

3.1.2 La proteïna PHOR1 fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 no activa per sí sola els gens marcadors HIS3 i ADE2.

Com hem vist anteriorment els experiments de doble híbrid es basen en la selecció de les cèl·lules de llevat que sobre-expressen la proteïna *bait* fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 (BD) i una de les proteïnes de la llibreria de cDNA (*prey*) fusionada al domini d'activació (AD) en un medi mínim –Leu –Trp –Ade –His. Quan les proteïnes *bait* i *prey* interaccionen entre sí, es posen en contacte els domini d'unió al DNA i d'activació de GAL4, restituint l'activitat d'aquesta proteïna reguladora. D'aquesta manera, s'activa la transcripció dels gens marcadors *HIS3* i *ADE2* que confereixen autotrofia per a la histidina i l'adenina i aquests clons poden créixer en un medi selectiu SD-L-T-A-H.

S'ha vist però que algunes proteïnes poden, per sí soles o quan estan fusionades al domini GAL4-BD, activar l'expressió dels gens marcadors sense necessitat d'interacció amb la proteïna *prey* fusionada al domini GAL4-AD. Aquest fet es dona freqüentment quan la proteïna a estudiar és un factor de transcripció, donat que aquestes proteïnes ja contenen un domini propi activador de la transcripció. Altres proteïnes que contenen dominis acídics amfipàtics són a vegades també capaces d'activar la transcripció dels gens marcadors quan es fusionen al GAL4-BD. Per aquesta raó, és important comprovar que la proteïna a estudiar fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4, no activa per sí sola la transcripció dels gens marcadors. En cas d'observar una activació dels gens marcadors, es pot provar d'eliminar el possible domini d'activació mitjançant l'obtenció de delecions específiques del gen, o treballar amb només fragments de la proteïna, comprovant de nou aquestes construccions truncades.

A fi de comprovar que la soca de llevat PJ69-2A transformada amb la construcció pAS2-1/*PHOR1* no activava l'expressió dels gens marcadors *HIS3* i *ADE2*, sota control dels promotors mínims $LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3$ i $GAL2::GAL1_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2$ aquesta es plaquejà en els medis selectius SD-Trp (selecciona les cèl·lules transformades amb el plàsmid pAS2-1) i SD-Trp-Ade-His, comprovant que creixia en el primer dels medis però no en el segon. Això demostra que la proteïna de fusió GAL4-BD:PHOR1 no té la capacitat d'activar la transcripció dels gens *HIS3* i *ADE2*, per sí sola (figura 24A).

Només quan la proteïna de fusió GAL4-BD:PHOR1 interaccioni amb una proteïna Y de la llibreria de cDNA fusionada al GAL4-AD, es donarà la proximitat suficient dels dominis BD i AD de GAL4 per activar els gens marcadors *HIS3* i *ADE2*, podent seleccionar els diploids positius en un medi SD-L-T-A-H (figura 24B). Si no existeix interacció entre aquestes proteïnes el diploid no creixerà en aquest medi (figura 24C).

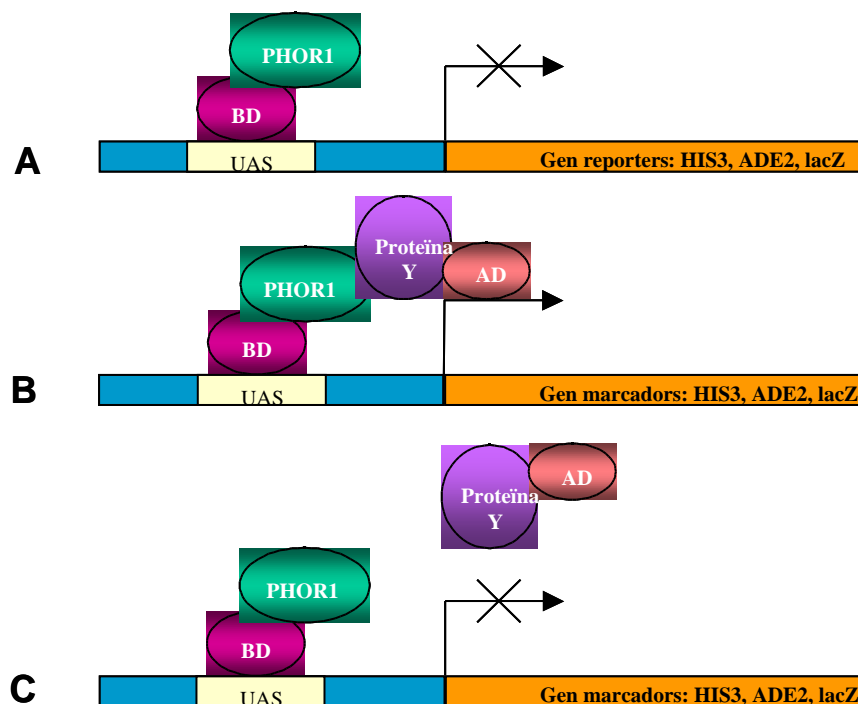


Figura 24. Esquema gràfic de l'expressió dels gens marcadors *HIS3* i *ADE2* en que es fonamenten els experiments de doble híbrid.

- A) La proteïna PHOR1 fusionada al GAL4-BD no és capaç d'activar la transcripció dels gens marcadors. La soca de llevat transformada amb el vector *pAS2-1/PHOR1*, creix en un medi SD-Trp, però no creix en un medi selectiu SD-Trp-Ade-His.
- B) La interacció de GAL4-BD:PHOR1 amb una proteïna Y fusionada al domini AD de GAL4, aproxima els dominis BD i AD restituint l'activitat de GAL4 i activant l'expressió dels gens marcadors *HIS3* i *ADE2* que confereixen autotrofia per a la histidina i l'adenina. Aquestes cèl·lules creixen en un medi selectiu SD-Leu-Trp-Ade-His.
- C) Si no existeix interacció no s'expressen els gens marcadors *HIS3* i *ADE2*. Aquestes cèl·lules creixen en un medi SD-Leu-Trp però no en el medi selectiu SD-Leu-Trp-Ade-His.

3.2 Conjugació de les soques de llevat MATa PJ69-2A i MAT α Y187.

Un cop fets aquests controls, les cèl.lules de llevat MATa PJ69-2A que sobre-expressaven la proteïna de fusió GAL4-BD:PHOR1 es van conjuguar amb la soca MAT Y187 pre-transformada amb la llibreria de cDNA de fulla de *Solanum lycopersicon* fusionada al domini activador de GAL4. Es van realitzar dos cribratges amb 1 mL de la llibreria pretransformada, que equival a una densitat de 4×10^8 cfu de la llibreria (2×10^6 clons de cDNA independents). Les eficiències de conjugació obtingudes van ser del 10% i 20%, recuperant-se de l'ordre de 1×10^7 i 2×10^7 cèl.lules diploids/mL (en total $40-80 \times 10^7$ diploids), respectivament. Un cop avaluada l'eficiència de conjugació, es seleccionaren 10×10^6 diploids per a cada creuament, plaquejant aquestes cèl.lules en 10 plaques de 15 cm de diàmetre amb medi selectiu SD –Trp –Leu –His –Ade.

Les colònies que al cap de 7 a 16 dies havien crescut en aquest medi, es van repicar en un medi de selecció fresc i també es van fer créixer en una segona placa sobre la que s'havia col·locat un filtre de paper per tal d'assajar l'activitat β -galactosidasa (codificada pel gen marcador *lacZ*) de les colònies. D'un total de 200 colònies obtingudes en els dos experiments de conjugació, el 70% van créixer després de 3 a 8 dies d'haver-les repicat i el 60% donaren una coloració blava a l'assaig β -galactosidasa sobre filtre. Es van escollir 58 clons, que corresponien a aquelles colònies que després de 5 dies de creixement en el medi selectiu havien donat un major creixement i en l'assaig β -galactosidasa donaven una coloració blava més intensa (s'observava després de 1-4 hores de reacció). Aquestes colònies havien doncs de correspondre als clons amb una interacció proteïna-proteïna més forta.

3.2.1. Seqüenciació dels clons positius e identificació de les proteïnes codificades pels corresponents inserts.

Amb l'objectiu d'identificar les proteïnes codificades pels diferents clons positius, es va procedir a l'extracció del DNA plasmídic (*pGAD/THX*) de les colònies diploids. En una primera aproximació, aquests s'analitzaren per digestió amb l'enzim *HaeIII* per tal d'identificar aquells que mostraven patrons de restricció relacionats. En aquells casos en

que es va observar un patró de digestió idèntic, indicatiu de que corresponien a clons duplicats, es seleccionà un únic clon, reduïnt així el nombre de cDNAs a caracteritzar. En algun cas no va ser possible recuperar el DNA plasmídic a partir de la colònia positiva, pel que aquests clons no es van poder caracteritzar.

Tot seguit, es procedí a la determinació de la seqüència nucleotídica dels corresponents inserts i a la comparació d'aquesta seqüència amb les seqüències dipositades als bancs de dades, per tal de veure si aquests inserts codificaven per a proteïnes conegudes. Com es mostra a la taula 3, utilitzant els programes informàtics FASTA i BLAST, es va detectar similitud per alguns dels cDNAs amb proteïnes ja caracteritzades. D'altres codificaven per proteïnes amb una funció desconeguda, tot i que en alguns casos, presentaven homologia amb dominis proteics coneguts.

Taula 3. Resultats obtinguts per comparació mitjançant el programa BLAST de les seqüències aminoacídiques corresponents a les proteïnes codificades pels diferents clons positius, amb les proteïnes dipositades als bancs de dades.

Els clons es van anomenar segons TH (per "Two Hybrid") i un número.

La segona columna representa el número de clons idèntics que es van aïllar. A la tercera columna s'indica la descripció de la proteïna codificada per aquests clons, segons les similituds trobades pel programa BLAST. A la taula A es mostren aquells clons que degut a les homologies trobades serien potencialment significatius. Molts d'aquests clons codifiquen per a proteïnes amb una funció desconeguda o que comparteixen certa homologia amb dominis proteics coneguts. A la taula B es mostra tot una sèrie de clons que malgrat que es van aïllar degut a que creixien en medi selectiu, codifiquen per a proteïnes molt abundants, implicades moltes d'elles a processos de fotosíntesi, i que per tant semblarien correspondre a artefactes de cribatge.

A)

NOM	REPRESENTATIVITAT	HOMOLOGIES
TH3	2	Cyclophilin peptidil-prolyl cis-trans isomerase
TH7	9	NOTCH homolog
TH42	2	Unknow protein of <i>A. thaliana</i>
TH44	1	Homologia amb el domini Coiled-coil
TH53	3	Homologia amb el domini KELCH
TH70	1	Unknow protein of <i>A. thaliana</i>
TH71	1	Unknow protein of <i>A. thaliana</i>

B)

NOM	REPRESENTATIVITAT	HOMOLOGIES
TH1	5	Chlorophyll a/b binding protein
TH4	2	Secretory peroxidase
TH6	3	Ribulose biphosphate carboxylase
TH10	4	Photosistem I reaction centre subunit
TH11	2	Lipid transfer protein
TH17	3	Photosistem II 10KD polypeptide precursor
TH18	1	ATP synthase B' chain precursor
TH26	3	Serine hydroxy methyltransferase
TH39	6	Ribosomal protein
TH41	1	Beta-tubulin

En base als resultats de seqüenciació, els clons de la taula B, que codifiquen per proteïnes ribosomals, proteïnes d'unió a clorofiles, o proteïnes dels fotosistemes I i II, es van descartar. Tots aquests clons corresponen a proteïnes codificades per missatgers molt abundants a la planta, els quals acostumen a aparèixer com a falsos positius en experiments de doble híbrid.

3.2.2 Comprovació de que l'activació dels gens marcadors *HIS3* i *ADE2* precisa de la presència de la proteïna GAL4-BD:PHOR1.

La tècnica de doble híbrid és molt sensible i sovint és subjecte de possibles artefactes o falsos positius. En efecte, algunes proteïnes fusionades al GAL4-AD poden activar per sí soles la transcripció dels gens marcadors, degut a que interaccionen directament amb la seqüència de reconeixement de GAL4 o amb les seqüències flanquejants, o a que ténen la capacitat d'interaccionar amb alguna de les proteïnes implicades en la maquinaria de transcripció de llevat. També pot succeir que aquestes proteïnes formin heterodímers amb el domini d'unió a DNA de GAL4, resultant en una activació dels gens marcadors mitjançant un mecanisme diferent al desitjat. Aquests artefactes són en

part seleccionats en contra mitjançant la utilització de dos gens marcadors independents (*HIS3* i *ADE2*), sota control de dos promotors diferents, però és encara necessari comprovar que l'activació es dona únicament en presència de la proteïna de fusió GAL4-BD:bait.

Així doncs, amb l'objectiu de comprovar que l'activació de la transcripció dels gens *HIS3* i *ADE2* als diploids positius identificats, es dona exclusivament per una interacció amb la proteïna GAL4-BD:PHOR1, es van portar a terme una sèrie de controls per co-transformació de la soca MATa AH109 amb els diferents DNAs *pGAD/THx*, al mateix temps que la construcció *pAS2-1/PHOR1* o el vector *pAS2-1* buit, respectivament. També es va fer un altre control addicional per transformació de només el plasmidi *pGAD/THx*.

La soca de llevat MATa AH109 és derivada de la soca MATa PJ69-2A però ha estat millorada per a ser més restrictiva, ja que conté els gens marcadors *HIS3*, *ADE2* i *LACZ* sota control de promotors mínims diferents (derivats respectivament de GAL1, GAL2 i MEL1). Això fa que es minimitzi el número de falsos positius, ja que s'exclouen automàticament aquelles proteïnes capaces d'interaccionar amb les seqüències promotores flanquejants (aquests clons podran créixer en un medi SD-Leu-Trp-Ade-His però donaran una coloració blanca a l'assaig β -galactosidasa). Els falsos positius degut a una interacció directa amb el domini GAL4-BD poden ser identificats degut a que també creixen en medi selectiu quan es co-transformen amb el vector *pAS2-1* buit. Per últim, els clons que codifiquen per proteïnes amb capacitat per sí soles d'activació de la transcripció es poden identificar per que creixen en un medi SD-Leu-Ade-His, en ser transformades en la soca MATa AH109.

En la taula 4 es mostren els resultats d'aquests experiments.

RESULTATS

Taula 4. Resultats de la co-transformació de la soca MATa AH109 amb els diferents DNAs *pGAD/THx*, al mateix temps que la construcció *pAS2-1/PHOR1* o el vector *pAS2-1* buit. Les cèl.lules es van plaquejar en un medi SD-L-T, per a seleccionar la presència de tots dos plàsmids i en un medi SD-L-T-A-H per a detectar la interacció entre les dues proteïnes de fusió.

PGAD424/	PAS2-1		PAS2-1/PHOR1	
	SD-L-T	SD-L-T-A-H	SD-L-T	SD-L-T-A-H
TH7	+	+	+	+
TH44	+	-	+	+
TH42	+	+	+	+
TH26	+	-	+	-
TH53	+	-	+	+
TH70	+	+	+	+
TH71	+	-	+	-

Podem observar que dels diferents clons positius que es van estudiar, només els clons TH44 i TH53 donaren els resultats esperats per a una proteïna amb una interacció específica amb la meitat PHOR1 de la fusió GAL4-BD:PHOR1.

El clon TH7, que s'havia vist que codificava una proteïna amb un domini similar al domini EGF de la proteïna NOTCH de *D. melanogaster*, va mostrar que interaccionava directament amb el domini a unió a DNA de GAL4. Els experiments de co-transformació de la soca MATa AH109 amb el plasmidi *pGAD424/TH7* conjuntament amb el vector *pAS2-1*, mostraren que les cèl.lules transformades creixen en un medi SD-L-A-H-T, i que la presència de PHOR1 no és necessària per a la interacció. Resultats similars es van obtenir pels clons TH70 i TH42, que codificaven per proteïnes de funció desconeguda. Alhora, altres dels clons com TH26 i TH71, no van tornar a créixer en el medi selectiu SD-L-T-A-H, en ser co-transformats amb el plàsmid *pAS2-1/PHOR1* en les cèl.lules MATa AH109.

Així doncs només els clons TH44 i TH53 semblaven presentar una interacció específica amb la proteïna GAL4-BD:PHOR1, la qual ve demostrada pel fet que poden créixer en

un medi selectiu i donen una coloració blau intens a l'assaig β -galactosidasa només quan són co-transformats amb la construcció pAS2-1/*PHOR1*.

3.3 Les proteïnes TH44 i TH53 interaccionen amb la proteïna PHOR1 a través del seu domini *armadillo*.

Els experiments de doble híbrid mitjançant co-transformació de la soca de llevat MATa AH109 amb els dos dominis de PHOR1 per separat, van demostrar que la interacció de les proteïnes GAL4-AD:TH44 i GAL4-AD:TH53 amb la fusió GAL4-BD:PHOR1 es dona a través del domini *armadillo* d'aquesta última.

Prèviament, havíem comprovat que les proteïnes GAL4-BD:CPI i GAL4-BD:ARM s'expressaven correctament a llevat (veure figura 23). Per tal de comprovar quin domini de la proteïna PHOR1 era el responsable de la interacció amb les proteïnes TH44 i TH53, es va co-transformar la soca de llevat MATa AH109 amb els plàsmids *pGAD/TH44* o *pGAD/TH53* conjuntament amb els vectors *pAS2-1*, *pAS2-1/PHOR1*, *pAS2-1/CPI* i *pAS2-1/ARM*, respectivament. Els resultats obtinguts d'aquest experiment es mostren a la figura 25. Es pot observar que les cèl·lules co-transformades creixen en un medi SD-L-T-A-H només en presència de les proteïnes de fusió GAL4-BD:PHOR1 o GAL4-BD:ARM, però no en presència del domini GAL4-BD com ja havíem vist anteriorment, ni de la proteïna de fusió GAL4-BD:CPI.

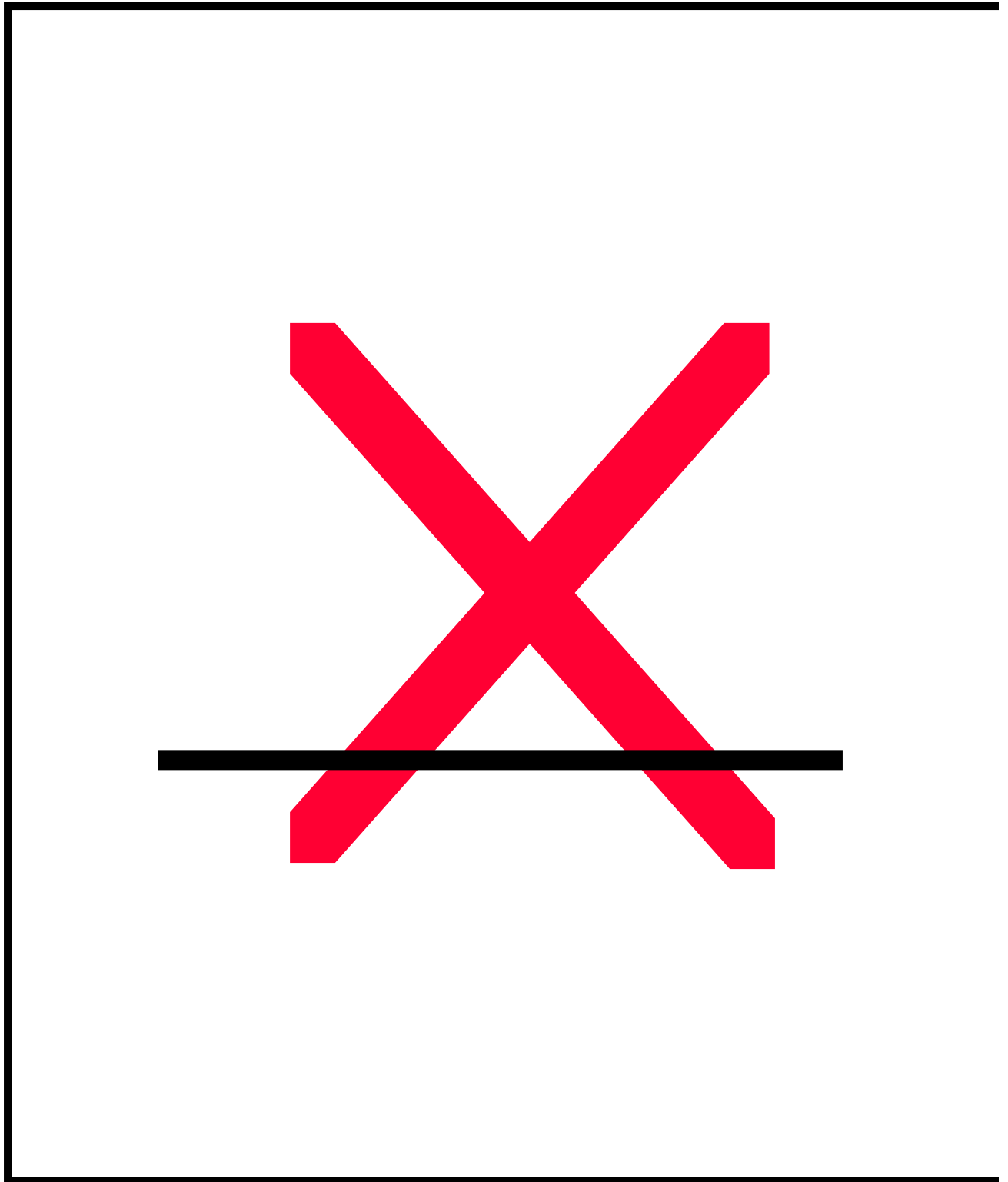


Figura 25. Co-transformació de la soca haploid MATa AH109 amb els plàsmids *pGAD/TH44* o *pGAD/TH53* i el vector *pAS2-1*, o les construccions *pAS1-2/PHORI*, *pAS2-1/CPI* i *pAS2-1/ARM*.

Les cèl·lules es van plaquejar en un medi SD-L-T, per a seleccionar la presència de tots dos plàsmids i en un medi SD-L-T-A-H per a detectar la interacció entre les dues proteïnes de fusió.

4. Comprovació de la interacció entre les proteïnes TH53 o TH44 i PHOR1 mitjançant experiments de *pull-down*.

Amb l'objectiu de comprovar la interacció directa entre les proteïnes TH44 i TH53 amb la proteïna PHOR1 es van realitzar experiment de "*pull-down*". Aquesta tècnica es basa en l'expressió d'una de les proteïnes fusionada a una cua d'histidines o a la glutatió-S transferasa (GST) per tal de poder purificar la proteïna de fusió a través d'una columna de Ni²⁺ o glutatió-*Sepharose*, i un cop aquesta proteïna es troba immobilitzada en aquesta matriu insoluble, comprovar la seva capacitat de retenció de la segona proteïna problema. En el nostre cas vam expressar a *E.coli* les proteïnes TH44 i TH53 fusionades pel seu extrem N-terminal a la proteïna glutatió-S transferasa. Les construccions GST:TH44 i GST:TH53 es van aconseguir mitjançant l'obtenció dels inserts que codifiquen per a les proteïnes TH44 i TH53, digerint els plàsmids pGAD/TH44 i pGAD/TH53 amb els enzims de digestió EcoRI i XhoI i lligant aquests en fase al gen que codifica per a la proteïna GST al plàsmid d'expressió pZEX (derivat del plàsmid PGEX2T, Jiménez et al., 1997), digerit amb aquests mateixos enzims. Les proteïnes de fusió es van unir a la reïna glutatió *Sepharose* i aquesta matriu s'utilitzà com a columna d'afinitat per tal d'estudiar la seva capacitat de retenció específica de PHOR1. A tal fi, es va sintetitzar la proteïna PHOR1 marcada per transcripció i traducció *in vitro*, en el sistema TNT, en presència de ³⁵S-Met. La proteïna marcada es va incubar o/n en presència de la reïna glutatió-*Sepharosa* amb les proteïnes GST:TH44 i GST:TH53, i després de rentar la columna, les proteïnes retingudes es van eluir amb un tampó desnaturalitzant que contenia SDS i es van analitzar en un gel SDS-PAGE. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la figura 26. A la tinció amb blau de Coomassie, s'observen les diferents proteïnes fusionades a GST. L'autoradiografia del gel mostra la presència de la proteïna PHOR1 (TNT) en els eluïts de les diferents columnes. Com podem observar vam detectar retenció de la proteïna PHOR1 a la columna GST:TH53, però no a la columna GST (utilitzada com a control negatiu) ni a la columna GST:TH44. Aquest resultat mostra, que en les condicions utilitzades, PHOR1 interacciona amb la proteïna GST:TH53, confirmant una interacció específica de la proteïna PHOR1 amb la proteïna TH53. En aquestes condicions no es va poder demostrar una interacció específica de

PHOR1 amb la proteïna TH44, pel que es va continuar treballant només amb la proteïna TH53.

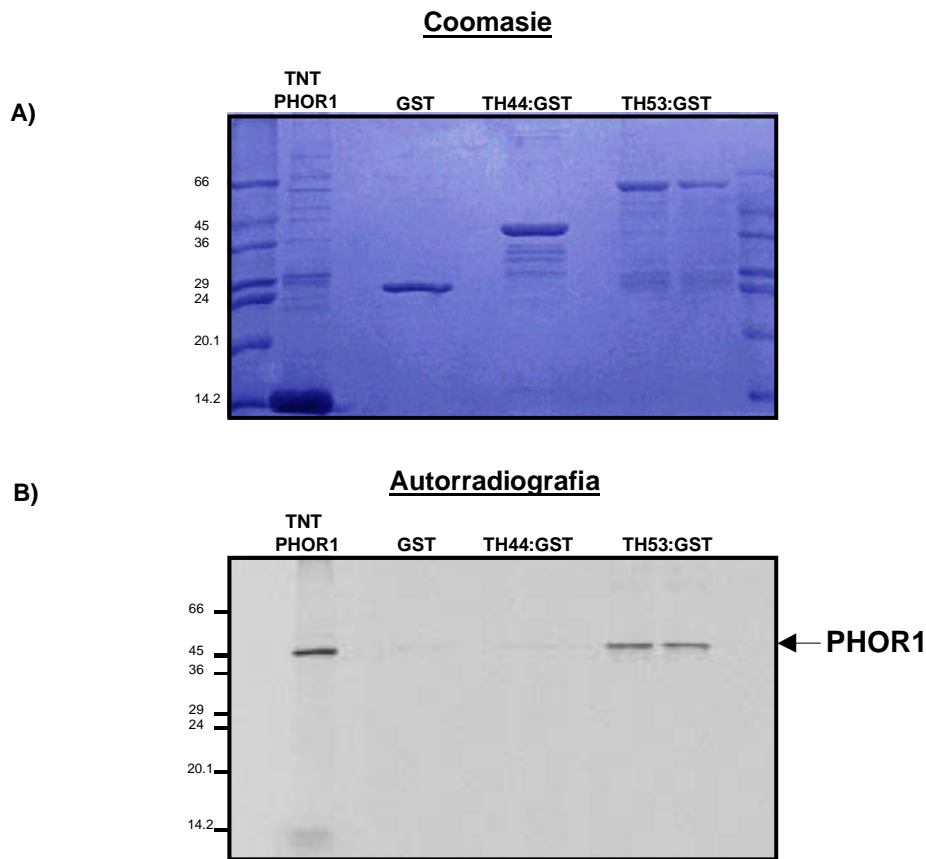


Figura 26. Experiments de *pull-down* per a demostrar la interacció entre la proteïna PHOR1 i les proteïnes TH44 i TH53.

PHOR1 es va marcar amb ^{35}S per transcripció i traducció *in vitro* mitjançant el sistema TNT. Les proteïnes TH44 i TH53 es van expressar a *E. coli* fusionades pel seu extrem N-terminal a la proteïna GST. Les proteïnes de fusió es van unir a la reïna glutatíó-*Sepharose* i es van utilitzar per als experiments de *pull-down*.

- A) Tinció amb Coomassie del gel SDS-PAGE al 12% on es pot observar que en els experiments de *pull-down* s'utilitzaren quantitats equivalents de les proteïnes GST, GST:TH44 i GST:TH53 retingudes a la reïna de glutatíó-*Sepharose*.
- B) Autoradiografia del gel on s'observa que la proteïna ^{35}S -PHOR1 es retinguda específicament per la reïna GST:TH53 però no per les reïnes GST o GST:TH44. En tots els casos es van incubar 45 μl del producte de traducció *in vitro* de PHOR1, amb les proteïnes de fusió immobilitzades a la reïna. Com a control positiu es va carregar 5 μl del producte de traducció en TNT.

Per comprovar quin domini de PHOR1 era el responsable de la interacció amb TH53, es van preparar diferents delecions de la proteïna (cedides pel Dr. Jaume Martínez), les quals es van transcriure i traduir en el sistema TNT com s'ha descrit anteriorment (veure figura 27A). Igual que s'havia observat en els estudis realitzats a llevat, es va comprovar que la interacció de PHOR1 amb la proteïna TH53 es dona a través del domini *armadillo*.

A l'autoradiografia de la figura 27B, s'observa que la reïna GST:TH53 no reté el domini CPI però sí és capaç d'unir el domini *armadillo* o les formes truncades de la proteïna que inclouen part del domini *armadillo*. Per tal d'investigar quina era l'afinitat d'unió de les diferents proteïnes truncades per GST:TH53, es va quantificar, utilitzant un aparell PhosphoImager, el marcatge de les bandes corresponents a proteïna retinguda, respecte del total de contes corresponents a proteïna que s'havien carregat a la columna, per tal de calcular la relació entre la proteïna retinguda/carregada. Com es pot observar a la figura 27C, la quantitat de proteïna ARM (89 a 418) retinguda a la columna GST:TH53 és 9 cops més elevada que la de proteïna CPI (1-88) retinguda per aquesta mateixa columna. L'addició dels dos primers dominis repetits *armadillo* a la proteïna CPI incrementa notablement la seva afinitat d'unió a GST:TH53, la proteïna C (1-175) essent retinguda 5 cops més eficientment que la proteïna CPI. Els dos primers dominis repetits *armadillo* semblen ser importants per a la interacció amb TH53, doncs la falta d'aquests dominis determina que la proteïna E (176-418) sigui retinguda amb 2'5 cops menys eficiència que la proteïna ARM (D). També vam observar que la interacció més forta es donava amb la proteïna PHOR1 sencera, la qual interacciona amb TH53 dos cops més eficientment que la delecció ARM.

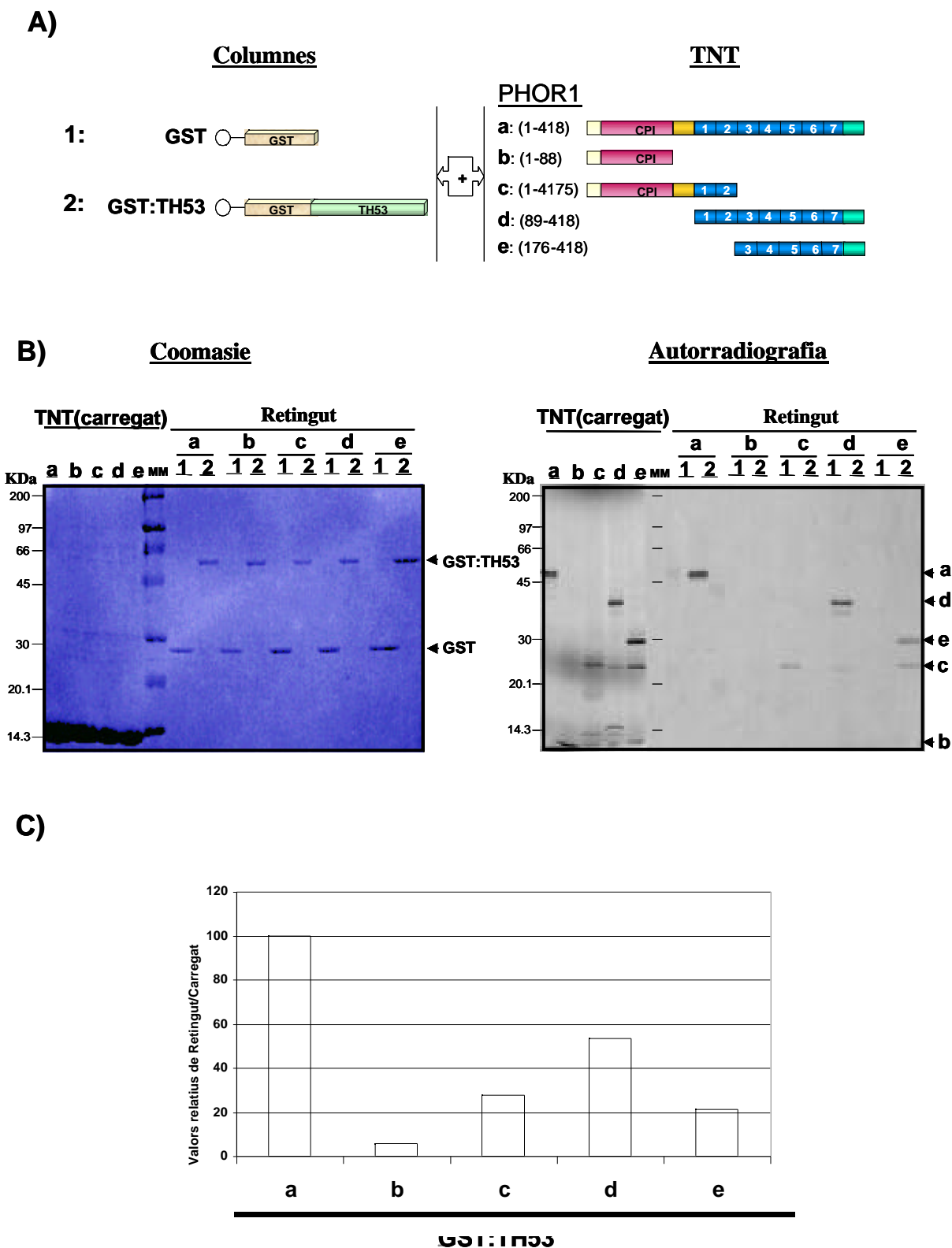


Figura 27. Quantificació de l'afinitat d'interacció de la proteïna GST:TH53 amb els diferents dominis de PHOR1.

A) Representació esquemàtica de les diferents proteïnes utilitzades pels experiments de *pull-down*.

Les columnes d'afinitat corresponen a les proteïnes GST o GST:TH53 unides a la reïna de glutatió *Sepharose*. La proteïna PHOR1 completa (1-418), o les deleccions CPI (1-88), CPI+2 repetits (1-175), ARM (89-418), ARM-2 repetits (176-418) es van obtenir per transcripció traducció *in vitro* en presència de ³⁵S-metionina, utilitzant el sistema TNT.

B) Gel SDS-PAGE en gradient del 10 al 17% d'acrilamida. S'observa que en tots els casos s'han utilitzat quantitats equivalents de les proteïnes GST i GST:TH53.

C) Autoradiografia del gel (12 hores d'exposició). Es mostren les proteïnes sintetitzades en el sistema TNT, les quals es carregaren a les columnes de GST i GST:TH53 (carregat) i el resultat de les interaccions amb aquestes columnes (retingut).

D) Quantificació de la quantitat de proteïna unida a la columna. El càlcul s'ha fet en base a la quantitat de proteïna retinguda/carregada a la columna, ténint en compte el nombre de metionines presents a cada construcció.

L'afinitat de les interaccions entre els diferents dominis de la proteïna PHOR1 i TH53 es va estimar també mitjançant assaigs líquids d'activitat β -galactosidasa en llevat, als quals es va quantificar el grau d'activació del gen marcador *LACZ*, assolit per les diferents construccions. Aquest estudi té l'avantatge respecte al *pull-down* de ser un assaig *in vivo*, i de utilitzar fusions proteiques totalment diferents (TH53 es fusionada al GAL4-AD en lloc de a GST). Per tant, en cas de que s'observin diferències degut al tipus de fusió, aquestes diferències serien obviades o com a mínim respondrien a paràmetres diferents. Els resultats obtinguts d'aquests estudis es mostren a la figura 28, on s'observa una major interacció de la proteïna GAL4-AD:TH53 amb el domini *armadillo* que amb la proteïna PHOR1 completa, doncs les unitats β -gal obtingudes dels diploids que expressen la proteïna ARM són el doble que les obtingudes amb la proteïna sencera. En aquests assaigs no es va detectar cap mena de interacció de la proteïna TH53 amb el domini CPI, amb el domini GAL4-AD (pAS2-1) ni amb la proteïna SNF1 (pSE1112), la qual conjuntament amb la proteïna SNF4 (pSE111) (Bhalerao et al., 1999; Lumbreras et al., 2000) s'utilitzà com a control positiu de la interacció. Curiosament, aquests resultats no són del tot idèntics als obtinguts en els experiments de *pull-down*. Si bé cap dels dos experiments era indicatiu d'una interacció de TH53 amb el domini CPI, els experiments de *pull-down* mostraven una interacció més forta amb la proteïna PHOR1 sencera que amb ARM, mentre que als assaigs β -galactosidasa semblaria que succeís el contrari. Malgrat que no podem descartar que part d'aquest efecte vingui donat per la fusió a GST o als dominis BD- i AD- de GAL4,

RESULTATS

aquestes diferències es podrien també explicar en part pel fet que, com s'observa a la figura 23, els nivells d'expressió de la proteïna GAL4-BD:ARM a llevat són més elevats que els de la proteïna GAL4-BD:PHOR1. Això afavoriria la interacció entre TH53 i ARM, i per tant resultaria en un número major de complexos capaços d'activar la transcripció dels gens marcadors, el que finalment es traduiria en una major activitat -galactosidasa.

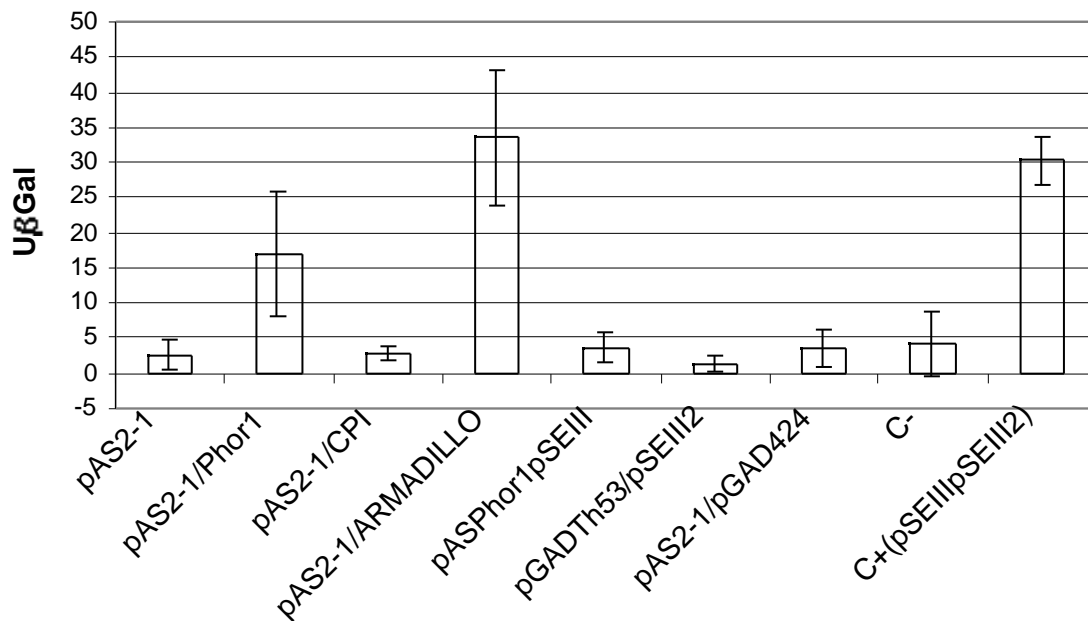


Figura 28. Assaig β -galactosidasa de les cèl.lules MATa AH109 co-transformades amb la construcció GAL4-AD:TH53 i els diferents dominis de PHOR1 fusionats al GAL4-BD.

Les cèl.lules es van créixer en un medi SD-L-T per a la selecció dels dos plàsmids.

A l'eix d'ordenades es mostra la combinació de plàsmids utilitzats en la co-transformació. A l'eix d'abscisses es mostren les unitats -galactosidasa obtingudes a les 4 hores de reacció. Els plasmidís pSE111 i pSE112 que codifiquen les proteïnes SNF4 i SNF1 es van utilitzar com a controls positius de la interacció.

5. El gen *TH53* s'expressa majoritàriament a les parts subterrànies de les plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena*.

La llibreria de cDNA utilitzada als experiments de doble híbrid a llevat fora una llibreria de *S. lycopersicon* i no de *S. tuberosum*, doncs era la única de que disposàvem en aquests moments. Malgrat això, el fet que tomàquet i patata siguin espècies taxonòmicament molt properes, fa que el percentatge d'homologia entre els gens d'ambdues plantes sigui extremadament elevat (més del 90%), el que fa que els gens de tomaquera poden ser utilitzats com a sondes en cribatges de llibreries de patatera i viceversa, o en anàlisi d'expressió.

Així, a fi de comprovar el patró d'expressió del trànscrit *TH53* a patatera, es va extreure RNA total de diferents teixits de plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena*, crescudes en condicions no inductores de la tuberització de dies llargs (LD) o dies curts amb una interrupció de la nit (SD+NB) o en condicions inductores de dies curts (SD). Es va extreure RNA de l'àpex, de les fulles, dels nusos, entrenusos, i de l'arrel, així com dels estolons, tubèrculs (SD) i flors. A la figura 29, es mostra el patró d'expressió del que es va obtenir pel gen *TH53* en plantes crescudes en condicions no-inductores de LD. S'observa que a les parts aèries de la planta, el missatger *TH53* s'expressa majoritàriament als nusos i entrenusos i en nivells inferiors a l'àpex, a les fulles i flors. Els nivells d'expressió són però més elevats a les parts subterrànies de la planta, observant-se nivells elevats de mRNA als estolons i majoritàriament a les arrels.

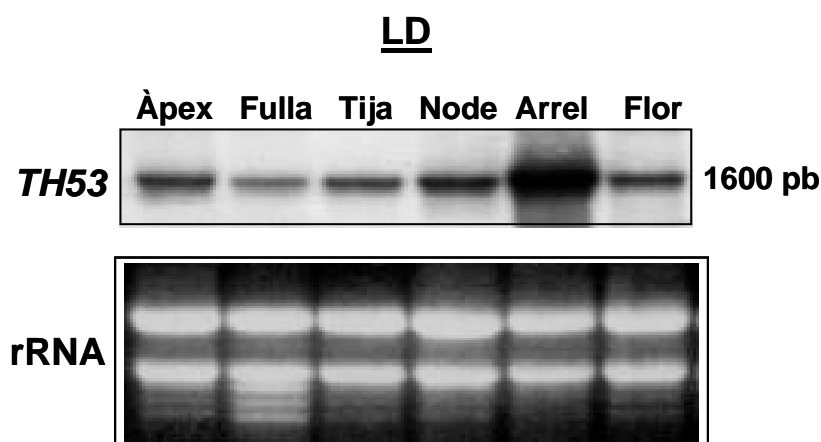


Figura 29. Anàlisi *northern* de l'expressió del missatger *TH53* a diferents teixits de les plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena*, crescudes en condicions no inductores de la tuberització de dia llarg (LD).

A la figura 30 es mostra l'anàlisi d'expressió específica de teixit del transcrit *TH53*, en plantes crescudes en condicions inductores de dies curts (SD) i en condicions no-inductores de dies curts amb una interrupció de la nit (SD+NB). El patró d'expressió del missatger en aquestes plantes és similar a l'observat en LD. S'observa de nou que *TH53* s'expressa principalment a les parts subterrànies de la planta majoritàriament a arrel, i també es detecta missatger però en nivells molt baixos al tubercle.

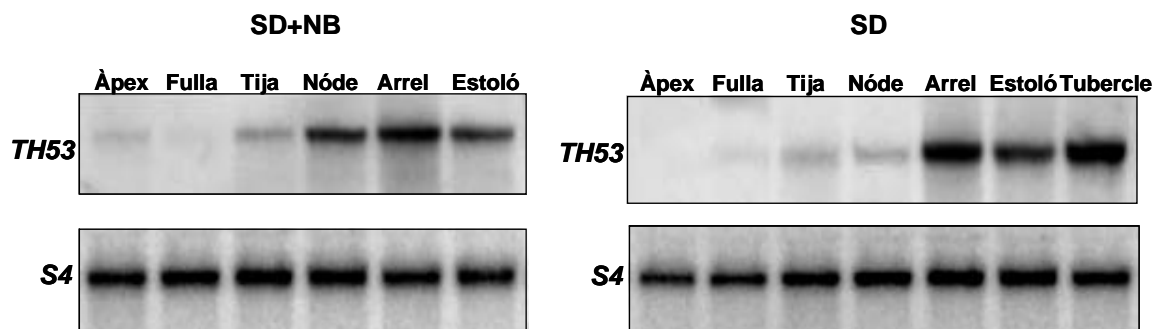


Figura 30. Anàlisi *northern* de l'expressió del missatger *TH53* a diferents teixits de les plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena*, crescudes en condicions inductores de la tuberització de dies curts (SD) i en condicions no inductores de dies curts amb una interrupció de la nit (SD+NB).

6. *TH53* mostra similitud amb la família de proteïnes F-box

Els tres cDNAs corresponents al clon *TH53*, aïllats en els experiments de doble híbrid, presentaven una longitud entre 1150 i 1200 parells de bases, i corresponien a clons parcials. Els resultats de anàlisi *northern* mostraven que el missatger *TH53* té una longitud aproximada d'entre 1500-1600 pb, pel que al clon *TH53* li manquen uns 400 nucleòtids corresponents a la regió 5'- del missatger. Per tal d'obtenir una còpia de cDNA completa, es van realitzar experiments de 5'-RACE utilitzant el kit 5' RACE System de GibcoBRL. Aquest kit es basa en la síntesi d'una primera cadena de cDNA utilitzant la transcriptasa inversa i un oligonucleòtid específic pel gen, seguit de l'addició d'una cua de Cs a l'extrem 3'- del cDNA, utilitzant la terminal transferasa. El cDNA així obtingut es pot aleshores amplificar per PCR, fent servir un segon oligonucleòtid específic pel gen (s'utilitza un oligonucleòtid *nested* o interior al que s'ha fet servir per a la síntesi de la 1a cadena) i un oligonucleòtid "*anchor*" complementari a

la cua de Cs. A tal fi es van dissenyar dos oligonucleòtids complementaris a l'extrem 5' del clon parcial (GSP1 i GSP2, marcats sobre la seqüència de nucleòtids corresponent al clon complet de tomaquera, figura 31A) i s'utilitzà mRNA d'arrel de tomaquera o patatera com a motlle per a la síntesi de cDNA (a *S. tuberosum* ssp. *andigena* es va veure que en aquest téixit hi ha una forta expressió de *TH53*). Es van obtenir fragments de cDNA de diferent longitud, el més llarg dels quals ténia una mida de uns 500 parells de bases. La seqüenciació d'aquest fragment de cDNA demostrar que en efecte corresponia a la regió 5'- del missatger *TH53*, ja que la seqüència del fragment es 100% idèntica a la del clon de cDNA *TH53* a la regió on se solapen. A la figura 30A, es mostra la seqüència nucleotídica i seqüència amino acídica deduïda del cDNA *TH53* complet de tomàquet. El clon té una mida de 1400 pb i conté un marc obert de lectura de 1185 parells de bases, amb una regió 3'- no codificant de 128 nucleòtids que inclou una cua poliA⁽⁺⁾ de 53 residus. A la regió 5'- el cDNA presenta un codó de parada 65 nucleòtids en front de l'ATG, el que indicaria que aquest cDNA correspón a una còpia complerta del missatger. La proteïna deduïda, que es va anomenar PIP1 (per PHOR1 Interacting Protein 1). A la figura 31B es mostra la comparació de la seqüències dels fragments obtinguts mitjançant 5'-RACE a partir de mRNAs de tomaquera i patatera. S'observa que els cDNAs són pràcticament idèntics, a excepció d'alguns canvi puntuals. És d'esperar que la resta de la seqüència nucleotídica sigui també pràcticament idèntica en ambdues espècies.

RESULTATS

A)

1 TGAAACAACGTTCCATCAATAATGTCATAAATCTGAAAAAGGAAAAACCATAACTAAAA
60 TTACTTCAAATACAAAAAATGCAAGCTACAGCCATGGACTTCATCCCGGGGCTACCTAAT
M D F I P G L P N 9
120 GAAATAGCTCTTGAATGTCTCATAACGTCTACCTGTGGATCAATTTTCTAAAGCAGCTTCA
E I A L E C L I R L P V D Q F S K A A S 29
180 GTATGCAAAAAATGGAACGGCGAGATTACGTGCGCCGAGTTTCGTGCGCCGGGAAATTT
V C K K W N G E I T S P E F R R R R K F 49
240 TCCGGATTGACCCGACCCGTTTTAGTCATGGTGAATCTATGGTGGCTACTGTGAAAAAA
S G L T R P V L V M V Q S M V A T V K K 69
300 CCAGAGGGTGATACTGCTCTTTTTTCTACTCAGGTTTACCGTATCTCCGTTTCTGACCCG
P E G D T A L F S T Q V Y R I S V S D P 89
360 GGAAACGGGTCTGGTACGATTTGCCGCCGATAACCGGAGTTAATTGATGGATTGCCGAGG
G N G S W Y D L P P I P E L I D G L P R 109
420 TTTTGCCGGATTGTTGGAGTCGGGTCCGATTTAGTAGTAATTGGCGGGTGTGACCCGGTT
F C R I V G V G S D L V V I G G C D P V 129
481 ACCTGGCGGGTTATGGATTGTGTTTTTCATTTACAATTTTCATATCCGGGTCATGGCGTCTGT
T W R V M D C V F I Y N F I S G S W R R 149
540 GGGGCGGATATGCCAGGTCAGCAGAGGTCGTTCTTCGGATGTGGATCGGATTCCGATAGA
G A D M P G Q Q R S F F G C G S D S D R 169
600 ATGATCGTTCGTGCGCCGGTGGCCACGACGACCAAAAGAAATGCTTTGATATCGGCGCTCTCA
M I V V A G G H D D Q K N A L I S A L S 189
660 TACGACGTCGTTAAAGACGAGTGGGTTACACTTCCTGATATGGTCATGGAGAGAGACGAA
Y D V V K D E W V T L P D M V M E R D E 209
720 TGTAAGGTTGTATATCACAAAGGTAATTCACGTCATCGGCGGTTATCCTACGTGGGCG
C K V V Y H K G K F H V I G G Y P T W A 229
780 CAAGGTCACTTTGAGAATGACGCTGAGGTGTTTCGACACCGCCACGTGGCAGTGGCGACTG
Q G H F E N D A E V F D T A T W Q W R L 269
840 GAAGATGACTTCTTGAGTGTGATCAACACTTCTCCTCAAAGTTGCGTTGAAGGTGATGAT
E D D F L S V I N T S P Q S C V E G D D 289
900 GGGAGATTATACATGTGCCGAGGAGGTGACGTGGCAGTGAAGGAAGATCGTACGTGGCGG
G R L Y M C R G G D V A V K E D R T W R 309
960 AAGTTGGCGGAATTGCCAACAGGGATTGCCAGCGTGGCATATTTGACAGCGTGTCAAGGG
K L A E L P T G I A S V A Y L T A C Q G 329
1020 AAGTTGATATTGGTGGGAAGGGTCCATTTGATGAAGTCTATAGTAGTTATGCTTTGGAT
K L I L V G R G P F D E V Y S S Y A L D 349
1080 TTGGATGTGGAGAGTGATGGCAAAATGAAAAAATGGACAAAAGTAGAAACTCCTAATGAA
L D V E S D G K M K K W T K V E T P N E 369
1140 TATAGTGGTCATGTTCAATATGGGTGTTGGtttggAACTATGATATTCTCAAAAACAAAT
Y S G H V Q Y G C W F G T M I F S K T N 389
1200 CACTAGTTAGGTTTAAAGAAATGAGAGTGGCTTTTTTTTCCCTTTTAAATTTCTTTTCTAAGA
H * L G L R M R V A F F P L L I S F L R 409
1260 TACTCAATTATTCTGGCATGATTGCACTTATTTTTTGGCATGTACAGTTGTGTGTTGTGTT
Y S I I L A * 505
1320 TCAAGTTTTGACTAACAAGCATAGTATTGGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1380 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

B)

TH53 patata	25	QARAMDLIPGLPFDIALECLIRLPVDQFSKAASVCIKWNGEITLPEFRRL	74
		:	
TH53 tomàquet	2	QATAMDFIPGLPNEIALECLIRLPVDQFSKAASVCKKWNGEITSPEFRRR	51
TH53 patata	75	RKVSGLTRPVLAMVQSMVATVKKPEGDTALFSTQVYRISVSDPGNGSWYD	124
TH53 tomàquet	52	RKFSGLTRPVLVMVQSMVATVKKPEGDTALFSTQVYRISVSDPGNGSWYD	101
TH53 patata	125	LPPIPELIDGLPRFCRIVGVGSDLVVIIGGCDPVTWRVMDCVFIYNFISGS	174
TH53 tomàquet	102	LPPIPELIDGLPRFCRIVGVGSDLVVIIGGCDPVTWRVMDCVFIYNFISGS	151
TH53 patata	175	WRRGADMPGQQRSFFGCGSDSDRMIVVAGGHDDQKNALISALSVDVVKDE	224
TH53 tomàquet	152	WRRGADMPGQQRSFFGCGSDSDRMIVVAGGHDDQKNALISALSVDVVKDE	201
TH53 patata	225	WVTLPDMVMERDECKVVYHKGKFHVIGGYPTWAQGHFENDAEVFDTATWQ	274
TH53 tomàquet	202	WVTLPDMVMERDECKVVYHKGKFHVIGGYPTWAQGHFENDAEVFDTATWQ	251
TH53 patata	275	WRLEDDFLSVINTSPQSCVEGGDGRLYMCRGGDVAVKEDRTWRKLAELPT	324
TH53 tomàquet	252	WRLEDDFLSVINTSPQSCVEGGDGRLYMCRGGDVAVKEDRTWRKLAELPT	301
TH53 patata	325	GIASVAYLTACQGKLILVGRGPFDEVYSSYALDLDVESDGKMKKWTKVET	374
TH53 tomàquet	302	GIASVAYLTACQGKLILVGRGPFDEVYSSYALDLDVESDGKMKKWTKVET	351
TH53 patata	375	PNEYSGHVQYGCWFGTMI FSKTNH	398
TH53 tomàquet	352	PNEYSGHVQYGCWFGTMI FSKTNH	375

Figura 31. Seqüència nucleotídica i seqüència aminoacídica deduïda a partir del clon de cDNA TH53 complet.

A) Seqüència corresponent al clon de tomaquera. Es marquen els dos oligonucleòtids complementaris a l'extrem 5' del clon parcial utilitzats pels experiments de 5' RACE GSP1 (marcat en taronja) i GSP2 (marcat en verd).

B) Comparació de les seqüències aminoacídiques deduïdes dels fragments 5'-RACE amplificats a partir de mRNA de *S. tuberosum* ssp *andigena* i *S. lycopersicon*.

La comparació de la seqüència amino acídica de PIP1 amb les proteïnes dipositades al banc de dades, utilitzant el programa BLAST, va mostrar que PIP1 presenta al seu extrem N-terminal un motiu F-box el qual s'ha vist està implicat en la ubiquitinació de proteïnes i senyalització cap a la seva degradació, i que al seu extrem C-terminal presenta un motiu repetit *kelch*, implicat en interaccions proteïna-proteïna. L'alineament de la seqüència amino acídica N-terminal de la proteïna PIP1, amb les

seqüències amino acídiques d'altres proteïnes de plantes de la família de proteïnes F-box, mostren que PIP1 presenta molt conservat el consens descrit pel motiu F-box (veure figura 32B). Recentment s'ha vist que les proteïnes F-box són una de les proteïnes que formen part del complex "E3 ubiquitin ligase", una classe d'enzims E3 implicats en ubiquïtinar proteïnes citoplasmàtiques i nuclears de vida mitja curta, com a senyal per a la seva degradació pel 26S proteasoma (Hochstrasser, 1995). Les proteïnes F-box formen part del complex anomenat SCF ubiquïtina proteïna lligasa, comprés per Skp1, Cdc53, i la proteïna F-box (Patton *et al.*, 1998). En aquest complex, Cdc53 fa de pont o unió entre Skp1 i un enzim E2, i Skp1 uneix el motiu F-box d'una proteïna F-box, la qual ahora uneix el substrat. Les proteïnes F-box funcionen així com adaptadors que uneixen substrats específics als enzims E2 per a la seva ubiquïtinació i posterior degradació. La primera proteïna F-box identificada va ser la ciclina F humana. Actualment s'han identificat 17, 50 i >60 proteïnes F-box en els genomes de *S. cerevisiae*, mamífers i *C. elegans*, respectivament. A *Arabidopsis* s'han trobat 38 possibles proteïnes F-box, i en l'actualitat s'està començant a esbrinar quina és la funció d'alguna d'aquestes proteïnes. S'ha vist que participen en processos crucials per a les plantes com la resposta a hormones, el ritme circadià, la fotomorfogènesi, resposta a l'estrès, el desenvolupament floral i la senescència. Exemples de proteïnes F-box són les proteïnes TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) implicades en la resposta a auxines, COI1 (Coronatine-Insensitive 1) implicada en la resposta a metil-jasmonat, UFO (Unusual Floral Organs) implicada en desenvolupaments floral i recentment ZTL (ZEITLUPE) i FKF1 (Flavin-binding, Kelch repeat F-box 1) amb una funció en el ritme circadià. Amb aquestes dues últimes proteïnes PIP1 comparteix a més a més del domini F-box un domini repetit amb sis motius Kelch (figura 32 C). Les proteïnes F-box juguen un paper essencial en enviar proteïnes diana específiques cap a la seva degradació gràcies a la seva interacció a través del domini F-box amb Skp1 i a la interacció amb el substrate a través d'un domini d'interacció proteïna-proteïna localitzat a la regió C-terminal. Aquest domini d'interacció proteïna-proteïna pot ser de diferent naturalesa, havent-se identificats proteïnes F-box que contenen motius repetits WD-40, motius rics en leucina i motius kelch (veure figura 32 A).

La comparació de la seqüència amino acídica de PIP1 amb les proteïnes dipositades als bancs de dades va mostrar que PIP1 presenta elevada similitud (40-70 %) amb un grup de ESTs d'*Arabidopsis* de funció desconeguda. A més al seu extrem C-terminal, PIP1

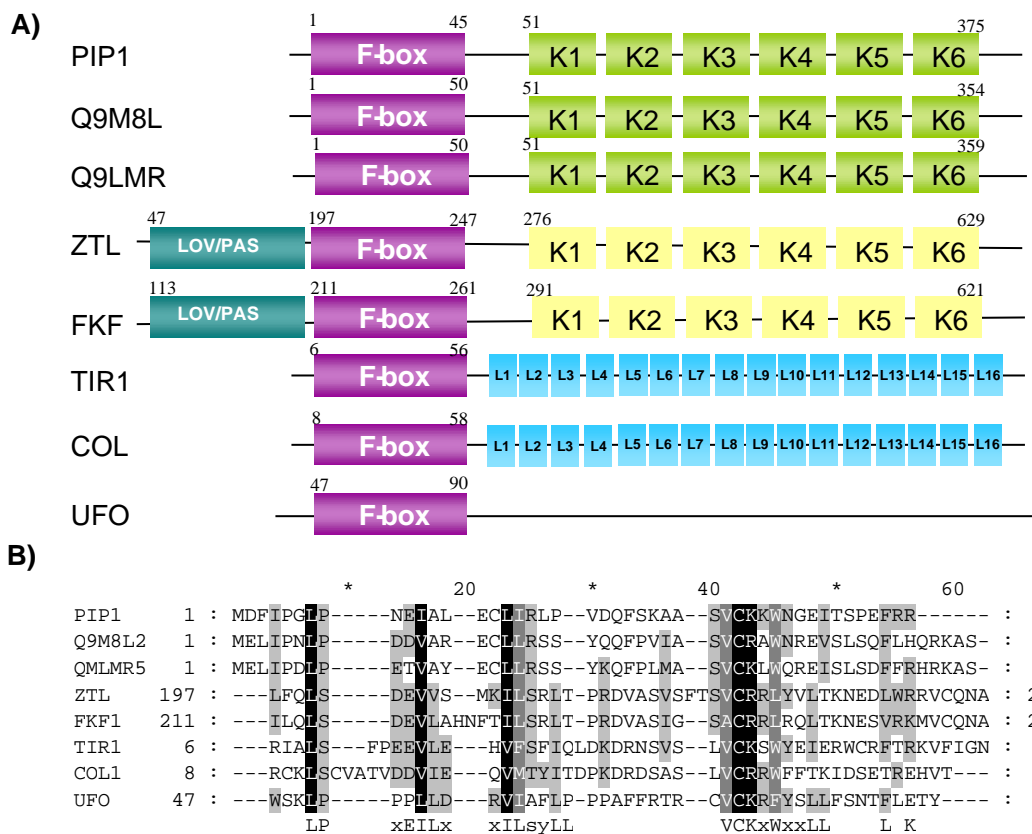
presenta homologia amb tota una sèrie de proteïnes com la Galactosa oxidasa (25% d'identitat), la proteïna Keap1 de ratolí (26% d'identitat), la proteïna "Kelch related protein 1" i Nrf2 de rata (26% d'identitat), la β -i γ -Scrutin de *Limulus polyphemus* (31% d'identitat), la proteïna Kel i la Ring canal Kelch protein de *Drosophila* (28% d'identitat), la NS1-BP i la proteïna Mayven que uneix actina humanes (27% d'identitat) o la Sarcosina i Calicina humanes (26% d'identitat). Aquestes proteïnes pertanyen a la família de proteïnes "Kelch", i tot i ser implicades en funcions diferents, totes presenten de 6-7 motius Kelch individuals repetits, d'entre 44-56 amino àcids que mostren entre ells una identitat baixa però conserven una estructura característica. La identitat entre els diferents motius individuals és baixa, a la proteïna Kelch de *Drosophila* essent per exemple d'entre 25-50%, però sent de fins només un 11% en d'altres proteïnes. Els diferents repetits però mostren molt conservats alguns residus tal com 4 residus hidrofòbics seguits per dues glicines, les quals són seguides a una distància conservada per dos residus aromàtics. Aquests residus són importants per la seva estructura terciària del domini repetit, que es plega en una estructura anomenada β -propeller. Tal com es mostra a la figura 32C, on es compara el domini *Kelch* de les proteïnes ZTL i FKF1 amb el de la proteïna PIP1. PIP1 presenta el consens descrit per aquesta superfamília de proteïnes, trobant-se conservats els residus importants i també les distàncies entre aquests residus.

Figura 32. Dominis F-box i “Kelch” de PIP1

A) Representació esquemàtica de la proteïna PIP1 de tomàquet, els dominis deduïts a partir de dos de les seqüències EST d'*Arabidopsis* amb més homologia a PIP1, amb uns motius N-terminal F-box i sis motius repetits *Kelch* (K) i les proteïnes TIR1 i COI1 amb un motiu N-terminal F-box i un domini C-terminal “*Leucine-rich-repeat*” (L), la proteïna UFO i les proteïnes ZTL i FKF1 amb un motiu F-box i sis motius repetits “*Kelch*” (K).

B) Comparació de la seqüència amino acídica del domini F-box de la proteïna PIP1 de tomàquet amb els dominis F-box de les proteïnes TIR1 (número d'accés AF005048), COI1 (número d'accés AF036340), UFO (número d'accés X89224), ZTL (AAF32300) i FKF1 (número d'accés AAF32298) d'*Arabidopsis* i els dominis N-terminals deduïts a partir de dos de les seqüències EST d'*Arabidopsis* amb més homologia amb PIP1. Els residus idèntics estan indicats en color negre i els residus conservats en gris. Els números a l'inici i final de les seqüències indiquen la posició d'aquestes regions conservades en la proteïna

C) Alineament de les seqüències amino acídiques corresponents als sis motius repetits *Kelch* (K1, K2, K3, K4, K5 i K6) de la proteïna PIP1 i els dominis C-terminals deduïts a partir de dos de les seqüències EST d'*Arabidopsis* amb més homologia amb PIP1, amb els sis motius *Kelch* de les proteïnes ZTL i FKF1. Els residus idèntics i conservats entre totes aquestes seqüències nucleotídiques estan indicats en color verd fosc i els residus idèntics entre PIP1 i les seqüències aminoacídiques deduïdes a partir de dos de les seqüències EST d'*Arabidopsis* amb més homologia amb PIP1 estan indicats en color verd fluix i els residus idèntics entre les seqüències nucleotídiques de les proteïnes ZTL i FKF1 estan indicats en color groc. Els números a l'inici i final de les seqüències indiquen la posició d'aquestes regions conservades en la proteïna. A la part de baix de les seqüències s'indica el consens descrit pels motius *kelch*.



c)

