FaNES1 y FPS1S para la síntesis de nerolidol a partir de IPP y DMAPP en hojas de *N. benthamiana*

Para investigar si una enzima bifuncional que fusiona a las enzimas FaNES1 y FPS1S es capaz de sintetizar nerolidol a partir de IPP y DMAPP de forma más

eficientemente que ambas enzimas por separado, se generaron 2 construcciones quiméricas que fusionan a las enzimas mencionadas a través de una secuencia espaciadora que codifica para Gln-Gly-Gln-Gly-Gln (Iturrate, 2010).

La región codificante del cDNA de la enzima FaNES1 se obtuvo a partir de la construcción 3HA-FaNES1-dmSQS y la región codificante del cDNA FPS1S a partir de la construcción existente en el laboratorio (Cunillera et al, 1997). Ambas se amplificaron por PCR, cada una con dos versiones *primers* que contenían la secuencia *linker*, para la construcción de FPS1S-FaNES1 y FaNES1-FPS1S, dando origen a 4 fragmentos amplificados con los siguientes primers:

- Fragmento 1 (1057pb), correspondiente al dominio FPS1S de la enzima FPS1S-FaNES1:

- FPS1 For *NdeI* 5'-**CATATG**GAG ACCGATCTCAAGTCAACC-3'
- FPS1 Rev linker 5'CAACGTT**CATCTGGCCCTGGCCCTG**CTTCTGCCTCTTGATAGAT CTTAG-3'

Se agregó al extremo 5' del *primer* FPS1-For *NdeI*, la diana *NdeI* indicada en negrita y que forma parte del codón ATG del inicio de la traducción de FPS1S (negrita y subrayado). El *primer* FPS1 Rev linker, incorpora además 10 nucleótidos del inicio de la región codificante de FaNES1 y la secuencia linker que sirve de unión y espaciador (negrita) entre las enzimas FPS1S-FaNES1.

- Fragmento 2 (1586pb), correspondiente al dominio FaNES1 de la enzima FPS1S-FaNES1:

- FaNES1-ForLinker 5'-GCAGAAG**CAGGGCCAGGGCCAGATG**AACGTTGAAACCAAGCATAC-3'
- FaNES Rev No stop 5'-**CTCGAG**CATTGATACAGTCTCATACAA C-3'

El *primer* FaNES1-For linker contiene el codón ATG de inicio de la traducción de FaNES1, y a 5' se añadió 7 nucleótidos del extremo 3' de FPS1S y la secuencia linker que sirve de unión y espaciador (negrita) entre las enzimas FPS1S-FaNES1. En el extremo 5' de FaNES1 Rev No stop se agregó la diana *XhoI* indicada en negrita.

- Fragmento 3 (1581pb), corresponde al dominio FaNES1 de la enzima FaNES1-FPS1S:

- FaNES1-For 5'**CATATG**AACGT GAAACCAAGCATAC-3'
- FaNES1-Rev linker 5'CTC**CATCTGGCCCTGGCCCTG**CATTGATACAGTCTCATACA AC-3'

Al extremo 5' de FaNES1-For se añadió la diana *NdeI* indicada en negrita que contiene el codón ATG del inicio de la traducción de FaNES1 (negrita y subrayado). El primer FaNES1-Rev linker cuenta a 5' con 6 nucleótidos del inicio de la región codificante de FPS1S que contiene el codón ATG del inicio de la traducción de FPS1S y a continuación la secuencia linker que sirve de unión y espaciador entre las enzimas FaNES1 y FPS1S.

- Fragmento 4 (1113pb), corresponde al dominio FPS1S de la enzima FaNES1-FPS1S:
 - FPS1S-For Linker 5'-GTATCAATGC**AGGGCCAGGGCCAG**ATGGAGACCGATCTCAAGTCAAC-3'
 - FPS1S Rev No Stop 5'-**CTCGAG**CTTCTGCCTCTGTAGATCTTAG-3'

El primer FPS1S-For Linker contiene el codón ATG del inicio de la traducción de FPS1S y se añadió en el extremo 5' además 9 nucleótidos de la secuencia codificante de FaNES1. También se agregó la secuencia linker que sirve de unión y espaciador entre las enzimas FaNES1 y FPS1S. El *primer* FPS1S Rev No stop contiene a 5' la diana *XhoI* indicada en negrita.

Todos los fragmentos fueron amplificados por PCR con la Taq polimerasa *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). Posteriormente los fragmentos fueron purificados mediante gel de agarosa. Ninguno de los fragmentos amplificados contiene el codón de parada. La obtención de la fusión de los dos dominios FaNES1 y FPS1S se realizó mediante PCR's solapantes, usando como templado 200 ng de cada uno de los fragmentos según correspondiera. Para la construcción FPS1S-FaNES1 se utilizaron 200 ng de los fragmentos 1 y 2. Los *primers* utilizados para amplificar mediante PCR el fragmento final fueron FPS1 For *NdeI* y FaNES Rev No stop. En la construcción FaNES1-FPS1S se utilizaron los fragmentos 3 y 4. Los *primers* utilizados para amplificar mediante PCR el fragmento final fueron FaNES1-For y FPS1S Rev No Stop. Los fragmentos fueron purificados en un gel de agarosa al 1% mediante el Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System*, Promega®, y clonado en el vector pGEM-T Easy, dando lugar a los plásmidos pGEM-T-FaNES1-FPS1S y pGEM-T-FPS1S-FaNES1. Una vez clonados los fragmentos, se verificaron mediante digestión enzimática y se secuenciaron completamente. Se estudio la posibilidad de clonar de forma convencional los fragmentos en un vector binario para la transformación en plantas, sin embargo, al ser construcciones bastante grandes, de 2601 pb, fue muy difícil traspasarlas mediante esta técnica a un vector final para plantas. Por esta razón se

decidió utilizar la tecnología *Gateway*[®] (Invitrogen). Para lo cual en primer lugar se procedió a la amplificación de cada una de las fusiones de 2601pb desde los plásmidos pGEM-T-FaNES1-FPS1S y pGEM-T-FPS1S-FaNES1 para su clonaje en el pENTR-D-TOPO[®]. Se utilizó para ello la polimerasa de alta fidelidad *Pwo Super Yield DNA polymerase* (Roche) y los *primers*:

- Fusión FPS1S-FaNES1

- For II 5'-CACCATGGAGACCGATCTCAAGTCAACC-3'

- Rev II 5'-TTACATTGATACAGTCTCATACAAC-3'

Al extremo 5' de For II, se añadieron 4 bases (subrayadas), por recomendación del protocolo para el clonaje dirigido en el vector TOPO, por delante del codón ATG del inicio de la traducción de FPS1S. El *primer* Rev II cuenta con el codón de parada TAA (negrita).

- Fusión FaNES1-FPS1S

- For I 5'-CACCATGAACGTTGAAACCAAGCATAC-3'

- Rev I 5'-TTACTTCTGCCTCTTGATAGATCTTAGCC-3'

En el extremo 5' de For I, se añadieron 4 bases (subrayadas), delante del codón ATG del inicio de la traducción de FaNES1, para el clonaje en el vector TOPO. El *primer* Rev I cuenta con el codón de parada TAA (negrita).

Una vez amplificados las fusiones FaNES1-FPS1S y FPS1S-FaNES1, se procedió al clonaje de las mismas en un plásmido pENTR-D-TOPO[®] (*Invitrogen*). Este plásmido permite el clonaje dirigido de fragmentos de extremos romos, debido a la presencia de cuatro bases extra en el extremo 5', que se añaden a través de uno de los *primers* utilizados durante la amplificación. Confirmada la presencia del fragmento en el vector pENTR-D-TOPO-FaNES1-FPS1S y pENTR-D-TOPO-FPS1S-FaNES1, se linearizó el plásmido mediante digestión con las enzimas *PvuI* y *EcoRV* con el fin de facilitar el clonaje posterior por recombinación homóloga. Las fusiones quiméricas fueron clonadas en el vector binario pEarlyGATE100 (Keith et al., 2006) cedido por la Dra. Teresa Altabella (UB, Centre de Recerca en Agrigenòmica CRAG), que permitió la expresión en plantas. El clonaje generó las construcciones p35S FaNES1-FPS1S (pEarlyGATE100-FaNES1-FPS1S) y p35S FPS1S-FaNES1 (pEarlyGATE100-FPS1S-FaNES1).

3. Métodos

3.1. Técnicas aplicadas en plantas

3.1.1. Esterilización de semillas

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante 2 lavados; el primero con una solución de etanol al 70% y el segundo con etanol al 99%. El proceso de esterilización se realizó en una cámara de flujo laminar. Las semillas fueron repartidas en tubos *ependorf* en una cantidad equivalente a 100 μ l como máximo. Posteriormente se añadieron 200 μ l de etanol al 70% y se mezclaron mediante vortex durante 45 segundos. Finalmente se realizó un lavado con etanol al 99% y se dejaron secar durante aproximadamente 2h en la cabina de flujo laminar para eliminar completamente el etanol, ya que su presencia puede interferir en la germinación de las mismas.

3.1.2. Siembra de semillas

Una vez que las semillas fueron esterilizadas, estas se distribuyeron homogéneamente, ya sea por dispersión desde el tubo *ependorf* o bien sembradas individualmente. La siembra una a una se realizó mediante pinzas de punta muy fina (previamente esterilizadas superficialmente), las cuales se sumerge la punta en agua estéril de forma que cuando se coge la semilla esta se adhiere por tensión superficial a la punta de las pinzas, facilitando la siembra sobre el medio de cultivo *Murashige y Skoog* (MS1) de las placas de *Petri*. El procedimiento se realizó al interior de la cabina de flujo laminar y las placas fueron selladas con esparadrapo transpirable (*Leukopor*[®]), y fueron dejadas a 4°C durante 2 a 3 días en oscuridad. El objetivo de este proceso, denominado estratificación, es sincronizar la germinación de las semillas sembradas. En aquellos casos en que fueron requeridos inductores, inhibidores, antibióticos o herbicidas, estos fueron añadidos en las concentraciones correspondientes (Tabla 5), en el medio autoclavado, en condiciones estériles y a una temperatura no mayor de 50°C, con el fin de evitar la degradación de la molécula añadida, debido a las altas temperaturas a la cual fue sometido el medio durante el proceso.

En los experimentos de silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* con Metoxifenocida (*Runner*®), las semillas de *A. thaliana* se sembraron homogéneamente sobre papel filtro estéril, en placas de Petri que contienen medio MS1. De esta forma, las plantas pueden crecer sin introducir la raíz en el medio de cultivo permitiendo la recogida de tejido (plántulas enteras) con mayor facilidad. El papel filtro se corta de acuerdo al diámetro de la placa, se envuelven en papel de aluminio y se autoclavan 30 min a 120°C. Por último, se secan en la estufa a 80°C. Una vez secas las membranas se colocaron en las placas de medio MS1 con la ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas con etanol. A continuación, se siembran las semillas esterilizadas (apartado 3.1.1) uniformemente, se estratifican y se dejan crecer durante 3 días en condiciones de día largo (LD) (16 horas de luz y 8 de oscuridad). Al cabo de 3 días, las membranas que contienen las semillas germinadas se trasladan con la ayuda de pinzas *Millipore*®, esterilizadas con etanol, a placas de *Petri* que contienen medio MFZ (medio que contiene la mitad de las concentraciones de sales del medio MS y 30 µM de Metoxifenocida). La concentración de inductor puede variar según el tratamiento que corresponda (Figura 59).

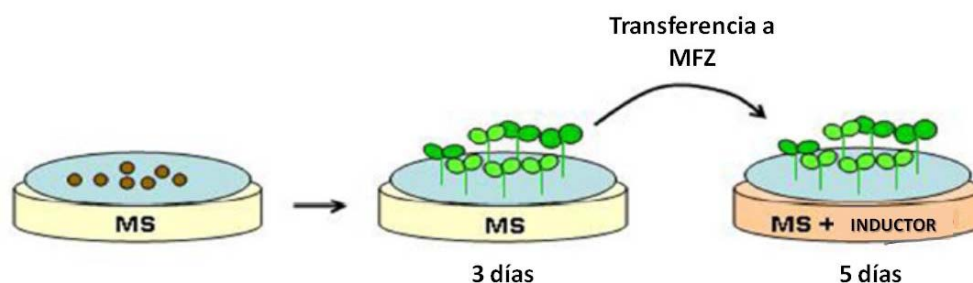


Figura 59. Esquema del diseño experimental usado para inducir el silenciamiento de los genes *AtFPS*. El diseño comprende, la siembra de semillas en medio MS1 y dejarlas de 2 a 3 días a 4°C (estratificación), 3 días en MS1 en condiciones de día largo, y finalmente traspasar el papel filtro con las plántulas al medio MFZ (MS en presencia de 30 µM metoxifenocida).

3.1.3. Cultivo de plantas en tierra

En aquellos casos en que fue necesario realizar estudios de plantas en estadio adulto y/o en fase reproductiva, se transplantaron plántulas de 10-15 días (que presentan el primer par de hojas verdaderas) crecidas en placas de cultivo *in vitro* a tiestos de 55mm de diámetro, que contenía una mezcla de sustrato/perlita/vermiculita

(apartado 1.1.1), los cuales fueron hidratados con agua normal y dispuestos en una bandeja. Durante el procedimiento de transplante, las plantas se separaron cuidadosamente del medio de germinación con ayuda de unas pinzas *Millipore* y se colocaron sobre un agujero realizado previamente en el sustrato de cada maceta. Posteriormente, se cubrió la raíz con sustrato y la bandeja fue recubierta con un film plástico (*Saram Wrap*[®]), con el fin de mantener condiciones de humedad elevada, debido a que las plántulas crecidas *in vitro* son muy sensibles a la deshidratación. Pasados 2 a 3 días se realizaron agujeros en el plástico, para que las plantas se adaptaran paulatinamente a las nuevas condiciones ambientales. Transcurridos 2-3 días más, este plástico fue retirado completamente. Por último las macetas fueron regadas con una solución nutritiva de fertirrigación por capilaridad con una periodicidad variable, según los requerimientos de las mismas, debido a que el sustrato no posee la cantidad de nutrientes necesarios para soportar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

3.1.4. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*

La generación de plantas de *A. thaliana* transgénicas se realizó mediante la utilización de la cepa *A. tumefaciens* GV3101 como vehículo para transferir a la planta los genes quiméricos de interés para su integración de forma estable. El procedimiento consistió en obtener las construcciones correspondientes que expresan los transgénicos de interés, introducirlos en la cepa de *Agrobacterium* y finalmente, infectar la línea de la planta correspondiente con la suspensión de las bacterias transformadas. Para llevar a cabo la infección, se utilizó una versión simplificada de la técnica de infiltración al vacío denominada *floral dip* (Clough and Bent, 1998).

Se utilizaron plantas crecidas en día corto de unas 2-3 semanas de edad, periodo en donde desarrollan al máximo la roseta basal. A partir de esta edad se trasladaron al fotoperíodo de día largo. En estas condiciones las plantas desarrollaron el tallo principal con el brote floral (día 20-30). Una vez que las plantas emitieron tallo, éste fue cortado desde la base, con el objetivo de eliminar la dominancia apical y favorecer el desarrollo de tallos laterales y obteniendo, así, un mayor número de inflorescencias. A los 10 días del corte del tallo principal, la planta ha producido

diversos tallos laterales y se encuentra en condiciones para proceder a la infiltración. Es conveniente que las flores estén todavía cerradas. También es recomendable que las plantas se presenten lo más sanas posible, ya que de esta manera resistirán mejor el estrés provocado por el proceso de infección. El método de agroinfiltración consistió en que el *A. tumefaciens* transformado infectase las células germinales de la planta, para que estas, posteriormente originasen semillas que portarán el transgén de interés. Para ello, basta con introducir sólo las inflorescencias de *A. thaliana* dentro del recipiente que contiene la suspensión de *A. tumefaciens* transformados en sacarosa con Silwet-77 y mantenerlas sumergidas entre 20 y 60 segundos. Luego se deja reposar las plantas en posición horizontal sobre un papel de filtro en una bandeja y se cubren con film plástico. Se mantienen en esta posición hasta que las inflorescencias comiencen a curvarse hacia arriba, debido al fototropismo (aproximadamente 12-20 h). Una vez transcurrido este tiempo, se quita el film plástico y se colocan las macetas en posición vertical. Es conveniente mantener en condiciones de luz de día largo para favorecer la producción de semillas.

3.1.5. Selección de plantas transgénicas

Una vez realizado el proceso de infiltración de las flores o transformación, y transcurrido el tiempo necesario para que estas plantas produzcan semillas (aproximadamente un mes después de la infiltración), éstas se recogieron y se procedió a la selección o *screening* de aquellas semillas que portan el transgén. Dependiendo de la eficiencia de la transformación y de las condiciones durante el desarrollo de las plantas, existirá un porcentaje de semillas producidas que no incorporaron el transgén, de manera que el éxito de la selección radica en detectar aquellas que sí lo han hecho. Cada plásmido Ti transfiere al cromosoma de *A. thaliana* un gen que otorga resistencia a un antibiótico o fluorescencia roja (en el caso de amiRFPS) en la planta que lo expresa, de manera que, el proceso de selección consiste en germinar las semillas en medio MS en presencia de dicho antibiótico y/o buscar las semillas que presentan fluorescencia roja bajo una luz verde. Aquellas que fueron capaces de crecer, evidenciaron la incorporación del transgén.

A partir de los 10 a 15 días fue posible observar las diferencias en el crecimiento entre las plantas transgénicas de aquellas que no lo son, ya que las primeras desarrollaron hojas verdaderas con normalidad, mientras que las no transgénicas presentaron susceptibilidad al antibiótico, caracterizado por un aspecto pálido, sin llegar a desarrollar hojas verdaderas. Confirmada la resistencia de las plantas estas fueron transferidas a tierra para completar su ciclo biológico, obteniéndose de esta manera la generación T₁.

3.1.6. Selección de líneas homocigóticas para el transgén

Mientras tiene lugar el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*, la planta incorpora el transgén en una de las dos dotaciones cromosómicas y por lo tanto, la generación T₁ es heterocigótica para el transgén. En la generación posterior, por autofecundación de la generación T₁, se obtiene una descendencia heterogénea, que corresponde a la generación T₂ en la que se pueden hallar plantas homocigotas y heterocigotas para el transgén, así como plantas *wild type* que no han insertado ninguna copia. En el caso de que haya habido una sola integración del T-DNA, estos tres genotipos se encuentran representados en una proporción de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, y $\frac{1}{4}$, respectivamente. Para llevar a cabo los estudios realizados, es de interés contar con líneas homocigotas. Por lo tanto se seleccionaron aquellas plantas de la generación T₂ homocigotas para el transgén, respecto de aquellas que no lo eran. Para ello, se observó la segregación del carácter de resistencia al antibiótico, y por lo tanto del transgén, en la descendencia de la generación T₂, obtenida por autofecundación y que constituye la generación T₃. Las plantas homocigotas para el transgén dieron lugar a una descendencia 100% resistente al antibiótico y por lo tanto fueron escogidas para los trabajos experimentales. Por otro lado, las plantas heterocigotas de la generación T₂ generarán una descendencia $\frac{3}{4}$ resistente al antibiótico y $\frac{1}{4}$ sensible mientras que las plantas *wild type* producirán una descendencia 100% sensible al antibiótico.

El estudio de la segregación del carácter de resistencia al antibiótico permitió, además de la selección de líneas homocigotas, tener una idea del número de integraciones del T-DNA en la planta, ya que las proporciones anteriores sólo son válidas en el caso de una única integración en el genoma. En el caso de haber más de

una integración en la generación T_1 , el número de plantas sensibles al antibiótico en la generación T_2 disminuye enormemente (en el caso de haber dos integraciones, esta proporción bajaría de 1/4 a 1/16).

3.1.7. Expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*.

La expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* de las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP, GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1, FaNES1-3HA-GFP y las enzimas bifuncionales FPS1S-FaNES1 y FaNES1-FPS1S se realizó a través de la cepa *A. tumefaciens* EHA105, utilizada como vehículo para transferir a la planta las construcciones quiméricas de interés. El procedimiento consistió en obtener las construcciones correspondientes que expresen los transgénos de interés, introducirlos en la cepa de *Agrobacterium* utilizando una variante del método de transformación de células de *E. coli* por choque térmico descrito por An (1987) y finalmente, agroinfiltrar las hojas de *N. benthamiana* con la suspensión de las bacterias transformadas. Esta técnica permitió verificar la correcta localización subcelular de las construcciones quiméricas dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP, GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA-GFP y la posterior la expresión sesquiterpenos, y captación nerolidol, desde estas mismas construcciones y de las enzimas bifuncionales mencionadas anteriormente.

En primer lugar fue necesario obtener DNA plasmídico correspondiente a cada uno de los plásmidos de interés, el cual fue transformado en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Una vez transformado y verificado el cultivo bacteriano de *Agrobacterium* se prepararon los cultivos para la infiltración. Los cultivos bacterianos fueron crecidos según las condiciones descritas anteriormente y resuspendidos a una DO de 1, para localización subcelular y de DO 1,2 para la cuantificación de nerolidol. Después de una incubación de 3-4 horas a temperatura ambiente, cada uno de los cultivos bacterianos de las diferentes versiones de FaNES1, se mezclaron con el cultivo del *Agrobacterium* del vector pTRANS5'TEV portador de HCPro en la proporción 1:1.

Para los experimentos de localización subcelular, la expresión de las suspensiones bacterianas de *A. tumefaciens* de dmHMGR1S-FaNES1-3HA-GFP, GFP-3HA-FaNES1-dmSQS1 y FaNES1-3HA-GFP se mezclaron con las suspensiones agrobacterianas de DsRedT3 y de pTRNA55'TEV en una proporción 1:1:1. El DsRed T3

es un marcador de retículo, se trata de la versión mejorada de la proteína fluorescente roja de discosoma DsRed.T3 (Bevis, 2002), con un péptido de tránsito de quitinasa para dirigirla a RE y posee además una señal de retención en RE de tipo KDEL (T3RE, cedido por Dr. Narciso Campos) en el vector binario pMDC83 (Curtis, 2003). La suspensión bacteriana contenía el plásmido pTRANS5'TEV que posee una secuencia génica del *potyvirus Tobacco etch virus* que codifica para una proteína supresora conocida como *helper component proteinase* (HC-Pro), cuyo cometido es evitar el silenciamiento postranscripcional inducido por la introducción de transgénos o genes víricos de forma transitoria en tabaco. La infiltración se realizó en hojas de *N. benthamina* de 4-5 semanas de edad, crecidas en invernadero bajo condiciones descritas en el apartado 1.1.1. El proceso de agroinfiltración consistió en inyectar de forma muy lenta los cultivos bacterianos a través de la superficie abaxial de las hojas mediante una jeringa de 1ml sin aguja. Los sitios agroinfiltrados de cada una de las hojas se marcaron con un rotulador para facilitar su identificación. Posteriormente, las plantas se dejaron crecer en las mismas condiciones de día largo y se recogieron muestras la cabo de 2-3-4 días para la visualización de la localización subceluar y 0, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 días post-infiltración para la cuantificación de nerolidol. Todas las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

3.2. Técnicas aplicadas en bacterias

3.2.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* EHA105

Para la preparación se células competentes de *A. tumefaciens* EHA105, se siguieron las siguientes instrucciones.

1. Inocular una colonia de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* en 3 ml de medio de cultivo YEB que contenga 150 µg/ml de rifampicina (antibiótico que permite la selección específica de esta cepa) e incubar a una temperatura de 28°C en agitación constante, de 160rpm durante 20 h.
2. Inocular 2 ml del precultivo anterior en 200 ml de medio YEB-rifampicina e incubar a 28°C en agitación constante hasta llegar a una $DO_{595}=0,6$ (aprox. 12-18 h).

3. Centrifugar a 3000 g durante 10 min a 4°C. A partir de aquí es importante mantener las células siempre en frío.
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 4ml de una solución de CaCl₂ 20 mM fría.
5. Distribuir las células en alícuotas de 200 µl y conservar al menos 24 h a -80°C antes de usarlas.

3.2.2. Transformación de *A. tumefaciens* GV3101

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

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

3.2.3. Transformación de *A. tumefaciens* EHA105

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

1. Descongelar una alícuota de 200 μ l células competentes obtenidas anteriormente y añadir 1-2 μ l de DNA del plásmido en 50 μ l de células competentes, mezclar e incubar en hielo durante 20 min.
2. Incubar las muestras durante 5 min en nitrógeno líquido y posteriormente atemperarlas en un baño a 37°C durante 5 min.
3. Añadir 800 μ l de medio de cultivo YEB, e incubar las células a 28°C durante 2-4 h en agitación (120 rpm).
4. Centrifugar el cultivo a 2600 rpm durante 3 min y resuspender las células en 200 μ l de medio YEB.
5. Sembrar repartiendo el total del volumen en dos placas de Petri que contengan medio YEB con rifampicina (150 μ g/ml) y el antibiótico de selección que posea el plásmido transformado.

3.2.4. Genotipado de la cepa de *A. tumefaciens* transformada

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

Para ello, se prepara el subcultivo de una colonia crecida de cada construcción en 3 ml de YEB en presencia de los antibióticos correspondientes, y se incuba durante 12-16 h. Posteriormente, para preparar el molde para la PCR, se añade 1-2 μ l del subcultivo en la PCR (Tabla 9)

Reacción PCR		
<i>primer Forward</i>	10 μ M	0,5 μ l
<i>primer Reverse</i>	10 μ M	0,5 μ l
GoTaq® Green(Promega®)		5,0 μ l
Agua miliQ	c.s.p	10 μ l

Tabla 9. Reacción PCR para genotipado de *A. tumefaciens*.

Se añaden los reactivos al tubo con la muestra y se mezcla suavemente. Por último se lleva a cabo una amplificación de 30 ciclos en condiciones estándar y se analizan los productos mediante un gel de agarosa. Una vez comprobada la presencia del plásmido de interés, puede almacenarse la cepa transformada de forma

permanente a -80°C , para ello, se realiza un nuevo subcultivo proveniente del cultivo analizado de *Agrobacterium* transformado en 3 ml de medio YEB en presencia de los antibióticos y se incuba durante 12-16 h. Transcurrido este tiempo, se prepara un resguardo de la misma, añadiendo 600 μl del cultivo a un tubo que contiene 50% (v/v) de glicerol.

3.2.5. Preparación de *A. tumefaciens* transformado para agroinfiltrar *A. thaliana*

1. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* GV3101 transformado en un tubo con 3ml de LB, suplementado con rifampicina (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (estos dos antibióticos sirven de selección para esta cepa) y el antibiótico correspondiente a la resistencia de cada plásmido. Incubar en agitación constante (180rpm) a 28°C durante 16-18h.
2. Inocular 200 μl del cultivo anterior en 250ml de LB (preparado en un erlenmeyer de 1 L) con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de resistencia del plásmido. Incubar a 28°C en agitación constante hasta obtener una $\text{DO}_{595} = 0,5-1$ (aproximadamente 16-18 h).
3. Pasar el volumen total a un tubo de centrifuga de 250ml y centrifugar a 5000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
4. Durante la centrifugación, preparar 150ml de una solución de sacarosa (7,5 g de sacarosa en 150 mL de agua estéril).
5. Una vez centrifugadas las bacterias de *A. tumefaciens*, eliminar la mayor cantidad de sobrenadante posible y resuspenderlas con 2,5ml de la solución de sacarosa.
6. Agregar 45 μl de Silwet-77 al volumen restante de solución de sacarosa y dejar en agitación suave. El Silwet-77 es un tensioactivo que facilita el proceso de infección.
7. Añadir el volumen restante de la solución de sacarosa con Silwet-77 a las células resuspendidas. Agitar suavemente para homogeneizar las células de *Agrobacterium*.
6. Incubar a 28°C durante 2 días.

3.2.6. Preparación de *A. tumefaciens* para la infiltración en *N. benthamiana*

1. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* EH105 transformado en un tubo con 3ml de YEB, suplementado con rifampicina (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), éste último

antibiótico correspondiente a la resistencia de los plásmidos. Incubar en agitación constante (180rpm) a 28°C durante 16-18h.

2. Inocular 30µl del cultivo anterior en 30ml de YEB rifampicina-kanamicina. Incubar a 28°C en agitación hasta obtener una $DO_{595} = 0,5-1$.
3. Pasar el volumen total a un falcon 50 y centrifugar a 3500rpm durante 10min a temperatura ambiente.
4. Una vez centrifugadas las bacterias de *A. tumefaciens*, eliminar la mayor cantidad de sobrenadante posible y resuspender el pellet con el volumen adecuado hasta conseguir una DO de 1 (localización subcelular) y 1,2 (cuantificación nerolidol). El volumen de resuspensión se calculó en base a la siguiente formula:

$$\text{Volumen de resuspensión: } \frac{\text{Volumen inicial} \times \text{OD inicial}}{\text{OD Final}}$$

5. Resuspender el pellet en 2 ml de la solución. Posteriormente añadir el volumen restante de la solución de resuspensión y agitar suavemente para homogeneizar las células de *A.tumefaciens*. Incubar a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. Resuspender el pellet en 2 ml de solución de homogenización 10 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, pH 5,6, y 200 mM de acetosiringona para localización subcelular o 10mM MES pH5.5, 10 mM MgCl₂ y 100µM de acetosiringona.en el caso de la determinación de nerolidol

3.3. Técnicas con RNA

3.3.1. Extracción de RNA de *A.thaliana* y *N.benthamiana*

En el transcurso de este trabajo se ha utilizado del kit comercial *PureLink® Mini Kit* (Ambion, Life Technologies) para los experimentos rutinarios con plantas de *A.thaliana* y *N. benthamiana* y el kit *NucleoSpin® RNA Plant* (Macherey-Nagel) exclusivamente para la obtención de las muestras de RNA para el RNAseq.

Los tejidos fueron recogidos y triturados individualmente en mortero y nitrógeno líquido. Una vez procesados, pueden guardarse a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA. El máximo de muestra a procesar no debe ser superior a 100

mg. Este método de obtención de RNA permite la extracción rápida, en aproximadamente 1 h y relativamente sencilla de pequeñas cantidades de RNA de elevada pureza, y por ello, está indicado para la manipulación de un número elevado de muestras. El método se basa en la adherencia del RNA a columnas de silica gel. El procedimiento se encuentra detallado en el protocolo del kit. Durante el proceso de obtención y/o manipulación de RNA se exige tomar las medidas necesarias para evitar cualquier contaminación posible con RNAsas, enzimas particularmente abundantes, estables y activas que podrían degradar el RNA. Para evitarlo, todo el material utilizado se esterilizó por autoclave dos veces. Asimismo, es esencial el uso de guantes en todas las manipulaciones que se realicen.

3.3.2. Cuantificación de las muestras de RNA

Una vez obtenido el RNA, se procede a la comprobación de la calidad y cuantificación mediante análisis espectrofotométrico en un NanoDrop 2000™. Existe una variación en el nivel de rendimiento en función del tejido de origen y del sistema de extracción utilizado. Los valores de rendimiento obtenido oscilan entre los 500 y 1500 ng/μl. La integridad del RNA debe comprobarse además por electroforesis de 0,5-1 μg de RNA en un gel de agarosa al 1% en presencia de BrEt.

3.3.3. Tratamiento para eliminar la posible presencia de DNA genómico

Finalizada la extracción de RNA con el kit comercial *PureLink® Mini Kit* (Ambion, Life Technologies), se alícuota una cantidad del RNA obtenido (aproximadamente 5-10 μg) y se procede al tratamiento con DNAsa. En este procedimiento se elimina la posible contaminación presente de DNA genómico. Para este procedimiento se utilizó el kit *DNA-free®*, *DNase Treatment and Removal* (Ambion). Se incubó el RNA durante 30 min a 37°C, con 5 μl de buffer de la DNAsa, 1 μl de enzima *DNase free* y se completa el volumen a 50 μl con agua *Nuclease free*. Luego se añade 5 μl de la resina de inactivación, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifuga a máxima velocidad durante 5 min y se traspasa el sobrenadante a un nuevo tubo. En el caso de las muestras de RNA extraídas con el kit *NucleoSpin® RNA Plant*

(*Macherey-Nagel*) para el análisis de RNA-seq, el tratamiento con DNAsa está incluido en el kit comercial y es parte del protocolo de extracción.

3.3.4. Síntesis de cDNA a partir de RNA total mediante reacción de retrotranscripción

Una vez obtenido el RNA, se procedió a realizar la síntesis de cDNA. Para ello se utilizó la enzima *Superscript[®] III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y oligo dT. Las instrucciones del proceso se detallan a continuación:

1. Preparar las Mezclas 1 y 2 (Tabla 10). Tener en cuenta que estos volúmenes son para una muestra y también que el volumen final de la Mezcla 1 no debe superar los 13 μ l.
2. Colocar el volumen de la mezcla 1 en el tubo de reacción y añadir el RNA.
3. Incubar 5 min a 65°C (desnaturaliza estructuras secundarias del RNA).
4. Colocar 1 min en hielo.
5. Añadir la Mezcla 2 al tubo de reacción que contiene la Mezcla 1 y el RNA.
6. Incubar 60 min a 50°C (síntesis de la cadena de cDNA a partir de los RNAm).
7. Inactivar 15 min a 70°C).
8. Una vez terminado el proceso de síntesis de cDNA, las muestras pueden almacenarse a -20°C.

Mezcla 1		Mezcla 2	
Oligo dT 50 μ M 5'(T) ₃₁ 3'	1,0 μ l	Buffer 5	4 μ l
dNTPs 10 mM	1,0 μ l	DTT 0,1 M	1 μ l
RNA	11 μ l	*RiboLock 40U/ μ l	1 μ l
		Superscript III	1 μ l

Tabla 10. Mezclas para síntesis de cDNA. *RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)

3.3.5. Amplificación de cDNA mediante RT-PCR

Una de las aplicaciones del cDNA obtenido en el paso anterior es determinar la cantidad de mRNA que se está expresando en una muestra determinada, en este caso a través de una amplificación mediante PCR con primers específicos del cDNA, aunque sólo proporciona una medida semicuantitativa. El programa de PCR ha sido estándar

(Tabla 11) y sólo se ha variado la Temperatura de hibridación, dependiendo de la pareja de *primers* utilizada y la cantidad de ciclos.

Reacción RT- PCR		
CDNA (dilución 1:10)		7,0 µl
dNTPs	10 mM	1,0µl
Buffer 10x		5,0 µl
<i>primer Forward</i>	10 µM	1 µl
<i>primer Reverse</i>	10 µM	1 µl
Taq pol.	5 U/µl	0,25 µl
Agua miliQ c.s.p		50 µl

Tabla 11. Reacción RT-PCR

Condiciones estándar del programa de amplificación:

1. 95°C - 2min
2. 95°C - 45seg
3. 45-65°C- 45seg, dependiendo de la pareja de *primers* usados
4. 72°C – 45seg
5. Repetición de los pasos 2 a 4 – X ciclos
6. 72°C – 10min
7. 8°C

A continuación se detallan los *primers* utilizados y las condiciones específicas de temperatura de *annealing* o hibridación (*Th*), ciclos y tamaño de los productos amplificados en cada caso:

- **PP2A** (307pb)

PP2A For: 5´-TAACGTGGCCAAAATGATGC -3´(Sense)

PP2A Rev: 5´-GAAGCCAACATTAACATTAGTAGC -3´ (AntiSense)

Th: 52°C - 27ciclos

- **dmHMGR1S-FaNES1-3HA** (690pb)

HMGR1S For *KpnI*: 5´-GGTACCATGGATCTCCGTCGGAGGCCTC-3´(Sense)

FaNES REV dm sqs: 5´-GTTGTAATCGATGCCTAGCC -3´(AntiSense)

Th: 50°C - 30ciclos

- **3HA-FaNES1-dmSQS1** (508pb)

FaNES REV dm sqs: 5´-GTTGTAATCGATGCCTAGCC -3´(Sense)

SQS1 dm Rev *NotI-SpeI*: 5´-GCGGCCGCACTAGTTCAGTTTGCTCTGAGATATGC-3´(AntiSense)

Th: 50°C - 30ciclos

- **FaNES1-3HA** (1188pb)

FaNES FOR 2: 5'-GCT TCG CAG CTA GGT ACA -3' (Sense)

FaNES1 Rev *Sall*: 5'-GTCGAC CATTGATACAGTCTCATACAAC -3' (AntiSense)

Th: 50°C – Extensión 1,20 min -30ciclos

- **ABCG40** (104pb)

ABCG40fw: 5'-GCTGTAGCTATGACGCCTAAC-3' (Sense)

ABCG40rv: 5'-ATACTGGGACGAGGGATGAG-3' (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **VSP1**(123pb)

VSP1fw: 5'-CTCGGGATTGAACCCATCATAA-3' (Sense)

VSP1rv: 5'-CGATCCGTTTGGCTTGAGTA-3' (AntiSense)

Th: 60°C – 30 ciclos

- **JAZ5** (92pb)

JAZ5fw: 5'-ACGCAGGTCATCATCGTTATC-3' (Sense)

JAZ5rv: 5'-GTTATCCGGCGGTCTTTGT-3' (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **AOC1 (140pb)**

AOC1fw: 5'-GTGCCTACGGACAGGTTAAG-3' (Sense)

AOC1rv: 5'-TGGCTCCACGTCTTAGA-3' (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **CLH** (138pb)

CLH1fw: CTGAGATGAGGAGCTTTGTAGG (Sense)

CLH1rv: CCAACTCAGGTGAAGGATCAA (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **BHLH100** (135pb)

BHLH100-fw: 5'-GCTATGCGTCGACAGTTTCT-3' (Sense)

BHLH100-rv: 5'-CCACAAGAACCAACCCATCT-3' (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **AtNEET** (117pb)

NEETfw: 5'-CACCGAGCTTTCCAAGAACATA-3' (Sense)

NEETrv: 5'-GGGCCAACGTTATCTCCATTAG-3' (AntiSense)

Th: 60°C - 30ciclos

- **AtFPS1**(1100pb)

FPS1 Fwd: 5'-GGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCGATCCAA -3' (Sense)

FPS1 Rev: 5'-GGAAATTTTTGAGGGCTGAGACTTATGTTTGTC -3'(Antisense)

Th: 60°C - 35ciclos

- **AtFPS2**(1100pb)

FPS2Fwd: 5'-GGCTTGCACACCTTCCTTG -3'(Sense)

FPS2 Rev: 5'-CGGAGAGAGGCCCGAGTATG -3'(AntiSense)

Th: 60°C - 29ciclos

3.3.6. PCR en tiempo real (qPCR)

La técnica de la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es el método más utilizado actualmente para evaluar la expresión génica. A diferencia con la PCR convencional, esta técnica permite la cuantificación del producto acumulado en cada ciclo de amplificación mediante la generación de una señal fluorescente, directamente relacionada con la síntesis de nuevas moléculas de ácidos nucleicos. Para ello, el agente reportero utilizado fue SYBR Green I, Master Mix (Roche Diagnostic, BS, SE). Este reactivo, posee un fluoróforo capaz de unirse al surco menor del ADN de doble cadena de tal manera que el aumento en la señal fluorescente es proporcional al aumento de productos de la reacción de PCR. Esta característica, permite detectar cualquier tipo de DNA de doble cadena y no se necesita ningún tipo de sonda específica marcada, hecho que lo convierte en un sistema más económico que otros.

Respecto al diseño de los *primers*, se deben tener en cuenta una serie de requisitos: T_m comprendida entre 58-60°C, máximo de 2 G+C en las últimas 5 posiciones del extremo 3' y que la longitud del fragmento a amplificar este comprendido entre 80-120pb, y a ser posible, separado por un intrón. Para cuantificar la abundancia de los mensajeros en las diferentes construcciones analizadas se utilizaron parejas de *primers* específicas que amplificaron diferentes fragmentos de la secuencia de la región codificante del transgén:

Construcciones amiRFPS (*A.thaliana*)

- **AtHMG1** (104 pb)
 - HMG1F(H1-F100): 5'- GGAGATTGTGAAATCGGTTATCG-3'
 - HMG1R (H1-3R): 5'- GCAACGCCTCACGACGAATCG-3'
- **AtHMG2** (104 pb)
 - HMG2F: 5'-CTAATCGGTTTCGTTGCTTCG -3'

- HMG2R: 5'-ACCCAAACATCATCATCGGAA- 3'

Construcciones FaNES1 (*N. benthamiana*)

- **FaNES1** (101 pb)
 - FaNES qPCR For: 5'- CTTCGACTCTGGGACGATTTAG -3'
 - FaNES qPCR Rev: 5'- GAACAGCCTTCATGTTCTCTA -3'

La abundancia de los transcritos fue normalizada en relación a los niveles de expresión de la proteína fosfatasa 2A (*PP2A*, *At1g13320/TC21939*).

Construcciones amiRFPS (*A.thaliana*)

- **AtPP2A** (*At1g13320*) (Hong et al., 2010)
 - PP2AA3 for GCG/GTTGTGGAGAACATGATACG
 - PP2AA3 rev GAACCAAACACAATTCGTTGCTG

Construcciones FaNES1 (*N. benthamiana*)

- **PP2A** (TC21939) (Liu et al., 2012)
 - PP2A Nb qPCR For: 5'- GACCCTGATGTTGATGTTTCGCT -3'
 - PP2A Nb qPCR Rev: 5'- GAGGGATTTGAAGAGAGATTTTC-3'

El molde utilizado para la reacción fue cDNA diluido 1:20 para las cconstrucciones amiRFPS y 1:40 para las construcciones FaNES1. En la tabla 12 se muestra el contenido de la reacción de Real-time.

Reacción q-PCR		
CDNA dilución 1:20/1:40		2,0 µl
<i>primer Forward</i>	10 µM	0,6 µl
<i>primer Reverse</i>	10 µM	0,6 µl
SYBR Green		10 µl
Agua miliQ		6,8 µl

Tabla 12. Reacción q-PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, BS, SE) empleando un programa que consta de una desnaturalización inicial de 3' a 94°C y 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30'' e hibridación y extensión a 60°C durante 30''. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La cuantificación de los niveles de mensajero puede realizarse de forma relativa, usando el método del $\Delta\Delta C_t$ o la ecuación de Pfaffl. El primero, utiliza la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$

para determinar la cantidad de mensajero de un gen determinado, normalizado por la expresión de un control interno referido a una muestra control (o no tratada) (Livak and Schmittgen, 2001). El Ct, se define como el ciclo en el cual la fluorescencia generada supera un valor umbral. En esta fórmula, se asume que la eficiencia de los *primers* utilizados es del 100%.

En el segundo método, es necesario calcular la eficiencia de los *primers* utilizados, valor que se incluye posteriormente en la ecuación final. Para ello, es necesario realizar una prueba con diferentes diluciones de la muestra de cDNA. Se comprobó la eficiencia de los *primers* con las siguientes diluciones: 1:5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 del cDNA:

Eficiencia *primers*

<i>AtHMG1</i>	1,95
<i>AtHMG2</i>	1,94
<i>AtPP2A (At1g13320)</i>	1,98
FaNES1	1,91
<i>PP2A (TC21939)</i>	1,93

Una vez calculada la eficiencia de los *primers*, se procede al cálculo del incremento relativo de la expresión del gen de interés, respecto al gen control. Por último, se normaliza los datos obtenidos mediante el incremento relativo obtenido del gen de interés respecto al del gen normalizador control.

La cuantificación relativa se calculó a partir de las siguientes fórmulas;

- **ΔCt** : $Ct_{\text{Gen problema}} - Ct_{\text{Control interno}}$
- **$\Delta\Delta Ct$** : $\Delta Ct_{\text{Muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{Muestra control}}$
- **Cuantificación relativa** : $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- **Eficiencia** : $[10^{(1/\text{pendiente})} - 1] * 100$.
- **Incremento** : $(\text{Valor de eficiencia})^{Ct_{\text{gen de intere1}} - Ct_{\text{gen control}}}$
- **Incremento relativo** : $\text{Incremento gen de interés} / \text{Incremento gen control}$

Por otro lado, en el caso de las construcciones de FaNES1 se cuantificaron además los niveles de mRNA del transgén de forma absoluta. Este cálculo permitió determinar el número de copias exactas que se están expresando en una determinada concentración de RNA. Para ello, fue necesario en primer lugar realizar una recta de

calibrado de 14 puntos que corresponden a diferentes diluciones de un DNA plasmídico (desde 1:5 hasta 1:335.544.320), con una concentración conocida y determinar el Ct de cada una de ellas.

Los valores medios de Ct en función de la cantidad de DNA de cada una de las diluciones se pueden representar en un gráfico semilogarítmico. De este modo, la recta de calibrado permite, mediante una regresión lineal con un determinado coeficiente de correlación (r^2), calcular el número de copias exacto para cada Ct. El número de copias se calcula en función del peso molecular del plásmido utilizado en la recta de calibrado, la concentración inicial de DNA de la recta de calibrado y el número de avogadro.

- **Peso molecular** (g/mol) : pb plásmido * 660 (peso medio de un par de bases)
- **nmol plásmido** : ng/ μ l RNA reacción/ peso molecular plásmido (g/mol)
- **Número de copias** : nmol plásmido * 6.022×10^{23} (número de avogadro)

Finalmente el cálculo absoluto de la expresión del gen de interés, respecto al gen control se obtiene a partir la eficiencia de los *primers*, los valores medios de Ct y el número de copias, este último valor es obtenido mediante la ecuación de la recta de calibrado. El número de copias para cada construcción fue expresado en función de los ng iniciales de RNA utilizados para la síntesis de cDNA.

3.4. Técnicas con proteínas

3.4.1. Obtención de extractos proteicos de *A. thaliana*

Los extractos proteicos se pueden obtener a partir de tejidos frescos o congelados con nitrógeno líquido. El tejido que se ha utilizado para la obtención de extracto crudo de proteínas de *A. thaliana*, en el caso de los experimentos de FPS se usaron plántulas de 8 días y para los experimentos de FaNES1 plántulas de 10-12 días. El procedimiento se detalla a continuación:

1. Se pesa entre 100 – 200 mg de tejido fresco y se tritura en N_2 líquido. El tejido triturado se alícuota en tubos de 1,5 ml y se almacenan a $-80^\circ C$ hasta el momento de la obtención del extracto proteico.

2. Para la obtención del extracto proteico se añade el tampón de homogenización frío en la proporción: 1:4 (p:v) para FPS y 1:2 (p:v) para HMGR y FaNES1 sobre el tejido triturado (Tabla 13) y se mezcla vigorosamente hasta homogenizar la mezcla. Se homogeniza el tejido en el tampón a 4°C durante: 90 min FPS y 30 min HMGR y FaNES1.
 3. Centrifugar a 200 x g los extractos de HMGR y FaNES1 durante 10 minutos a 4°C.
 4. Se vuelve a centrifugar a 200 x g durante 10 min a 4°C y finalmente se recupera el sobrenadante que constituye el extracto crudo proteico o sobrenadante de 200 x g.
- En el caso de los extractos de FPS para realizar ensayos enzimáticos es necesario obtener la fracción 16.000 x g. Para ello el extracto de 200 x g se centrifuga dos veces a 200 g, durante 10 min a 4°C y sin separar el sobrenadante, se procedió a centrifugar de nuevo a 16.000 x g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se denominara fracción 16.000 x g.

Tampon FPS		Tampon HMGR		Tampon FaNES1	
Pipes pH 7,0	50mM	KCl	50mM	Tris-HCl pH 7,8	50mM
Cl ₂ Mg	5mM	H ₂ KPO ₄ ·3H ₂ O pH7,2	40mM	EDTA	1mM
NaCl	10mM	EDTA pH8	30mM	NaCl	150mM
Sacarosa	250mM	Sacarosa	100mM	Triton X	0,002
		Tritón X-100	0,2%		
<i>Inhibidores de proteasas*</i>		<i>Inhibidores de proteasas*</i>		<i>Inhibidores de proteasas*</i>	
PMSF	100mM	PMSF	0,5mM	PMSF	0,5mM
Aprotinina	10 µg/ml	Aprotinina	15 µg/ml	Aprotinina	15 µg/ml
E64	1 µg/ml	E64	1,5 µg/ml	E64	1,5 µg/ml
Pesptatina A	1,46mM	Pesptatina A	1,5 µg/ml	Pesptatina A	1,5 µg/ml
Leupeptina	21mM	DTT	10mM	DTT	1mM
DTT	1M				

Tabla 13. Tampones de homogenización para la extracción de proteína desde plántulas de *A. thaliana*. Tampones utilizados para la obtención de extractos proteicos para ensayos de actividad y Western blot de HMGR, FPS y FaNES1. Los inhibidores de proteasas* indicados se añaden de forma extemporánea al tampón de homogenización correspondiente a partir de las soluciones stock.

3.4.2. Obtención de extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana*

Los extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* se obtuvieron a partir de hojas agro-infiltradas. El tejido infectado se trituró en presencia de nitrógeno líquido y se transfirió a tubos de 50 ml y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción.

El procedimiento que se utilizó para la extracción fue el siguiente:

1. Pesar 40 mg de tejido fresco y se tritura en N_2 líquido. El tejido triturado se alícuota en tubos de 1,5 ml.
2. Añadir 200 μl de Tampón DB FaNES1 (Tabla 14) caliente (100°C) y mezclar vigorosamente hasta homogenizar la muestra.
3. Incubar a 100°C durante 10 minutos
4. Centrifugar a 16000 x g durante 15 minutos. Recuperar el sobrenadante y eliminar los restos celulares.
5. Finalmente se recupera el sobrenadante que constituye el extracto crudo proteico o sobrenadante de 16000 x g.

Tampón DB FaNES1	
Tris-HCl pH 8,6	120mM
β -Mercaptoetanol*	0,04
SDS	0,06
<i>Inhibidores de proteasas*</i>	
PMSF	1mM
Aprotinina	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
E64	1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Pesptatina A	1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tabla 14. Tampón de homogenización desnaturizante (DB) para la extracción de proteína desde hojas de *N. benthamiana*. El β -Mercaptoetanol* se y los inhibidores de proteasas* se añaden de forma extemporánea al tampón de homogenización a partir de las soluciones stock.

3.4.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en los extractos proteicos fue determinado mediante el método espectrofotométrico de Bradford (1976). Se utilizó el reactivo comercial BioRad Protein Assay (BioRad) y como proteína patrón la albúmina sérica bovina (BSA). Los valores de concentración de proteína se obtuvieron por

extrapolación de aquellos procedentes de la recta patrón de albúmina sérica bovina, elaborada dentro de un rango de concentraciones de 0 a 0,8 µg/ml. Cada muestra fue analizada por duplicado y se realizó previamente una dilución 1/10 de los extractos proteicos con el fin de incluir los valores de absorbancia de las muestras dentro del rango de la recta patrón de BSA.

3.4.4. Western blot

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

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

Posteriormente, se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF y sobre ella se lleva a cabo la hibridación con el anticuerpo primario. Una vez que el anticuerpo ha reconocido la proteína de interés, la membrana se incuba con el anticuerpo secundario, que reconoce las regiones constantes del anticuerpo primario y está conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (RHP). La unión del anticuerpo a la proteína de interés es finalmente detectada mediante el uso del reactivo *ECL Advanced*[®] Western Blotting Detection Kit (*Amersham*). Este reactivo es transformado por la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano, emitiendo luz suficiente para la captación digitalmente mediante el equipo LAS400, y su software, utilizando la opción *Chemiluminescent*. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido y por tanto, a la cantidad de proteína de interés presente en la membrana.

3.4.4.1. Electroforesis de poliacrilamida-SDS (PAGE)

Para los *Western blot* realizados durante este trabajo se han utilizado geles de poliacrilamida-SDS a la concentración del 9%. Tanto la preparación de los geles, como la electroforesis se han llevado a cabo mediante el equipo de electroforesis *Mini-Protean 3 (BioRad)*. A los extractos proteicos de *A. thaliana* se les añadió un volumen de *tampón* (2X) de muestra (Tabla 15) y se incubaron a 100°C durante 5 min. Las muestras se sembraron en el gel al 9%, en el cual se sembró en un carril adicional 8 µl del marcador de proteínas *Prestained Protein* de *Fermentas* (rango de 20 a 120 kDa).

Para cargar los extractos proteicos de *N. benthamiana* en el gel, se añadió solamente una solución de azulbromofenol en glicerol (Glicerol 50%, azulbromofenol 1%) al extracto proteico a la proporción 1:10. Las muestras al ser hervidas durante el proceso de extracción de proteína, ya se encuentran desnaturalizadas y se pueden sembrar directamente en el gel al 9%, en el que se sembró en un carril adicional 8 µl del marcador de proteínas *Prestained Protein* de *Fermentas* (rango de 20 a 120 kDa).

Una vez colocado el gel en la cubeta de electroforesis se añadió Tampon de electroforesis a la cubeta. Se sembraron las muestras y se aplicó un amperaje constante de 20 o 40 mA, según se trabaje con uno o dos geles, respectivamente, hasta que el azul de bromofenol del frente de migración llegue al final del gel.

3.4.4.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF

Una vez separadas las proteínas en función de su masa molecular en la electroforesis, se procede a transferirlas a una membrana de PVDF (*Hybond-P Amersham Biosciences*), la cual será el soporte sobre la que se harán las distintas hibridaciones con los anticuerpos (primario y secundario) y la posterior detección quimioluminiscente. El montaje de la transferencia se realizó directamente sobre la parte gris del cassette de transferencia en el siguiente orden; esponja, papel Whatman 3MM, gel de poliacrilamida, membrana PVDF (activada previamente con metanol al 100% mediante inmersión) y papel Whatman 3MM, todos ellos humedecidos con tampón de transferencia.

El casete se insertó en la cubeta de transferencia y se añadió el tampón de transferencia (Tabla 16). Se conectaron los electrodos y se fijó una intensidad de

corriente eléctrica constante de 200 mA durante 2 horas a 4°C, con hielo en la cubeta accesoria, para evitar el incremento de la temperatura durante el proceso. Una vez realizada la transferencia se desmonta el *cassette* y se recupera la membrana PVDF, la cual se puede guardar seca a temperatura ambiente hasta el momento de su uso o bien continuar inmediatamente con el *Western blot*.

3.4.4.3. Hibridación con el anticuerpo

La detección de la proteína de interés se llevó a cabo sobre la membrana de PVDF mediante la incubación con un anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés. Este anticuerpo primario, es reconocido posteriormente mediante un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a la peroxidasa de rábano (RHP). La adición del substrato *Lumigen PS-3* del kit comercial *ECL Advanced® Western Blotting Detection (Amersham)* es procesado por la peroxidasa provocando emisión de luz que permite la detección quimioluminiscente de la proteína marcada.

Para el procedimiento se debe seguir con las siguientes instrucciones:

1. Lavar la membrana con PBS 1X a temperatura ambiente durante 3 min.
2. Incubar la membrana en solución PBS-T-Leche durante 16 h a 4°C. Este proceso de bloqueo de la membrana tiene como objetivo evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario.
3. Realizar dos lavados de PBS-T durante 2 min y dos de 10 min, a temperatura ambiente.
4. Incubar con el anticuerpo primario; Anti-FPS 1:8.000 (Masferrer et al., 2002); Anti-HMGR 1:20.000 (Manzano et al., 2004); Anti-HA (Y-11) sc-805 (Santa Cruz), 1:500, diluidos en solución PBS-T-Leche con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente en solución PBS-T-Leche con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación repetir el paso 3.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario diluido, anti-IgG de conejo, durante 1h a temperatura ambiente. Se utilizó anti-suero de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano de *Amersham* a la dilución de 1/50.000 en solución PBS-T-Leche (para todos los casos). Transcurrido el tiempo de incubación repetir el paso 3.
6. Lavar dos veces la membrana con PBS durante 4 min a temperatura ambiente.

3.4.4.4. Inmunodetección quimioluminiscente

A continuación se lleva a cabo el proceso de detección. Para el cual se ha usado el sistema *ECL Advanced*[®] Western Blotting Detection Kit de *Amersham*. Preparar 800 μ l (400 μ l de cada uno de los reactivos A y B) y añadirlo a la superficie de la membrana que se encuentra sobre una funda de plástico transparente, cubrirla con otro plástico flexible transparente para esparcir uniformemente el reactivo. Eliminar el exceso de reactivo con la ayuda de un papel secante, eliminar las burbujas y colocar el plástico en la bandeja del equipo LAS 4000, donde se seleccionó la opción *Chemiluminescent, Precision* y se capturó imágenes cada 15 segundos hasta completar de 2 a 5 minutos, dependiendo de la intensidad de las bandas.

3.4.4.5. Tinción de las proteínas de la membrana de PVDF

La tinción de la membrana de PVDF después de realizar el *Western blot*, resulta de gran ayuda para confirmar la integridad de las proteínas presentes en la misma, así como para evaluar la normalización de la cantidad de proteína presente en los diferentes carriles. El procedimiento de tinción se realiza mediante azul de Coomassie de manera irreversible. Para ello, sólo basta colocar la membrana en la Solución de tinción con agitación suave durante 5-10 min a temperatura ambiente. A continuación se destiñe la membrana con la Solución de destinción (es necesario reemplazar la solución varias veces hasta que la relación entre la intensidad de las proteínas marcadas y el de fondo resulte óptima).

Tampón de muestra 2x	
Tris-HCl pH 6,8 0,5M	2,5ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
B-Mercaptoetanol	1 ml
Azul bromofenol	4 mg
Agua miliQ c.s.p	10 ml

Tabla 15. Tampón desnaturizante de proteínas 2x

Gel Apilador		Gel Separador	
Tampón apilador	1,25 ml	Tampón separador	2,5 ml
Acrid/bisacrilamida 30% (37,5/1) Bio Rad	0,67 ml	Acrid/bisacrilamida 30% (37,5/1) Bio Rad	3,02 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	100 µl
PSA 10%(p/v)	38 µl	PSA 10%(p/v)	75 µl
TEMED	3,8 µl	TEMED	7,5 µl
Agua miliQ c.s.p	5 ml	Agua miliQ c.s.p	10ml

Tampón Apilador		Tampón Separador	
Tris-HCl pH 6,8	0,5 M	TRIS-HCl pH 8,8	1,5 M
Pesar 3,025 g de Tris Base y llevar a 50 ml con agua. Ajustar el pH con HCl		Pesar 9,075 g de Tris Base y llevar a 50 ml con agua. Ajustar el pH con HCl	

Tampón de electroforesis 10x		Tampón de transferencia 10x	
Tris-HCl pH 8,3 0,25 M	30,28 g	Tris-HCl pH 8,3 0,25 M	30,28 g
Glicina 1,92 M	144,13 g	Glicina 1,92 M	144,13 g
SDS	10g	Agua c.s.p	1L
Agua c.s.p	1L		

PBS - 10X		PBS-T 1X	
NaCl	100 g	PBS 10X	100 ml
Na ₂ HPO ₄	18 g	Tween 20	1 ml
NaH ₂ PO ₄	2 g	Agua miliQ c.s.p	1 L
KCl	2,5 g	PBS-T- leche	
Agua miliQ c.s.p	1 L	Blotto	2,5 g
Ajustar pH a 7,5 con NaOH		PBS-T 1X	50 ml

Solución de Coomasie		Solución de destinción	
Azul brillante de Coomasie	0,125 g	Metanol	400 ml
Metanol	200 ml	Ácido acético glacial	70 ml
Ácido acético glacial	35 ml	Agua miliQ c.s.p	500 ml
Agua miliQ c.s.p	500 ml		

Tabla 16. Soluciones Western Blot. Soluciones para los procedimientos de electroforesis, transferencia e inmunodetección.

3.4.4.6. Cuantificación los niveles de proteínas desde el *Western Blot*

Para cuantificar los *Western Blot* anti HA de las versiones químicas de FaNES1 se utilizó la herramienta bioinformática *Quantity One* de Bio-Rad. Ella permite cuantificar el volumen de intensidad de bandas, manchas, matrices y otros. El volumen son los datos de intensidad dentro de un límite definido dibujado en su imagen y que se define como la suma de las intensidades de los píxeles dentro de la zona x pixel volumen límite. Este dato se expresa en Unidades de volumen, las cuales corresponden a unidades de intensidad x mm². Para medir el volumen de un determinado objeto en una imagen, se dibuja un rectángulo o un círculo alrededor del objeto y se compararan los datos de intensidad dentro de la frontera con los datos de un control o background definido. El software analiza los datos y entrega los resultados en un reporte con la correspondiente curva de regresión.

4. Análisis de compuestos de naturaleza isoprenoide.

4.1. Extracción y análisis de esteroides

El proceso de análisis de esteroides en muestras provenientes de plántulas de *A. thaliana* estudiadas en este trabajo, se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Fraser et al. (Fraser et al., 2000) con algunas modificaciones. Para ello fue necesario triturar homogéneamente el material vegetal en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Posteriormente las muestras fueron liofilizadas durante 14-16 h, para extraer el agua contenida en las mismas y se conservaron a temperatura ambiente protegidas de la luz hasta el momento de la extracción. El proceso de extracción se llevo a cabo, siguiendo el siguiente procedimiento.

1. Pesar en tubos de vidrio pyrex (10x15mm) entre 15-30 mg de tejido liofilizado.
2. Agregar 10 µl de 5α-colestano (1,2 mg/ml disuelto en hexano) sobre el tejido liofilizado y pesado, el cual cumple la función de patrón interno.
3. Añadir 3ml de diclorometano: metanol (2:1, v/v grado GC), sonicar en un baño de agua durante 10 min. Centrifugar durante 3 min a 5000 x rpm. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo de vidrio y volver a extraer el pellet dos veces más.

Los extractos reunidos se llevaron a sequedad con la ayuda de un SpeedVac (Savant ISS110 SpeedVac Concentrator).

4. La fracción correspondiente a los ésteres de esteroles del residuo seco fue saponificado añadiendo 1,5 ml de KOH al 7,5% en 95% de metanol durante una noche a temperatura ambiente, o alternativamente incubar 1 h a 80°C.
5. Detener la saponificación, incubando 5 min en hielo. Añadir 1,5 ml de agua destilada para diluir el KOH.
6. Extraer los esteroides libres añadiendo 3 ml de hexano y agitar en vórtex. Centrifugar 3 min a 5000 rpm a temperatura ambiente.
7. Recuperar la fase orgánica.
8. Realizar dos re-extracciones de la fase acuosa con 3 ml de hexano.
9. Juntar las fases hexánicas en un tubo de 10x13mm y evaporar a sequedad en el SpeedVac. En este punto las muestras pueden conservarse a -20°C hasta el siguiente paso.

A continuación, las muestras fueron silenizadas. Este paso consiste en la derivatización de los compuestos extraídos, añadiendo trimetilsilil a todas las moléculas con grupos -OH. Para silenizar, es necesario disolver el residuo seco en 50 µl de Bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (Merck) e incubar durante 60 min a 70°C. A continuación secar las muestras mediante SpeedVac y resuspender en 100 µl de isooctano. Por último, analizar 1 µl del extracto silenizado mediante cromatografía de gases acoplado a masas GC-MS, en un cromatógrafo Perkin Elmer GC Autosystem® acoplado a un espectrómetro de masas ITQ900. El cromatógrafo estaba equipado con una columna capilar DB-5MS (95% metilpolisiloxano y 5% de fenilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 µm de diámetro interno; 0,25 µm de tamaño de partícula (AWScientific), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y que utiliza helio como gas portador a una velocidad de 2 ml/min. El sistema de inyección es manual con *splits* de 12,5:1. Las condiciones de la cromatografía son:

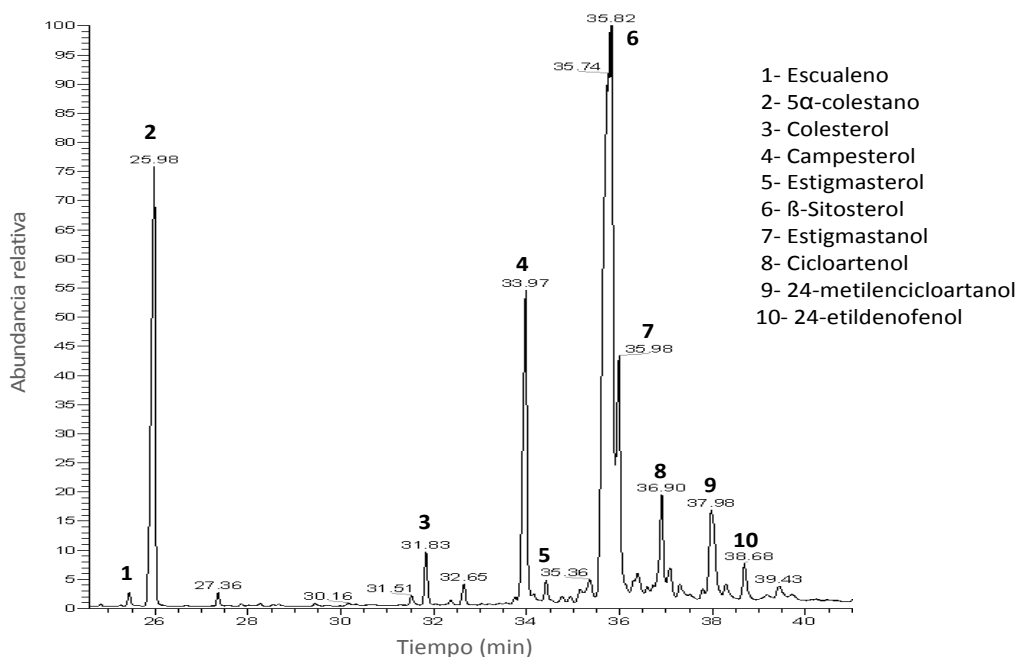
Temperatura del inyector: 280°C

Temperatura del detector: 300°C

Temperatura del horno: 30 seg a 245°C y luego hasta 265°C, a razón de 2°C/min.
Finalmente hasta 290°C, a razón de 3,5°C/min.

La identificación de los perfiles obtenidos en el GC-MS se realizó en base a los tiempos de retención relativos y por cromatogramas de esteroides estándar. La integración de las áreas de los picos se realizó mediante el programa Xcalibur (Thermo Scientific) y la cuantificación se calculó a partir de las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma, por normalización interna, basado en el área relativa del pico del esteroide en cuestión respecto al área del pico del 5 α -colestano:

$$\frac{\text{ÁREA DE ESTEROL}}{\text{ÁREA 5}\alpha\text{-COLESTANO}} = \frac{\text{CONCENTRACIÓN DE ESTEROL}}{\text{CONCENTRACIÓN 5}\alpha\text{-COLESTANO}}$$



4.2. Análisis de carotenoides y clorofilas en plantas de Arabidopsis.

Para la extracción y análisis de clorofilas y carotenoides se llevó a cabo mediante un método de espectroscopía que permitió cuantificar de forma rápida la cantidad de pigmentos presente en las muestras. La extracción se realizó a partir de 50 mg de tejido verde (pesar de forma muy precisa la cantidad de material de partida). El material previamente congelado a -80 °C se introdujo en un tubo *Eppendorf* de 2mL y se trituró con ayuda del *TissueLyser* de *Qiagen*. Los pigmentos fotosintéticos se

extrajeron con 1mL de acetona (80% v/v) en oscuridad durante 1h en agitación a 4°C. A continuación se centrifugó la mezcla a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C y se midió la absorbancia de las muestras bajo las longitudes de onda de 663nm y 647 nm (clorofilas, Cl) y 472 nm (carotenoides, CRTs). El contenido de pigmentos fotosintéticos se calculó a partir de las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler, 1987). Los resultados obtenidos se expresaron en µg de clorofilas o carotenoides por mg de peso fresco.

$$Cl_a = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{647}$$

$$Cl_b = 21,50 A_{647} - 5.10 A_{663}$$

$$Cl_{a+b} = 7.15 A_{663} - 18.71 A_{647}$$

$$CRTs = (1000 A_{470} - 1.82 Cl_a - 85.02 Cl_b) / 198$$

4.3. Captación, análisis y cuantificación de la emisión de nerolidol en hojas de *N. benthamiana*.

La captación de la emisión de nerolidol en hojas de *N. benthamiana* procedentes de la expresión transitoria de las distintas versiones quiméricas de FaNES1, se realizó con la técnica HS-SPME, que acopla el sistema de espacio de cabeza (*headspace*) y la microextracción en fase solida (SPME) (Figura 60). La microextracción en fase sólida (SPME) es una tecnología novedosa que permite la extracción y concentración de moléculas químicas pequeñas, sin el uso de disolventes. Se utiliza para el análisis de trazas de compuestos volátiles y semivolátiles. Es una técnica rápida, económica y versátil, que cuenta con una fibra revestida de una fase estacionaria de un polímero líquido, de una fase sólida, o de una combinación de las dos.

El funcionamiento del sistema consiste en que el revestimiento o fase estacionaria de la fibra recoge los compuestos de la muestra por absorción en el caso de revestimientos líquidos o adsorción en el caso de revestimientos sólidos directamente de la muestra o del espacio cabezal. Los compuestos volátiles de la muestra se adhieren a la fibra hasta que ésta alcanza el equilibrio. Realizada la extracción, la fibra de SPME es introducida directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para la desorción térmica al interior del inyector, en donde los compuestos son liberados desde la fibra y se introducen directamente en el interior de la columna capilar del equipo GC-MS para su separación cromatográfica.

En los últimos años la fibra SPME ha ganado amplia aceptación como técnica de preferencia en muchas aplicaciones, que incluyen análisis de aromas y perfumes, química forense y toxicología, matrices medioambientales y biológicas.

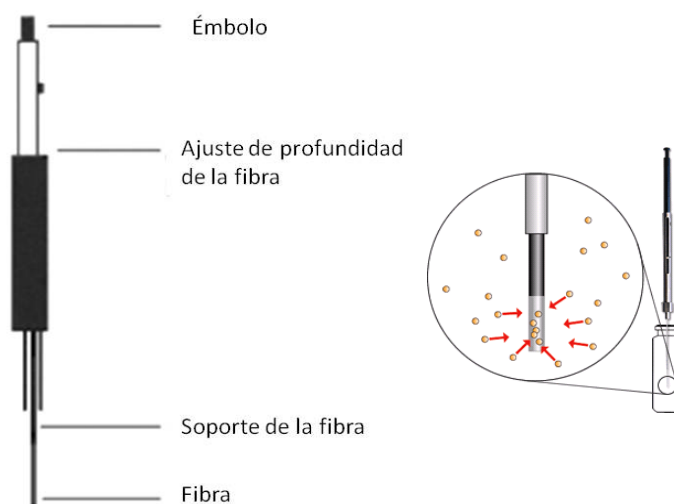


Figura 60. Sistema de micro-extracción en fase sólida (SPME) para la captación de volátiles.

4.3.1. Curvas patrón de nerolidol y geraniol captados mediante HS-SPME

Se realizaron dos curvas de calibración, una para el estándar comercial de nerolidol (*trans*-nerolidol, Ref 18143 de Fluka) y otra para el de geraniol (Geraniol, Ref. 48798 de Fluka), las cuales permitieron cuantificar los niveles de nerolidol captados por el sistema HS-SPME emitidos por las hojas de *N. benthamiana* que expresaban transitoriamente las distintas versiones químicas de FaNES1. La fibra SPME utilizada durante este trabajo fue de Polydimethylsilosane 100 μm PDMS, fused Silica/SS 24Ga (57300-U, Supelco). Para captar el nerolidol y el geraniol para obtener las curvas estándar se siguió el siguiente protocolo:

1. Acondicionado de la fibra SPME según las instrucciones del fabricante. La fibra fue introducida manualmente en el puerto de inyección del GC-MS exponiéndola a un proceso de desorción a 250°C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de desorción y 10 min después como máximo, la fibra fue retirada del equipo quedando en óptimas condiciones para iniciar la captación de nerolidol.
2. Se prepararon dos soluciones de trabajo inicial de 1mg/ml de nerolidol y de geraniol comerciales en acetona de calidad GC-MS. Para ello se peso una pequeña cantidad

del estándar comercial en una balanza de precisión. A partir del peso obtenido, densidad y pureza del producto se calculó la concentración de la solución stock inicial. A partir de esta solución inicial se prepararon diferentes concentraciones entre 0,1 y 100 µg/ml tanto de nerolidol como de geraniol (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml).

3. Se añadieron con la ayuda de una jeringa Hamilton, diferentes cantidades de nerolidol o geraniol entre 0 y 1 µg (85, 10, 50, 100, 500 y 1000 ng) en un vial de 5 ml de espacio de cabeza o headspace con un tapón de aluminio y un septum (18mm silicona/PTFE, Thermo Scientific), y antes de cerrar el vial se dejó evaporar por unos segundos la acetona.
4. Se colocó el vial cerrado en un baño seco a 40°C. Previamente, se añadió agua en el baño seco para cubrir hasta la mitad del vial con el objetivo de mantener una temperatura constante en todo el vial.
5. Se perforó el septum con la aguja de la fibra SPME (Figura 61) e introdujo la fibra a la atmosfera del vial. Se ancló y fijo la fibra en posición vertical sobre el vial mediante un soporte metálico.
6. Se expuso la fibra accionando el mecanismo de la fibra para que ésta quedase en contacto con la atmosfera del vial y captase el nerolidol usado como patrón.
7. Se incubó durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se retrae la fibra y se retira la aguja del vial.
8. Se insertó la fibra de SPME en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción del nerolidol retenido. La inserción de la fibra SPME en el puerto de inyección del GC-MS se realiza de forma manual, perforando el septum del equipo con la aguja de la fibra. Una vez que el equipo alcanzó la temperatura óptima de 250°C se procedió a exponer la fibra y poner en marcha el programa para la desorción y análisis de los compuestos atrapados en la fibra. La fibra fue dejada en el puerto de inyección a 250 °C (temperatura de desorción) durante 10 minutos para asegurar una transferencia rápida y completa de los compuestos desde la fibra y el puerto de inyección a la columna capilar del GC-MS.

Para evitar posibles remanentes de compuestos atrapados en la fibra SPME, después de la desorción a 250°C durante 10 minutos y antes de cada nueva extracción,

se realizó un ensayo blanco para comprobar la ausencia de nerolidol en el cromatograma.

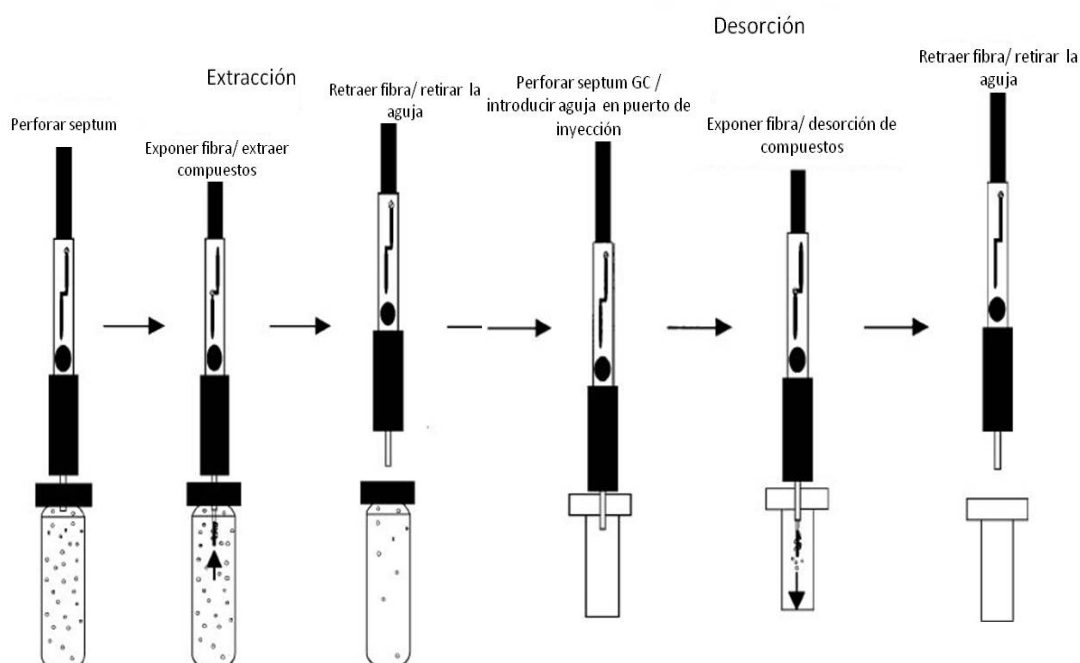


Figura 61. Representación esquemática del proceso de captación de volátiles HE-SPME. Adsorción y desorción de los compuestos atrapados en la fibra SPME para su análisis mediante GC-MS.

4.3.2. Captación de nerolidol desde hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las versiones quiméricas de FaNES1 mediante HS-SPME.

Los niveles de nerolidol fueron determinados a partir de tejido de hojas *N. benthamiana* agroinfiltradas. El tejido fue congelado y triturado en nitrógeno líquido. El procedimiento para la captación de Nerolidol desde el tejido vegetal en la fibra SPME fue el siguiente:

1. Se pesaron 80 mg de tejido agroinfiltrado y triturado en presencia de nitrógeno líquido. Se colocó el tejido en un tubo de 1,5 ml y se dejó en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso.
2. Se añadió el tejido rápidamente al interior del vial de espacio cabezal y se tapó de inmediato. Se colocó el vial en el baño seco a 40°C, en el que previamente se había rellenado el pocillo con agua para que cubriera la mitad de la altura del vial.

3. Se incubó durante 4 minutos y se agregó 100 ng de geraniol disuelto en acetona con la ayuda de la aguja de la jeringa Hamilton perforando el septum. Inmediatamente se introdujo la fibra de SPME pinchando a través del septum. Se expuso la fibra a la atmosfera del vial durante 30 minutos a 40°C. A continuación se retrajo la fibra y se retiró del vial.
4. Se insertó la fibra de SPME en el puerto de inyección del GC-MS para la desorción de los compuestos a 250°C durante 10 minutos, en las mismas condiciones del apartado anterior y se puso en marcha el programa de análisis por cromatografía de gases. A continuación, la fibra se dejaba en el puerto de inyección durante 10 minutos para su desorción completa.

4.3.3. Separación cromatográfica mediante GC-MS y cuantificación de los compuestos volátiles retenidos mediante HS-SPME

La separación cromatográfica de los compuestos retenidos y concentrados en el sistema HS-SPME se realizó mediante el equipo de cromatografía de gases modelo GC 7890A de Agilent Technologies, acoplado a un espectrómetro de masas modelo MSD 5975C de Agilent Technologies. Los compuestos desorbidos del sistema HS-SPME pasaron directamente a la columna HP-5MS (30m longitud, de 30 m x 0,25 µm de diámetro interno; 0,25 µm de tamaño de partícula). Las condiciones de separación en la cromatografía GC-MS responden a una mezcla de diversos métodos referidos en la literatura (Bouwmeester et al., 1999; Aharoni et al., 2003; Green et al., 2012).

Como ya hemos comentado la desorción de la fibra se realizó a 250 °C durante 10 minutos, los compuestos pasan directamente a la columna que se encuentra a la temperatura inicial de 35°C durante 2 minutos. A continuación la temperatura del horno va aumentando de forma gradual, manteniendo el flujo de gas helio portador de la columna a un 1ml/min, con una presión de 6,7776 psi:

- Temperatura inicial de la columna 35°C
- 3°C por minuto hasta llegar a 60°C
- 5°C por minuto hasta llegar a 100°C
- 8°C por minuto hasta llegar a 170°C

- 10°C por minuto hasta llegar a 200°C, temperatura que se mantiene durante 5 minutos
- 100°C por minuto hasta llegar a 325°C, que se mantiene durante 3,667 minutos

Los compuestos separados en la columna del cromatógrafo de gases fueron analizados automáticamente en el espectrómetro de masas MSD. El cuadropolo detector de masas funcionó a 150°C en la ionización por el impacto de electrones a 70eV. La temperatura de iones se fijó en 230°C, y la línea de transferencia se fijó en 280°C. Se seleccionó el rango de adquisición de masas en el intervalo de 40 a 350 uma (m/z). Los compuestos separados en el GC-MS se identificaron en el cromatograma a partir de los datos obtenidos por el patrón del espectro de fragmentación de masas de los estándares de nerolidol y geraniol. Además las identidades fueron confirmadas mediante la comparación con los espectros de la librería del equipo. Una vez identificados los picos de nerolidol emitido por la expresión transitoria de las diversas versiones de FaNES1, se cuantificaron a partir del área de los picos obtenidos, integrando sus áreas y comparándolas con las de la curva de calibración del estándar comercial de nerolidol, y corregido por el pico del estándar interno de geraniol, y referido a la cantidad de tejido.

5. Ensayos de actividad enzimática

Con el fin de medir la actividad de las enzimas FPS y HMGR, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática *in vitro*, en extractos proteicos de plántulas de *A. thaliana*. Estos se incubaron con una mezcla que contiene el sustrato de la enzima marcada radiactivamente con ^{14}C . A continuación se detuvo la reacción enzimática y se purificó el producto de la misma para separarlo del sustrato marcado. Finalmente, la actividad enzimática se cuantificó midiendo la radiactividad presente en el producto de la reacción mediante un contador de centelleo.

5.1. Determinación de la actividad HMGR

El ensayo de actividad enzimática HMGR se basa en el método descrito por Bach *et al.* (1986). Se han utilizado extractos proteicos de la fracción del sobrenadante a 200 g de plántulas de *Arabidopsis* (apartado 3.4.1).

5.1.1. Reacción enzimática

1. Se colocó en un tubo *ependorf*, 26,5 μ l de extracto proteico del sobrenadante de 200 g de plántulas y se añadió 33,5 μ l de la mezcla de reacción (Tabla 17) (volumen final, 60 μ l). Se mezcló suavemente con el vórtex.
2. Se preparó un blanco de la reacción mezclando 26,5 μ l de buffer de homogeneización HMGR y 33,5 μ l de la mezcla de reacción, y se procesó en paralelo junto a las muestras.
3. Se incubó durante 2 h a 37°C en el caso de semillas o de 15 a 30 minutos en el caso de plántulas.
4. Se añadió 10 μ l de HCl al 25%, para cambiar el pH del medio de reacción e inactivar las enzimas.
5. A continuación se incubó durante 15 min a 50°C. El objetivo es lactonizar el mevalonato producido por la enzima. El proceso de formación de lactonas es necesario para la separación del [14C] mevalonato producido por la enzima del [14C] HMG-CoA que no ha sido transformado mediante cromatografía en capa fina. Se enfriaron las muestras durante 4 min a -20°C.

REACTIVOS:

Sustrato HMG-CoA frío^a

Se preparó una solución stock 4 mM disolviendo 5 mg de HMG-CoA (DL-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, *Sigma*) en 1,371 ml de KH_2PO_4 50 mM pH 4,5 y una vez disuelto, se distribuyó en alícuotas de 100 μ l que se conservaron a -80°C. En el momento de usarla se diluye a la concentración de 0,8 mM con buffer KH_2PO_4 50 mM pH 4,5 (dilución 1:5).

Sustrato marcado (^{14}C -HMG-CoA)^b

Se utilizó 3-hydroxy-3-methyl [$3\text{-}^{14}\text{C}$] glutaryl coenzyme A (Code CFA732, *Amersham-Pharmacia Biotech*) 20 $\mu\text{Ci/ml}$, 59 mCi/mmol. El peso molecular del HMG-CoA no marcado es 912 y el del marcado con esta actividad específica es de 914.

Gliceraldeído-6-deshidrogenasa^c - 0,25 U/ μl

Se disolvió 1000 U de la enzima Glucosa-6-P-deshidrogenasa liofilizada (*Boheringer*) en 4 ml de citrato sódico 5 mM pH 7,4. Se conservó en alícuotas a -20°C .

Solución de HCl 25%

Se mezcló 10,13 ml de ácido clorhídrico (al 37%) con 4,87 ml de agua.

Mezcla de reacción HMGR	Stock	Conc. final	P/33,5 μl
HMG-CoA frío ^a	0,8 mM	33,3 μM	2,5 μl
HMG-CoA (^{14}C) ^b	0,338 mM	14,11 μM	2,5 μl
DTT	170 mM	4,25 μM	1,5 μl
G-6-PdH ^c	0,25 U	0,017U/ μl	2 μl
Solución cocktail			25 μl

Solución cocktail	Stock	Conc. final	P/100ml
Tris-HCl pH 7,2	500 mM	208,3 mM	50 ml
EDTA	120 mM	50 mM	12 ml
Glucosa-6-fosfato	120 mM	50 mM	3,65 g
NADP ⁺	6 mM	2,5 mM	0,47g
BSA	1,2 mg/ml	0,5 mg/ml	0,12 g
Agua miliQ c.s.p			100 ml

Tabla 17. Componentes de la mezcla de reacción para medir la actividad HMGR.

5.1.2. Cromatografía en capa fina

La purificación del mevalonato producido en la reacción enzimática de la HMGR se realizó mediante una cromatografía en capa fina (TLC) en un soporte de Silicagel 60 (*Merck*). La placa, de 20 x 20 cm, se cortó en dos fragmentos de 20 x 10 cm. En cada fragmento, se marcaron 7 carriles de 2,5 cm cada uno en sentido vertical, eliminando la sílica en la separación de cada carril con la punta de una pipeta, para evitar la mezcla de las muestras de dos carriles diferentes. El origen de la cromatografía se situó a 1,5

cm de la parte inferior de la placa y se marcó con lápiz. Asimismo, se identificó también una línea a 3,5 cm del origen (ambas en sentido horizontal) por encima de la cual se situó el producto marcado de la reacción lactonizado, la mevalonolactona, una vez se hubó efectuado la cromatografía (Figura 62).

Procedimiento: Se centrifugaron de las muestras que se habían guardado a -20°C durante 2 min a 10.000 rpm. Se sembraron 35 μl (de los 70 μl totales), dosificándolos lentamente en pequeñas gotas sobre la línea marcada a 1,5 cm de la parte inferior, y se aceleró el secado por acción de un secador convencional. Es importante evitar el contacto de la punta de la pipeta con la sílica de la placa cromatográfica ya que ésta podría deformar la superficie o eliminar la sílica y alterar así el resultado final de la cromatografía.

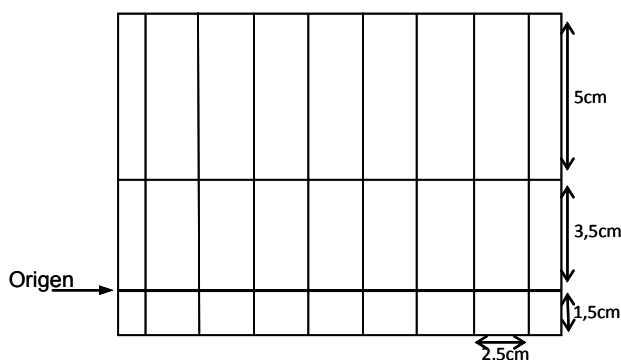


Figura 62. Representación esquemática de las divisiones realizadas sobre una placa de silicagel 60 utilizada en la cromatografía de capa fina para la separación de los productos de reacción del ensayo de actividad enzimática HMGR.

Una vez sembradas las muestras y completamente seca la placa, se colocó la placa de TLC en una cubeta de vidrio que contenía una mezcla de acetona:benceno (1:1), preparada con anterioridad con el fin de saturar la cubeta con los vapores de la fase móvil. Se dejó progresar esta fase hasta el límite superior de la placa (10 cm) durante 20 min. Una vez alcanzado este punto, se retiró la placa y se dejó secar completamente. Este proceso se realizó íntegramente en campana de extracción de gases, debido a la manipulación de disolventes orgánicos.

5.1.3. Cuantificación de la mevalonolactona marcada con [14C]

Una vez evaporado totalmente el disolvente de la placa TLC, se humedeció la placa con agua destilada mediante un pulverizador y se recuperó la mevalonolactona,

rascando (con ayuda de un bisturí) los 5 cm de sílica de la parte superior de la placa. La sílica obtenida se depositó dentro de un vial de centelleo y se añadió 10 ml de líquido de centelleo *CytostintTM ES (ICN)*. Paralelamente, en otro vial, se mezclaron 33,5 µl de la mezcla de reacción con 10 ml de líquido de centelleo, que sirvió para cuantificar la actividad específica de la mezcla de reacción usada. Finalmente se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo (Hewlett Packard).

5.1.4. Cálculo de la actividad específica

La actividad específica de una enzima se expresó en U/mg proteína. Cada unidad de actividad de la enzima HMGR se define como pmoles de sustrato transformado en producto por minuto a 37°C. A continuación se detalla el cálculo utilizado para obtener el valor de la actividad específica.

$$\text{Actividad específica (pmol HMG-CoA/min.mg)} = \text{cpm} \times \frac{\text{pmol HMG-CoA en mezcla}}{\text{cpm mezcla reacción}} \times \frac{1}{\text{min de reacción}} \times \frac{1}{\text{vol. extracto (26,5 } \mu\text{l)}} \times \frac{\text{vol. Total (70 } \mu\text{l)}}{\text{vol. en TLC(35} \mu\text{l)}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{ml de extracto}}$$

pmol de HMG-CoA en mezcla de reacción= 2000 pmoles HMG-CoA frío (2,5µl 0,8mM) + 847 pmoles de [¹⁴C]HMG-CoA (2,5 µl 0,338mM)= 2847 pmoles.

5.2. Determinación de la actividad FPS

La técnica utilizada para realizar la medición de la actividad de las enzimas FPS es la descrita por Chambon *et al.* (1990) con algunas modificaciones. Los extractos proteicos de plántulas de *A. thaliana* utilizados se han obtenido como se describe en el apartado 3.4.1. El procedimiento consiste en incubar el extracto proteico con la mezcla de reacción que contiene el sustrato radiactivo (¹⁴C-IPP). La reacción se detiene por cambio de pH. El medio ácido facilita la hidrólisis de los grupos fosfato tanto del sustrato IPP como del producto FPP, ambos marcados radioactivamente. El producto marcado de la reacción, el ¹⁴C-FPP, desfosforilado es más hidrofóbico por lo que se purifica mediante extracción con hexano y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada al producto mediante un contador de centelleo.

5.2.1. Reacción enzimática

1. Se colocó en un tubo de 2 ml de la marca *ependorf* la cantidad del extracto proteico a ensayar (10 μ l), del sobrenadante de 16.000 g procedente de plántulas de *A. thaliana* (3.4.1) y completó el volumen hasta 68 μ l con tampón FPS de homogeneización (Tabla 13).
2. Se añadió 12 μ l de Cl_2Mg 25 mM y se inició la reacción añadiendo 20 μ l de la Mezcla de reacción FPS (Tabla 18) a cada tubo, cada 15 segundos y se incubó durante 15 min a 37°C.
3. Se detuvo la reacción añadiendo 500 μ l de agua y 86 μ l de HCl 2 M enfriados previamente a 0°C. Se incubó a continuación en hielo durante 1 min.
4. Se incubó 15 min a 37°C para hidrolizar los grupos fosfato. El HCl proporciona el pH necesario para lograr una desfosforilación en medio ácido.
5. Se añadió NaCl a saturación (aproximadamente una punta de espátula).
6. A continuación se añadió 900 μ l de hexano y se agitó en vórtex durante 1 min. El FPP sintetizado, una vez desfosforilado será extraído por el hexano, pero no se extraerá el ^{14}C -IPP, a pesar de estar también desfosforilado, menos hidrofóbico que el FPP.
7. Se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga a 8000 rpm, durante 10 min a 4°C para forzar la separación de las dos fases.
8. Se recogieron 200 μ l de la fase hexánica y se colocaron en un vial de centelleo, y a continuación se añadieron 10 ml de líquido de centelleo *ECOSCYNT H (National Diagnostics)*.
9. Cuantificar la radioactividad (c.p.m) en un contador de centelleo (*Hewlett Packard*).

Mezcla de reacción FPS	Stock	Con. Final	Vol Final 20 µl
GGPP	4 mM	100µM	2,5 µl
IPP	4 mM	92 µM	2,375 µl
IPP (¹⁴ C)*	56mCi/mmol	13,39µM	3,75 µl
Agua MQ			11,375 µl

Tabla 18. Componentes de la mezcla de reacción para medir la actividad FPS. *Sustrato marcado (¹⁴C-IPP): Se utiliza [1-¹⁴C] Isopentenyl pyrophosphate, ammonium salt (3-methyl-[1-¹⁴C]but-3-enylpyrophosphate). Code CFA476, (Amersham-Pharmacia Biotech) 20 µCi/ml, 56 mCi/mmol. Pm 299,1.

5.2.2. Cálculo de la actividad específica

La actividad específica se expresó en U/mg de proteína. La unidad de la enzima FPS se define como el número de nmoles de IPP incorporados en productos ácido-lábiles por minuto a 37°C. Para calcular la actividad específica, en primer lugar se obtuvo el valor de la actividad en U/ml y después la actividad específica, que relaciona la actividad con la cantidad de proteína de la muestra.

$$\text{Actividad específica (nmol FPP/min.mg)} = \frac{\text{cpm} \times \text{nmol IPP en la mezcla}}{\text{cpm mezcla de reacción}} \times \frac{1}{\text{min. reacción}} \times \frac{1}{\mu\text{l extracto}} \times \frac{\text{volumen hexano (900}\mu\text{l)}}{\mu\text{l hexano contado (500}\mu\text{l)}} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{ml de extracto}}$$

nmol de IPP en la mezcla de reacción= 9,2 nmoles IPP frío (2,375µl 4mM) + 1,339 nmoles [¹⁴C]IPP* (3,75 µl 0,357mM)= 10,53 nmoles

6. Microscopía e imagen

6.1. Microscopía óptica.

Para examinar de forma rápida y previa la localización subcelular de las distintas versiones de FaNES1 en hojas agroinfiltradas de *N.benthamiana* se utilizó la lupa binocular de fluorescencia Leica DC250.

Por otro lado para observar las raíces de las plántulas de Arabidopsis transgénicas con los microRNAs para producir el silenciamiento inducible de los genes *AtFPS* se utilizó el estereoscopio Olympus SZX16.

6.2. Microscopía Láser confocal.

En la observación de los cloroplastos de las plántulas de *A. thaliana* en las que se había silenciado los genes *AtFP* con metoxifenoazida, se utilizó el microscopio láser confocal TCS Leica Scanning Confocal SP5 II con objetivo 63x de inmersión en agua NA 1.2. La autofluorescencia de la clorofila se detectó con un filtro LP590 tras la excitación con luz verde a 568 nm.

Para la observación de localización de las proteínas de fusión FaNES1 a la *Green Fluorescent Protein* (GFP), y la colocación con la proteína de *Discosoma sp.* Red (DsRed) se utilizó un microscopio láser de escáner confocal modelo *Leica SP11*, ubicado en la *Unidad de Microscopia Confocal* de la *Facultat de Biologia (Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona)*. Transcurridos 2-3 días post infiltración, las hojas agrofiltradas se observaron al microscopio las zonas donde se presentaba un mayor número de células fluorescentes. La fluorescencia verde de las células transformadas correspondiente a la proteína FaNES1 fusionada a la GFP, se detectó usando un filtro BP515-525, tras la excitación con láser a 500 nm, mientras que la detección de la DsRed, se llevó a cabo utilizando un filtro LP590, previa excitación con láser a 567nm, para evitar el solapamiento con la autofluorescencia (roja) proveniente de los cloroplastos. Para llevar a cabo el proceso de obtención de las imágenes y su posterior edición se utilizaron, como soporte informático, los programas *Image-J* y *Adobe Photoshop Elements*, respectivamente.

6.3. Microscopia electrónica

Para la observación de la ultraestructura de los cloroplastos en hojas de plántulas de *Arabidopsis* de las líneas con silenciamiento inducible de los genes *AtFPS*, fueron analizadas en los *Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona* mediante la utilización de un Microscopio electrónico de transmisión (TEM) Jeol JEM 1010 MT (Jeol, Japan).

En primer lugar las hojas de las plántulas crecidas en MS y MFZ, según diseño experimental (Figura 59), fueron cortadas y fijadas con una mezcla de 2% de paraformaldehído y 2,5% de glutaraldehído. Las muestras cortadas se mantuvieron en la mezcla de fijación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, y después de varios lavados, se fijaron con 2% OsO₄ durante 2 h, y luego se lavaron nuevamente con agua

mQ. Las muestras fueron deshidratadas con diferentes concentraciones crecientes de acetona desde 50 a 100% (50, 70, 90, 96, 100 %). Una vez deshidratadas las muestras, fueron incrustadas progresivamente en concentraciones crecientes de resina epoxi Epon 812 (25 %, 50 %, 75 %, 100 %), que polimeriza a 60°C durante 48 h. Finalmente las secciones fueron cortadas con un ultramicrotomo UC6 (Leica Microsystems, Viena) y se colocaron en el microscopio TEM que opera a 80 kV. Las imágenes fueron registradas con una cámara CCD Megaview III.

6.4. Fotografía e imagen.

Se utilizó la cámara Nikon D7000 acoplada a los objetivos AF-S NIKKOR 18-70 mm 1:3.5-4.5G y AF-S MICRO NIKKOR 105 mm 1:2.8G para fotografiar y mostrar el fenotipo de todas las líneas de *Arabidopsis* transgénicas estudiadas en esta tesis.

El equipo LAS 4000 Fujifilm fue utilizado para la captura de imágenes de membranas de Western Blot tratadas con el kit de revelado *ECL Advanced® System Blotting detection kit (Amersham)*.

7. Análisis transcriptómico RNA seq

El estudio se llevó a cabo a través de **aScidea**, empresa de base tecnológica situada en el Campus de la UAB, que ofrece servicios científicos basados en herramientas bioinformáticas y de computación avanzada. Esta empresa fue la encargada secuenciar y analizar bioinformáticamente los datos obtenidos por la técnica de secuenciación masiva de RNA (RNA seq).

La técnica RNA-Seq es una herramienta transcriptómica que pertenece a las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) que han cambiado la manera cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Wang et al., 2009). Es un poderoso método para cuantificar transcritos de RNA, y además, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de splicing (Lister et al., 2009; Gullledge et al., 2012). Esta herramienta permite un análisis de la expresión génica en una etapa específica del desarrollo o condiciones fisiológicas determinadas, aun sin ninguna información genómica previa, es posible a través de la

implementación de la tecnología conocida como RNA-seq (Wang et al., 2009; Garber et al., 2011; Egan et al., 2012; Ward et al., 2012).

La técnica RNA-Seq permite identificar el número de lecturas (reads) que alinean con cada uno de los miles de RNAs diferentes presentes en una célula en un momento determinado, si bien los resultados son similares a los producidos por los microarrays de expresión génica, resultan más completos que estos al no depender necesariamente de una secuencia genómica previa. Además suelen ser más específicos, y sobretodo, tienen un rango dinámico (es decir, el rango de niveles de expresión en los que los transcritos pueden ser cuantificados con precisión) mucho menos limitado (Wang et al., 2009). A diferencia de las tecnologías de arrays, basadas en la hibridación que miden las intensidades continuas de las sondas, en el RNA-Seq se mide el número discreto de lecturas (reads). Esta estadística de contaje a menudo requiere diferentes tests estadísticos para determinar la expresión diferencial y otros tipos de patrones (Bullard et al., 2010) para los que actualmente existe una gran variedad de softwares disponibles. Esta técnica proporciona una oportunidad para generar diseños experimentales libres de hipótesis e investigar las especies con anotaciones genómicas pobres o ausentes.

7.1. Condiciones de crecimiento de las plántulas y recolección de muestras

El primer paso para el análisis de RNA seq es obtener el suficiente material vegetal para la extracción de RNA. La línea seleccionada para analizar fue la línea A con silenciamiento inducible de los genes *AtFPS*.

Las semillas de la línea A se sembraron según diseño experimental descrito en el apartado 3.2.1 en placas de MS por triplicado con la finalidad de obtener 3 réplicas biológicas de cada tratamiento. Una vez estratificadas las semillas fueron crecidas en condiciones de día largo (LD) (16 horas de luz y 8 de oscuridad) durante 3 días para luego y de acuerdo al tratamiento, traspasarlas a placas de MS y MFZ. Las plántulas fueron crecidas 5 días más en las mismas condiciones para luego recoger el material vegetal y congelar en nitrógeno líquido. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -80°C

7.2. Extracción y cuantificación del RNA

Para el análisis de RNA seq fue necesario obtener un RNA de alta pureza. Para ello, la extracción RNA se realizó con el kit comercial *NucleoSpin® RNA Plant* (Macherey-Nagel) (de purificación por columna), siguiendo el protocolo detallado en el manual del kit. Cada replica biológica fue recolectada y triturada de forma manual e independiente en mortero y en presencia de nitrógeno líquido para evitar que la muestra se descongelara. Para eliminar el posible DNA genómico que se pueda haber extraído conjuntamente con el RNA, se realizó un tratamiento con DNAsa en la misma columna de extracción del RNA antes de finalizar el proceso. Para ello se utilizó la DNAsa incluida en el mismo kit comercial.

7.3. Cuantificación y control de calidad del RNA

En una primera aproximación el RNA de cada replica biológica fue cuantificado mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* de *ThermoScientific* a 260 nm y observada su integridad mediante electroforesis de agarosa al 1%. Este análisis preliminar permitió detectar rápidamente posibles anomalías en el RNA. Realizadas las aproximaciones preliminares, las muestras de RNA de cada réplica biológica, fueron analizadas mediante la plataforma de *Bionalyzer Expert 2100* (Agilent Technologies). Esta plataforma se ha convertido en la tecnología estándar para la cuantificación y evaluación de la calidad del RNA. El *Bionalyzer Expert 2100* proporciona una evaluación del RNA, mostrando una imagen detallada de su integridad, lo que permite una evaluación visual de la calidad de las muestras. La tecnología se basa en la electroforesis capilar a partir de la cual se genera un electroferograma. Obtenido el electroferograma, el software de la plataforma genera, en primer lugar, la relación de las subunidades 18S a 28S ribosomales. Este parámetro sirve como indicador de degradación del RNA de la muestra. Sin embargo, un análisis más detallado sobre la calidad del RNA lo entrega el número *RIN (RNA integrity number)* (Schroeder et al., 2006). *RIN* es una herramienta de software diseñada para la evaluación de la calidad e integridad de las muestras de RNA. Este parámetro se basa en el rastro electroforético de la muestra al completo (y no sólo los rRNAs), incluyendo la presencia o ausencia de productos de degradación. El *RIN* permite obtener una evaluación numérica de la integridad del RNA basado en un sistema de numeración de 1 a 10, siendo 1 el perfil

más degradado y 10 él más intacto. Analizadas la réplicas biológicas de RNA, estas fueron mezcladas originando una muestra (mix) única por tratamiento para su posterior análisis mediante secuenciación masiva (Tabla 19).

Nombre muestra	Conc RNA ng/ μ l	Volumen 1μ g	Volumen Final (Mix 3 μ g RNA)
<i>Tratamiento MS</i>			9,01 μ l
AMS1	436,5	2,29 μ l	
AMS2	335,0	2,98 μ l	
AMS3	267,0	3,74 μ l	
<i>Tratamiento MFZ</i>			13,02 μ l
AMFZ1	244,4	4,09 μ l	
AMFZ2	210,6	4,75 μ l	
AMFZ3	238,9	4,18 μ l	

Tabla 19. Concentraciones de RNA. Replicas biológicas de cada tratamiento analizadas mediante el *Bionalyzer Expert 2100*. Posteriormente fueron mezcladas para originar un mix de 3 μ g de RNA para analizar mediante la técnica de RNA-seq.

7.4. Secuenciación masiva mediante la plataforma *Illumina*

El análisis de secuenciación masiva se realizó mediante la plataforma *Illumina*. Esta plataforma genera un alto número de lecturas PE (*paired-end reads*) del rango de 90 a 100 nucleótidos dando mayor confiabilidad a los datos para la cuantificación de la expresión. La plataforma *Illumina* (Figura 63) se basa en el principio de amplificación en puente y el uso de marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores reversibles (Metzker, 2010). El modelo de plataforma utilizada para secuenciar los RNA de plántulas de la línea A fue *HiSeq2000 Sequencing 2x 100bp*. El alto número de lecturas generadas fueron almacenadas y tratadas de acuerdo a los parámetros bioinformáticos establecidos por la empresa *aScidea*.

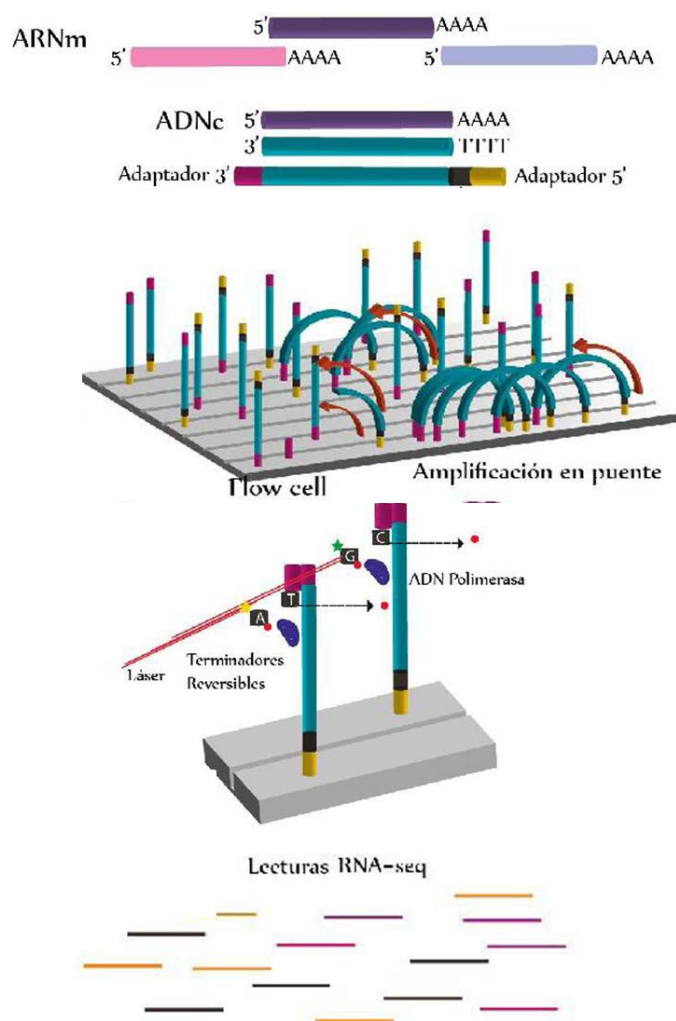


Figura 63. Representación esquemática del proceso de RNA-seq. Tecnología de secuenciación *Illumina* basado en el principio de amplificación en puente y el uso de marcaje por fluorescencia de terminadores reversible.

7.5. Análisis bioinformático.

El estudio bioinformático fue realizado mediante el uso de las herramientas específicas para el análisis de datos de RNA-seq. Según el informe de la empresa el estudio fue organizado de acuerdo a los siguientes componentes principales:

7.5.1. Control de calidad.

Este es el punto de partida del estudio, en donde se analizó la calidad de las lecturas obtenidas desde los servicios de secuenciación para definir el grado de calidad global del proceso de secuenciación. Este control permite detectar errores y zonas de

baja calidad en las secuencias. La calidad de las lecturas obtenidas fue comprobada con el software *FastQC* <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>

7.5.2. Pre-procesado de los datos.

En este paso se eliminaron todos los datos que no superaron los controles de calidad, de esta manera se obtuvieron los datos definitivos con los que se realizaron los diversos análisis del estudio. El pre-procesamiento de las lecturas se realizó con *fastx-toolkit* (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html) y scripts específicos propios de aScidea (<http://www.ascidea.com>) con objetivo de filtrar regiones de baja calidad.

7.5.3. Mapeo de las secuencias.

Esta es una parte esencial del análisis y consiste en el alineamiento de las lecturas obtenidas en el paso anterior con un genoma de referencia. En este caso se utilizó el genoma de *A. thaliana* TAIR10, disponible en la red <http://www.arabidopsis.org>.

Las lecturas obtenidas que superaron los filtros de calidad fueron mapeadas utilizando las herramientas bioinformáticas *Tophat 2.0.7* (Trapnell et al., 2009) y *Bowtie2 2.0.6* (Langmead, 2010).

Tras el alineamiento de las secuencias se realizaron controles de calidad específicos y se determinó el grado de cobertura de las secuencias del estudio, es decir el número de secuencias que alinean con alguna región del genoma de *A. thaliana* y si estas regiones cubren la mayoría del genoma o si lo hacen de una manera homogénea.

7.5.4. Expresión diferencial (DE) y análisis de significación biológica.

La selección de genes y su expresión diferencial fue determinada mediante el uso de la plataforma bioinformática *Cufflinks 2.0.2 software* (Trapnell et al., 2010) que permitió cuantificar y normalizar los niveles de transcripción de los transcritos. La medida de abundancia de transcripción utilizada fue el FPKM (*fragments per kilobase of exon per million reads mapped*) (Trapnell et al., 2010). FPKM es un parámetro que permite calcular la abundancia relativa de transcritos a partir de PE (paired-end

sequencing reads) y es análoga a RPKM que sirve para cuantificar abundancias de SE (single reads) (Mortazavi et al., 2008).

A continuación, se determinaron los niveles de expresión diferencial, mediante el uso de *Cuffdiff* (Trapnell et al., 2013), herramienta bioinformática que pertenece a la plataforma anteriormente mencionada. Los parámetros de selección se fijaron en *fold_change* > 2 y < -2 y un q_value <0,05 y los datos se ordenan de mayor a menor según su valor de expresión diferencial. El parámetro *fold change* corresponde a la división entre los valores de FPKM. Al estimar este parámetro es posible correlacionar la expresión de un gen en dos condiciones distintas.

El análisis de la significancia biológica de los genes seleccionados se realizó mediante la proyección de ellos en términos de Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>). Los análisis GO para la selección de genes diferencialmente expresados se realizaron mediante el uso de la herramienta bioinformática *GeneCodis* (Nogales-Cadenas et al., 2009; Carmona-Saez et al., 2007).

BIBLIOGRAFÍA

Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Alvarez-Fernández, A., and López-Millán, A.F. (2011). Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 471–82.

Adiwilaga, K. and Kush, A. (1996). Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol. Biol.* **30**: 935–46.

Aharoni, A., Giri, A.P., and Deuerlein, S. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell ...* **15**: 2866–2884.

Aharoni, A., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Berteaux, C.M., and Sevenier, R. (2004). Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species. *Plant Cell* **16**: 3110–3131.

Aharoni, A., Jongsma, M. a., and Bouwmeester, H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 594–602.

Aharoni, A., Jongsma, M. a., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W. a., Schwab, W., and Bouwmeester, H.J. (2006). Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in Plants. *Phytochem. Rev.* **5**: 49–58.

Aksoy, E., Jeong, I.S., and Koiwa, H. (2013). Loss of function of *Arabidopsis* C-terminal domain phosphatase-like1 activates iron deficiency responses at the transcriptional level. *Plant Physiol.* **161**: 330–45.

Albertsen, L., Chen, Y., Bach, L.S., Rattleff, S., Maury, J., Brix, S., Nielsen, J., and Mortensen, U.H. (2011). Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 1033–40.

Alonso, J.M. et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–7.

An, G. (1987). Binary *ti* vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol.* **153**: 292–305.

Anderson, M.S., Yarger, J.G., Burck, C.L., and Poulter, C.D. (1989). Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**: 19176–84.

Andersson, M.X., Goksör, M., and Sandelius, A.S. (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **282**: 1170–4.

Antolín-Llovera, M. (2005). Papel de las proteínas AtKLC-1 y AtB” en la regulación de la HMG-CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*.

Apfel, C.M., Takács, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., and Keck, W. (1999). Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene. *J. Bacteriol.* **181**: 483–92.

Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J. Mol. Biol.* **211**: 943–58.

Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., and Zenk, M.H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 10600–5.

Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., and Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**: 512–5.

Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* **141**: 391–6.

Ashburner, M. et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**: 25–9.

Attucci, S., Aitken, S.M., Gulick, P.J., and Ibrahim, R.K. (1995a). Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 493–500.

Attucci, S., Aitken, S.M., Ibrahim, R.K., and Gulick, P.J. (1995b). A cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase in white lupin. *Plant Physiol.* **108**: 835–6.

Awai, K., Xu, C., Lu, B., and Benning, C. (2006). Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the chloroplast. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 395–8.

Baadhe, R.R., Mekala, N.K., Parcha, S.R., and Prameela Devi, Y. (2013). Combination of ERG9 Repression and Enzyme Fusion Technology for Improved Production of Amoradiene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**: 140469.

Babiychuk, E., Bouvier-Navé, P., Compagnon, V., Suzuki, M., Muranaka, T., Van Montagu, M., Kushnir, S., and Schaller, H. (2008a). Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **3**: 978–80.

Babiychuk, E., Bouvier-Navé, P., Compagnon, V., Suzuki, M., Muranaka, T., Van Montagu, M., Kushnir, S., and Schaller, H. (2008b). Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 3163–8.

Bach, T.J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., and Vollack, K.U. (1999). Mevalonate biosynthesis in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 107–22.

- Balbi, V. and Devoto, A.** (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* **177**: 301–18.
- Banas, A., Carlsson, A.S., Huang, B., Lenman, M., Banas, W., Lee, M., Noiriél, A., Benveniste, P., Schaller, H., Bouvier-Navé, P., and Stymne, S.** (2005). Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA:sterol acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **280**: 34626–34.
- Barnard, G.F. and Popják, G.** (1981). Human liver prenyltransferase and its characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **661**: 87–99.
- Bartel, D.P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281–97.
- Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356–63.
- Beale, M.H. et al.** (2006). Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 10509–13.
- Benke, A. and Stich, B.** (2011). An analysis of selection on candidate genes for regulation, mobilization, uptake, and transport of iron in maize. *Genome* **54**: 674–83.
- Benveniste, P.** (2002). Sterol metabolism. *Arabidopsis Book* **1**: e0004.
- 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.
- Biswal, U.C., Biswal, B., and Raval, M.K.** (2003). *Chloroplast Biogenesis* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Blake, J.A. and Harris, M.A.** (2008). The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **Chapter 7**: Unit 7.2.
- Blatzer, M., Barker, B.M., Willger, S.D., Beckmann, N., Blosser, S.J., Cornish, E.J., Mazurie, A., Grahl, N., Haas, H., and Cramer, R.A.** (2011). SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* **7**: e1002374.
- Bloch, K.E.** (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **14**: 47–92.
- Bohlmann, J. and Keeling, C.I.** (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J.* **54**: 656–69.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R.** (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 4126–33.

Boutté, Y. and Grebe, M. (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 705–13.

Bouvier, F., Rahier, A., and Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **44**: 357–429.

Bouvier-Navé, P., Berna, A., Noiriél, A., Compagnon, V., Carlsson, A.S., Banas, A., Stymne, S., and Schaller, H. (2010). Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol.* **152**: 107–19.

Bouwmeester, H.J., Kodde, J., Verstappen, F.W.A., Altug, I.G., de Kraker, J.-W., and Wallaart, T.E. (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol.* **129**: 134–44.

Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 358–64.

Bouwmeester, H.J., Verstappen, F.W., Posthumus, M.A., and Dicke, M. (1999). Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiol.* **121**: 173–80.

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Z.F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In In P Marschner, ed, *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, Ed 3. Academic Press, London, pp, pp. 191–248.

Brodelius, M., Lundgren, A., Mercke, P., and Brodelius, P.E. (2002). Fusion of farnesyldiphosphate synthase and epi-aristolochene synthase, a sesquiterpene cyclase involved in capsidiol biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3570–3577.

Browse, J. and Howe, G.A. (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.* **146**: 832–8.

Van den Brûle, S. and Smart, C.C. (2002). The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* **216**: 95–106.

Bullard, J.H., Purdom, E., Hansen, K.D., and Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* **11**: 94.

Bülow, L. (1987). Characterization of an artificial bifunctional enzyme, beta-galactosidase/galactokinase, prepared by gene fusion. *Eur. J. Biochem.* **163**: 443–8.

Busquets, A. (2008). Biosíntesis de terpenoides en *Arabidopsis thaliana*: estudio de la escualeno sintasa y la farnesildifosfato sintasa mitocondrial.

Busquets, A., Keim, V., Closa, M., del Arco, A., Boronat, A., Arró, M., and Ferrer, A. (2008). *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase. *Plant Mol. Biol.* **67**: 25–36.

Campbell, E.J., Schenk, P.M., Kazan, K., Penninckx, I.A.M.A., Anderson, J.P., Maclean, D.J., Cammue, B.P.A., Ebert, P.R., Manners, J.M., and Plant, T. (2003). Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in *Arabidopsis* 1. **133**: 1272–1284.

Campos, N. and Boronat, a (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**: 2163–74.

Carlsson, H., Ljung, S., and Bülow, L. (1996). Physical and kinetic effects on induction of various linker regions in beta-galactosidase/galactose dehydrogenase fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1293**: 154–60.

Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* **8**: R3.

Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., and Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiol.* **129**: 1581–91.

Chang, M.C.Y. and Keasling, J.D. (2006). Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 674–81.

Chappell, J. (1995a). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 521–547.

Chappell, J. (1995b). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol.* **107**: 1–6.

Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 151–7.

Chen, A., Kroon, P.A., and Poulter, C.D. (1994). Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein Sci.* **3**: 600–7.

Chen, A.P.-C., Chang, S.-Y., Lin, Y.-C., Sun, Y.-S., Chen, C.-T., Wang, A.H.-J., and Liang, P.-H. (2005). Substrate and product specificities of cis-type undecaprenyl pyrophosphate synthase. *Biochem. J.* **386**: 169–76.

Chen, D., Ye, H., and Li, G. (2000). Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci.* **155**: 179–185.

Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., and Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* **66**: 212–29.

Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J.C., Farooq, A., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **15**: 481–94.

Chen, Q., Steinhauer, L., Hammerlindl, J., Keller, W., and Zou, J. (2007). Biosynthesis of phytosterol esters: identification of a sterol *o*-acyltransferase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145**: 974–84.

Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* **579**: 5923–31.

Choe, S., Dilkes, B.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E., and Feldmann, K.A. (1999a). The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**: 897–907.

Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E., and Feldmann, K.A. (1999b). The *Arabidopsis* dwf7/ste1 mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **11**: 207–221.

Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A.S., Tax, F.E., Yoshida, S., and Feldmann, K.A. (2000). Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J.* **21**: 431–443.

Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, a D., and Howe, G. a (2008). Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**: 952–64.

Clarke, C.F., Tanaka, R.D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, a M., and Edwards, P. a (1987). Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to prenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3138–46.

Closa, M. (2007). Estudi de l' especialització funcional dels isoenzims citosòlics de la farnesildifosfat sintasa d' *Arabidopsis thaliana*.

Closa, M., Vranová, E., Bortolotti, C., Bigler, L., Arró, M., Ferrer, A., and Grisse, W. (2010). The *Arabidopsis thaliana* FPP synthase isozymes have overlapping and specific

functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J.* **20**: 512–525.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.

Clouse, S.D. (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell* **14**: 1995–2000.

Conrado, R.J., Mansell, T.J., Varner, J.D., and DeLisa, M.P. (2007). Stochastic reaction-diffusion simulation of enzyme compartmentalization reveals improved catalytic efficiency for a synthetic metabolic pathway. *Metab. Eng.* **9**: 355–63.

Conrado, R.J., Varner, J.D., and DeLisa, M.P. (2008). Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 492–9.

Craven, R.J., Mallory, J.C., and Hand, R.A. (2007). Regulation of iron homeostasis mediated by the heme-binding protein Dap1 (damage resistance protein 1) via the P450 protein Erg11/Cyp51. *J. Biol. Chem.* **282**: 36543–51.

Croteau, R., Kutchan, T., and Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones, eds (Am. Soc. Plant Physiol.: Rockville), pp. 568–628.

Crowell, D.N. and Huizinga, D.H. (2009). Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends Plant Sci.* **14**: 163–70.

Crowell, D.N. and Salaz, M.S. (1992). Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of lovastatin is reversed by cytokinin. *Plant Physiol.* **100**: 2090–5.

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**: 7774–80.

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**: 747–58.

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**: 15381–8.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 5–17.

D'Aoust, M.-A., Lavoie, P.-O., Couture, M.M.-J., Trépanier, S., Guay, J.-M., Dargis, M., Mongrand, S., Landry, N., Ward, B.J., and Vézina, L.-P. (2008). Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol. J.* **6**: 930–40.

Dale, S., Arró, 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.

Dedryver, C.-A., Le Ralec, A., and Fabre, F. The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biol.* **333**: 539–53.

Degenhardt, J., Gershenzon, J., Baldwin, I.T., and Kessler, A. (2003). Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 169–76.

Degenhardt, J., Köllner, T.G., and Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**: 1621–37.

Delourme, D., Lacroute, F., and Karst, F. (1994). Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1867–73.

Demel, R.A. and De Kruyff, B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **457**: 109–32.

Demmig-Adams, B., Cohu, C.M., Amiard, V., Zadelhoff, G., Veldink, G.A., Muller, O., and Adams, W.W. (2013). Emerging trade-offs - impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytol.* **197**: 720–9.

Denbow, C.J., Lång, S., and Cramer, C.L. (1996). The N-terminal Domain of Tomato 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. **271**: 9710–9715.

Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., and Le, D.P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 545–69.

Dicke, M., Agrawal, A.A., and Bruin, J. (2003). Plants talk, but are they deaf? *Trends Plant Sci.* **8**: 403–5.

Dicke, M. and Baldwin, I.T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help”. *Trends Plant Sci.* **15**: 167–75.

Diener, a C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., and Fink, G.R. (2000). Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell* **12**: 853–870.

Dietrich, C.R., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M., and Cahoon, E.B. (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* **54**: 284–98.

Doblas, V.G. et al. (2013). The SUD1 gene encodes a putative E3 ubiquitin ligase and is a positive regulator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 728–43.

Douce, R. and Joyard, J. (1990). Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**: 173–216.

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 regulated by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *Biochem. J.* **325 (Pt 1)**: 101–109.

Dubin, M.J., Bowler, C., and Benvenuto, G. (2008). A modified Gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants. *Plant Methods* **4**: 3.

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., and Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **198**: 16–32.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., and Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **25**: 417–440.

Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* **135**: 1893–902.

Dudley, M.W., Dueber, M.T., and West, C. a (1986). Biosynthesis of the Macrocyclic Diterpene Casbene in Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Seedlings : Changes in Enzyme Levels Induced by Fungal Infection and Intracellular Localization of the Pathway. *Plant Physiol.* **81**: 335–42.

Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N.A., and Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* **147**: 456–68.

Eberhardt, N.L. and Rilling, H.C. (1975). Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J. Biol. Chem.* **250**: 863–6.

Egan, A.N., Schlueter, J., and Spooner, D.M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.* **99**: 175–85.

El-Wakeil, N.E., Volkmar, C., and Sallam, A.A. (2010). Jasmonic acid induces resistance to economically important insect pests in winter wheat. *Pest Manag. Sci.* **66**: 549–54.

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**: 927–31.

Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., and León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 22901–22909.

Feron, G., Clastre, M., and Ambid, C. (1990). Prenyltransferase compartmentation in cells of *Vitis vinifera* cultivated in vitro. *FEBS Lett.* **271**: 236–8.

Firestone, G.L. and Sundar, S.N. (2009). Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**: e32.

Flores-Pérez, U., Pérez-Gil, J., Closa, M., Wright, L.P., Botella-Pavía, P., Phillips, M.A., Ferrer, A., Gershenzon, J., and Rodríguez-Concepción, M. (2010). Pleiotropic regulatory locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **3**: 101–112.

Flügge, U.-I. and Gao, W. (2005). Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biol. (Stuttg.)* **7**: 91–97.

Fraser, P.D., Pinto, M.E., Holloway, D.E., and Bramley, P.M. (2000a). Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**: 551–558.

Fraser, P.D., Schuch, W., and Bramley, P.M. (2000b). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts--partial purification and biochemical properties. *Planta* **211**: 361–369.

Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M., and Grierson, D. (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* **8**: 693–701.

Gaffe, J., Bru, J.P., Causse, M., Vidal, a, Stamitti-Bert, L., Carde, J.P., and Gallusci, P. (2000). LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development. *Plant Physiol.* **123**: 1351–62.

Galichet, A. and Gruissem, W. (2003). Protein farnesylation in plants--conserved mechanisms but different targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 530–5.

- Garber, M., Grabherr, M.G., Guttman, M., and Trapnell, C.** (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat. Methods* **8**: 469–77.
- Gerber, E., Hemmerlin, A., Hartmann, M., Heintz, D., Hartmann, M.-A., Mutterer, J., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A., Van Dorsselaer, A., Rohmer, M., Crowell, D.N., and Bach, T.J.** (2009). The plastidial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway provides the isoprenyl moiety for protein geranylgeranylation in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **21**: 285–300.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N.** (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 408–14.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., and Farmer, E.E.** (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Sci. Signal.* **3**: cm3.
- Gfeller, A., Liechti, R., and Farmer, E.E.** (2006). Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. STKE* **2006**: cm1.
- Ghassemian, M., Lutes, J., Tepperman, J.M., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., Quail, P.H., and Lange, B.M.** (2006). Integrative analysis of transcript and metabolite profiling data sets to evaluate the regulation of biochemical pathways during photomorphogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **448**: 45–59.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–27.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., and Lommel, S.A.** (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**: 1015–26.
- Grandmougin-Ferjani, A., Schuler-Muller, I., and Hartmann, M.A.** (1997). Sterol Modulation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity from Corn Roots Reconstituted into Soybean Lipids. *Plant Physiol.* **113**: 163–174.
- Green, S. a, Chen, X., Nieuwenhuizen, N.J., Matich, A.J., Wang, M.Y., Bunn, B.J., Yauk, Y.-K., and Atkinson, R.G.** (2012). Identification, functional characterization, and regulation of the enzyme responsible for floral (E)-nerolidol biosynthesis in kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *J. Exp. Bot.* **63**: 1951–67.
- Guerinot, M.L. and Yi, Y.** (1994). Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol.* **104**: 815–820.
- Gulledge, A.A., Roberts, A.D., Vora, H., Patel, K., and Loraine, A.E.** (2012). Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-seq data with Integrated Genome Browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *Am. J. Bot.* **99**: 219–31.

Gupta, a K., Savopoulos, C.G., Ahuja, J., and Hatzitolios, a I. (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: current perspectives. *QJM* **104**: 301–8.

Gutensohn, M., Orlova, I., Nguyen, T.T.H., Davidovich-Rikanati, R., Ferruzzi, M.G., Sitrit, Y., Lewinsohn, E., Pichersky, E., and Dudareva, N. (2013). Cytosolic monoterpene biosynthesis is supported by plastid-generated geranyl diphosphate substrate in transgenic tomato fruits. *Plant J.* **75**: 351–363.

Halitschke, R. and Baldwin, I.T. (2003). Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* **36**: 794–807.

Han, J.-L., Liu, B.-Y., Ye, H.-C., Wang, H., Li, Z.-Q., and Li, G.-F. (2006). Effects of Overexpression of the Endogenous Farnesyl Diphosphate Synthase on the Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. *J. Integr. Plant Biol.* **48**: 482–487.

Hartmann, M. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **3**: 170–175.

Hartmann, M.-A. (2004). 5 Sterol metabolism and functions in higher plants. *Lipid Metab. Membr. Biog.* **Volume 6**: pp 183–211.

Hartmann, M.-A. and Bach, T.J. (2001). Incorporation of all-trans-farnesol into sterols and ubiquinone in *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 cell cultures. *Tetrahedron Lett.* **42**: 655–657.

Hasegawa, M., Mitsuhara, I., Seo, S., Imai, T., Koga, J., Okada, K., Yamane, H., and Ohashi, Y. (2010). Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **23**: 1000–11.

Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* **178**: 41–61.

Heiling, S., Schuman, M.C., Schoettner, M., Mukerjee, P., Berger, B., Schneider, B., Jassbi, A.R., and Baldwin, I.T. (2010). Jasmonate and ppHsystemin regulate key Malonylation steps in the biosynthesis of 17-Hydroxygeranylinalool Diterpene Glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* **22**: 273–92.

Hemmerlin, A. (2013). Post-translational events and modifications regulating plant enzymes involved in isoprenoid precursor biosynthesis. *Plant Sci.* **203-204**: 41–54.

Hemmerlin, A., Hoeffler, J.-F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. a, Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., and Bach, T.J. (2003a). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 26666–76.

- Hemmerlin, A., Rivera, S.B., Erickson, H.K., and Poulter, C.D.** (2003b). Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the Big Sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 32132–40.
- Van Herpen, T.W.J.M., Cankar, K., Nogueira, M., Bosch, D., Bouwmeester, H.J., and Beekwilder, J.** (2010). *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. *PLoS One* **5**: e14222.
- Himejima, M., Hobson, K.R., Otsuka, T., Wood, D.L., and Kubo, I.** (1992). Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1809–18.
- Hirooka, K., Bamba, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.** (2003). Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase. *Biochem. J.* **370**: 679–686.
- Hirooka, K., Izumi, Y., An, C.-I., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.** (2005). Functional analysis of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 592–601.
- Hohn, T.M. and Ohlrogge, J.B.** (1991). Expression of a fungal sesquiterpene cyclase gene in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **97**: 460–2.
- Hosogaya, N. et al.** (2013). The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* **13**: 411–21.
- Hossain, M.A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I.C., and Murata, Y.** (2011). Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 430–8.
- Houshyani, B., Assareh, M., Busquets, A., Ferrer, A., Bouwmeester, H.J., and Kappers, I.F.** (2013). Three-step pathway engineering results in more incidence rate and higher emission of nerolidol and improved attraction of *Diadegma semiclausum*. *Metab. Eng.* **15**: 88–97.
- Howe, G.A. and Jander, G.** (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 41–66.
- Hsieh, F.-L., Chang, T.-H., Ko, T.-P., and Wang, A.H.-J.** (2011). Structure and mechanism of an *Arabidopsis* medium/long-chain-length prenyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiol.* **155**: 1079–1090.
- Huang, M., Sanchez-Moreiras, A.M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., and Tholl, D.** (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.* **193**: 997–1008.

Huguenev, P., Bouvier, F., Badillo, a, Quennemet, J., d'Harlingue, a, and Camara, B. (1996). Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* **111**: 619–26.

Hyde, C.C., Ahmed, S.A., Padlan, E.A., Miles, E.W., and Davies, D.R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263**: 17857–71.

Hyun, Y. and Lee, I. (2008). Generating and maintaining jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **3**: 798–800.

Ishiguro, S., Nishimori, Y., Yamada, M., Saito, H., Suzuki, T., Nakagawa, T., Miyake, H., Okada, K., and Nakamura, K. (2010). The *Arabidopsis* FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol.* **51**: 896–911.

Iturrate, L., Sánchez-Moreno, I., Oroz-Guinea, I., Pérez-Gil, J., and García-Junceda, E. (2010). Preparation and characterization of a bifunctional aldolase/kinase enzyme: a more efficient biocatalyst for C-C bond formation. *Chemistry* **16**: 4018–30.

Jang, I.-C., Oh, S.-J., Seo, J.-S., Choi, W.-B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.-S., Choi, Y. Do, Nahm, B.H., and Kim, J.-K. (2003). Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* **131**: 516–24.

Jeong, J. and Guerinot, M. Lou (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 280–5.

Ji, W., Hatzios, K.K., and Cramer, C.L. (1992). Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in maize tissues. *Physiol. Plant.* **84**: 185–192.

Jin, H., Song, Z., and Nikolau, B.J. (2012). Reverse genetic characterization of two paralogous acetoacetyl CoA thiolase genes in *Arabidopsis* reveals their importance in plant growth and development. *Plant J.* **70**: 1015–1032.

Joly, A. and Edwards, P.A. (1993). Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 26983–9.

Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J.S., Choi, Y. Do, and Cheong, J.-J. (2007). Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **26**: 1053–63.

Takeya, H., Miyazaki, T., Miyazaki, Y., and Kohno, S. (2003). [Azole resistance in *Candida* spp]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **44**: 87–92.

- Kanagarajan, S., Muthusamy, S., Gliszczynska, A., Lundgren, A., and Brodelius, P.E.** (2012). Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Rep.* **31**: 1309–19.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 2355–60.
- Kappers, I.F., Aharoni, A., van Herpen, T.W.J.M., Luckerhoff, L.L.P., Dicke, M., and Bouwmeester, H.J.** (2005). Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* **309**: 2070–2.
- 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.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sakakibara, H.** (2004). Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **279**: 14049–14054.
- Keeling, C.I. and Bohlmann, J.** (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* **170**: 657–75.
- Keeling, C.I., Weisshaar, S., Lin, R.P.C., and Bohlmann, J.** (2008). Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 1085–90.
- Keim, V., Manzano, D., Fernández, F.J., Closa, M., Andrade, P., Caudepón, D., Bortolotti, C., Vega, M.C., Arró, M., and Ferrer, A.** (2012). Characterization of *Arabidopsis* FPS isozymes and FPS gene expression analysis provide insight into the biosynthesis of isoprenoid precursors in seeds. *PLoS One* **7**: e49109.
- Kessler, A. and Baldwin, I.T.** (2004). Herbivore-induced plant vaccination. Part I. The orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences in the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* **38**: 639–49.
- Kharel, Y. and Koyama, T.** (2003). Molecular analysis of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 111–8.
- Kholodenko, B.N., Westerhoff, H. V, and Cascante, M.** (1996). Effect of channelling on the concentration of bulk-phase intermediates as cytosolic proteins become more concentrated. *Biochem. J.* **313 (Pt 3)**: 921–6.
- Kim, H.B., Lee, H., Oh, C.J., Lee, H.-Y., Eum, H.L., Kim, H.-S., Hong, Y.-P., Lee, Y., Choe, S., An, C.S., and Choi, S.-B.** (2010). Postembryonic seedling lethality in the sterol-

deficient Arabidopsis cyp51A2 mutant is partially mediated by the composite action of ethylene and reactive oxygen species. *Plant Physiol.* **152**: 192–205.

Kim, H.B., Schaller, H., Goh, C., Kwon, M., Choe, S., An, C.S., Durst, F., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2005a). Arabidopsis cyp51 mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity. *Plant Physiol.* **138**: 2033–2047.

Kim, J., Cho, Y.-J., Do, E., Choi, J., Hu, G., Cadieux, B., Chun, J., Lee, Y., Kronstad, J.W., and Jung, W.H. (2012). A defect in iron uptake enhances the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to azole antifungal drugs. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 955–66.

Kim, O.T., Ahn, J.C., Hwang, S.J., and Hwang, B. (2005b). Cloning and expression of a farnesyl diphosphate synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Mol. Cells* **19**: 294–9.

Kim, O.T., Lee, J.W., Bang, K.H., Kim, Y.C., Hyun, D.Y., Cha, S.W., Choi, Y.E., Jin, M.L., and Hwang, B. (2009). Characterization of a dammarenediol synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 998–1002.

Klahre, U., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Nomura, T., Yoshida, S., and Chua, N.H. (1998). The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* **10**: 1677–1690.

Knighton, D.R., Kan, C.C., Howland, E., Janson, C.A., Hostomska, Z., Welsh, K.M., and Matthews, D.A. (1994). Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 186–94.

Kobayashi, K. et al. (2007). Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **48**: 322–31.

Köllner, T.G., Lenk, C., Schnee, C., Köpke, S., Lindemann, P., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2013). Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. *BMC Plant Biol.* **13**: 15.

Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2004). The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* **16**: 1115–31.

Koo, J.C., Asurmendi, S., Bick, J., Woodford-Thomas, T., and Beachy, R.N. (2004). Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic Arabidopsis. *Plant J.* **37**: 439–448.

Kos, M., Houshyani, B., Overeem, A.-J., Bouwmeester, H.J., Weldegergis, B.T., van Loon, J.J. a, Dicke, M., and Vet, L.E.M. (2013). Genetic engineering of plant volatile terpenoids: effects on a herbivore, a predator and a parasitoid. *Pest Manag. Sci.* **69**: 302–11.

- Koyama, T.** (1999). Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1671–1676.
- Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K.** (1993). Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J. Biochem.* **113**: 355–63.
- Kribii, R., Arró, M., Del Arco, A., González, V., Balcells, L., Delourme, D., Ferrer, A., Karst, F., and Boronat, A.** (1997). Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase--involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *Eur. J. Biochem.* **249**: 61–9.
- Krieger-Liszak, A. and Trebst, A.** (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J. Exp. Bot.* **57**: 1677–84.
- Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrøm, C.T., Galbraith, D.W., Møller, B.L., and Bak, S.** (2005). Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 1779–84.
- Kumar, M.B., Fujimoto, T., Potter, D.W., Deng, Q., and Palli, S.R.** (2002). A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14710–5.
- Kuromori, T. and Shinozaki, K.** (2010). ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1124–1126.
- Lange, B.M. and Ahkami, A.** (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes--current status and future opportunities. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 169–96.
- Lange, B.M. and Croteau, R.** (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 13714–9.
- 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.
- Larbi, A., Abadía, A., Abadía, J., and Morales, F.** (2006). Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res.* **89**: 113–26.

Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Grisse, W., and Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 6866–71.

Learned, R.M. (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**: 645–55.

Learned, R.M. and 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**: 499–511.

Lee, S., Badieyan, S., Bevan, D.R., Herde, M., Gatz, C., and Tholl, D. (2010). Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 21205–10.

Leivar, P., Antolín-Llovera, M., Ferrero, S., Closa, M., Arró, M., Ferrer, A., Boronat, A., and Campos, N. (2011). Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *Plant Cell* **23**: 1494–511.

Leivar, P., González, V.M., 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 Physiol.* **137**: 57–69.

Li, C.P. and Larkins, B. a (1996). Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *Gene* **171**: 193–6.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: Pigments of Photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**: 350–382.

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., Schwender, J., Disch, A., and Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271–4.

Lindsey, K., Pullen, M.L., and Topping, J.F. (2003). Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends Plant Sci.* **8**: 521–5.

Lister, R., Gregory, B.D., and Ecker, J.R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 107–18.

Liu, C.J., Heinsteins, P., and Chen, X.Y. (1999). Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **12**: 1095–104.

Liu, Q., Majdi, M., Cankar, K., Goedbloed, M., Charnikhova, T., Verstappen, F.W.A., de Vos, R.C.H., Beekwilder, J., van der Krol, S., and Bouwmeester, H.J. (2011). Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* **6**: e23255.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* **25**: 402–408.

Loivamäki, M., Mumm, R., Dicke, M., and Schnitzler, J.-P. (2008). Isoprene interferes with the attraction of bodyguards by herbaceous plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 17430–5.

Loreto, F. and Schnitzler, J.-P. (2010). Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci.* **15**: 154–66.

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**: 541–9.

Lundquist, P.K., Poliakov, A., Giacomelli, L., Friso, G., Appel, M., McQuinn, R.P., Krasnoff, S.B., Rowland, E., Ponnala, L., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2013). Loss of plastoglobule kinases ABC1K1 and ABC1K3 causes conditional degreening, modified prenyl-lipids, and recruitment of the jasmonic acid pathway. *Plant Cell* **25**: 1818–39.

Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 1062–7.

Manzano, D. (2004). Estudio de la función reguladora de las enzimas farnesildifosfato sintasa y HMG-CoA reductasa en la vía del mevalonato en *Arabidopsis thaliana*.

Manzano, D., Busquets, A., Closa, M., Hoyerová, K., Schaller, H., Kamínek, M., Arró, M., and Ferrer, A. (2006). Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in *Arabidopsis* mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis. *Plant Mol. Biol.* **61**: 195–213.

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.

Marjanac, G., Karimi, M., Naudts, M., Beeckman, T., Depicker, A., and De Buck, S. (2009). Gene silencing induced by hairpin or inverted repeated sense transgenes varies among promoters and cell types. *New Phytol.* **184**: 851–64.

Marrero, P.F., Poulter, C.D., and Edwards, P. a (1992). Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 21873–8.

Martínez-Andújar, C., Ordiz, M.I., Huang, Z., Nonogaki, M., Beachy, R.N., and Nonogaki, H. (2011). Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 17225–9.

Masferrer, A., Arró, M., Manzano, D., Schaller, H., Fernández-Busquets, X., Moncaleán, P., Fernández, B., Cunillera, N., Boronat, A., and Ferrer, A. (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J.* **30**: 123–32.

McGarvey, D.J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015–26.

Melkonian, M., Robenek, H., and Steup, M. (1981). Occurrence and distribution of filipin-sterol complexes in chloroplast envelope membranes of algae and higher plants as visualized by freeze-fracture. *Protoplasma* **109**: 349–358.

Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.-D., Hartmann, M.-A., Moritz, T., and Grebe, M. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* **10**: 237–44.

Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 31–46.

Meynial Salles, I., Forchhammer, N., Croux, C., Girbal, L., and Soucaille, P. (2007). Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **9**: 152–9.

Mifsud, W. and Bateman, A. (2002). Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0068.

Mishiba, K., Nishihara, M., Nakatsuka, T., Abe, Y., Hirano, H., Yokoi, T., Kikuchi, A., and Yamamura, S. (2005). Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *Plant J.* **44**: 541–56.

Mishiba, K., Yamasaki, S., Nakatsuka, T., Abe, Y., Daimon, H., Oda, M., and Nishihara, M. (2010). Strict de novo methylation of the 35S enhancer sequence in gentian. *PLoS One* **5**: e9670.

Miziorko, H.M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **505**: 131–43.

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.

- Morales, F., Abadía, A., and Abadía, J.** (1990). Characterization of the Xanthophyll Cycle and Other Photosynthetic Pigment Changes Induced by Iron Deficiency in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **94**: 607–13.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**: 621–8.
- Mosquera, J.L. and Sánchez-Pla, A.** (2008). SerbGO: searching for the best GO tool. *Nucleic Acids Res.* **36**: W368–71.
- Mühlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., and Karpinski, S.** (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2339–56.
- Mumm, R. and Dicke, M.** (2010). Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defenseThe present review is one in the special series of reviews on animal–plant interactions. *Can. J. Zool.* **88**: 628–667.
- 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. *Planta* **216**: 345–350.
- Nagegowda, D. a** (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett.* **584**: 2965–73.
- Nagegowda, D.A., Gutensohn, M., Wilkerson, C.G., and Dudareva, N.** (2008). Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant J.* **55**: 224–39.
- Nechushtai, R. et al.** (2012). Characterization of Arabidopsis NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *Plant Cell* **24**: 2139–54.
- Newman, J.D. and Chappell, J.** (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 95–106.
- Nieto, B., Forés, O., Arró, M., and Ferrer, A.** (2009). Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry* **70**: 53–9.
- Nishio, J.N. and Terry, N.** (1983). Iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol.* **71**: 688–91.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A.** (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* **37**: W317–22.

Nouet, C., Motte, P., and Hanikenne, M. (2011). Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* **16**: 395–404.

Oh, S.K., Han, K.H., Ryu, S.B., and Kang, H. (2000). Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Implications in rubber biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 18482–8.

Ohyama, K., Suzuki, M., Masuda, K., Yoshida, S., and Muranaka, T. (2007). Chemical phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* mutants of *Arabidopsis* demonstrate the in-plant role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **55**: 1518–21.

Okada, K., Ohara, K., Yazaki, K., Nozaki, K., Uchida, N., Kawamukai, M., Nojiri, H., and Yamane, H. (2004). The *AtPPT1* gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **55**: 567–577.

Orita, I., Sakamoto, N., Kato, N., Yurimoto, H., and Sakai, Y. (2007). Bifunctional enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 439–45.

Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* **53**: 674–90.

Padidam, M., Gore, M., Lu, D.L., and Smirnova, O. (2003). Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgenic Res.* **12**: 101–9.

Pan, Z., Herickhoff, L., and Backhaus, R. a (1996). Cloning, characterization, and heterologous expression of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**: 196–204.

Phillips, M. a, D’Auria, J.C., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2008a). The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell* **20**: 677–96.

Phillips, M. a, León, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2008b). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* **13**: 619–23.

Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 237–43.

Pichersky, E., Sharkey, T.D., and Gershenzon, J. (2006). Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge? *Trends Plant Sci.* **11**: 421; author reply 422–3.

- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., and Lampi, A.-M.** (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 939–966.
- Van Poecke, R.M., Posthumus, M.A., and Dicke, M.** (2001). Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J. Chem. Ecol.* **27**: 1911–28.
- Van Poecke, R.M.P. and Dicke, M.** (2004). Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol. (Stuttg.)* **6**: 387–401.
- Pollier, J. et al.** (2013). The protein quality control system manages plant defence compound synthesis. *Nature* **504**: 148–52.
- Posé, D. and Botella, M.A.** (2009). Analysis of the *arabidopsis dry2/sqe1-5* mutant suggests a role for sterols in signaling. *Plant Signal. Behav.* **4**: 873–4.
- Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Tacconnat, L., Ferrer, A., Dolan, L., Valpuesta, V., and Botella, M. a** (2009). Identification of the *Arabidopsis dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J.* **59**: 63–76.
- Poulter, C.D. and Rilling, H.C.** (1976). Prenyltransferase: the mechanism of the reaction. *Biochemistry* **15**: 1079–1083.
- Pulido, P., Perello, C., and Rodriguez-Concepcion, M.** (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol. Plant* **5**: 964–967.
- Ramos-Valdivia, A.C., van der Heijden, R., and Verpoorte, R.** (1997). Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* **14**: 591–603.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.-F., Gaymard, F., and Cellier, F.** (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57**: 400–12.
- Rea, P. a** (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 347–75.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., and Reinbothe, S.** (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* **276**: 4666–81.
- Rodríguez-Celma, J., Pan, I.C., Li, W., Lan, P., Buckhout, T.J., and Schmidt, W.** (2013). The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Front. Plant Sci.* **4**: 276.

Rodríguez-Concepción, M. (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **504**: 118–22.

Rodríguez-Concepción, M. (2004). The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 2391–400.

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**: 1079–89.

Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Ferrer, A., and Boronat, A. (2013). Biosynthesis of isoprenoid precursors in Arabidopsis. In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches*, T.J. Bach and M. Rohmer, eds (Springer Science+Business Media: New York), pp. 439–456.

Rodríguez-concepción, M., Forés, O., Martínez-garcía, J.F., González, 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. **16**: 144–156.

Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 1158–1163.

Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C.A., Hecht, S., Zenk, M.H., and Bacher, A. (2000a). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6451–6.

Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., and Zenk, M.H. (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of Escherichia coli catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 11758–63.

Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Luttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M.H., and Bacher, A. (2000b). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8251–6.

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., and Arigoni, D. (2003). The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1586–91.

Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295** (Pt 2: 517–24.

Rowinsky, E.K. (1994). Update on the antitumor activity of paclitaxel in clinical trials. *Ann. Pharmacother.* **28**: S18–22.

Rynkiewicz, M.J., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 13543–8.

Sabde, S., Bodiwala, H.S., Karmase, A., Deshpande, P.J., Kaur, A., Ahmed, N., Chauthe, S.K., Brahmabhatt, K.G., Phadke, R.U., Mitra, D., Bhutani, K.K., and Singh, I.P. (2011). Anti-HIV activity of Indian medicinal plants. *J. Nat. Med.* **65**: 662–9.

Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., and Lomonossoff, G.P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* **7**: 682–93.

Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabès, F., Duffé, P., Giacalone, C., Thoraval, S., Escoffier, C., Herbette, G., Leonhardt, N., Causse, M., and Tissier, A. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell* **21**: 301–17.

Sanmiya, K., Iwasaki, T., Matsuoka, M., Miyao, M., and Yamamoto, N. (1997). Cloning of a cDNA that encodes farnesyl diphosphate synthase and the blue-light-induced expression of the corresponding gene in the leaves of rice plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1350**: 240–6.

Sanmiya, K., Ueno, O., Matsuoka, M., and Yamamoto, N. (1999). Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **40**: 348–54.

Sapir-Mir, M., Mett, A., Belausov, E., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Gidoni, D., and Eyal, Y. (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* **148**: 1219–28.

Sato, M., Sato, K., Nishikawa, S., Hirata, a, Kato, J., and Nakano, a (1999). The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 471–83.

Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 465–476.

Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* **42**: 163–75.

Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M.L., Tan, C.T., Song, Y.H., and Chua, N.H. (1995). Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in Sterol Overproduction. *Plant Physiol.* **109**: 761–770.

Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P., and Hörtensteiner, S. (2007). The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**: 5517–25.

Schenk, P.M., Carvalhais, L.C., and Kazan, K. (2012). Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol.* **30**: 177–84.

Schnee, C., Köllner, T.G., Held, M., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1129–34.

Schrack, K., Mayer, U., Horrichs, a, Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J., and Jürgens, G. (2000). FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* **14**: 1471–1484.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**: 3.

Schulbach, M.C., Brennan, P.J., and Crick, D.C. (2000). Identification of a short (C15) chain Z-isoprenyl diphosphate synthase and a homologous long (C50) chain isoprenyl diphosphate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 22876–81.

Schuler, I., Milon, A., Nakatani, Y., Ourisson, G., Albrecht, A.M., Benveniste, P., and Hartman, M.A. (1991). Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 6926–30.

Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Dev. Cell* **8**: 517–527.

Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., and Lichtenthaler, H.K. (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **455**: 140–4.

Seltmann, M.A., Stingl, N.E., Lautenschlaeger, J.K., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S. (2010). Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1940–50.

Seo, H.S., Koo, Y.J., Lim, J.Y., Song, J.T., Kim, C.H., Kim, J.K., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2000). Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate

synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2484–90.

Seo, Y.S., Kim, E.Y., Kim, J.H., and Kim, W.T. (2009). Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **583**: 2301–7.

Sessions, A. et al. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–94.

Sharon-Asa, L., Shalit, M., Frydman, A., Bar, E., Holland, D., Or, E., Lavi, U., Lewinsohn, E., and Eyal, Y. (2003). Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *Plant J.* **36**: 664–674.

Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998). Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases. *J. Biol. Chem.* **273**: 19476–81.

Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzyme.

Snoeren, T.A.L., Kappers, I.F., Broekgaarden, C., Mumm, R., Dicke, M., and Bouwmeester, H.J. (2010). Natural variation in herbivore-induced volatiles in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **61**: 3041–56.

Song, L. and Poulter, C.D. (1994). Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 3044–8.

Souret, F.F., Kim, Y., Wyslouzil, B.E., Wobbe, K.K., and Weathers, P.J. (2003). Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 653–67.

Souter, M., Topping, J., Pullen, M., Friml, J., Palme, K., Hackett, R., Grierson, D., and Lindsey, K. (2002). *hydra* Mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* **14**: 1017–1031.

Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., and Wasternack, C. (2012). ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *J. Exp. Bot.* **63**: 6125–38.

Stermer, B. a, Bianchini, G.M., and Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* **35**: 1133–40.

Streb, S. and Zeeman, S.C. (2012). Starch metabolism in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **10**: e0160.

Suzuki, M., Kamide, Y., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H., Masuda, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yoshida, S., 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. *Plant J.* **37**: 750–761.

Suzuki, M., Nakagawa, S., Kamide, Y., Kobayashi, K., Ohyama, K., Hashinokuchi, H., Kiuchi, R., Saito, K., Muranaka, T., and Nagata, N. (2009). Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J. Exp. Bot.* **60**: 2055–64.

Svoboda, J.A. and Weirich, G.F. (1995). Sterol metabolism in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*--a review. *Lipids* **30**: 263–7.

Szkopińska, A. and Płochocka, D. (2005). Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim. Pol.* **52**: 45–55.

Szmigielski, R., Cieslak, M., Rudziński, K.J., and Maciejewska, B. (2011). Identification of volatiles from *Pinus silvestris* attractive for *Monochamus galloprovincialis* using a SPME-GC/MS platform. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**: 2860–9.

Tang, J., Kobayashi, K., Suzuki, M., Matsumoto, S., and Muranaka, T. (2010). The mitochondrial PPR protein LOVASTATIN INSENSITIVE 1 plays regulatory roles in cytosolic and plastidial isoprenoid biosynthesis through RNA editing. *Plant J.* **61**: 456–66.

Tarshis, L.C., Proteau, P.J., Kellogg, B. a, Sacchettini, J.C., and Poulter, C.D. (1996). Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 15018–23.

Tarshis, L.C., Yan, M., Poulter, C.D., and Sacchettini, J.C. (1994). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **33**: 10871–7.

Terry, N. (1980). Limiting Factors in Photosynthesis: I. USE OF IRON STRESS TO CONTROL PHOTOCHEMICAL CAPACITY IN VIVO. *Plant Physiol.* **65**: 114–20.

Terry, N. and Abadia, J. (1986). Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* **9**: 609–646.

Thabet, I., Guirimand, G., Courdavault, V., Papon, N., Godet, S., Dutilleul, C., Bouzid, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., and Simkin, A.J. (2011). The subcellular localization of periwinkle farnesyl diphosphate synthase provides insight into the role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis. *J. Plant Physiol.* **168**: 2110–6.

Tharayil, N. (2009). To survive or to slay: Resource-foraging role of metabolites implicated in allelopathy. *Plant Signal. Behav.* **4**: 580–3.

Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 297–304.

Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* **42**: 757–71.

Tholl, D., Croteau, R., and Gershenzon, J. (2001). Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch. Biochem. Biophys.* **386**: 233–42.

Tholl, D. and Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* **9**: e0143.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**: 1187–1194.

Thulasiram, H. V., Erickson, H.K., and Poulter, C.D. (2007). Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science* **316**: 73–76.

Toyomasu, T., Tsukahara, M., Kaneko, A., Niida, R., Mitsunashi, W., Dairi, T., Kato, N., and Sassa, T. (2007). Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 3084–8.

Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* **31**: 46–53.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**: 511–5.

Tritsch, D., Hemmerlin, A., Bach, T.J., and Rohmer, M. (2010). Plant isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway: in vivo IPP/DMAPP ratio produced by (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures. *FEBS Lett.* **584**: 129–34.

Turlings, T.C.J. and Ton, J. (2006). Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 421–7.

Turner, J.G., Ellis, C., and Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14 Suppl**: S153–64.

- Unsicker, S.B., Kunert, G., and Gershenzon, J.** (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 479–85.
- Urbany, C., Benke, A., Marsian, J., Huettel, B., Reinhardt, R., and Stich, B.** (2013). Ups and downs of a transcriptional landscape shape iron deficiency associated chlorosis of the maize inbreds B73 and Mo17. *BMC Plant Biol.* **13**: 213.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.** (1996). Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* **111**: 589–595.
- Vasicek, E.M., Berkow, E.L., Flowers, S. a, Barker, K.S., and Rogers, P.D.** (2014). UPC2 is Universally Essential for Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.*
- Vickers, C.E., Bongers, M., Liu, Q., Delatte, T., and Bouwmeester, H.** (2014). Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant. Cell Environ.*: 1–75.
- Vickers, C.E., Gershenzon, J., Lerdau, M.T., and Loreto, F.** (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 283–91.
- Vijayaraj, P., Jashal, C.B., Vijayakumar, A., Rani, S.H., Venkata Rao, D.K., and Rajasekharan, R.** (2012). A bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and acyl hydrolase activities. *Plant Physiol.* **160**: 667–83.
- Vorwieger, A., Gryczka, C., Czihal, A., Douchkov, D., Tiedemann, J., Mock, H.-P., Jakoby, M., Weisshaar, B., Saalbach, I., and Bäumllein, H.** (2007). Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. *Planta* **226**: 147–58.
- Vranová, E., Coman, D., and Gruissem, W.** (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 665–700.
- Vranová, E., Coman, D., and Gruissem, W.** (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol. Plant* **5**: 318–33.
- Wagner, A.M. and Wagner, M.J.** (1995). Measurements of in Vivo Ubiquinone Reduction Levels in Plant Cells. *Plant Physiol.* **108**: 277–283.
- Wagner, K.-H. and Elmadfa, I.** (2003). Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metab.* **47**: 95–106.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., and Mauch, F.** (2002). Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* **49**: 515–32.
- WAKABAYASHI, K. and BOGER, P.** (2004). Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): Amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides. *Weed Biol. Manag.* **4**: 59–70.

- Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., Poppinga, L., and Majers, N.C.** (2001). Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* **212**: 460–5.
- Wang, H.-Y., Klatte, M., Jakoby, M., Bäumlein, H., Weisshaar, B., and Bauer, P.** (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 897–908.
- Wang, K.C. and Ohnuma, S.** (2000). Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**: 33–48.
- Wang, M.-B. and Metzloff, M.** (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 216–22.
- Wang, P., Liao, Z., Guo, L., Li, W., Chen, M., Pi, Y., Gong, Y., Sun, X., and Tang, K.** (2004). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding *Ginkgo biloba* farnesyl diphosphate synthase. *Mol. Cells* **18**: 150–6.
- Wang, Z. and Benning, C.** (2012). Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites. *Biochem. Soc. Trans.* **40**: 457–63.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 57–63.
- Ward, J. a, Ponnala, L., and Weber, C. a** (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am. J. Bot.* **99**: 267–76.
- Wasternack, C.** (2013). Action of jasmonates in plant stress responses and development--applied aspects. *Biotechnol. Adv.* **32**: 31–9.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681–97.
- Wasternack, C. and Kombrink, E.** (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* **5**: 63–77.
- Weir, T.L., Park, S.-W., and Vivanco, J.M.** (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 472–9.
- Wentzinger, L.F., Bach, T.J., and Hartmann, M.-A.** (2002). Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Plant Physiol.* **130**: 334–46.
- Wilkin, D.J., Kutsunai, S.Y., and Edwards, P.A.** (1990). Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by ph. *J. Biol. Chem.* **265**: 4607–14.

Wong, R.J., McCormack, D.K., and Russell, D.W. (1982). Plastid 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase has distinctive kinetic and regulatory features: properties of the enzyme and positive phytochrome control of activity in pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 631–8.

Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, R.B., Coates, R., and Chappell, J. (2006). Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1441–1447.

Xu, M., Wilderman, P.R., and Peters, R.J. (2007). Following evolution's lead to a single residue switch for diterpene synthase product outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 7397–401.

Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., and London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and cer. *J. Biol. Chem.* **276**: 33540–6.

Yamasaki, S., Oda, M., Daimon, H., Mitsukuri, K., Johkan, M., Nakatsuka, T., Nishihara, M., and Mishiba, K. (2011). Epigenetic modifications of the 35S promoter in cultured gentian cells. *Plant Sci.* **180**: 612–9.

Yang, L., Mercke, P., van Loon, J.J., FANG, Z., Dicke, M., and Jongsma, M.A. (2008). Expression in *Arabidopsis* of a Strawberry Linalool Synthase Gene Under the Control of the Inducible Potato PI2 Promoter. *Agric. Sci. China* **7**: 521–534.

Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* **2**: 137–143.

Yu, X.-D., Pickett, J., Ma, Y.-Z., Bruce, T., Napier, J., Jones, H.D., and Xia, L.-Q. (2012). Metabolic engineering of plant-derived (E)- β -farnesene synthase genes for a novel type of aphid-resistant genetically modified crop plants. *J. Integr. Plant Biol.* **54**: 282–99.

Zhang, H. and Zhou, C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **82**: 539–45.

Zhang, W., He, S.Y., and Assmann, S.M. (2008). The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J.* **56**: 984–96.

Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B.A., and Assmann, S.M. (2008). Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* **20**: 3210–26.

PUBLICACIONES

Characterization of Arabidopsis FPS Isozymes and *FPS* Gene Expression Analysis Provide Insight into the Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Seeds

Verónica Keim^{1,2}, David Manzano^{1,2}, Francisco J. Fernández³, Marta Closa², Paola Andrade^{1,2}, Daniel Caudepón^{1,2}, Cristina Bortolotti^{1,2}, M. Cristina Vega³, Montserrat Arró^{1,2}, Albert Ferrer^{1,2*}

1 Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain, **2** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Department of Structural and Quantitative Biology, Centre for Biological Research (CIB-CSIC), Madrid, Spain

Abstract

Arabidopsis thaliana contains two genes encoding farnesyl diphosphate (FPP) synthase (FPS), the prenyl diphosphate synthase that catalyzes the synthesis of FPP from isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In this study, we provide evidence that the two Arabidopsis short FPS isozymes FPS1S and FPS2 localize to the cytosol. Both enzymes were expressed in *E. coli*, purified and biochemically characterized. Despite FPS1S and FPS2 share more than 90% amino acid sequence identity, FPS2 was found to be more efficient as a catalyst, more sensitive to the inhibitory effect of NaCl, and more resistant to thermal inactivation than FPS1S. Homology modelling for FPS1S and FPS2 and analysis of the amino acid differences between the two enzymes revealed an increase in surface polarity and a greater capacity to form surface salt bridges of FPS2 compared to FPS1S. These factors most likely account for the enhanced thermostability of FPS2. Expression analysis of *FPS::GUS* genes in seeds showed that *FPS1* and *FPS2* display complementary patterns of expression particularly at late stages of seed development, which suggests that Arabidopsis seeds have two spatially segregated sources of FPP. Functional complementation studies of the Arabidopsis *fps2* knockout mutant seed phenotypes demonstrated that under normal conditions FPS1S and FPS2 are functionally interchangeable. A putative role for FPS2 in maintaining seed germination capacity under adverse environmental conditions is discussed.

Citation: Keim V, Manzano D, Fernández FJ, Closa M, Andrade P, et al. (2012) Characterization of Arabidopsis FPS Isozymes and *FPS* Gene Expression Analysis Provide Insight into the Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Seeds. PLoS ONE 7(11): e49109. doi:10.1371/journal.pone.0049109

Editor: Joshua L. Heazlewood, Lawrence Berkeley National Laboratory, United States of America

Received: June 5, 2012; **Accepted:** October 7, 2012; **Published:** November 7, 2012

Copyright: © 2012 Keim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (cofinanced by the European Regional Development Fund) (BIO2009-06984 and CSD2007-00036 to A.F., and PET2008_0101 and BFU2010-22260-C02-02 to M.C.V.), the Generalitat de Catalunya (SGR-00914 to A.F.), and the European Commission Framework Programme 7 (FP7 Project ComplexINC No. 279039 to M.C.V.) The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: albertferrer@ub.edu

These authors contributed equally to this work.

Introduction

All isoprenoids are derived from the C₅ building blocks isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, IPP and DMAPP are synthesized via two independent pathways: the mevalonic acid (MVA) pathway in the cytosol [1] and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway in the plastids [2]. IPP and DMAPP are subsequently used as substrates by distinct short-chain prenyl diphosphate synthases that catalyze the head-to-tail condensation of one molecule of DMAPP with one, two or three IPP units to produce geranyl diphosphate (GPP; C₁₀), farnesyl diphosphate (FPP; C₁₅) and geranylgeranyl diphosphate (GGPP; C₂₀), respectively [3], [4]. Pathway specialized branches starting from these prenyl diphosphates lead ultimately to the production of the astonishing number of isoprenoid end products synthesized by plants. GPP serves as a precursor for monoterpenoids, GGPP is a precursor of diterpenoids, gibberellins, carotenoids and abscisic acid, side chains of chlorophyll, phylloquinone, plastoquinone and tocopherols, and geranylgeranylated proteins, and FPP serves as a

precursor for sesquiterpenoids, sterols, brassinosteroids, triterpenoids, polyprenols, side chains of ubiquinone, and farnesylated proteins [5]. It is generally accepted that the intracellular levels of these prenyl diphosphates and their precursors IPP and DMAPP must be strictly controlled to avoid deleterious effects on the metabolic flux through the pathway branches competing for these intermediates [6]. Indeed, overexpression of FPP synthase (FPS) in Arabidopsis [7], [8], [9] and phytoene synthase in tomato [10] results in altered levels of specialized isoprenoid end products that negatively affect plant performance.

Plants contain small FPS (EC 2.5.1.1/EC 2.5.1.10) isozyme families [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18]. This, together with the key position of FPP at a node of the isoprenoid pathway to which many branches leading to mitochondrial and cytosolic isoprenoids are connected [19], [20], has fuelled interest in deciphering the role of individual FPS isozymes in the isoprenoid pathway. Arabidopsis contains two genes, *FPS1* (At5g47770) and *FPS2* (At4g17190), encoding three FPS isozymes: FPS1L, FPS1S and FPS2. The *FPS1* gene encodes FPS1S and FPS1L, which

differ only by an N-terminal extension of 41 amino acid residues that targets FPS1L into mitochondria [10], [13] whereas the *FPS2* gene encodes FPS2 that shares 90.6% amino acid identity with FPS1 isoforms [12]. Although the intracellular localization of Arabidopsis FPS1S and FPS2 remains to be experimentally established, both isoforms are predicted to localize in the cytosol since they do not bear any obvious subcellular targeting signal [12]. However, the possibility that one or both Arabidopsis short FPS isoforms might reside in a different compartment cannot be excluded. In fact, a *Catharanthus roseus* short FPS lacking a canonical peroxisomal targeting sequence partially localizes to the peroxisomes of *C. roseus* cells [21]. This observation would support the hypothesis for a partial localization of the early steps of the plant isoprenoid pathway in peroxisomes [22], [23] as reported to occur in mammals [24].

Studies in transgenic Arabidopsis expressing chimeric *FPS::GUS* genes [25] and analysis of microarray expression data [26] have shown that *FPS* genes are expressed in all organs throughout plant development, albeit at greatly different levels. *FPS1* is widely expressed in all tissues throughout plant development whereas expression of *FPS2* is mainly concentrated in floral organs, seeds and the early stages of seedling development. Characterization of Arabidopsis *fps1* and *fps2* single knockout mutants demonstrated that a single functional *FPS* gene is enough to sustain normal plant growth and development, thereby indicating that *FPS1* and *FPS2* can almost fully complement each other. However, simultaneous knockout of both *FPS* genes is embryo-lethal and severely impairs male genetic transmission [26]. Thus, the small Arabidopsis *FPS* gene family seemingly constitutes a redundant two-locus genetic network in which as long as one gene functions, no noticeable loss of plant fitness occurs. Nevertheless, *FPS1* and *FPS2* functions are not completely redundant. FPS activity measurements and analysis of sterol and ubiquinone levels, the major cytosolic and mitochondrial FPP-derived isoprenoids, have shown that FPS1S has a major role during most of the plant life cycle, whereas FPS2 has a predominant role in seeds and during the early stages of seedling development. In fact, FPS2 is by far the major contributor to total FPS activity in mature seeds, though shortly after germination FPS1 replaces FPS2 as the major provider of FPS activity. Hence, lack of FPS2, but not of FPS1, leads to a marked reduction of sitosterol content in mature seeds concomitant to a positive feedback regulatory response of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), the enzyme that catalyzes the main regulatory step in the MVA pathway and downstream isoprenoid pathways [27]. The elevated levels of HMGR activity become essential to sustaining a flux through the isoprenoid pathway that is high enough to produce sufficient sterols and likely other isoprenoids needed for normal seed viability, as revealed by the hypersensitivity of *fps2* mutant seeds to the HMGR inhibitor mevastatin [26]. Correct quantitative and qualitative sterol composition is essential for proper seed development and viability, not only because sterols have well established roles in maintaining membrane structure and function [28] and as precursors of brassinosteroids [29], but also because they are involved in signalling pathways that are essential for normal embryogenesis [30], [31].

Biochemical characterization of individual FPS isoforms can also greatly contribute to the understanding of their physiological functions. So far, studies on the biochemical properties of plant FPSs have been conducted in a very limited number of species using purified native [32], [33] and recombinant [18], [34] enzyme preparations and, to the best of our knowledge, a comparative biochemical analysis between individual members of FPS isoform families has only been reported in *Artemisia tridentata*. This plant contains two FPS isoforms that share 83% of amino

acid identity. In spite of this, FDS-1 and FDS-2 exhibit different functional properties, which led the authors to propose specific cellular functions for each of the two isoforms [18]. In the present study, we report the results of a detailed functional and structural characterization of the two Arabidopsis short FPS isoforms FPS1S and FPS2. We also expand our previous *FPS* gene expression analysis [25] by establishing the spatial and temporal pattern of expression of the *FPS* genes during seed development, and present the results of functional complementation studies of the *fps2* single knockout mutant phenotypes [26] with chimeric *FPS* gene constructs. Altogether, findings reported herein provide new clues to understand the biological role of FPS isoforms in Arabidopsis.

Materials and Methods

Chemicals

Unlabelled IPP, DMAPP, GPP and FPP were purchased from Echelon Biosciences and [4-¹⁴C]IPP (60 mCi/mmol) was from GE Healthcare Life Sciences. Mevastatin (Calbiochem, www.merck-chemicals.com) was dissolved in EtOH to prepare a 5 mM stock solution.

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana wild-type (ecotype Col-3 *qrt1/qrt1*) and *fps2* mutant plants were grown *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa, <http://www.duchefa.com>) solidified using 0.8% w/v agar, or *in vivo* on soil in a climate-controlled growth chamber, under long-day conditions (16 h light/8 h dark) at 22°C. When required, MS medium was supplemented with 1 μM mevastatin.

Heterologous Expression of GST-FPS1S and GST-FPS2 in *E. coli* and Recombinant Protein Purification

Arabidopsis FPS proteins were expressed as N-terminal GST fusion proteins using a modified version of pGEX-3X plasmid (Pharmacia Biotech). The polylinker of pGEX-3X was modified by introducing a *NotI* restriction site upstream from the *BamHI* site that allows to obtain native proteins having an N-terminal end without extra residues after cleavage with Factor Xa protease [35]. The cDNAs coding for FPS1S and FPS2 were amplified by PCR using, respectively, the forward primers 5'-**ATGGAGACC**-GATCTCAAGTCAACC-3' and 5'-**ATGGCGGATCT**-GAAATCAACC-3', the common reverse primer 5'-CGCGGATCC**CTACTTCTGCCTCTTGTAG**-3' (translation start and stop codons are shown in bold, and *BamHI* restriction site is underlined) and plasmids pcNC3 [13] and pcNC2 [12] as templates, respectively. The resulting PCR products were digested with *BamHI*, phosphorylated with T4 Polynucleotide kinase (Promega) and cloned into the *NotI* (blunt ended by nuclease S1 treatment) and *BamHI* restriction sites of the modified pGEX-3X, yielding plasmids pGEX-3X-NotI-FPS1 and pGEX-3X-NotI-FPS2. These expression plasmids were transformed into the *E. coli* strain BL21 (DE3), harbouring pUBS520 encoding *E. coli* tRNA^{Arg} AGA/AGG [36], and transformed cells were grown overnight on LB plates supplemented with ampicillin (100 μg/mL). Plasmids were isolated from overnight cultures and their sequences were verified. To express the recombinant proteins, 30 mL of LB medium supplemented with ampicillin (100 μg/mL) and kanamycin (50 μg/mL) was inoculated with 0.5 mL of an overnight culture of BL21 (DE3) cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 or pGEX-3X-NotI-FPS2 and grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.5–0.6. After induction with 0.4 mM isopropyl thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) the cultures were shifted to 20°C and incubated for 16 additional hours at 200 rpm. *E. coli* cells were

collected by centrifugation at 7,000 *g* for 5 min at 4°C, resuspended in 3 mL of PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5) and disrupted by sonication (0.5 min/mL suspension) while being chilled in a -10°C bath. Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 *g* for 30 min at 4°C, and the resulting supernatant was loaded onto a 1 mL Glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography column (GE Healthcare) pre-equilibrated with PBS. All procedures for enzyme purification were performed at 4°C unless otherwise indicated. The column was washed with a minimum volume of 10 mL of PBS and re-equilibrated with Factor Xa cleavage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂). GST-FPS fusion proteins were digested by adding to the column 40U of Factor Xa (Amersham Biosciences) in cleavage buffer to the column. After overnight incubation at 20–22°C the resulting native FPS proteins were eluted with cleavage buffer. Fractions of 250 µL were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE [37] after a quick estimation of protein concentration with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fractions enriched in FPS protein were pooled and the remaining Factor Xa protease was removed by treatment with Factor Xa removal resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Glycerol was then added to a final concentration of 15% (v/v) and samples were stored frozen at -80°C. The purity of each FPS preparation was checked by SDS-PAGE. Protein concentration was determined by the method of Lowry [38] using BSA as a standard.

FPS Enzyme Activity Assay and Kinetic Studies

FPS activity of purified recombinant FPS isoforms was measured in a total volume of 100 µL containing 30 mM PIPES (pH 7.0), 6 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 150 mM sucrose, 10 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL E64, 1 µg/mL pepstatin, 0.35 mM PMSF, 0.30 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 100 µM [¹⁴C]IPP (6.97 µCi/µmol), 100 µM GPP and the appropriate amount of enzyme (between 10 and 40 ng). The reaction was initiated by the addition of the substrates after preincubation of the enzyme for 5 min at 37°C. The reaction was carried out at 37°C for 15 min and terminated by the addition of 585 µL of 2 M HCl pre-chilled at 0°C. Solid NaCl was added to saturation and the reaction products were acid hydrolysed by incubation for 30 min at 37°C. The mixture was extracted with 1 mL of *n*-hexane and the radioactivity in 500 µL of the hexanic phase was quantified by liquid scintillation counting. To measure FPS activity in extracts from plant tissues, shoots (between 200 and 250 mg) or seeds (between 25 and 40 mg) were mixed with extraction buffer (2 µL per mg of seedlings and 20 µL per mg of seeds) containing 50 mM PIPES, pH 7.0, 250 mM sucrose, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 15 µg/mL aprotinin, 3 µg/mL E64, 1.5 µg/mL pepstatin, and 0.5 mM PMSF pre-chilled at 4°C and ground to a fine powder with mortar and pestle. The slurry was centrifuged at 200 *g* for 10 min at 4°C to remove cell debris and the resulting supernatant was collected and centrifuged again at 16,000 *g* for 20 min at 4°C. The supernatant was recovered and FPS activity (between 100 and 200 µg of protein) was assayed for 30 min at 37°C as described above. One unit of FPS is defined as the amount of enzyme that incorporates one nanomol of IPP into acid-labile products per minute and mg of protein at 37°C.

For pH dependence analysis, enzyme activity assays were carried out using MES (5.5, 6.0), PIPES (6.5, 7.0) and Tris-HCl (7.5, 8.0, 8.5, 9.0). The apparent *K_m* values for the substrates IPP, DMAPP and GPP were calculated from Lineweaver-Burk plots of FPS activity. The *K_m* values for DMAPP and GPP were determined with substrate concentrations in the range of 6.25 to 200 µM with a fixed IPP concentration of 100 µM. The *K_m* value

for IPP was determined with concentrations in the range between 1 to 100 µM and a fixed DMAPP concentration of 200 µM. A nonlinear regression analysis in Sigma Plot 7.0 was used to calculate the kinetic parameters.

Determination of HMGR Enzyme Activity and Sitosterol Content in Seeds

For HMGR activity measurements, seeds (50 mg) were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder with mortar and pestle, and mixed with 0.4 mL of pre-chilled extraction buffer (40 mM sodium phosphate, pH 7.5, 100 mM sucrose, 30 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL E64, 0.5 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 0.5 mM PMSF and 0.25% (w/v) Triton X-100). The slurry was centrifuged at 200 *g* for 10 min at 4°C to remove cell debris and HMGR activity was immediately measured in the supernatant as previously described [39]. One unit of HMGR activity is defined as the amount of enzyme that converts one picomol of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A into MVA per min and mg of protein at 37°C. Sitosterol levels in seeds were analyzed by GC-MS as previously described [26].

Western Blot Analysis

Aliquots (40–50 µg of protein) of the same seed extracts used for FPS activity measurements (16,000 *g* supernatant) were fractionated by 10% SDS-PAGE and electrotransferred onto Hybond-P polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) at a constant intensity of 125 mA for 3 h at 4°C. The membrane was blocked in PBS pH 7.5, 0.5% (v/v) Tween 20 and 5% (v/v) Blotto non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology inc.) for 16 h at 4°C, and incubated with rabbit polyclonal anti-FPS1S antibody [8] (1:8000 dilution in blocking solution) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (Amersham) (1:60000 dilution in blocking solution) for 1 h at room temperature. The FPS1S-antibody complex was visualized using the ECL Advance Western blotting system (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Protein loading was assessed by Coomassie blue staining of the membranes.

Differential Scanning Fluorimetry

The difference in thermal stability between FPS1S and FPS2 was analyzed by differential scanning fluorimetry (DSF) [40]. In brief, 20 µL reactions were set up on a 96-well thin-wall plate (Bio-Rad) containing 3–14 µM each protein in assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 15% (v/v) glycerol and 5× Sypro Orange (Invitrogen)). Assay buffer was added instead of protein in the control samples. The plates were sealed with optical-quality sealing tape (Bio-Rad) and heated on a iQ5 Real Time (RT)-PCR instrument (Bio-Rad) from 20–80°C in increments of 0.2°C. Fluorescence was monitored with a charge-coupled device (CCD) camera using 490 and 575 nm as emission and excitation wavelengths, respectively. The mid-point temperature of the unfolding transition or melting temperature (*T_m*) was calculated by fitting a Boltzmann model to the fluorescence imaging data after eliminating data beyond the fluorescence intensity maximum.

Homology Modelling

To construct homology models of Arabidopsis FPS1S and FPS2 that could be directly comparable with respect to their sequence differences, we chose as template the crystal structure of unliganded human FPS (PDB 2F7M) [41]. The sequence identity

of human FPS and FPS1S was 45% over 99% of its length (339 out of 343 amino acids) and between human FPS and FPS2 was 46% over 99% of its length (338 out of 342 amino acids). The phosphate ion and the four water molecules found in the active site of FPS in this structure were kept to maintain a stable conformation of the active site loops during modelling. First, we threaded the correct FPS1S and FPS2 sequences onto the template structure using Modeller 9.10 [42] and then selected the 10 best models out of 1000 independent models on the basis of the Z-DOPE normalized scores, which ranged from -1.916 to -1.337 for FPS1S and from -1.949 to -1.529 for FPS2 (a Z-DOPE of less than -1 indicates a plausible model with 80% of the C α atoms lying within 3.5 Å of their correct positions). Next, the top ten models for each protein were refined and minimized using the Rosetta force field and Monte Carlo sampling methods [43], [44] and the improved models were clustered and analyzed to obtain a final model. The final models for FPS1S and FPS2 showed correct stereochemistry as assessed by MolProbity [45].

In Silico Evaluation of Free Energy and Structure Changes Upon Mutation

Free energy (*DDG*) and structure changes upon mutation were calculated using two established methods, the Rosetta *DDG* application [46] and the publicly available CC/PBSA web server (<http://ccpbsa.biologie.uni-erlangen.de/ccpbsa/>) [47]. The changes in stability predicted by the two independent calculations were analyzed in the context of the predicted structural changes. The Rosetta *DDG* protocol corresponds to row 16 of a recent benchmarking study [46]. Row 16 protocol first repacks all residues according to Rosetta standard sidechain sampling procedures while keeping the backbone fixed, and then minimizes all backbone and sidechain degrees of freedom. Energies are calculated for 50 wild-type and mutant sequence contexts and the predicted *DDG* is the difference in the free energy between the mutant and wild-type protein. The CC/PBSA method is accessed via a web interface where the coordinates are submitted along with a string describing the desired mutation. In a nutshell, the CC/PBSA method generates two random conformational ensembles each one of them consisting of 300 wild-type and mutant minimized structures for which energies are evaluated using a custom energy function. Those energy contributions are scaled to reproduce experimentally measured free energies using five-fold cross validation.

Gene Constructs for Mutant Complementation

To construct plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S, a 1388-bp fragment including 1329 bp of the *FPS2* gene promoter, the 5' untranslated region and the ATG translation start codon, was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GCGTCGACAGCTTGGAGCATAAGAAG-3' and reverse primer 5'-TCCGCCATGGATAGGATCAAGG-3'. A *SaI* restriction site was added at the 5' end of forward primer and an *NcoI* site encompassing the ATG start codon of FPS2 was created in the reverse primer by introducing a G (shown in bold) instead of a C. A 2353-bp fragment including the region encoding FPS1S and 339 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-AGCTCTTCCATGGAGACCGATC-3' and reverse primer 5'-TTGGAGCTCTTTTGAATGGAATGTAGG-3'. An *NcoI* restriction site encompassing the ATG start codon of FPS1S was created by introducing a C (shown in bold) instead of a G in the forward primer and a *SacI* restriction site was added at the 5' end of reverse primer. Both genomic fragments were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), excised by digestion with either

SaI and *NcoI* or *NcoI* and *SacI*, and cloned into the *SaI* and *SacI* sites of pBluescript KS⁺ in a three-piece ligation yielding pBFPS2p::FPS1S. The entire FPS2p::FPS1S fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA2300 yielding plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S.

To create plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S-mutdis, a 1375-bp fragment including 1329 bp of the *FPS2* gene promoter was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GCGTCGACAGCTTGGAGCATAAGAAG-3' and reverse primer 5'-CCCAAGCTTGATAGGATCAAGGAAGGTGT-3'. Restriction sites for *SaI* and *HindIII* (underlined) were added at the 5' end of forward and reverse primers, respectively. The amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy vector yielding pGEM-FPS2p. A 2472-bp fragment including the entire coding region of the *FPS1* gene and 339 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GGGATATCAGTGTGAGTTGTTGTTGT-3' and reverse primer 5'-TTGGAGCTCTTTTGAATGGAATGTAGG-3'. Restriction sites for *EcoRV* and *SacI* (underlined) were added at the 5' end of forward and reverse primers, respectively. In the forward primer the third base of the ATG codon corresponding to the translation start codon of FPS1L isoform was changed to C (shown in bold). The amplified fragment was cloned into the *EcoRV* and *SacI* sites of pBluescript SK⁺ yielding pBFPS1S-mutdis. The *FPS1* gene fragment was then excised from pBFPS1S-mutdis with *EcoRV* and *SacI* and cloned into plasmid pGEM-FPS2p, which had been previously digested with *HindIII*, treated with nuclease S1 to produce blunt ends and digested again with *SacI* (in the pGEM-T polylinker) yielding pGEM-FPS2p::FPS1S-mutdis. The entire FPS2p::FPS1S-mutdis fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA2300 yielding plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S-mutdis.

To construct plasmid pCAM-FPS1p::FPS2, a 1526-bp fragment including 1338 bp of the *FPS1* gene promoter and 185 bp of the 5' leader region up to the ATG translation start codon of FPS1S was amplified by PCR using DNA from genomic clone pgNC241 as a template [12], forward primer 5'-GCGTCGACATAGTAGTTAATGTTGGGG-3' and reverse primer 5'-TCTCCATGGAAGAGCTTTGGATACG-3'. A *SaI* site was added at the 5' end of forward primer and an *NcoI* site encompassing the ATG start codon of FPS1S was created by introducing a G (shown in bold) instead of a T in the reverse primer. A 2553-bp fragment including the entire coding region of the *FPS2* gene and 438 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GATCCTATCCATGGCGGATCTG-3' and reverse primer 5'-AGCGAGCTCATTCCACTAATCTTCTCG-3'. An *NcoI* restriction site encompassing the ATG start codon of FPS2 was created by introducing a C (shown in bold) instead of an A in the forward primer. A *SacI* restriction site was added at the 5' end of reverse primer. Both genomic fragments were cloned into pGEM-T Easy vector, excised by digestion with either *SaI* and *NcoI* or *NcoI* and *SacI*, and cloned into the *SaI* and *SacI* sites of pBluescript KS⁺ in a three-piece ligation yielding pBFPS1p::FPS2. The entire FPS1p::FPS2 fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA1300-T-Nos yielding plasmid pCAM-FPS1p::FPS2. Plasmid pCAMBIA1300-T-Nos was generated by introducing the T-Nos sequence from pBI221 into the *SacI* and *EcoRI* sites of pCAMBIA1300.

To create plasmid pCAM-FPS1mutdisp::FPS2, a 1526-bp fragment of the *FPS1* flanking region was amplified by PCR using as a template a chimeric translational *FPS1S::GUS* gene fusion in which the ATG start codon of FPS1L had been converted to an

ATC codon by site directed mutagenesis [25] and the same forward and reverse primers used to construct pCAM-FPS1p::FPS2. The amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy yielding pGEM-FPS1mutdisp. The *FPS1* gene fragment was then excised with *SaI* and *NcoI* and cloned into pBFPS1p::FPS2 to replace the corresponding non-mutated region of *FPS1* promoter, yielding plasmid pBFPS1mutdisp::FPS2. The entire pBFPS1mutdisp::FPS2 fragment was then excised with *SaI* and *SacI* and cloned into pCambia1300-T-Nos yielding plasmid pCAM-FPS1mutdisp::FPS2.

All PCR fragments used to construct plasmids described above were sequenced to exclude amplification artifacts. The correct fusion of the genomic fragments was also confirmed by sequencing.

Plant Transformation and Transgene Expression Analysis

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 harbouring plasmids described above was used to transform Arabidopsis *fps2-1* mutant plants by the floral dip method [48]. Seeds from infiltrated plants were surface sterilized and sown in Petri dishes containing solid MS medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin. Antibiotic-resistant seedlings (T₁) were transplanted into soil and grown to maturity. Lines homozygous for the transgenes containing a single insertion were selected by segregation analysis of the kanamycin resistance trait.

To analyze the expression of the transgenes introduced into the *fps2-1* mutant, total RNA was isolated from 12-days-old seedlings from *fps2-1* lines harbouring *FPS2p::FPS1S*, *FPS2p::FPS1-mutdis*, *FPS1p::FPS2*, or *FPS1mutdisp::FPS2*. Total RNA (1.5 µg) was treated with DNase (Ambion) and single-stranded cDNA pools were synthesized using oligo-dT primer and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to standard protocols. PCR reactions were carried out by 35 cycles of amplification (45 s at 94°C, 60 s at 50°C and 90 s at 72°C with a 5 min final extension at 72°C) using as template 7.5 µL of a 1:10 dilution of the corresponding single-stranded cDNA pools and 1 unit of Taq polymerase (Biotools). Primers 5'-GGCTTTGCA-CACCTTCCTTG-3' and 5'-CCTGTGGATGTGATTGC-GAAG-3' were used for expression analysis of *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1-mutdis* genes, and primers 5'-GGTGGGAGTCTC-TATCGTCGTCGTATCCAA-3' and 5'-CGGAGAGGCCG-GAGTATG-3' were used for expression analysis of *FPS1p::FPS2* and *FPS1mutdisp::FPS2* genes. The expression of the *ACT2* (At3g18780) gene was analyzed using primers 5'-GATCTGG-CATCACACTTTCTAC-3' and 5'-GCCTTGGAGATCCA-CATCTGCTG-3'. The expression of the *PP2AA3* (At1g13320) gene encoding the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A) was analyzed using primers 5'-TAACGTGGC-CAAATGATGC-3' and 5'-GAAGCCAACATTAACATTAG-TAGC-3'.

GUS Assay in Arabidopsis Seeds

Siliques were harvested, opened longitudinally, placed in GUS assay buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 0.2% (v/v) Triton X-100, 20 mM X-Gluc and 2 mM potassium ferricyanide) and subjected to vacuum for 10 min. After incubation for 24 hours at 37°C, siliques were placed in ethanol:acetic acid (1:1) and incubated for either 4 hours (young seeds with embryos at the globular and heart stages) or 8 hours (mature seeds with embryos at torpedo and cotyledon stages). GUS-stained seeds were cleared in Hoyer's medium for 3–4 days in darkness [49]. Dissected seeds were placed on a slide covered with a coverslip, stored in darkness for 24 hours and observed under a Zeiss Axiophot microscope equipped with Nomarski optics. Photographs were taken using the same microscope equipped with an Olympus DP70 photo camera.

Expression of GFP-FPS1S, GFP-FPS2, FPS1S-GFP and FPS2-GFP in Agroinfiltrated Leaves of *N. benthamiana* Plants

The FPS1S coding sequence (1029 bp) was amplified by PCR using forward primer 5'-ACGCGTGCACAATGGAGACC-GATCTCAAGTCAACC-3', reverse primer 5'-CTGTGCA-TATCCCTTCTGCCTCTTGTAGATCTTAGC-3' and plasmid pcNC3 [13] as a template. The sequence coding for FPS2 (1039 bp) was amplified using forward primer 5'-ACGCGTGCACAATGGCGGATCTGAAATCAACCTTC-3', reverse primer 5'-GAGTATGATATCCCTTCTGCCTCTTGTAGATCT-TAGC-3' and plasmid pcNC2 [12] as a template. Translational start codons are shown in bold. *SaI* and *EcoRV* restriction sites (underlined) were added at the 5' end of the forward and reverse primers, respectively. The amplified fragments were cloned into the corresponding sites of plasmid pENTR3C (Gateway[®], Invitrogen) yielding plasmids pENTR-FPS1S and pENTR-FPS2. Both cDNA fragments were subsequently transferred from pENTR-FPS1S and pENTR-FPS2 to pMDC43 and pMDC83 (Gateway[®], Invitrogen) yielding plasmids pMDC43FPS1S, pMDC43FPS2, pMDC83FPS1S and pMDC83FPS2, in which the FPS coding sequences were fused in-frame to the 5'- or 3'-ends of the green fluorescent protein (GFP) coding sequence. In all cases the coding sequences were under the transcriptional control of the CaMV35S gene promoter. All constructs were sequenced to confirm the in-frame fusions. Plasmids coding for the different protein fusions were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The recombinant *A. tumefaciens* strains were grown overnight at 28°C in YEB liquid medium supplemented with 100 µg/mL rifampicine and 25 µg/mL kanamycin. Cells were harvested by centrifugation and resuspended to an OD₆₀₀ of 0.150 in a solution containing 10 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 5.6, and 200 µM acetosyringone (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone). Prior infiltration, bacterial suspensions were incubated at room temperature for 3 h. For co-expression experiments, suspensions of *A. tumefaciens* harbouring the FPS-GFP expression constructs were mixed with *A. tumefaciens* cultures harbouring constructs for expression of the cyan fluorescent protein (CFP)-peroxisome marker (CFP-SKL) [50] and the tobacco etch polytivirus helper component protein (HC-Pro) silencing suppressor [51] in a 1:1:1 ratio. Leaves of 2–4 week old *N. benthamiana* plants were infiltrated by gently appressing a 2-ml syringe without a needle to the abaxial surface of fully expanded leaves. Following a 2–3 day incubation of infiltrated plants under long-day conditions at 25°C and 60% humidity, abaxial epidermis of leaf tissue was examined by confocal laser-scanning microscopy using a Leica SP5 microscope (Leica Microsystems). GFP and CFP were excited by using 488 and 458 laser lines, respectively. Images were acquired sequentially to avoid crosstalk between channels. LAS-AF Lite 2.6.0 software was used for image capture and for merging false-coloured images of transiently co-transformed cells.

Results

Biochemical Characterization of Recombinant FPS1S and FPS2 Isozymes

Arabidopsis FPS1S and FPS2 isozymes were expressed in *E. coli* as soluble N-terminal GST fusions (Figure 1A). The resulting recombinant proteins were purified through Glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography, digested with Factor Xa protease to release native FPS1S and FPS2 enzymes, and further purified to remove both the excised GST moiety and Factor Xa protease. SDS-PAGE analysis showed that this purification procedure

yielded highly purified preparations of both enzymes (Figure 1B) that were used for biochemical characterization.

Prenyltransferases are known to require a divalent metal ion for catalytic activity. Thus, we first analyzed the effect of different Mg^{2+} concentrations on FPS1S and FPS2 activity. Similar values of activity were obtained when the enzyme activity was measured in the presence of $MgCl_2$ concentrations ranging between 1 and 5 mM (data not shown). The optimal pH range for FPS1S and FPS2 was also determined. Both enzymes showed a similar pH-rate profile with only minor differences (Figure 2A). Maximal activity for both enzymes was observed at a pH value of 7.0, albeit the pH-rate profile of FPS1S was slightly shifted toward more acidic pH values compared to FPS2. We next investigated the effect of NaCl on the activity of FPS1S and FPS2 using concentrations in the range from 0 to 2 M. As shown in Figure 2B, the activity of both enzymes progressively declined as the concentration of NaCl increased, though in the case of FPS1S this effect was observed only at NaCl concentrations higher than 0.5 M. At all NaCl concentrations tested, FPS2 was markedly more sensitive to the inhibitory effect of NaCl than FPS1S. Purified FPS1S and FPS2 were also subjected to kinetic analyses and the resulting steady-state kinetic constants are shown in Table 1. Both enzymes displayed typical Michaelis-Menten behaviour, as observed for other FPSs, and exhibited similar K_m values in the μ molar range (from 8.3 to 31.5 μ M) for both IPP and the allylic substrates DMAPP and GPP. The affinity (K_m) of FPS1S and FPS2 for the reaction intermediate GPP was approximately 2.7-fold higher than for DMAPP, thus indicating a preference of both enzymes for the allylic intermediate. Similarly, comparison of the specificity constants (k_{cat}/K_m) indicated a 2-fold higher catalytic efficiency for GPP compared to DMAPP. The inhibitory effect of the reaction product FPP on FPS1S and FPS2 activity was analyzed using concentrations in the range from 0 to 1 mM. The activity inhibition profile was nearly identical for both enzymes, with a maximal 30% reduction of activity at the highest FPP concentration assayed.

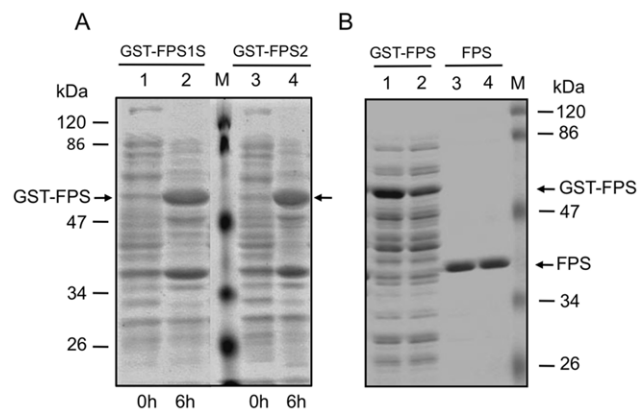


Figure 1. Expression in *E. coli* and purification of recombinant FPS1S and FPS2 proteins. (A) Total protein extracts from *E. coli* cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 or pGEX-3X-NotI-FPS2 before (lanes 1 and 3) and after induction (lanes 2 and 4) of GST-FPS1S and GST-FPS2 expression with 0.4 mM IPTG for 6 hours at 22°C. (B) Soluble protein extracts of IPTG-induced *E. coli* cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 (lane 1) or pGEX-3X-NotI-FPS2 (lane 2), and purified native FPS1S (lane 3) and FPS2 (lane 4) protein preparations after Glutathione-Sepharose 4B affinity column chromatography, proteolytic digestion with Factor Xa and protease removal. Arrows indicate the position of GST-FPS protein fusions and purified native FPS proteins. Molecular masses of standards (M) are indicated in kDa. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g001

Interestingly, FPS2 preparations consistently showed higher specific activity than the FPS1S ones. In fact, FPS2 showed catalytic rate constant (k_{cat}) values for IPP, DMAPP, and GPP that were 3.2-, 2.7- and 2.7-fold higher, respectively, than FPS1S, thus indicating that FPS2 is a more efficient catalyst than FPS1S. These differences cannot be attributed to differential stability of the enzymes either under storage conditions or during the purification procedure since both retained more than 90% of their initial activity after 2 months of storage at $-80^{\circ}C$ and their activity remained virtually unaffected after incubation for 1 hour at $37^{\circ}C$ (Figure 3A). In contrast to this later observation, we observed a markedly different response of FPS1S and FPS2 to treatment at $45^{\circ}C$ for different time-periods. As shown in Figure 3A, FPS2 activity remained unaltered after incubation for 1 hour at $45^{\circ}C$

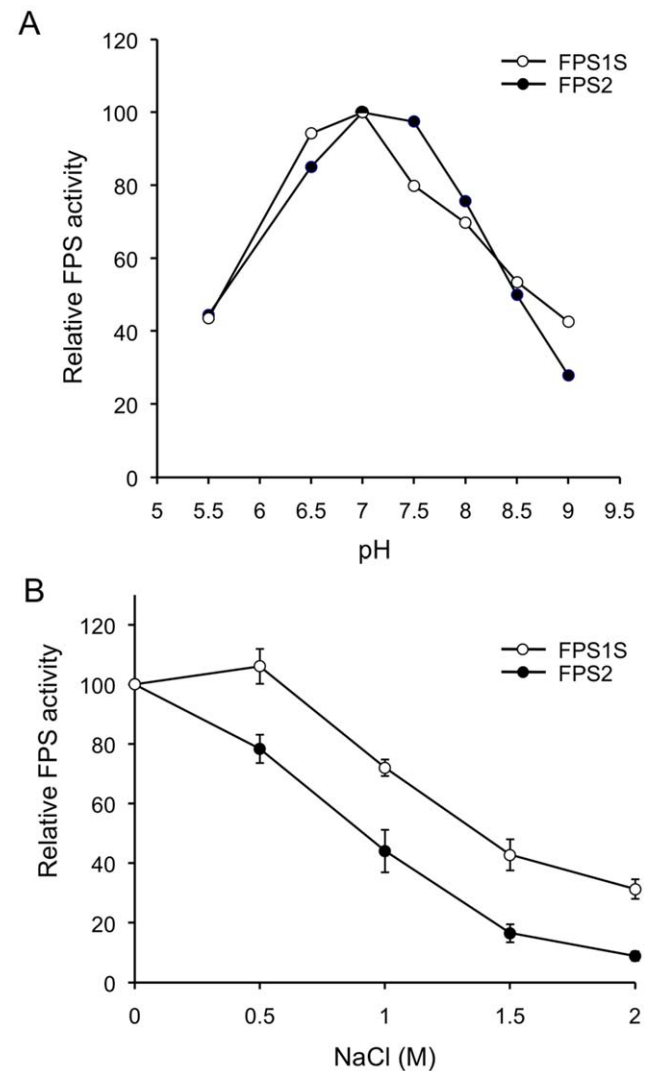


Figure 2. Effect of pH and NaCl on FPS1S and FPS2 enzyme activity. (A) FPS activity of purified FPS1S and FPS2 was determined at pH values ranging from 5.5 to 9.0 as described under Materials and Methods. Enzyme activities are expressed relative to the maximal activity values for FPS1S and FPS2. (B) Effect of NaCl on FPS1S and FPS2 enzyme activity. FPS activity of purified FPS1S and FPS2 was determined at the indicated NaCl concentrations. Enzyme activities are expressed relative to the activity values for FPS1S and FPS2 measured without NaCl. The mean values and SE were calculated from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g002

Table 1. Steady-state kinetic constants for FPS1S and FPS2.

Variable substrate	Kinetic parameter	FPS1S	FPS2
IPP	K_m (μM)	23.1 ± 0.4	31.3 ± 0.5
	k_{cat} (min^{-1})	62.5	269.0
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	2.7	8.6
DMAPP	K_m (μM)	22.7 ± 2.1	31.5 ± 0.5
	k_{cat} (min^{-1})	52.2	197.3
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	2.3	6.2
GPP	K_m (μM)	8.3 ± 1.2	11.3 ± 1.0
	k_{cat} (min^{-1})	36.4	132.8
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	4.4	11.7

The K_m mean values and SE were calculated from three independent experiments.

k_{cat} values were calculated for the dimeric form of the enzyme.

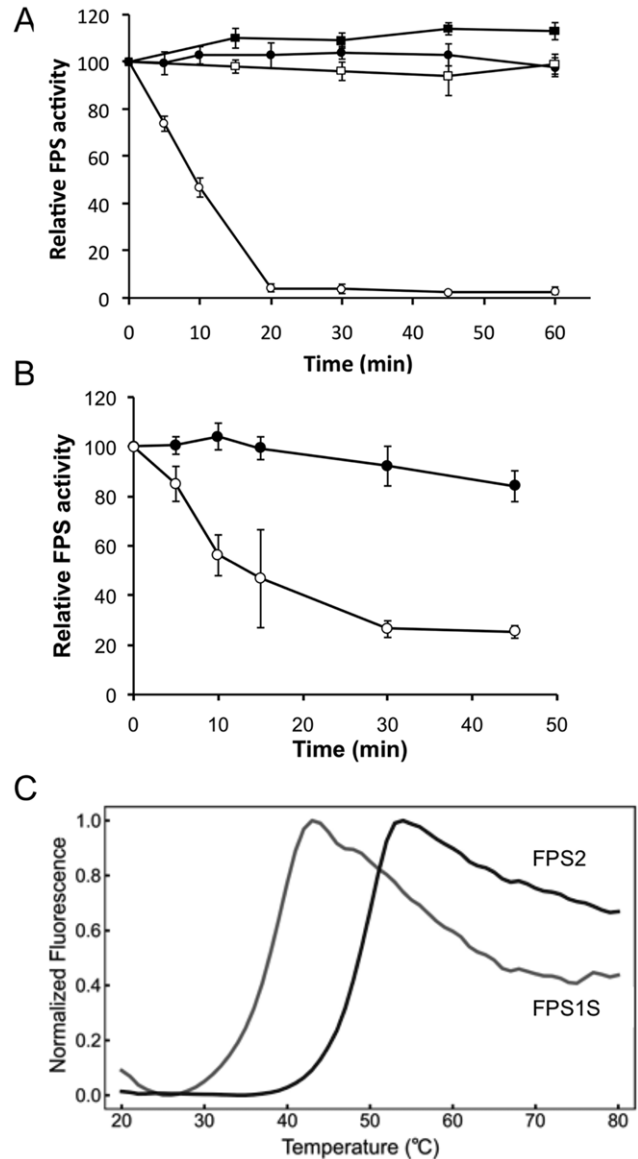
doi:10.1371/journal.pone.0049109.t001

whereas FPS1S activity was completely abolished after 20 minutes at the same temperature. A similar result was obtained when protein extracts from the *Arabidopsis fps1-1* and *fps2-1* single knockout mutants bearing only one functional *FPS* gene (*FPS2* and *FPS1* respectively) were incubated at 45°C for different time-periods and assayed for FPS activity. Again, incubation at 45°C had almost no effect on FPS2-derived activity in extracts from *fps1-1* plants, whereas FPS1-derived activity in extracts from *fps2-1* plants was severely diminished upon incubation at the same temperature (Figure 3B). These differences in thermal stability were corroborated by differential scanning fluorimetry (DSF) [40]. The melting temperature (T_m) derived from the DSF data is a useful diagnostic tool because greater thermal stability is associated with a positive shift in T_m with respect to a reference T_0 ($T_m - T_0 = \Delta T_m > 0$) and vice versa. DSF experiments with 3–14 μM FPS1S or FPS2 in FPS activity assay buffer yielded T_m values of 37°C and 48.3°C, respectively, a difference in T_m of 11.3°C (Figure 3C). Based on these results, it can be concluded that FPS2 is more resistant to thermal inactivation than FPS1S because FPS2 protein is thermodynamically more stable than FPS1S.

Structural Basis of the Enhanced Thermal Stability of FPS2

To further our understanding of the differential thermal stability between FPS1S and FPS2, homology models for both proteins were built using as a template the crystal structure of unliganded human FPS (PDB 2F7M) [41] (Figure 4A) and carefully assessed with respect to their stereochemistry. Best models for both enzymes showed correct stereochemical parameters and native dimer interfaces using various stringent criteria [45], [52]. The root-mean-square (r.m.s.) deviation between each model and the template structure was 0.26 Å and between the two models was 0.29 Å. Mapping of the sequence substitutions between FPS1S and FPS2 onto their respective ribbon structures and molecular surfaces (Figure 4B) showed that the immense majority of these substitutions occur at the outer surface of the enzyme.

Detailed analysis of the thirty-two substitutions that separate FPS2 from FPS1S revealed that the increase in surface polarity and the greater capacity to form surface salt bridges of FPS2 compared with FPS1S appear to be determining factors of the enhanced thermostability of FPS2. Indeed, there are several discernable trends in amino acid substitution between FPS2 and


Figure 3. Thermal stability of FPS1S and FPS2 enzyme activity.

(A) Activity of purified FPS1S (open symbols) and FPS2 (closed symbols) was measured after incubation at either 37°C (squares) or 45°C (circles) for the indicated time periods. (B) FPS activity in 16,000 *g* protein extracts from *fps1-1* (FPS2 activity, closed circles) and *fps2-1* (FPS1 activity, open circles) mutants was determined after incubation at 45°C for the indicated times. In both cases enzyme activities are expressed relative to the FPS activity values at time 0 min and the mean values and SE were calculated from three independent experiments. (C) Differential scanning fluorimetry (DSF) results plotted as change in fluorescence emission intensity (normalized to unity at its maximum) with increasing temperature (20–80°C). The FPS1S and FPS2 curves correspond to 6 μM enzyme. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g003

FPS1S that lends support to this hypothesis. First, FPS2 has four charged residues more than FPS1S of which three are basic and one is acidic. Secondly, polar and charged sidechains in FPS2 tend to be longer on average than in FPS1S (e.g., substitutions follow Asp => Glu, Asn => Gln), which could afford greater rotameric freedom and thereby facilitate formation of polar interactions on the protein's surface. In summary, inspecting the FPS1S and FPS2 homology models around each mutated residue suggested that as

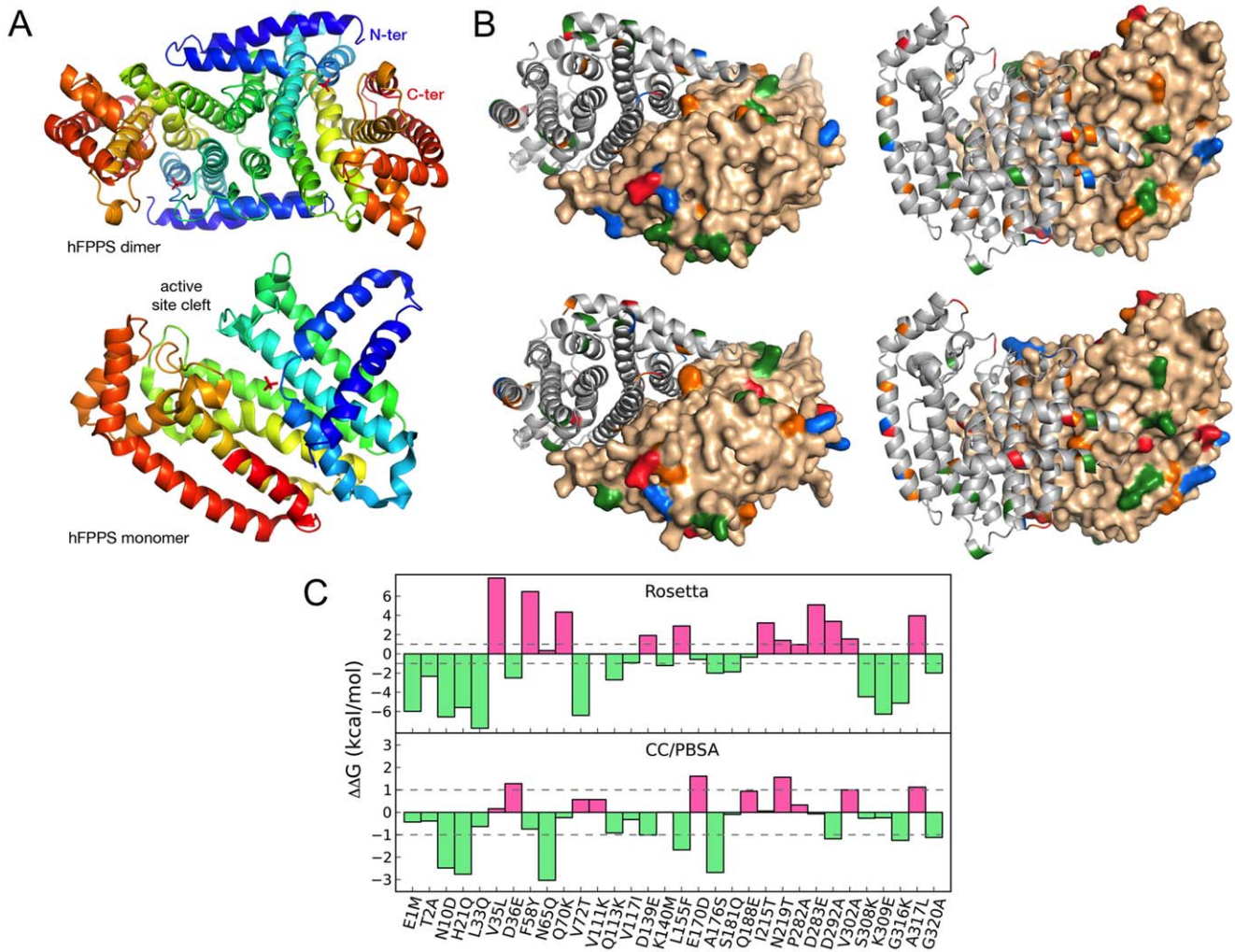


Figure 4. Homology modelling of FPS15 and FPS2 proteins and in silico DDG calculations. (A) Ribbon representation of the dimeric and monomeric structures of human FPS (PDB 2F7M), which was used to template the threading of Arabidopsis FPS15 and FPS2. The active site cleft is labelled and a bound phosphate ion is shown in sticks. (B) Sequence substitutions between FPS15 (top) and FPS2 (bottom) were mapped onto the ribbon structure (left monomer) or the molecular surface (right monomer) of the homology modeled dimers. Chemical character is colour coded as follows: red, acidic (Asp, Glu); blue, basic (Arg, Lys, His); green, polar (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr); orange, apolar (Met, Phe, Pro, Trp, Val, Leu, Ile, Ala). (C) Histogram of *DDG* (kcal/mol) upon single-site substitution calculated using Rosetta *DDG* application (top) or CC/PBSA (bottom). Mutations predicted to occur with a decrease in *DDG* are coloured green and those expected to increase *DDG* are coloured pink. Horizontal dashed lines at -1 to $+1$ kcal/mol bound the neutral area where *DDG* is supposed to contribute little to the overall stabilization or destabilization of the mutated protein. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g004

many as three additional salt bridges (and several strong hydrogen bonds) could be established in FPS2 compared to FPS1S. Other metrics of structure stability, such as sidechain hydrogen bonds (31 in all/4 strong versus 30 in all/2 strong) and salt bridges across the dimer interface (7 versus 5) interface did also favour FPS2 with respect to FPS1S. Interestingly, a number of aromatic-aromatic, aromatic-sulfur and pi-cation interactions seem to be more prevalent in FPS2 than in FPS1S, and could also make a sizable contribution to the overall thermal stability of the two enzymes.

To accurately calculate the changes in free energy and structure induced by single residue substitutions we applied the Rosetta *DDG* [46] and CC/PBSA [47] methods to predict the free energy and structure changes underwent by FPS1S as single FPS2-mimicking substitutions are introduced. Results indicated that the cumulative free energy change summed over all mutated residues was energetically very favourable regardless of the method used, in qualitative agreement with the results from DSF experiments.

Moreover, the Rosetta *DDG* and CC/PBSA protocols flag 58% (15 versus 11) and 69% (9 versus 4) of the non-neutral substitutions as stabilizing (*DDG* < -1 kcal/mol). Of the non-stabilizing mutations, Rosetta *DDG* brands more mutations than CC/PBSA as destabilizing (*DDG* $> +1$ kcal/mol) than neutral (*DDG* between -1 and $+1$ kcal/mol). Figure 4C shows this pattern for both the Rosetta *DDG* and the CC/PBSA protocols. Of the 21 out of 32 substitutions that change any residue in FPS1S to a polar/charged residue in FPS2, 85% (18) are predicted as non-destabilizing (the three exceptions are Q70K, E170D and D283E) thereby providing corroborative evidence for the important role of surface electrostatic interactions for FPS2 thermal stability. Perhaps one of the larger discrepancies between the two prediction methods involves substitutions F58Y, N65Q, Q70K and V72T, for which *DDG* estimates are reversed. These four substitutions, which are located in three consecutive helices, cluster tightly together around a 6-Å sphere and therefore it is plausible that the true structure of

FPS2 had undergone compensatory changes that cannot be accurately captured by our single-site mutation calculations. Future structural studies of FPS1S and FPS2 should provide more accurate rationales for the observed stability differences.

Subcellular Localization of FPS1S and FPS2

Arabidopsis FPS1S and FPS2 isoforms have long been considered to localize in the cytosol, mainly because no obvious organellar targeting signals have been detected in their primary structure. To provide experimental data supporting this assumption, the subcellular localization of Arabidopsis FPS1S and FPS2 was investigated by transiently expressing N- and C-terminal fusions of both FPS isoforms to the GFP in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf cells (Figure 5). Confocal laser microscopy analysis of the transfected cells revealed that all four tested proteins (GFP-FPS1S, FPS1S-GFP, GFP-FPS2, and FPS2-GFP) showed a diffuse pattern of fluorescence throughout the cytosol that was completely different from the punctuate fluorescence pattern characteristic for peroxisomal proteins, as revealed by comparison with the fluorescence signal of the peroxisomal marker CFP-SKL. These results strongly suggested that both FPS1S and FPS2 localize in the cytosol and not in the peroxisomes.

Expression Pattern of Arabidopsis FPS1 and FPS2 Genes during Seed Development

Characterization of Arabidopsis *fps* single knockout mutants revealed a differential contribution of FPS isoforms to total FPS activity in mature seeds [26]. In order to investigate whether this effect could be due to differential expression of FPS1 and FPS2 in seed tissues, we analyzed the spatial and temporal pattern of expression of GUS activity in seeds at different developmental stages harvested from Arabidopsis lines harbouring FPS1S::GUS and FPS2::GUS transgenes (Figure 6). These chimeric gene fusions included approximately 1350 bp of the corresponding FPS promoter region [25]. In FPS1S::GUS plants, the primary site of GUS activity detection at all stages of development was the maternal chalazal seed coat (Figure 6A–E). At the globular, heart and early-torpedo stages of embryo development some variable and weaker GUS staining could also be detected in surrounding tissues (Figure 6A–C) although it is difficult to establish whether this expression reflected diffusion of the substrate or true expression of the transgene. At latter stages of embryo development GUS activity was restricted to the chalazal seed coat (Figure 6D and E). Interestingly, no expression of GUS activity in the embryo could be detected at any developmental stage. The pattern of GUS expression driven by the FPS2 promoter was completely different (Figure 6F–J). At the globular stage of embryo development GUS staining was detected only in the chalazal endosperm (Figure 6F), but from the heart stage onward GUS activity could also be detected in the embryo (Figure 6G–J). At the heart and early torpedo stage GUS expression in the embryo was primarily localized to the root apical meristem region (Figure 6G and H, arrowhead) and the pro-vascular tissue of embryo (Figure 6, inset). Up to this developmental stage, a very faint staining could also be detected in the endosperm of some seeds when they were subjected to intensive staining. At later developmental stages GUS activity was clearly detected in the whole embryo as well as in the surrounding endosperm (Figure 6I). In mature seeds, strong GUS activity was also present in the cotyledonary embryo (Figure 6J), which is in sharp contrast to the absence of GUS activity in the embryo of mature seeds expressing FPS1S::GUS (Figure 6E). In conclusion, analysis of FPS1S::GUS and FPS2::GUS expression analysis demonstrated that FPS genes are differentially regulated during Arabidopsis seed development, showing highly comple-

mentary expression patterns particularly at late stages of seed formation.

Functional Complementation of *fps2* Mutant Seed Phenotypes by FPS1S

Mature seeds lacking FPS2 activity display several phenotypes including reduced levels of sitosterol, the main sterol found in plant tissues, increased HMGR activity and hypersensitivity to mevastatin compared to both *fps1* and wild-type seeds [26]. To determine whether FPS1S could complement these phenotypes, transgenic *fps2-1* plants expressing FPS1S under the control of the FPS2 gene promoter were obtained. To this end we created two different gene constructs that were able to produce only isoform FPS1S (Figure 7A and B). The FPS2p::FPS1S-*mutdis* gene consisted of 1375 bp of the FPS2 5'-flanking region, including 1329 bp of the promoter and the entire 5'-untranslated region, fused to the genomic coding region of FPS1 in which the distal ATG start codon was converted into an ATC codon to ensure that only FPS1S isoform could be produced. The FPS2p::FPS1S gene differed from FPS2p::FPS1S-*mutdis* gene in that the region comprised between the two ATG codons was removed.

Several independent lines of these two kinds of transgenic plants were obtained and characterized. Among them, lines 6.2, 7.2 and 10.2 for FPS2p::FPS1S-*mutdis* and lines 2.2, 7.1 and 8.1 for FPS2p::FPS1S were selected for further characterization. The expression of FPS2p::FPS1S-*mutdis* and FPS2p::FPS1S was analyzed in young seedlings using semiquantitative RT-PCR and a primer set consisting of a forward primer specific for the FPS2 5'-untranslated sequence and a reverse primer located in the FPS1 coding region. The three selected FPS2p::FPS1S-*mutdis* lines showed very similar levels of expression of the FPS1 mRNA that were even higher than those detected in wild-type plants (Figure 8A). Accordingly, protein extracts from seeds of FPS2p::FPS1S-*mutdis* lines also contained both higher levels of FPS1S protein, as demonstrated by Western blot analysis (Figure 8B), and higher values of FPS activity (Figure 9C) compared to wild-type seeds. On the contrary, FPS protein and enzyme activity levels in extracts from seeds of the three FPS2p::FPS1S transgenic lines were comparable to those found in extracts of *fps2-1* mutant seeds, which indeed were much lower than those detected in wild-type seed extracts (Figure 8B and C). The inability of FPS2p::FPS1S to restore wild-type levels of FPS protein and enzyme activity was not due to a lack of expression of the transgene, since its mRNA was detected in the seedlings of the three selected lines. In two of them (lines 7.1 and 8.1), expression of the transgene was less intense than in wild-type plants whereas in the third one (line 2.2) expression was slightly stronger than in control plants (Figure 8A). These observations suggested that translation of the chimeric FPS2::FPS1S mRNA expressed by FPS2p::FPS1S was severely impaired, which is most likely due to the different structural environment around the AUG start codon of the FPS2::FPS1S mRNA compared to that of the FPS2 and FPS2::FPS1S-*mutdis* mRNAs (Figure S1). Among the different structural features known to be involved in translational control of specific mRNAs [53], base-pairing involving nucleotides within the AUG codon has been recognized as an important structural determinant that may influence translation initiation [54], [55].

To complete the characterization of the transgenic lines we next assessed whether expression of FPS1S driven by the FPS2 promoter could complement the characteristic phenotypes of *fps2-1* seeds. Sitosterol and HMGR activity levels were quantified in seeds of FPS2p::FPS1S-*mutdis* and FPS2p::FPS1S lines. None of the *fps2-1* seed phenotypes could be rescued by FPS2p::FPS1S expression (Figures 9A–C), a result that was fully consistent with

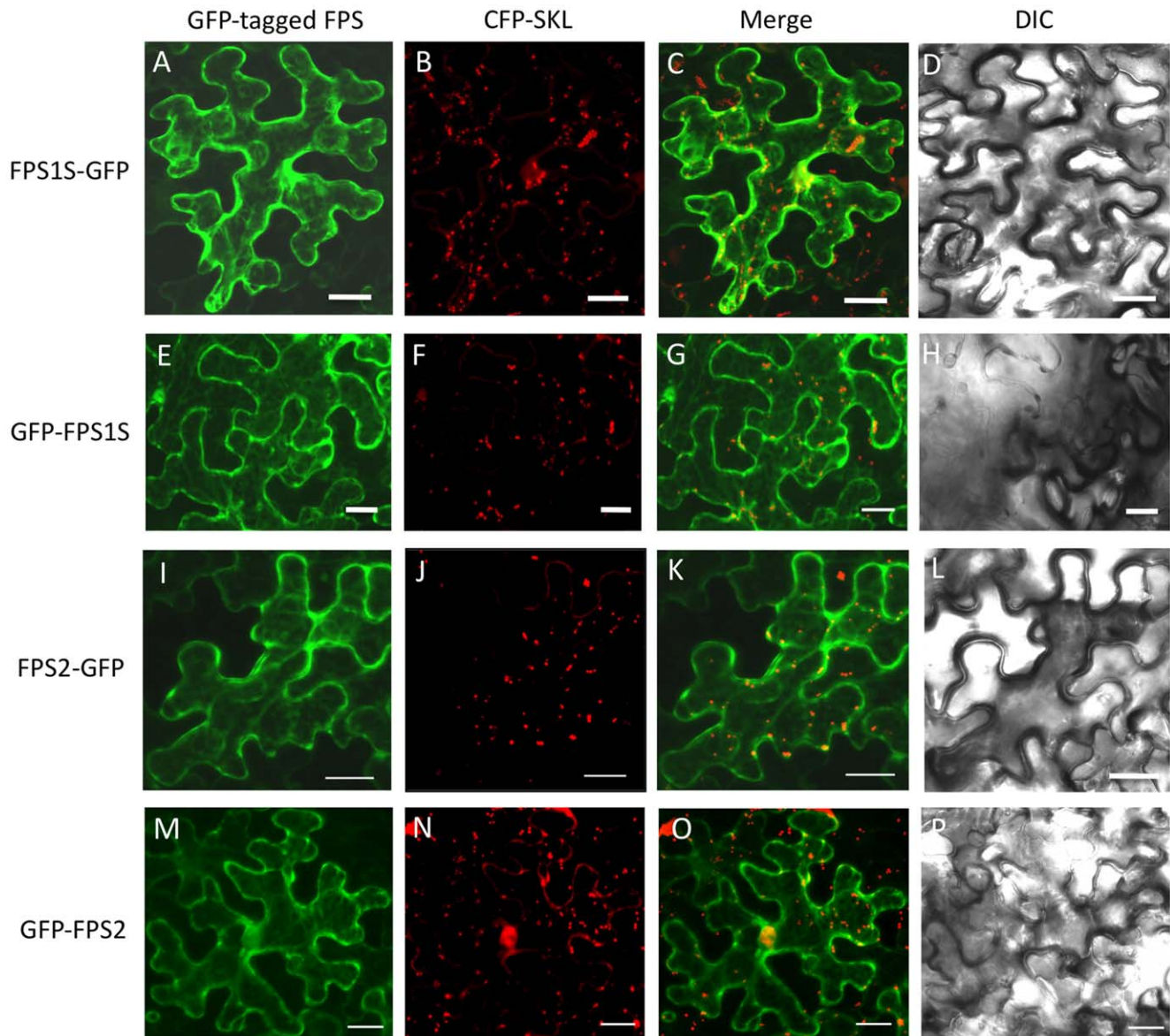


Figure 5. Subcellular localization of GFP-tagged FPS1S and FPS2 proteins. Confocal laser scanning micrographs showing the distribution of fluorescence in agroinfiltrated *N. benthamiana* epidermal cells transiently co-expressing FPS1S-GFP (A), GFP-FPS1S (E), FPS2-GFP (I) or GFP-FPS2 (M) with the peroxisome protein marker CFP-SKL (B, F, J and N). Co-localization evaluation of GFP-tagged FPS proteins with the peroxisome protein marker (C, G, K and O). Differential interference contrast (DIC) images showing the morphology of transformed cells (D, H, L and P). Scale bars = 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0049109.g005

the lack of FPS1S protein production and enzyme activity recovery (Figure 8B and C). On the contrary, sitosterol and HMGR activity levels were both restored to those of wild-type seeds in lines expressing *FPS2p::FPS1S-mutdis* (Figures 9A and B). Recovery of wild-type levels of HMGR activity in seeds also restored normal mevastatin sensitivity to these lines (Figure 9C). Altogether, these results demonstrated that FPS1S is able to functionally replace FPS2.

Rescue of *fps2* Mutant Seed Phenotypes by Increasing Total FPS Activity in Seeds

Once we had demonstrated that expression of FPS1S driven by the *FPS2* promoter was able to rescue the phenotypes caused by loss of function of FPS2, we set out to determine whether

expression of FPS2 driven by the *FPS1* promoter could also rescue the *fps2-1* phenotypes. To this end *fps2-1* plants harbouring genes *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* (Figure 7C and D) were created and characterized. *FPS1mutdisp::FPS2* consisted of 1526 bp of the *FPS1* 5'-flanking region, including 1338 bp of the *FPS1* gene promoter and the entire 5'-untranslated region in which the distal ATG start codon was converted into an ATC codon, fused to the genomic coding region of *FPS2* so that only FPS2 isoform could be produced from this transgene. In the *FPS1p::FPS2* gene, the distal ATG codon was not disrupted and therefore this transgene could potentially express both FPS2 and a long version of FPS2 equivalent to FPS1L. Among the transgenic lines obtained, lines 6.2, 5.4 and 5.2 harbouring *FPS1mutdisp::FPS2*, and lines 3.1, 2.4 and 2.1 harbouring *FPS1p::FPS2* were selected for further

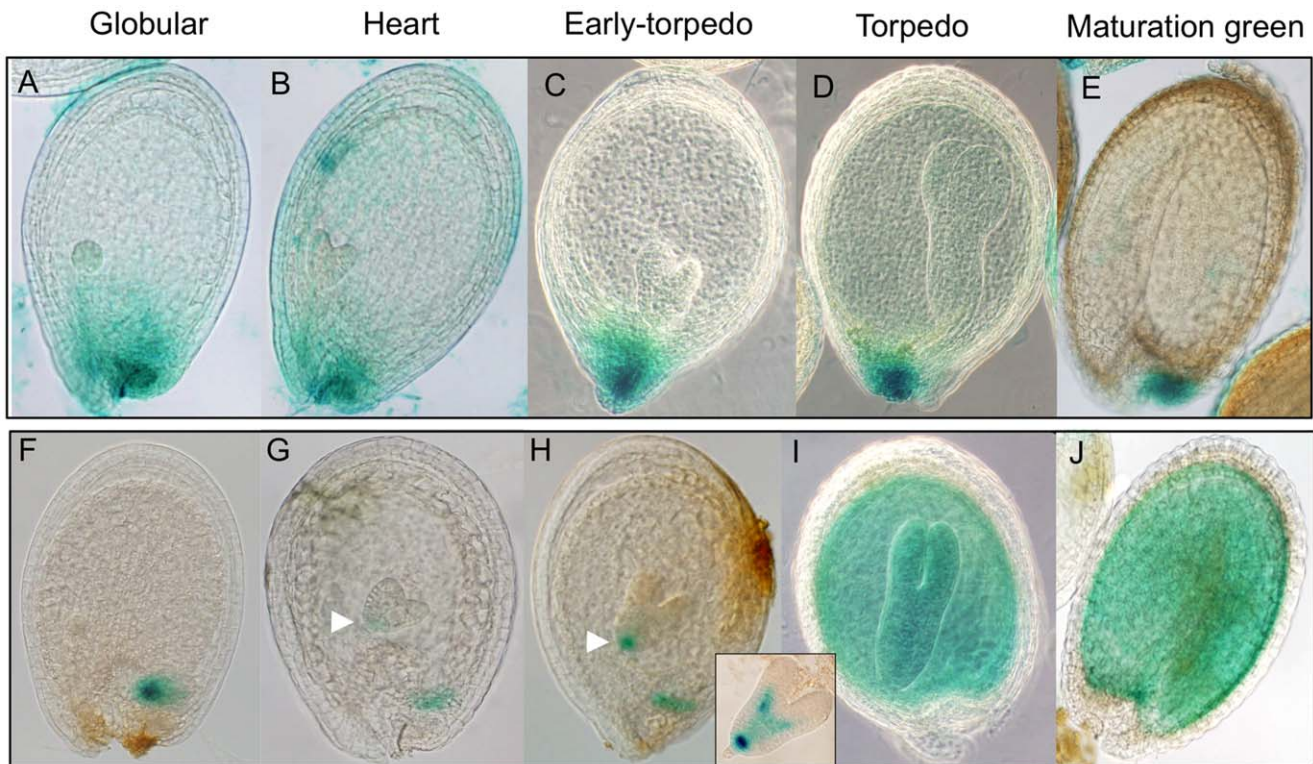


Figure 6. Histochemical analysis of GUS activity during seed development in Arabidopsis lines harbouring transgenes *FPS15::GUS* (panels A to E) and *FPS2::GUS* (panels F to J). Seeds containing embryos at the globular (A and F), heart (B and G), early-torpedo (C and H), torpedo (D and I) and maturation green (E and J) developmental stages were analyzed for GUS expression as described under Material and Methods. GUS expression in the root meristematic region of the embryo at heart (G) and early-torpedo (H) stages in *FPS2::GUS* seeds is indicated by arrowheads. The inset between panels (H) and (I) shows expression of *FPS2::GUS* in the root meristematic region and the pro-vascular tissue of an embryo at the early-torpedo stage.

doi:10.1371/journal.pone.0049109.g006

characterization. The expression of the transgenes was analyzed in young seedlings of these lines using semiquantitative RT-PCR and a primer set consisting of a forward primer specific for the *FPS1* 5'-untranslated sequence and a reverse primer specific for the *FPS2* coding region. All selected lines showed comparable expression levels of the chimeric *FPS2* mRNAs that, as expected, were not detected either in wild-type plants or in *fps2-1* plants (Figure 10A). However, striking differences in FPS protein and activity levels were observed between the two groups of transgenic plants. FPS protein content in seeds of the three *FPS1mutdisp::FPS2* lines was comparable and only slightly above that found in *fps2-1* seed extracts. By contrast, total FPS protein levels in *FPS1p::FPS2* seeds varied greatly. The amount of FPS protein in line 2.4 was pretty similar to that found in *FPS1mutdisp::FPS2* plants whereas line 3.1 had strikingly elevated levels of FPS protein. Line 2.1 showed intermediate levels of FPS that were, nevertheless, higher than in wild-type plants (Figure 10B). These differences could be due to the production of different relative amounts of short and long versions of *FPS2* in *FPS1p::FPS2* seeds. Unfortunately, it is not possible to determine the relative contributions of the individual short and long *FPS2* forms to the total amount of *FPS2* protein since they both have the same size after processing of the long version of *FPS2* [9]. In any case, a close correlation between FPS protein content and enzyme activity levels was observed in the seed extracts of all lines (Figure 10C). Analysis of the characteristic *fps2-1* phenotypes in seeds of the transgenic lines revealed that the phenotypes associated to loss of function of *FPS2* were fully rescued in all transgenic lines regardless of the degree of FPS

activity enhancement in the mature mutant seeds (Figure 11A–C). In fact, a small increase of FPS activity of only 1.2-fold (line 6.2) was sufficient to restore wild-type sitosterol and HMGR activity values as well as normal Mst sensitivity to the same extent than a drastic enhancement of FPS activity (approximately 9-fold in line 3.1). These results suggested that impaired synthesis of FPP in the mature embryo due to the lack of *FPS2* activity could be fully compensated just by increasing slightly the synthesis of FPP in the seed maternal tissues.

Discussion

Isozymes usually display specific biochemical properties that allow fine-tuning of metabolic pathways to meet the specific needs of tissues and organs at different developmental stages and/or under different environmental conditions. The occurrence in plants of small FPS isozyme families has raised the still-unanswered question about the role of individual FPS isozymes in the cytosol/ER isoprenoid biosynthetic pathway. Most of the information currently available on the biological function of FPS isozyme family members has been obtained from the pattern of expression of the corresponding genes [11], [14], [15], [16], [17], [25] and the characterization of mutants that either overexpress [8], [10] or lack individual FPS isozymes [26]. By contrast, much less attention has been paid to investigate and compare the biochemical properties of individual FPS isozyme family members, despite this knowledge may also greatly contribute to the understanding of their role in the isoprenoid pathway [18].

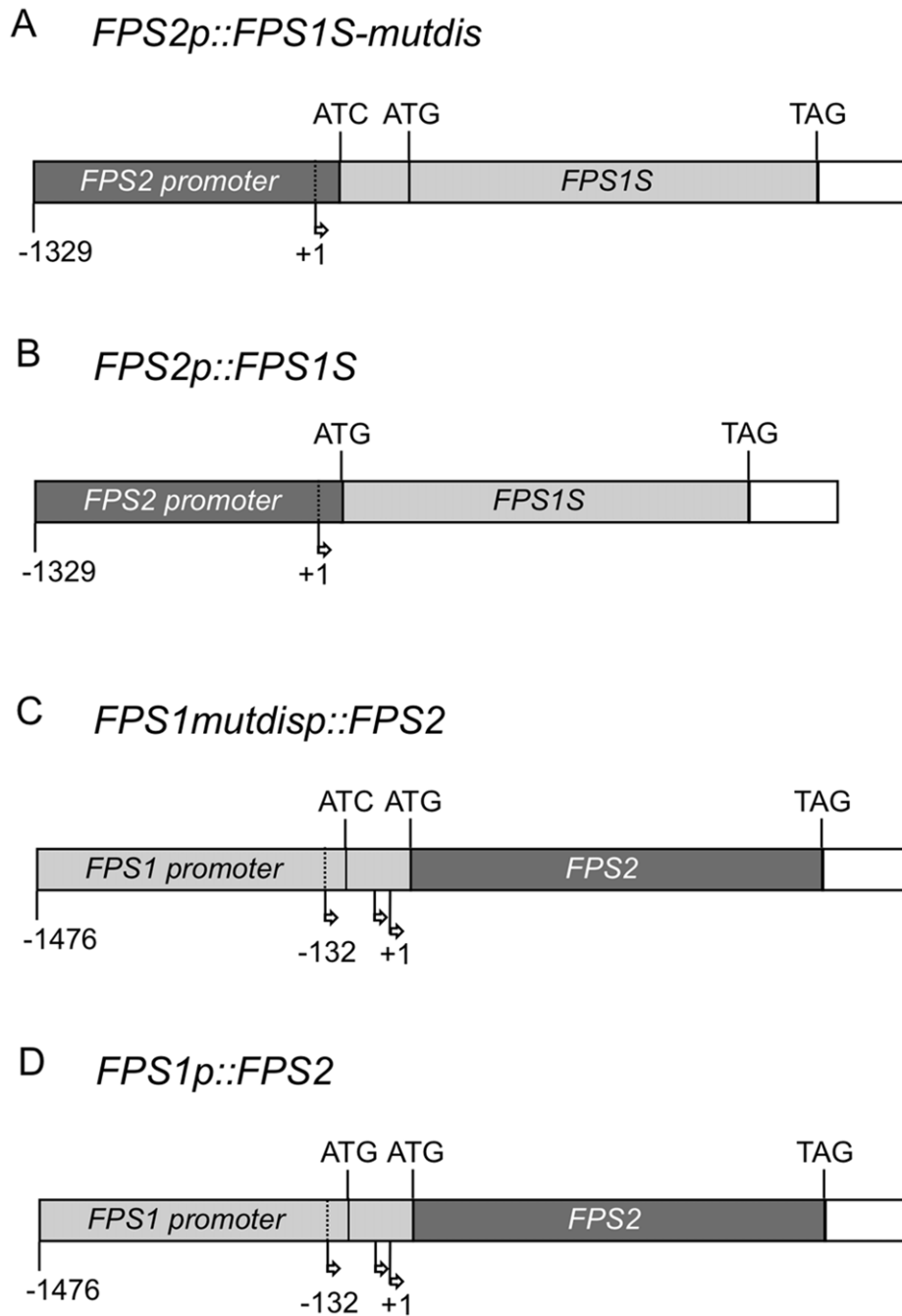


Figure 7. Schematic representation of chimeric genes *FPS2p::FPS1-mutdis* (A), *FPS2p::FPS1S* (B), *FPS1mutdisp::FPS2* (C) and *FPS1p::FPS2* (D). Dark gray boxes represent *FPS2* genomic sequences whereas sequences corresponding to *FPS1* gene are represented by light gray boxes. In all constructs the 3'-untranslated regions of both *FPS* genes is represented by an empty box. The position of the translational start codons is indicated as ATG and that of stop codons is indicated as TAG. In the *FPS2p::FPS1S-mutdis* (A) and *FPS1mutdisp::FPS2* (C) constructs, the 5'-most ATG codon in exon 1 of the *FPS1* gene was mutated to an ATC codon (encoding Ile). Arrows indicate the transcription start sites. In the *FPS1* gene, position +1 was assigned to the most internal transcription start site.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g007

In this study we report a detailed functional and structural characterization of the Arabidopsis FPS1S and FPS2 isozymes. Both enzymes were efficiently expressed in *E. coli* as GST-FPS fusion proteins, though the GST tag was removed by proteolytic cleavage during the purification process (Figure 1) to avoid any interference it could have on FPS activity [56]. Biochemical characterization of the purified native FPS1S and FPS2 revealed

that both enzymes displayed very similar pH-rate profiles with an optimum at pH 7.0 (Figure 2). This pH preference was consistent with the predicted cytosolic localization of both FPS isozymes because the pH of the cytoplasm of plant cells is kept slightly alkaline at 7.2-7.5 under non-eliciting conditions [57]. The cytosolic localization of both FPS isozymes was demonstrated by transiently expressing N- and C-terminal fusions of FPS1S and

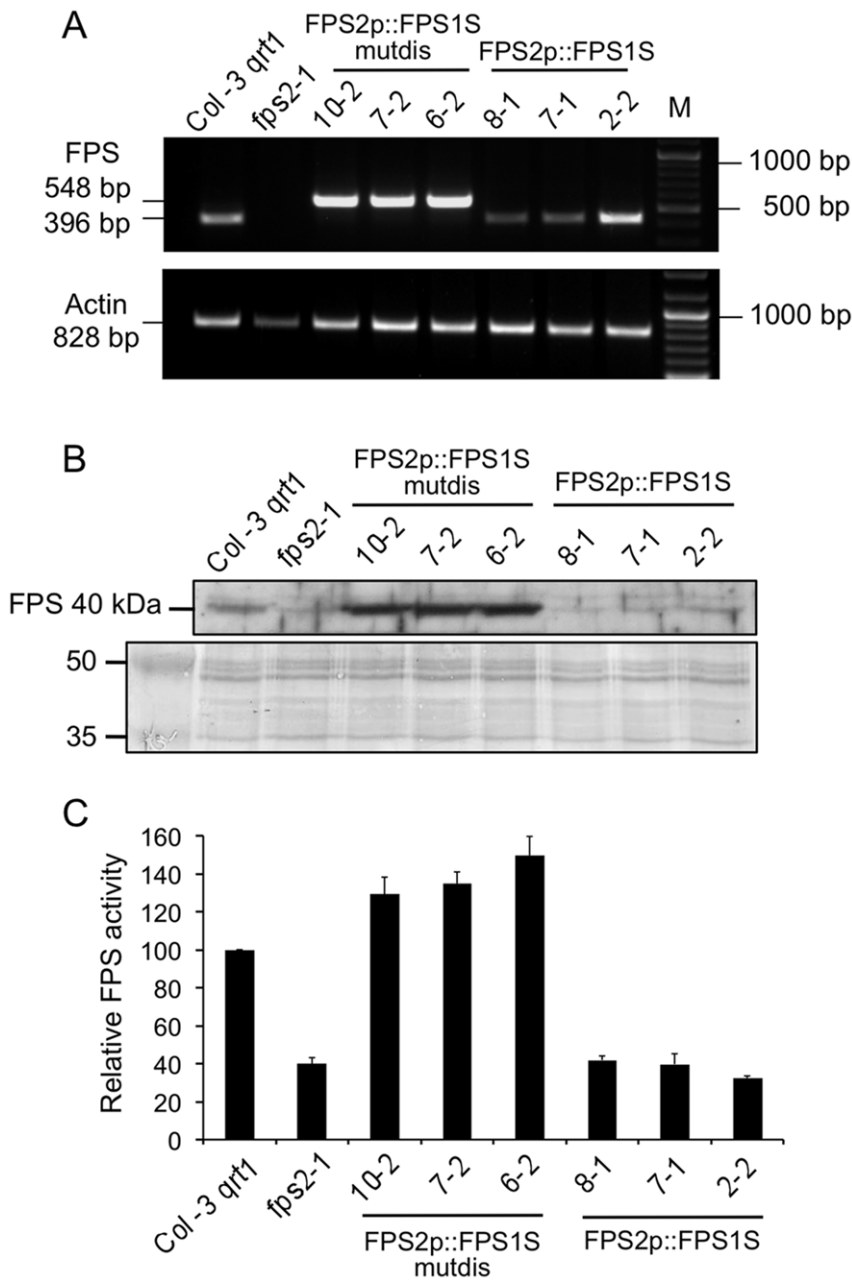


Figure 8. Characterization of *fps2-1* mutant lines harbouring *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1S-mutdis* genes. (A) The expression of *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1S-mutdis* was investigated using total RNA from 12-day-old seedlings of Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS2p::FPS1S-mutdis* and *FPS2p::FPS1S* chimeric genes (upper panel). PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. The size in bp of the amplified cDNA fragments corresponding to *FPS2p::FPS1S-mutdis*, *FPS2p::FPS1S* and *ACT2* (actin) genes is indicated on the left. The size of the fragment amplified from *FPS2p::FPS1S-mutdis* lines (548 bp) was larger than that amplified from both *FPS2p::FPS1S* lines and wild-type plants (396 bp) because the *FPS2p::FPS1S-mutdis* mRNA contains the region between the two ATG translation start codons of the *FPS1* gene, which is not present in the *FPS2p::FPS1S* mRNA. Numbers on the right indicate the sizes in bp of DNA markers shown in lane M. (B) Western blot analysis of total FPS protein in 16,000 g extracts from seeds of plant lines indicated above (upper panel). The lower panel shows the Coomassie blue-stained electrophoretic protein patterns in the 35 to 50 kDa range of extracts used for FPS protein level determinations. Images show the results of one representative experiment. (C) FPS activity in the 16,000 g protein extracts used for Western blot analysis. FPS activity in *fps2-1* mutants is expressed relative to that in the wild-type, which was assigned a value of 100. The mean values and SE were calculated from three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g008

FPS2 with GFP in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf cells. Under our experimental conditions all the four fusion proteins localized exclusively in the cytosol (Figure 5). This result was fully consistent with the absence of canonical subcellular targeting signals in the FPS1S and FPS2 proteins, and argued against the possibility that

FPS1S and FPS2 could harbour a cryptic signal for peroxisomal targeting as recently reported to occur in a *C. roseus* short FPS enzyme. In contrast to our results, an N-terminal fusion of CrFPS with YFP was found to localize both in the peroxisomes and the cytosol of *C. roseus* cells despite the protein does not contain any

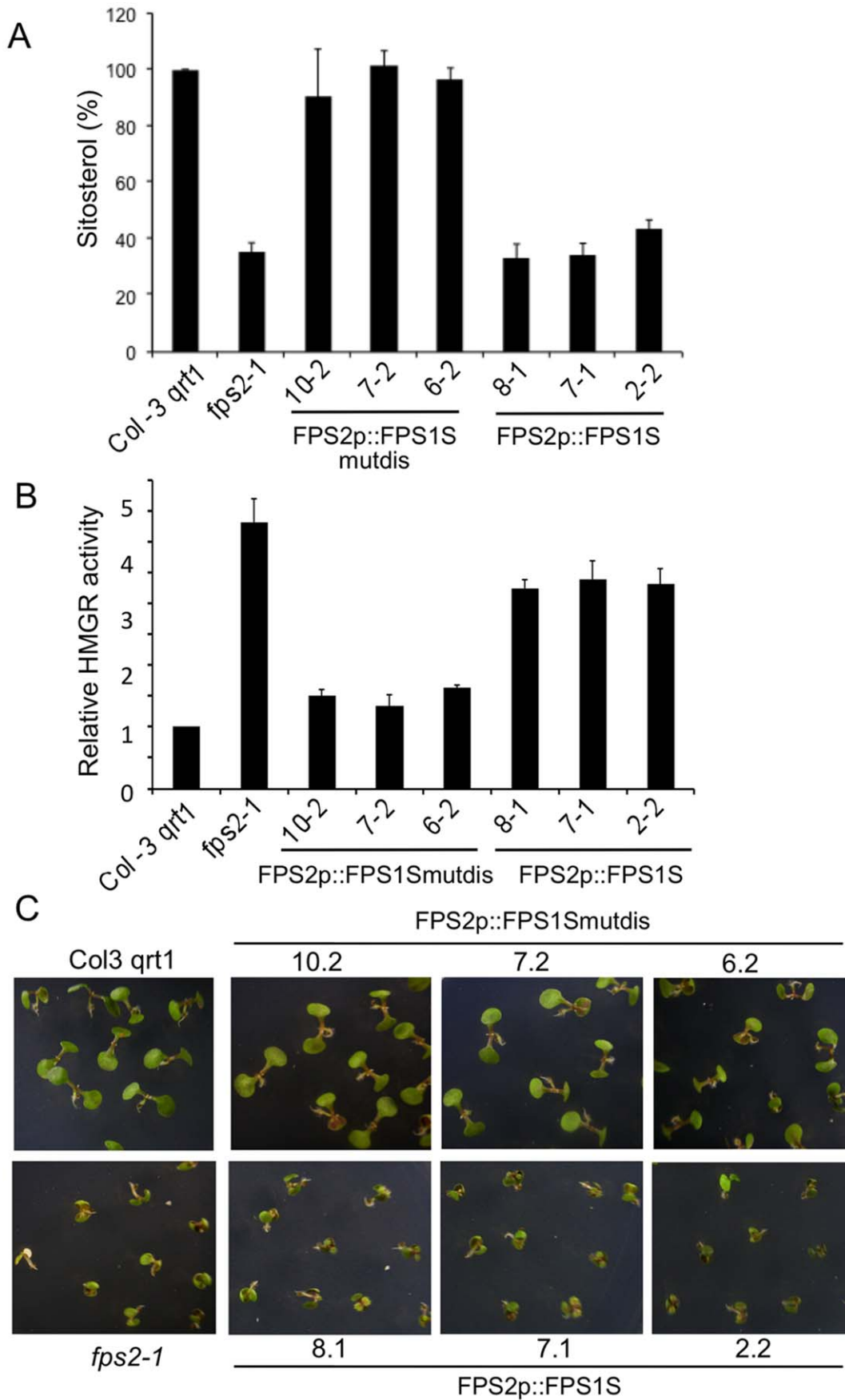


Figure 9. Reversion of *fps2-1* phenotypes by expressing FPS1S under control of the *FPS2* promoter. Sitosterol (A) and HMGR activity (B) levels in seeds from Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS2p::FPS1S-mutdis* and *FPS2p::FPS1S* chimeric genes. Values are expressed relative to the wild-type values. Data represent the mean values and SE of three independent experiments. (C) Reversion of mevastatin hypersensitivity. Representative seedlings of the same lines were grown for 12 days under long-day conditions (16 h light/ 8 h dark) on MS plates supplemented with 1 μ M mevastatin.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g009

classical peroxisomal targeting sequence [21]. It is also worth noting that our finding that none of the Arabidopsis short FPS isoforms reside in the peroxisomes was fully consistent with the results of extensive proteomic studies that have detected both FPS1S and FPS2 in the cytosolic proteome of Arabidopsis [58] and could not detect any FPS protein in purified Arabidopsis

peroxisomes [59], [60]. The distinct subcellular localization of Arabidopsis and *C. roseus* short FPS isozymes could be related to the different profile of isoprenoid compounds produced by these two plant species [3], [61], though the central position of FPS in the isoprenoid pathway and the fundamental role of isoprenoid biosynthesis in plant biochemistry and physiology would argue

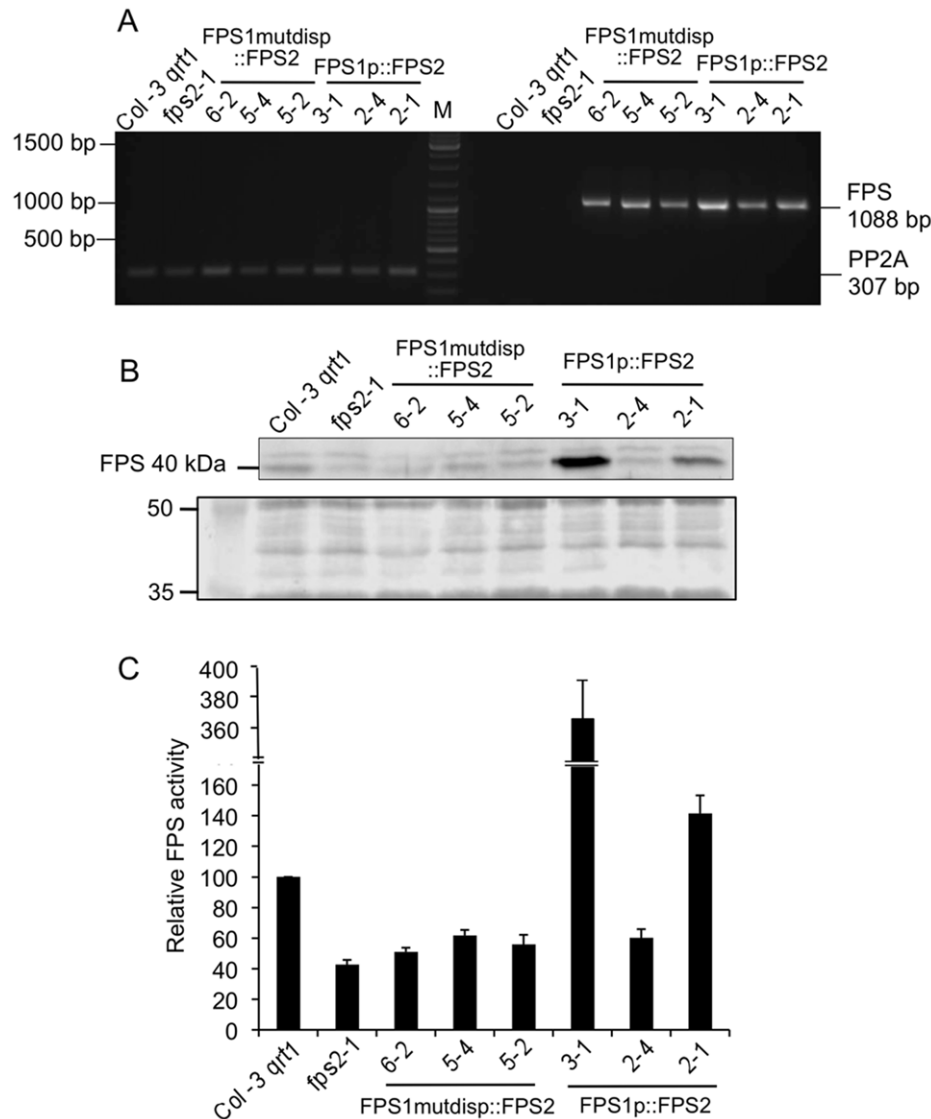


Figure 10. Characterization of *fps2-1* mutant lines harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* genes. (A) The expression of *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* was investigated using total RNA from 12-day-old seedlings of Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* chimeric genes. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. The size in bp of the amplified cDNA fragments corresponding to *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* (1088 bp) and *PP2A* genes (307 bp) is indicated on the right. Numbers on the left indicate the sizes in bp of DNA markers shown in lane M. (B) Western blot analysis of total FPS protein in 16,000 g extracts from seeds of plant lines indicated above (upper panel). The lower panel shows the Coomassie blue-stained electrophoretic protein patterns in the 35 to 50 kDa range of extracts used for FPS protein level determinations. Images show the results of one representative experiment. (C) FPS activity in the 16,000 g protein extracts used for Western blot analysis. FPS activity in mutants is expressed relative to that in the wild-type, which was assigned a value of 100. The mean values and SE were calculated from three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g010

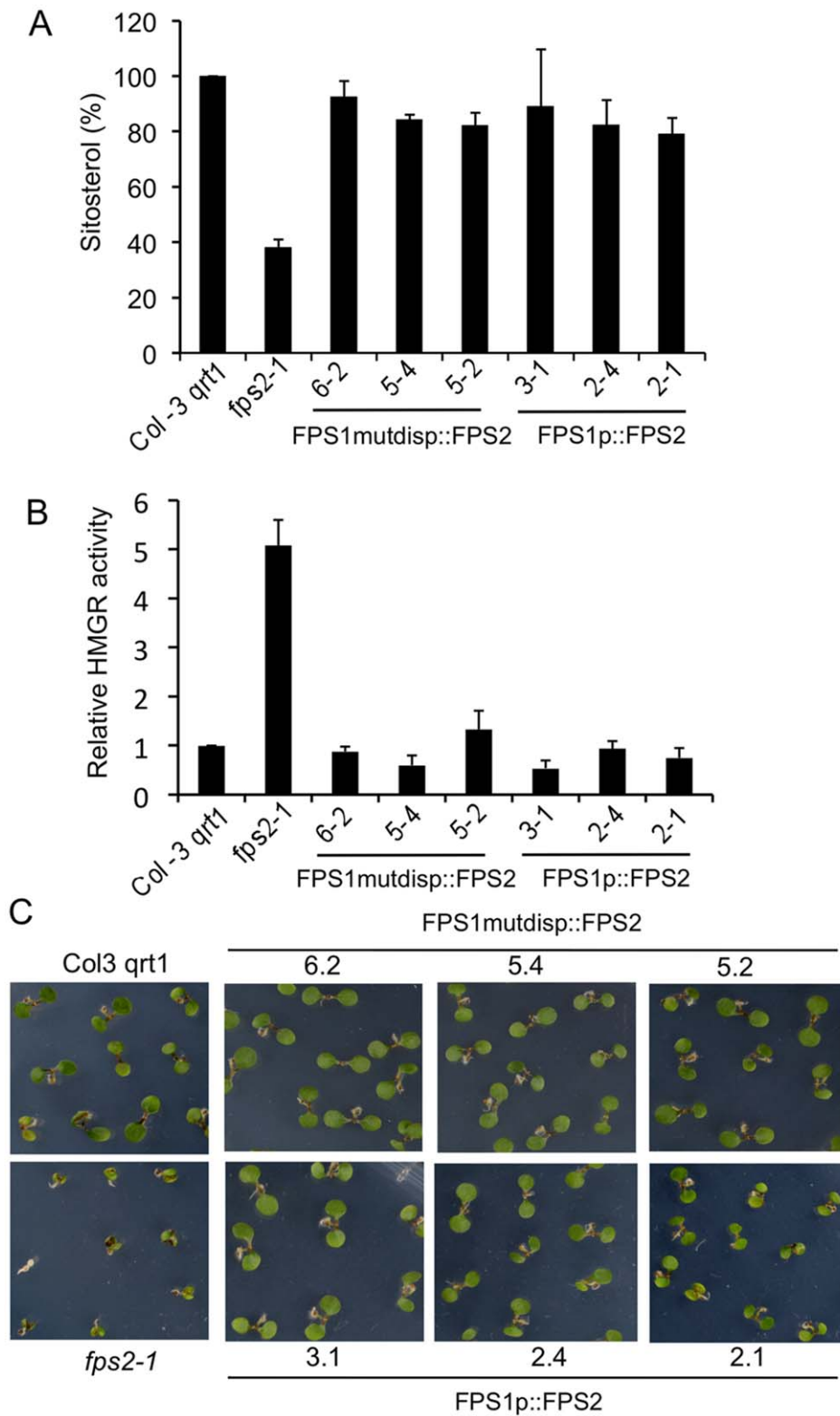


Figure 11. Reversion of *fps2-1* phenotypes by expressing FPS2 under the control of the FPS1 promoter. Sitosterol (A) and HMGR activity (B) levels in seeds from Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* chimeric genes. Values are expressed relative to the wild-type values. Data represent the mean values and SE of three independent experiments. (C) Reversion of mevastatin hypersensitivity. Representative seedlings of the same lines were grown for 12 days under long-day conditions (16 h light/ 8 h dark) on MS plates supplemented with 1 μ M mevastatin. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g011

against this hypothesis. Thus, given the ongoing controversy regarding the subcellular localization of FPS and other MVA pathway enzymes and the potential interference of fluorescent protein tags with proper subcellular targeting of proteins, further studies based on alternative experimental approaches are required in order to establish whether or not short FPS isozymes localize in different subcellular compartments in a plant-species dependent manner.

Comparison of the steady-state kinetic constants of purified FPS1S and FPS2 (Table 1) revealed that both enzymes have similar K_m values for their substrates and a clear preference for GPP over DMAPP as the allylic substrate for FPP formation. A similar kinetic behaviour has also been reported for FPS enzymes from both eukaryotic and prokaryotic organisms [33], [18], [56], [62], [63]. The kinetic similarities between FPS1S and FPS2 are consistent with the high degree of sequence conservation (90.6% identity) shared by these isozymes. However, FPS1S and FPS2 also displayed some remarkable differential properties that must be a consequence of the small differences in their primary structure. FPS2 is a more efficient catalyst than FPS1S by a factor of 2.5- to 3-fold (Table 1). All known FPS proteins contain seven highly conserved amino acid motifs [64] that are involved in enzyme catalysis and product chain length determination [5], [65]. Arabidopsis FPS1S and FPS2 differ by only 32 amino acid residues out of a total of 343 and 342 amino acids, respectively. These amino acid changes are scattered throughout the sequence but, interestingly, none of them is located within the conserved motifs involved in catalysis [12]. Thus, it is difficult to attribute the differences in catalytic efficiency between FPS1S and FPS2 to a particular amino acid substitution. Rather it appears that this functional difference is the consequence of subtle changes in the three-dimensional structure of the enzymes due to multiple individual amino acid changes acting together. In fact, FPS is a homodimeric enzyme in which subunits interact with each other to form a shared active site rather than bearing an independent active site in each subunit [66]. The suggested structural differences between FPS1S and FPS2 must also account for the greater thermal stability (Figure 3) and higher sensitivity to the inhibitory effect of NaCl (Figure 2) exhibited by FPS2 compared to FPS1S. In fact, a single amino acid substitution is sufficient to alter temperature and salt sensitivity in the case of malate dehydrogenase [67], [68], [69]. Indeed, inspection of atomic-level homology models of FPS1S and FPS2 and theoretical calculations of the free energy and structural changes that accompany the single-site substitution of FPS2 unique amino acids into the FPS1S structural template indicate that surface salt bridge formation and reduced conformational entropy might largely account for the increased thermostability observed for FPS2. These stabilizing electrostatic effects are reflected in specific amino acid composition biases that have been extensively studied in thermophilic proteins [70], [71].

Our recent characterization of Arabidopsis *fps* single knockout mutants showing that FPS1S and FPS2 can almost fully compensate each other's loss throughout most of the plant life cycle demonstrated that FPS1S and FPS2 have largely overlapping physiological functionalities. The only signs of functional specialization were observed in mature seeds and early developing seedlings. At these developmental stages FPS2 becomes the major contributor to total FPS activity, to the point that residual FPS1-derived activity in mature seeds is unable to supply enough FPP for normal sterol production, which triggers a compensatory enhancement of HMGR activity that is crucial for proper seed germination and seedling establishment [26]. Interestingly, our GUS expression analysis during seed development revealed a marked spatial and temporal divergence in the *FPS1* and *FPS2*

expression pattern, which from the torpedo stage onward showed a strong degree of qualitative complementarity (Figure 6), also known as reciprocal expression pattern. This is when only one gene copy is expressed in some organs or tissue types and the other copy is expressed in others [72]. In the mature stages of seed development *FPS2* expression clearly dominates over the expression of *FPS1*. The *FPS2* gene is expressed throughout the endosperm and the embryo at the torpedo stage, and throughout the cotyledonary embryo in mature seeds, whereas the expression of *FPS1* remains restricted to the maternal chalazal seed coat. The exclusive expression of *FPS2* in the whole cotyledonary embryo, which at this stage occupies most of the seed, along with the higher catalytic efficiency of FPS2, explain why this isozyme is the major contributor to total FPS activity in mature seeds [26]. Interestingly, our results from genetic cross-complementation studies of the *fps2-1* mutant seed phenotypes showed that expression of FPS1S driven by the *FPS2* gene promoter (Figure 8) restored wild-type sitosterol and HMGR activity levels as well as normal sensitivity to mevastatin (Figure 9). This finding demonstrated that under normal conditions FPS1S and FPS2 are completely functionally interchangeable, which is fully consistent with the kinetic similarities exhibited by FPS1S and FPS2, and raises the question as to why FPS2 is the predominant FPS isozyme expressed in mature seeds and during the early stages of seed germination and seedling emergence. Seed viability is essential for survival of higher plants and therefore seeds are well equipped to withstand extended periods of exposure to harsh environmental conditions, as for instance extreme temperatures that may cause protein denaturation and inactivation among other effects. Arabidopsis seeds can complete germination even after treatment for more than 3.5 hours at 45°C [73], a temperature that is lethal for seedlings [74]. It is thus tempting to speculate that FPS2 has been evolutionarily selected as the predominant FPS isozyme in mature seeds of Arabidopsis because of its striking thermotolerance that could contribute to maintain seed germination capability of seeds exposed to high temperatures. It will be interesting to determine whether other isoprenoid biosynthetic enzymes expressed in seeds also display this biochemical feature. Moreover, the higher catalytic efficiency of FPS2 compared to FPS1S would enable early developing seedlings to sustain an active synthesis of isoprenoid precursors until the newly made FPS1S replaces FPS2 in this task.

FPP synthesis has been found to be indispensable for Arabidopsis embryos to progress beyond the pre-globular/globular stage and continue further development [26]. Our GUS expression analysis in seeds suggests that early developing embryos do not synthesize their own FPP since no embryo-specific expression of any of the *FPS* genes could be detected until the heart stage of embryo development (Figure 6). Rather it seems that early developing embryos import FPP or downstream FPP-derived isoprenoid precursors from other seed tissues like the maternal chalazal seed coat and/or the chalazal endosperm, where FPP can be synthesized as inferred from the expression of *FPS1* and *FPS2* in these tissues. This is a plausible hypothesis since the maternal chalazal seed coat and the chalazal endosperm are both considered to be specialized seed tissues involved in the uptake, reprocessing and release of metabolites into the endosperm to support embryogenesis [75], [76]. The proposal that an active synthesis of isoprenoid precursors occurs in the chalazal endosperm at the early stages of embryo development is further supported by the results of a previous study showing a strong expression of isopentenyl transferase (IPT) genes *AtIPT4* and *AtIPT8* in the chalazal zone of Arabidopsis seeds, that disappeared when the embryo progressed to the heart stage [77]. IPTs catalyze

the first committed step of the cytokinin biosynthetic pathway, the isopentenylation of AMP, ADP and ATP from DMAPP [78]. Interestingly, the finding that *FPS2* gene started to be expressed in embryos at the heart stage of development suggests that the embryo acquires the ability to synthesize its own FPP at this stage, though this biosynthetic capability does not seem to be essential for normal embryo and seed development since embryos in *fps2* mutant seeds lacking FPS2 activity are fully viable (Figure S2). These observations support the hypothesis that the maternal chalazal seed coat is able to supply sufficient FPP or FPP-derived precursors to the embryo and the endosperm to sustain normal seed development, though the amount of isoprenoid precursors supplied by this tissue would not be sufficient to sustain normal sterol production in the *fps2* seeds (Figure 9). The finding that expression of FPS2 under control of the *FPS1* promoter (Figure 10), whose activity is restricted to the chalazal seed coat based on the GUS expression analysis (Figure 6), was also able to restore normal sterols levels to *fps2* seeds (Figure 11) lends further support to the hypothesis that the maternal chalazal seed coat can function as a source of FPP for the developing embryo and reinforces the view that maternal seed tissues contribute sterol precursors to developing Arabidopsis embryos [79]. Nevertheless, to the best of our knowledge direct experimental evidence of FPP exchange between cells has yet to be provided. These cross-complementation experiments also indicated that the level of FPS1-derived activity in the chalazal seed coat of *fps2* seeds is only slightly below the minimum threshold of total FPS activity needed to sustain a normal flux through the sterol pathway in seeds, since a 1.2-fold increase of FPS activity in this tissue with respect to the activity in *fps2* seeds (Figure 10) is enough to prevent all *fps2* seed and seedling phenotypes including normal sterols levels (Figure 11). In conclusion, the existence of two potential sources of FPP in seeds would explain why under normal conditions embryos and seeds of

fps single knockout mutants develop like their wild-type counterparts.

Supporting Information

Figure S1 Predicted secondary structure of the region containing the AUG translation initiation codon of the FPS2::FPS1S, FPS2, and FPS2::FPS1S-mutdis mRNAs.

Secondary structure models were generated by using the RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). The AUG start codons are marked with an oval.

(TIF)

Figure S2 Normal embryo development in *fps2-1* mutant seeds. Seeds with embryos at the indicated developmental stages were fixed and cleared for visualization as previously described [26].

(TIF)

Acknowledgments

The excellent technical support from Patricia Lordén and members of the Greenhouse and Microscopy facilities at CRAG and the Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona is greatly appreciated. The authors also thank the Galicia Supercomputing Center (CESGA) for the provision of computational support. V.K. and D.C. were recipients of PhD fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VK DM FJF MCV MA AF. Performed the experiments: VK DM FJF MC PA DC CB MA AF. Analyzed the data: VK DM FJF CB MCV MA AF. Wrote the paper: MCV AF.

References

- Croteau RB, Kutchan T, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville MD: American Society of Plant Biologists. 1250–1268.
- Rodríguez-Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 5: 1–15.
- Wang KC, Ohnuma S (2000) Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta* 1529: 33–48.
- Vandermoten S, Haulbruge E, Cusson M (2009) New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cel Mol Life Sci* 66: 3685–3695.
- Tholl D, Sungbeon L (2011) Terpene specialized metabolism in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book* 9: e0143. doi:10.1043/tab.0143.
- Crowell DN, Salaz MS (1992) Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of lovastatin is reversed by cytokinin. *Plant Physiol* 100: 2090–2095.
- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernandez-Busquets X, et al. (2002) Overexpression of Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic Arabidopsis induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J* 30: 123–132.
- Manzano D, Fernández-Busquets X, Schaller H, González V, Boronat A, et al. (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.
- Manzano D, Busquets A, Closa M, Hoyerová K, Schaller H, et al. (2006) Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in Arabidopsis mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis. *Plant Mol Biol* 61: 195–213.
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, et al. (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* 8: 693–701.
- Attucci S, Aitken SM, Gulick PJ, Ibrahim RK (1995) Farnesylpyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* 321: 493–500.
- Cunillera N, Arró M, Delourme D, Karst F, Boronat A, et al. (1996) Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* 271: 7774–7780.
- Cunillera N, Boronat A, Ferrer A (1997) The Arabidopsis thaliana FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* 272: 15381–15388.
- Li C-P, Larkins BA (1996) Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *Gene* 171: 193–196.
- Pan Z, Herickhoff L, Backhaus RA (1996) Cloning, characterization, and heterologous expression of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles. *Arch Biochem Biophys* 332: 196–204.
- Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N (1999) Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 40: 348–354.
- Gaffe J, Bru JP, Causse M, Vidal A, Stamitti-Bert L, et al. (2000) LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development. *Plant Physiol* 123: 1351–1362.
- Hemmerlin A, Rivera SB, Erickson HK, Poulter CD (2003) Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J Biol Chem* 278: 32132–32140.
- Suzuki M, Muranaka T (2007) Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids* 42: 47–54.
- Vranová E, Coman D, Gruissem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* 5: 318–333.
- Thabet I, Guirimand G, Courdavault V, Papon N, Godet S, et al. (2011) The subcellular localization of periwinkle farnesyl diphosphate synthase provides insight into the role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis. *J Plant Physiol* 168: 2110–2116.
- Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, et al. (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol* 148: 1219–1228.
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, et al. (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta* 234: 903–914.

24. Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan X, Kasumov T, et al. (2007) Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem Cell Biol* 127: 273–290.
25. Cunillera N, Boronat A, Ferrer A (2000) Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Mol Biol* 44: 745–758.
26. Closa M, Vranová E, Bortolotti C, Bigler L, Arró M, et al. (2010) The Arabidopsis thaliana FPP synthase isozymes have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J* 63: 512–525.
27. Bach TJ, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Vollack KU (1999) Mevalonate biosynthesis in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34: 107–122.
28. Hodzic A, Rappolt M, Amenitsch H, Laggner P, Pabst G (2008) Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol. *Biophys J* 94: 3935–3944.
29. Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* 54: 137–164.
30. Schrick K, Mayer U, Horrichs A, Kuhnt C, Bellini C, et al. (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* 14: 1471–1484.
31. Schrick K, Mayer U, Martin G, Bellini C, Kuhnt C, et al. (2002) Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of Arabidopsis. *Plant J* 31: 61–73.
32. Huguency P, Camara B (1990) Purification and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*. *FEBS Lett* 273: 235–238.
33. Tholl D, Croteau R, Gershenzon J (2001) Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch Biochem Biophys* 386: 233–242.
34. Schmidt A, Gershenzon J (2007) Cloning and characterization of isoprenyl diphosphate synthases with farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate synthase activity from Norway spruce (*Picea abies*) and their relation to induced oleoresin formation. *Phytochemistry* 68: 2649–2659.
35. Montella C, Bellsollé L, Pérez-Luque R, Badia J, Baldomà L, et al. (2005) Crystal structure of an iron-dependent group III dehydrogenase that interconverts l-lactaldehyde and l-1,2-propanediol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 4957–4966.
36. Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85: 109–114.
37. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–75.
39. Dale S, Arró M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, et al. (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.
40. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2: 2212–2221.
41. Rondeau J-M, Bitsch F, Bourgier E, Geiser M, Hemmig R, et al. (2006) Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *Chem Med Chem* 1: 267–273.
42. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 426: 145–159.
43. Kim DE, Chivian D, Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*. 32 (Web Server issue), W526–531.
44. Kaufmann KW, Lemmon GH, Deluca SL, Sheehan JH, Meiler J (2010) Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry* 49: 2987–2998.
45. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, et al. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue), W375–383.
46. Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D (2011) Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins* 79: 830–838.
47. Benedix A, Becker CM, de Groot BL, Caffisch A, Böckmann RA (2009) Predicting free energy changes using structural ensembles. *Nat Methods* 6: 3–4.
48. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 735–743.
49. Stangeland B, Salehian Z (2002) An improved clearing method for GUS staining in Arabidopsis endosperm. *Plant Mol Biol Rep* 20: 107–114.
50. Nelson BK, Cai X, Nebenführ A (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* 51: 1126–1136.
51. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, et al. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13079–13084.
52. Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372: 774–797.
53. Adeli K (2011) Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E1051–E1064.
54. Reineke LC, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC (2008) A small stem-loop element directs internal initiation of the URE2 internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283: 19011–19025.
55. Blaszczak L, Ciesiolka J (2011) Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* 50: 7080–7092.
56. Mekkiengkrai D, Sando T, Hirooka K, Sakdapiphanich J, Tanaka Y, et al. (2004) Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom *Lactarius chrysorheus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2360–2368.
57. Felle HH (2001) pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol* 3: 577–591.
58. Ito J, Bath TS, Petzold CJ, Redding-Johansson AM, Mukhopadhyay A, et al. (2011) Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res* 10, 1571–1582.
59. Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, et al. (2007) Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* 19, 3170–3193.
60. Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, et al. (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol* 150: 125–143.
61. Guirimand G, Courdavault V, St-Pierre B, Burlat V (2010) Biosynthesis and regulation of alkaloids. In Pua EC, Davey M, editors. *Plant Developmental Biology. Biotechnological Perspectives*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. vol. 2, 139–160.
62. Sen SE, Trobaugh C, Béliève C, Richard T, Cusson M (2007) Cloning, expression and characterization of a dipteran farnesyl diphosphate synthase. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1198–1206.
63. Ranzer LK, Brück TB, Brück WM, López JV, Kerr RG (2009) A new prokaryotic farnesyl diphosphate synthase from the octocoral *Eunicia fusca*: differential display, inverse PCR, cloning, and characterization. *Mar Biotechnol* 11: 62–73.
64. Koyama T, Obata S, Osabe M, Takeshita A, Yokoyama K, et al. (1993) Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J Biochem (Tokyo)* 113: 355–363.
65. Szkopinska A, Plochocka D (2005) Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Polon* 52: 45–55.
66. Koyama T, Gotoh Y, Nishino T (2000) Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: Reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants. *Biochemistry* 39: 463–469.
67. Madern D, Ebel C, Zaccai G (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91–98.
68. Madern D, Pfister C, Zaccai G (1995) Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* 230: 1088–1095.
69. Dong Y, Somero GN (2009) Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions. *J Exp Biol* 212: 169–177.
70. Kumar S, Tsai C (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* 13: 179–191.
71. Zeldovich BZ, Berezovsky IN, Shakhnovich EI (2007) Protein and DNS sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol* 3: e5.
72. Liu S-L, Baute GJ, Adams K (2011) Organ and cell type-specific complementary expression patterns and regulatory neofunctionalization between duplicated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol Evol* 3: 1419–1436.
73. Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005) Heat stress phenotypes of Arabidopsis thaliana mutants implicate multiple signalling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138: 882–897.
74. Burke JJ, O'Mahony PJ, Oliver MJ (2000) Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. *Plant Physiol* 123: 575–587.
75. Nguyen H, Brown RC, Lemmon B (2000) The specialized chalazal endosperm in *Arabidopsis thaliana* and *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Protoplasma* 212: 99–110.
76. Ingram GC (2010) Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. *Protoplasma* 247: 195–214.
77. Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128–138.
78. Sakakibara H (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431–449.
79. Rasbery JM, Shan H, LeClair RJ, Norman M, Matsuda SPT, et al. (2007) Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem* 282: 17002–17013.

ANEXO

Anexo 1. RNA-seq. Listado de genes expresados diferencialmente.

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT5G51720	AT5G51720	5:21009591-21010345	AM	AR	230	14	-4	-8.8	0,00005	0.011	2 iron, 2 sulfur cluster binding
AT1G29395	COR414-TM1	1:10288196-10289621	AM	AR	120	14	-3,1	-6.4	0,00005	0.011	COLD REGULATED 314 INNER MEMBRANE 1
AT4G26530	AT4G2653	4:13391292-13393107	AM	AR	570	65	-3,1	-4.5	0,00010	0.019	Aldolase superfamily protein
AT2G42530	COR15B	2:17709035-17709945	AM	AR	220	29	-3	-6.7	0,00005	0.011	cold regulated 15b
AT5G01600	FER1	5:227023-230051	AM	AR	340	57	-2,6	-4.1	0,00025	0.037	ferretin 1
AT5G47770	FPS1	5:19345172-19347629	AM	AR	60	11	-2,5	-4.9	0,00005	0.011	farnesyl diphosphate synthase 1
AT2G01520	MLP328	2:235924-237147	AM	AR	300	57	-2,4	-5.2	0,00015	0.025	MLP-like protein 328
AT2G01530	MLP329	2:239704-240520	AM	AR	140	27	-2,4	-5.4	0,00005	0.011	MLP-like protein 329
AT2G40300	ATFER4	2:16831292-16833280	AM	AR	65	13	-2,4	-4.8	0,00010	0.019	ferritin 4
AT3G25190	AT3G25190	3:9174456-9175776	AM	AR	76	14	-2,4	-5.1	0,00010	0.019	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein
AT5G36910	THI2.2	5:14561816-14562750	AM	AR	110	21	-2,4	-5.2	0,00005	0.011	thionin 2.2
AT5G52310	LTI140	5:21240848-21243613	AM	AR	100	20	-2,4	-4.4	0,00035	0.047	low-temperature-responsive protein 78 (LTI78) / desiccation-responsive protein 29A (RD29A)
AT1G31690	AT1G31690	1:11343979-11347767	AM	AR	28	5,8	-2,3	-4.3	0,00030	0.042	Copper amine oxidase family protein
AT5G06690	WCRKC1	5:2060500-2061956	AM	AR	83	17	-2,3	-4	0,00010	0.019	WCRKC thioredoxin 1
AT1G04800	AT1G04800	1:1348451-1349286	AM	AR	140	31	-2,1	-4.7	0,00030	0.042	glycine-rich protein
AT1G13650	AT1G13650	1:4680431-4682196	AM	AR	78	18	-2,1	-3.8	0,00020	0.032	No description available
AT2G15080	RLP19	2:6533686-6536995	AM	AR	7,6	31	2	3.7	0,00025	0.037	receptor like protein 19
AT3G47340	AT-ASN1	3:17437883-17441243	AM	AR	8,3	37	2,1	3.9	0,00010	0.019	glutamine-dependent asparagine synthase 1
AT5G24530	DMR6	5:8378832-8383401	AM	AR	12	52	2,1	4.3	0,00025	0.037	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT2G37760	AT2G37760	2:15831853-15833920	AM	AR	28	130	2,2	4	0,00015	0.025	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT2G38470	WRKY33	2:16108360-16111797	AM	AR	8,3	39	2,2	4.1	0,00015	0.025	WRKY DNA-binding protein 33
AT3G28270	AT3G28270	3:10538104-10540024	AM	AR	8,4	38	2,2	3.8	0,00035	0.047	Protein of unknown function (DUF677)
AT3G49110	ATPCA	3:18200663-18203142	AM	AR	21	94	2,2	4.4	0,00025	0.037	peroxidase CA
AT5G24210	AT5G24210	5:8217334-8219619	AM	AR	9	43	2,2	4.4	0,00025	0.037	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G72450	JAZ6	1:27274064-27276317	AM	AR	21	110	2,3	4.8	0,00010	0.019	jasmonate-zim-domain protein 6
AT3G26830	PAD3	3:9887947-9889705	AM	AR	4,9	25	2,3	4.3	0,00035	0.047	Cytochrome P450 superfamily protein
AT5G06320	NHL3	5:1928390-1931768	AM	AR	33	180	2,4	4.2	0,00005	0.011	NDR1/HIN1-like 3
AT1G61820	BGLU46	1:22835077-22838615	AM	AR	7,8	44	2,5	4.5	0,00005	0.011	beta glucosidase 46
AT3G44300	AtNIT2	3:15983310-15985535	AM	AR	27	150	2,5	4.9	0,00015	0.025	nitrilase 2
AT4G02330	ATPMEPCRB	4:1032412-1035037	AM	AR	6,5	37	2,5	4.8	0,00005	0.011	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT5G24420	PGL5	5:8336613-8338008	AM	AR	26	140	2,5	5	0,00010	0.019	6-phosphogluconolactonase 5
AT1G02220	ANAC003	1:428813-430647	AM	AR	4,7	28	2,6	4.7	0,00035	0.047	NAC domain containing protein 3
AT1G70700	JAZ9	1:26654767-26657064	AM	AR	21	130	2,6	4.7	0,00005	0.011	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
AT2G05510	AT2G05510	2:2015705-2016749	AM	AR	61	370	2,6	4.7	0,00005	0.011	Glycine-rich protein family
AT3G28220	AT3G28220	3:10524403-10526728	AM	AR	59	360	2,6	4.6	0,00015	0.025	TRAF-like family protein
AT3G63380	AT3G63380	3:23406610-23410360	AM	AR	1,5	8,9	2,6	4.4	0,00030	0.042	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT4G17470	AT4G17470	4:9742758-9744860	AM	AR	10	62	2,6	4.6	0,00005	0.011	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G48850	ATSDI1	5:19805436-19807759	AM	AR	12	77	2,6	5.3	0,00005	0.011	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G35710	AT1G35710	1:13220939-13224681	AM	AR	2,2	14	2,7	4.8	0,00005	0.011	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain
AT2G45220	AT2G45220	2:18644083-18646447	AM	AR	8,7	57	2,7	5.3	0,00005	0.011	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT5G17220	ATGSTF12	5:5658459-5659386	AM	AR	12	76	2,7	5.6	0,00010	0.019	glutathione S-transferase phi 12
AT5G50915	AT5G50915	5:20710208-20712315	AM	AR	5,6	36	2,7	4.5	0,00015	0.025	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT1G19670	ATCLH1	1:6803610-6805044	AM	AR	37	260	2,8	5.3	0,00005	0.011	chlorophyllase 1
AT1G44350	ILL6	1:16834209-16838286	AM	AR	3,8	26	2,8	5	0,00010	0.019	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6
AT3G15356	AT3G15356	3:5174401-5175469	AM	AR	13	91	2,8	5.6	0,00005	0.011	Legume lectin family protein
AT3G25780	AOC3	3:9409289-9410567	AM	AR	8,2	57	2,8	5.5	0,00005	0.011	allene oxide cyclase 3
AT4G08770	Prx37	4:5598114-5600312	AM	AR	4,4	30	2,8	5	0,00010	0.019	Peroxidase superfamily protein
AT5G06870	PGIP2	5:2133917-2135166	AM	AR	19	140	2,8	5.7	0,00005	0.011	polygalacturonase inhibiting protein 2
AT2G30766	AT2G30766	2:13105769-13108863	AM	AR	44	330	2,9	5.1	0,00005	0.011	No description available
AT3G25760	AOC1	3:9403882-9405250	AM	AR	29	210	2,9	5.9	0,00005	0.011	allene oxide cyclase 1
AT5G07010	ST2A	5:2174677-2176106	AM	AR	2,7	20	2,9	4.8	0,00030	0.042	sulfotransferase 2A
AT1G02920	GST11	1:658656-659771	AM	AR	44	360	3	6.1	0,00005	0.011	glutathione S-transferase 7
AT1G22400	ATUGT85A1	1:7903659-7906673	AM	AR	6,2	49	3	5.6	0,00005	0.011	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT2G33380	CLO-3	2:14144830-14146471	AM	AR	10	85	3	5.1	0,00005	0.011	Caleosin-related family protein
AT2G44460	BGLU28	2:18346438-18349966	AM	AR	2,6	21	3	5.1	0,00005	0.011	beta glucosidase 28
AT4G01080	TBL26	4:466390-468294	AM	AR	3,4	27	3	5.2	0,00005	0.011	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 26
AT1G61800	GPT2	1:22824439-22826774	AM	AR	3,7	32	3,1	5.5	0,00005	0.011	glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2
AT3G12145	FLR1	3:3874498-3876237	AM	AR	11	96	3,1	6.1	0,00005	0.011	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT4G37370	CYP81D8	4:17569827-17571704	AM	AR	2,3	20	3,1	5.2	0,00005	0.011	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8
AT2G43530	AT2G43530	2:18070055-18070718	AM	AR	39	370	3,2	7.8	0,00005	0.011	Scorpion toxin-like knottin superfamily protein

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT3G28540	AT3G28540	3:10694443-10696123	AM	AR	2,2	20	3,2	4.8	0,00020	0.032	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT4G25810	XTR6	4:13128642-13129884	AM	AR	3,7	33	3,2	5.5	0,00010	0.019	xyloglucan endotransglycosylase 6
AT4G32480	AT4G32480	4:15676403-15677973	AM	AR	8,7	82	3,2	6.3	0,00005	0.011	Protein of unknown function (DUF506)
AT1G52410	TSA1	1:19520727-19525624	AM	AR	17	160	3,3	5.3	0,00005	0.011	No Description Available
AT2G14247	AT2G14247	2:6034347-6034835	AM	AR	13	130	3,3	7.4	0,00005	0.011	Expressed protein
AT2G41100	ATCAL4	2:17137828-17139612	AM	AR	17	170	3,3	5.8	0,00005	0.011	Calcium-binding EF hand family protein
AT4G08870	AT4G08870	4:5646438-5648727	AM	AR	40	390	3,3	5.2	0,00005	0.011	Arginase/deacetylase superfamily protein
AT4G22880	TDS4	4:12004767-12006209	AM	AR	9	87	3,3	5.6	0,00005	0.011	leucoanthocyanidin dioxygenase
AT4G23210	CRK13	4:12148713-12151479	AM	AR	1,1	10	3,3	4.6	0,00025	0.037	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 13
AT5G54060	UF3GT	5:21936878-21938369	AM	AR	2,7	27	3,3	5.6	0,00010	0.019	UDP-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase
AT1G72520	LOX4	1:27308514-27312754	AM	AR	0,85	8,6	3,4	5	0,00035	0.047	PLAT/LH2 domain-containing lipoxygenase family protein
AT2G43510	ATTI1	2:18067171-18067802	AM	AR	27	300	3,4	8.2	0,00005	0.011	trypsin inhibitor protein 1
AT3G56980	BHLH039	3:21086545-21087494	AM	AR	3,7	42	3,5	6.1	0,00010	0.019	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G42530	AT5G42530	5:17004737-17005393	AM	AR	48	540	3,5	8.4	0,00005	0.011	No description available
AT1G19180	JAZ1	1:6622093-6623620	AM	AR	9,5	120	3,6	6.2	0,00005	0.011	No Description Available
AT1G56650	ATMYB75	1:21233594-21235137	AM	AR	4,6	57	3,6	6.5	0,00005	0.011	production of anthocyanin pigment 1
AT2G31865	PARG2	2:13546595-13549536	AM	AR	1,3	15	3,6	5	0,00015	0.025	poly(ADP-ribose) glycohydrolase 2
AT5G13220	TIFY9	5:4218887-4220883	AM	AR	3,5	44	3,6	5.4	0,00005	0.011	jasmonate-zim-domain protein 10
AT1G02930	ATGSTF6	1:661176-662456	AM	AR	39	530	3,7	5.9	0,00005	0.011	glutathione S-transferase 6
AT1G13609	AT1G13609	1:4662720-4663219	AM	AR	9	110	3,7	5.1	0,00005	0.011	Defensin-like (DEFL) family protein

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT2G37770	AT2G37770	2:15834866-15837001	AM	AR	2,2	30	3,7	5.3	0,00005	0.011	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
AT4G23600	JR2	4:12310618-12313212	AM	AR	30	400	3,7	5.6	0,00005	0.011	Tyrosine transaminase family protein
AT5G26920	CBP60G	5:9475681-9478751	AM	AR	1,3	17	3,7	5.3	0,00005	0.011	Cam-binding protein 60-like G
AT1G47400	AT1G47400	1:17385716-17386186	AM	AR	9,6	140	3,8	8.3	0,00005	0.011	No description available
AT2G34810	AT2G34810	2:14685255-14687062	AM	AR	11	160	3,8	7	0,00005	0.011	FAD-binding Berberine family protein
AT2G41240	BHLH100	2:17198281-17199320	AM	AR	6,8	96	3,8	5.9	0,00005	0.011	basic helix-loop-helix protein 100
AT3G44860	FAMT	3:16379632-16381070	AM	AR	2	27	3,8	6	0,00005	0.011	farnesoic acid carboxyl-O-methyltransferase
AT5G03350	AT5G03350	5:815673-816658	AM	AR	6,8	93	3,8	7.2	0,00005	0.011	Legume lectin family protein
AT5G13330	Rap2.6L	5:4272059-4274660	AM	AR	2,7	37	3,8	6.3	0,00010	0.019	related to AP2 6l
AT5G36220	CYP81D1	5:14253689-14256033	AM	AR	1,6	22	3,8	5.9	0,00005	0.011	No Description Available
AT5G42800	DFR	5:17164140-17165918	AM	AR	8	110	3,8	7.1	0,00005	0.011	dihydroflavonol 4-reductase
AT2G26560	PLA-IIA	2:11293768-11295806	AM	AR	2,3	34	3,9	6.4	0,00005	0.011	No Description Available
AT2G43570	CHI	2:18076223-18077463	AM	AR	8,9	130	3,9	7.5	0,00005	0.011	No Description Available
AT3G50480	HR4	3:18733067-18734388	AM	AR	7,3	120	4	7.5	0,00005	0.011	No Description Available
AT3G56970	BHLH038	3:21084109-21085150	AM	AR	6	99	4	7.5	0,00005	0.011	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
ATCG01130	YCF1.2	Pt:123883-129244	AM	AR	0,39	6,2	4	5.7	0,00035	0.047	Ycf1 protein
AT1G52040	MBP1	1:19350374-19352782	AM	AR	5	84	4,1	7.3	0,00005	0.011	No Description Available
AT2G18690	AT2G18690	2:8097419-8098827	AM	AR	3,2	54	4,1	6.3	0,00005	0.011	No description available
AT2G25510	AT2G25510	2:10856371-10857156	AM	AR	33	590	4,1	6.8	0,00005	0.011	No description available

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT3G56400	WRKY70	3:20908927-20910481	AM	AR	2,6	46	4,1	6.8	0,00005	0.011	WRKY DNA-binding protein 70. Crosstalk between SA and JA, directly controlled by atMYB44 that activates the SA-induced defense response and represses the JA branch. Wasternack p1036 (Shim et al., 2013) Active in leaf senescence and JA linked (p1046)
AT5G41750	AT5G41750	5:16693908-16698943	AM	AR	0,36	6,1	4,1	5.4	0,00015	0.025	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G66090	AT1G66090	1:24602145-24604763	AM	AR	0,67	12	4,2	5.7	0,00025	0.037	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
AT2G29460	GST22	2:12626535-12627678	AM	AR	2	35	4,2	6.6	0,00035	0.047	glutathione S-transferase tau 4
AT4G15210	BMV1	4:8666337-8669470	AM	AR	0,59	11	4,2	5.3	0,00025	0.037	beta-amylase 5
AT5G10760	AT5G10760	5:3400341-3402207	AM	AR	0,46	8,7	4,2	5.5	0,00030	0.042	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT4G14365	XBAT34	4:8271463-8273765	AM	AR	1,5	30	4,3	6.6	0,00005	0.011	XB3 ortholog 4 in Arabidopsis thaliana
AT2G30770	CYP71A13	2:13109793-13112011	AM	AR	2,5	52	4,4	7.3	0,00005	0.011	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13
AT5G05600	AT5G05600	5:1672119-1674739	AM	AR	4,4	94	4,4	7.8	0,00005	0.011	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G17380	JAZ5	1:5955487-5957212	AM	AR	1,1	26	4,5	6.6	0,00020	0.032	jasmonate-zim-domain protein 5
AT1G21250	WAK1	1:7439265-7442113	AM	AR	1,5	34	4,5	7.2	0,00005	0.011	cell wall-associated kinase
AT1G52030	MBP1.2	1:19345939-19349088	AM	AR	2,1	49	4,5	7	0,00005	0.011	myrosinase-binding protein 2
AT1G69880	ATH8	1:26321478-26322993	AM	AR	2	43	4,5	7.1	0,00020	0.032	No Description Available
AT5G19110	AT5G19110	5:6411560-6413170	AM	AR	0,58	13	4,5	5.9	0,00020	0.032	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT1G47395	AT1G47395	1:17383033-17383408	AM	AR	16	380	4,6	11	0,00005	0.011	No description available
AT2G30750	CYP71A12	2:13099335-13101413	AM	AR	4,3	100	4,6	8	0,00005	0.011	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12
AT2G35980	NHL10	2:15110587-15111471	AM	AR	1,4	34	4,6	6.9	0,00010	0.019	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT3G60420	AT3G60420	3:22334423-22337617	AM	AR	2,1	51	4,6	6.4	0,00020	0.032	Phosphoglycerate mutase family protein
AT5G13320	GDG1	5:4267509-4271051	AM	AR	1,2	28	4,6	7	0,00005	0.011	Auxin-responsive GH3 family protein
AT2G31980	AtCYS2	2:13609092-13609902	AM	AR	2	50	4,7	7.5	0,00020	0.032	PHYTOCYSTATIN 2
AT3G48520	CYP94B3	3:17974976-17976670	AM	AR	0,91	24	4,7	6.8	0,00030	0.042	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3
AT3G50770	CML41	3:18873957-18874780	AM	AR	0,66	20	4,9	6.7	0,00035	0.047	calmodulin-like 41
AT5G20230	SAG14	5:6826505-6827629	AM	AR	4,6	140	5	8.8	0,00005	0.011	blue-copper-binding protein
AT1G52890	ANAC019	1:19697003-19698482	AM	AR	0,77	28	5,2	7.3	0,00010	0.019	NAC domain containing protein 19
AT3G60140	DIN2	3:22216671-22220824	AM	AR	1,1	41	5,2	7.7	0,00005	0.011	Glycosyl hydrolase superfamily protein
AT1G26390	AT1G26390	1:9130016-9131779	AM	AR	0,73	29	5,3	7.5	0,00030	0.042	FAD-binding Berberine family protein
AT5G24780	VSP1	5:8507589-8508957	AM	AR	31	1300	5,4	6.8	0,00005	0.011	vegetative storage protein 1
AT3G49620	DIN11	3:18393746-18396816	AM	AR	1,5	70	5,6	8.5	0,00005	0.011	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G61810	BGLU45	1:22830014-22834728	AM	AR	1,5	77	5,7	7.9	0,00005	0.011	beta-glucosidase 45
AT3G47480	AT3G47480	3:17496353-17496947	AM	AR	1,7	84	5,7	9.1	0,00005	0.011	Calcium-binding EF-hand family protein
AT3G22910	AT3G22910	3:8116334-8119388	AM	AR	0,28	16	5,8	7.5	0,00010	0.019	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT1G15520	ABCG40	1:5331857-5338326	AM	AR	0,43	32	6,2	8.7	0,00005	0.011	pleiotropic drug resistance 12
AT2G39330	JAL23	2:16419595-16421852	AM	AR	1,2	120	6,7	9.7	0,00005	0.011	jacalin-related lectin 23
AT1G32910	AT1G32910	1:11925425-11926908	AM	AR	0	0,31	Inf	NaN	0,00015	0.025	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT1G33730	CYP76C5	1:12227278-12228460	AM	AR	0	1	Inf	NaN	0,00005	0.011	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 5
AT1G33950	AT1G33950	1:12333045-12339182	AM	AR	0	3	Inf	NaN	0,00005	0.011	Avirulence induced gene (AIG1) family protein
AT1G47495	AT1G47495	1:17428944-17429813	AM	AR	0	1,7	Inf	NaN	0,00015	0.025	No description available

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT1G51780	ILL5	1:19204511-19206586	AM	AR	0	0,23	Inf	NaN	0,00015	0.025	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 5
AT1G57640	AT1G57640	1:21346353-21350793	AM	AR	0	0,16	Inf	NaN	0,00005	0.011	transposable element gene
AT1G57650	AT1G57650	1:21351290-21354311	AM	AR	0	1,3	Inf	NaN	0,00005	0.011	ATP binding
AT1G59950	AT1G59950	1:22068032-22070588	AM	AR	0	0,57	Inf	NaN	0,00020	0.032	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
AT1G61120	GES	1:22523636-22528811	AM	AR	0	9,7	Inf	NaN	0,00005	0.011	terpene synthase 04
AT1G66370	AtMYB113	1:24753633-24754604	AM	AR	0	4	Inf	NaN	0,00005	0.011	myb domain protein 113
AT1G66550	WRKY67	1:24828501-24829639	AM	AR	0	0,53	Inf	NaN	0,00030	0.042	WRKY DNA-binding protein 67
AT1G66570	SUC7	1:24835250-24837322	AM	AR	0	3,6	Inf	NaN	0,00005	0.011	sucrose-proton symporter 7
AT1G68380	AT1G68380	1:25635837-25637462	AM	AR	0	0,41	Inf	NaN	0,00015	0.025	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
AT1G71390	AtRLP11	1:26906452-26908807	AM	AR	0	0,15	Inf	NaN	0,00015	0.025	receptor like protein 11
AT1G72260	THI2.1	1:27198432-27199444	AM	AR	0	21	Inf	NaN	0,00005	0.011	thionin 2.1
AT1G75930	EXL6	1:28508071-28509857	AM	AR	0	0,71	Inf	NaN	0,00005	0.011	No Description Available
AT2G04495	AT2G04495	2:1564165-1565106	AM	AR	0	1,6	Inf	NaN	0,00005	0.011	No description available
AT2G26380	AT2G26380	2:11226614-11228057	AM	AR	0	0,24	Inf	NaN	0,00020	0.032	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT2G43730	AT2G43730	2:18124647-18125868	AM	AR	0	0,86	Inf	NaN	0,00005	0.011	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT3G15536	AT3G15536	3:5260722-5261322	AM	AR	0	2,8	Inf	NaN	0,00005	0.011	No description available
AT3G43250	AT3G43250	3:15216712-15217462	AM	AR	0	1	Inf	NaN	0,00005	0.011	Family of unknown function (DUF572)
AT3G44350	anac061	3:16022835-16024487	AM	AR	0	1,2	Inf	NaN	0,00005	0.011	NAC domain containing protein 61
AT3G49540	AT3G49540	3:18365677-18366565	AM	AR	0	0,9	Inf	NaN	0,00005	0.011	No description available
AT4G08867	AT4G08867	4:5659814-5660903	AM	AR	0	0,56	Inf	NaN	0,00010	0.019	No description available
AT4G11340	AT4G11340	4:6894207-6899130	AM	AR	0	0,53	Inf	NaN	0,00005	0.011	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family

Gene Name	Gene Symbol	Locus	Sample 1	Sample 2	FPKM 1	FPKM 2	log2 fold change	test_stat	p_value	q_value	Gene.Description
AT4G15980	AT4G15980	4:9057465-9059983	AM	AR	0	0,21	Inf	NaN	0,00025	0.037	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT4G26466	LRE	4:13367644-13368629	AM	AR	0	2,2	Inf	NaN	0,00005	0.011	lorelei
AT4G27670	HSP21	4:13818869-13819971	AM	AR	0	0,94	Inf	NaN	0,00005	0.011	heat shock protein 21
AT4G37710	AT4G37710	4:17718127-17718742	AM	AR	0	1,3	Inf	NaN	0,00005	0.011	VQ motif-containing protein
AT4G39610	AT4G39610	4:18393569-18394745	AM	AR	0	0,47	Inf	NaN	0,00015	0.025	Protein of unknown function, DUF617
AT5G21960	AT5G21960	5:7258362-7259308	AM	AR	0	0,53	Inf	NaN	0,00035	0.047	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT5G22380	NAC090	5:7408776-7410102	AM	AR	0	1,4	Inf	NaN	0,00005	0.011	NAC domain containing protein 90
AT5G24540	BGLU31	5:8384875-8388027	AM	AR	0	0,3	Inf	NaN	0,00005	0.011	beta glucosidase 31
AT5G44990	AT5G44990	5:18163131-18164768	AM	AR	0	3,3	Inf	NaN	0,00005	0.011	Glutathione S-transferase family protein
AT5G63225	AT5G63225	5:25356132-25356740	AM	AR	0	1,8	Inf	NaN	0,00005	0.011	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
AT4G39250	ATRL1	4:18271456-18271857	AM	AR	4	0	-Inf	NaN	0,00005	0.011	RAD-like 1

inf: Fold Change infinito/ NaN: no determinado