

## **4. RESULTATS**

---

## RESULTATS

---

### 1 Localització subcel·lular de la proteïna PHOR1.

A l'inici d'aquest treball es coneixia que la proteïna PHOR1 (per Photoperiod responsive 1) havia de tenir una funció relacionada amb la biosíntesi o acció de les hormones giberel·lines ja que les plantes portadores d'una construcció antisentit per aquest gen són més nanes i en dies curts (SD) formen tubercles abans que les plantes controls (Monte, 1998). Aquest mateix fenotip s'havia observat en plantes que mostraven una inhibició de l'expressió de l'enzim biosintètic GA 20-oxidasa (Carrera, 1998). A més a més, en aquestes plantes el fenotip era revertit per aplicació exògena de GAs, el que indica que aquests caràcters són controlats per les hormones giberel·lines. No obstant disposàvem d'aquestes dades preliminars, la comparació de la seqüència aminoacídica de la proteïna deduïda amb d'altres proteïnes presents en els bancs de dades demostraven que PHOR1 era una proteïna nova que només presentava una certa similitud amb un EST d'*Arabidopsis* ("*expressed sequence tag*", seqüenciat dins dels projectes de seqüenciació sistemàtica d'*Arabidopsis*) sobre el que no es disposava de cap dada en quan al seu patró d'expressió o funció. A part d'aquesta seqüència, no es detectà similitud significativa amb cap altre proteïna coneguda que ens pogués donar idea sobre la seva funció.

Estudis de la seqüència aminoacídica de PHOR1 en que s'utilitzaren els programes informàtics MOTIF i PROSITE (<http://www2.ebi.ac.uk>), així com el programa NETPHOS (<http://www.cbs.dtu.dk>) que prediu llocs de fosforilació de les proteïnes no únicament en base a la seva seqüència aminoacídica, sinó també en base a la seva estructura, mostraren que PHOR1 correspon a una proteïna de 46 KDa amb un punt

isoelèctric de 8,83. La proteïna conté 13 cisteïnes, i tres potencials llocs específics de N-glicosilació de seqüència consens Asn-Xaa-Ser/Thr. PHOR1 té quatre potencials llocs de fosforilació per Caseina Kinasa II, deu potencials llocs de fosforilació per Proteïna Kinasa C i un lloc de fosforilació per Tirosin Kinases. A la proteïna s'observen també dos potencials llocs de N-miristilació i tres llocs potencials d'O-N-acetilglucosaminació. A la Figura 1 es mostren localitzats tots aquests potencials llocs de modificació post-traduccionals.

Alhora, estudis mitjançant el programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) que prediu els senyals de tràfic intracel·lular i la localització de la proteïna en base a la seva estructura primària, indicaven que PHOR1 podria correspondre a una proteïna associada a la membrana plasmàtica, i que la seva disposició seria la d'una proteïna trans-membrana de tipus IIIa, amb un domini central trans-membrana (aminoàcids 135-171), una regió N-terminal citoplasmàtica i un domini C-terminal extracel·lular (Figura 1). Donat que la localització subcel·lular de PHOR1 és una dada força important alhora de determinar quina podria ser la possible funció d'aquesta proteïna, ens vam plantejar d'obtenir anticossos específics en front d'aquesta proteïna, per a poder-los utilitzar en estudis de localització subcel·lular basats en fraccionament de membranes i orgànells o immunomicroscopia electrònica.

```

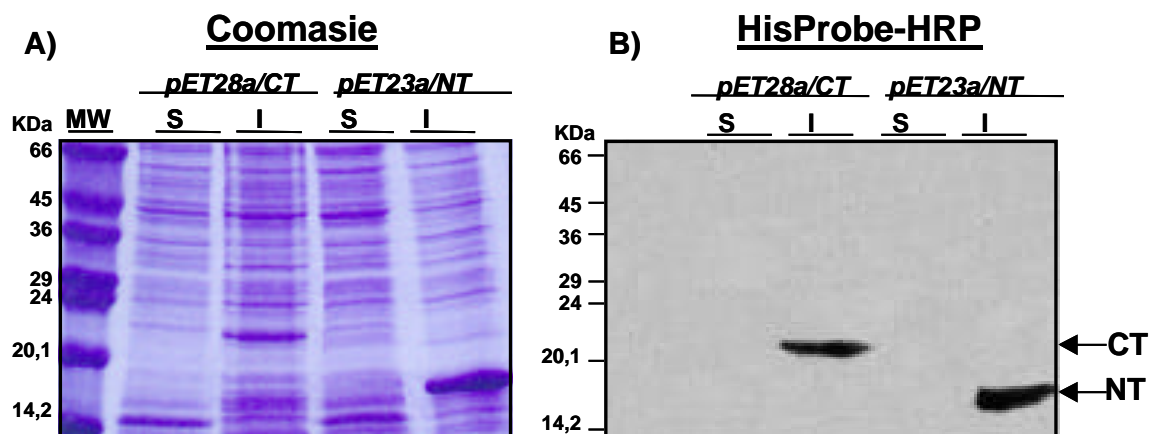
1
14 ATGGTGAGAAATAGGAGAGAAGAATTATACGTTACCGTTCCCAGCCTTTTCCGATGTCCGATATCCATG
    M V R N R R E E L Y V T V P S L F R C P I S M 23
83 GACGTAATGAAGTCTCCGGTGAGTCTCTGCACCGCGTCACTTACGATCGGAGTTCATTCAAACCTGG
    D V M K S P V S L C T G V T Y D R S S I Q T W 46
152 CTTTCACAAGGTCATAATACTTGTCCCGCCACTATGCAAATCCTTCCGTCTACCGATTTTCATACCTAAC
    L S Q G H N T C P A T M Q I L P S T D F I P N 69
221 CTCACTCTCCGGCGGCTTATCAACGTCTGGATTACAGCATCAGCCGTCGAGCTCACCGGGATACACAACG
L T L R R L I N V W I Q H Q P S S S P G Y T T 92
290 CCGTCTTCATCCTCTGTTACAAAGTCGGAAGTTGTTGAAATTGTCAAAAATCTCAACGGCGAGGTCGAT
P S S S S V T K S E V V E I V K N L N G E V D 115
359 AGGTTGAGTTCCTTGGCGAAGATTGTGGAATTTGTTAAATGTTCTGGTGAAAACAGGAGGTTTTTTGTG
    R L S S L A K I V E F V K C S G E N R R F F V 138
428 AATTCGAGTGATGCGATTGTGAGTGTGTTGGAGTTTTGGTGATTGTGATGTGGGTGAGTTTTGTGAA
N S S D A I V S V V G V L V D C D V G E V C E 161
497 GCGTGTTCGCGTTTTGGATTTGGTTGTATCGGAAAATGGAGTTAAGGAGCAGTTGAACAAAGAGATT
A V V A V L D L V V S E N G V K E Q L N K E I 184
566 TTGAAGAGCGATCGGAAATTTCTACCGAAGTTTCTTTTGATTCTTCGTAAAGGAAAGTTGAGTTCGAGG
    L K S D R K F L P K F L L I L R K G K L S S R 207
635 ATTCAAACCGCTCGGATTCTAGAATTCATCGCATTAGACGCCGATTTCGCAGCGAAAAATGATCGAGGAG
    I Q T A R I L E F I A L D A D S Q R K M I E E 230
704 CAAGGTTTACTCTACGAATTGCACGTATTCACTAGCACGGAGACGAACCGGTTTCGCGATCGAAGCCGGT
    Q G L L Y E L H V F T S T E T N R F A I E A G 253
773 TTATCAACTCTAATCGCGGTCTCAACCACCAGACCGCGCAAAAAGAGCTAGTCCGGTTCGGAATTGTA
    L S T L I A V S T T R P A K K E L V R F G I V 276
842 CAAACCATCGGAAAATCCTTAGCGGTTTCGAAAACCGCTCGGGCGGTGGTGGAGAAGTCATTGAAGCTG
    Q T I G K I L S G S E T A R A V V E K S L K L 299
911 TTGGAACAGTAGCGACGTGTACGGAAGGCAGGGCGCGATAGTTAAAGGCGAAGAGTGCATGTCCGGCG
    L E T V A T C T E G R A A I V K G E E C M S A 322
980 ATAGTTACAAGGCTGATGAAGAGCTCGAAAGCAGCGACGGAGCACGGGGTGACAGTACTGTGGAGCGTG
    I V T R L M K S S K A A T E H G V T V L W S V 345
1049 TGCTGCTTGTTCGTGATACGGCGGCGCTGATGTGGTGGGAAAGGCAAATGGGCTAACTAAAGTGTTG
    C C L F R D T A A R D V V G K A N G L T K V L 368
1118 CTGGTAATGCAGAGTGACTGCTCCGCGGCGGTACGGCAGATGTGTGGGGAATTAGTCAAAGCATTGCGC
    L V M Q S D C S A A V R Q M C G E L V K A L R 391
1187 GTGGTGAATAATAAACATAAGAATTATTCAAAGTCGTGTTTGGCGAGTTATGATACAAAACACTACTCAC
    V V N N K H K N Y S K S C L A S Y D T K T T H 414
1256 ATTATGCCCTACTGAAaataataataataaccactcttaatttgtgttgactaaccatccataccaaaag
    I M P Y * 418
1325 aatcaaacactagtttttattttctttaattaataattattacaccatttgtttgtttatagaaataga
1394 attaggtagtttcatgctgtaaatcaaaaggaattctgctaataatgatacaaatgacatcaaactgttagc
1463 taaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1492

```

**Figura 1.** Seqüència aminoacídica de la proteïna PHOR1 on es mostren els diferents potencials llocs de modificació post-traducional predits pels programes MOTIF i PROSITE, i el domini transmembrana predit pel programa PSORT. Els potencials llocs de N-glicosilació amb consens Asn-Xaa-Ser/Thr es mostren enquadrats en vermell, els potencials llocs de fosforilació per Caseïna Kinasa II es mostren com a requadres blau clar, els potencials llocs de N-miristolació com a requadres blau fosc, els potencials llocs de fosforilació per Proteïna Kinasa C en negres i el lloc de fosforilació per Tiroxina Kinasa com a requadres de color lila. Els potencials llocs d’*O*-N-acetilglucosaminació es mostren de color blau mentre que el domini transmembrana es mostra de color groc.

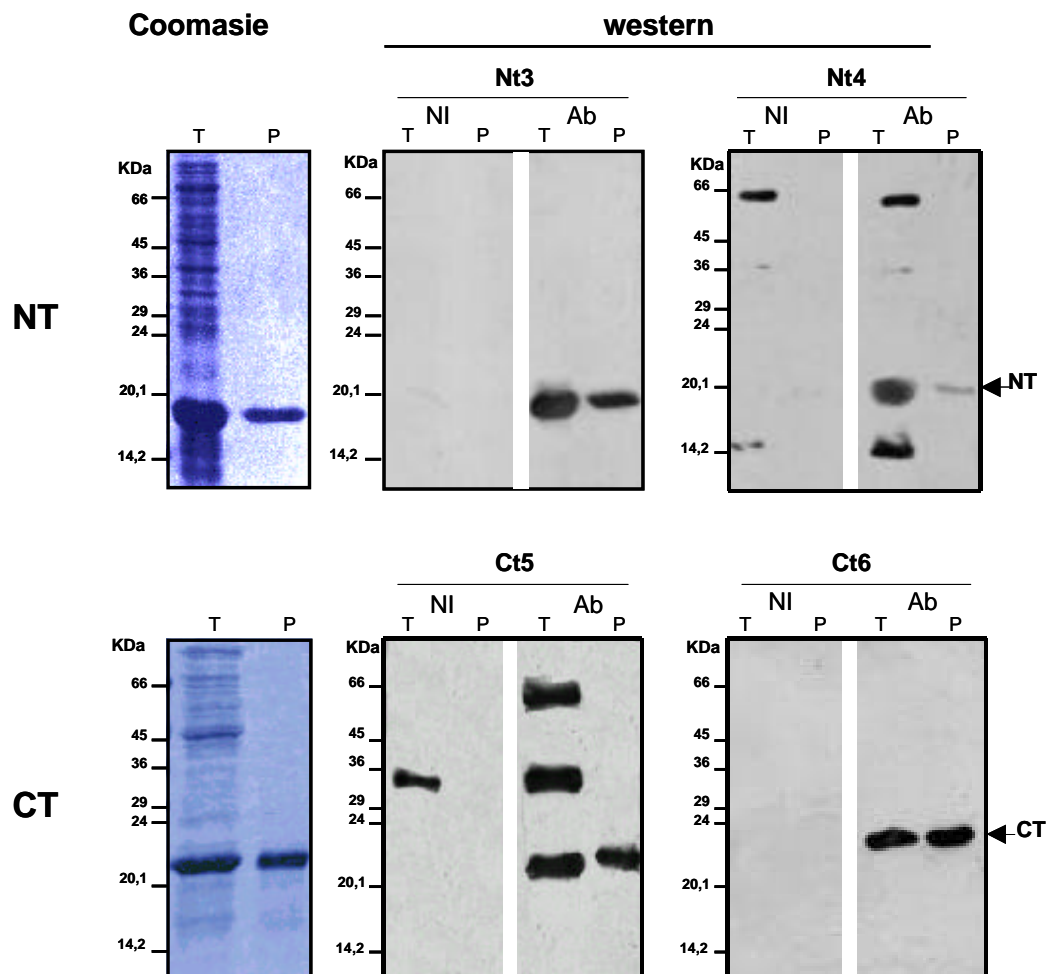
## 1.1 Obtenció de sèrum immune contra la proteïna PHOR1

Per tal d'obtenir antigen suficient per a l'immunització de conills es van clonar els dominis N-terminal (nucleòtids 17-412 de *Phor1*) i C-terminal (nucleòtids 728-1432 de *Phor1*) de la proteïna PHOR1, en fase amb la cua d'histidines en els vectors d'expressió pET23a i pET28a (Novagen), amb la finalitat d'obtenir les proteïnes recombinants fusionades a les cues d'histidines, el que ens permetria la seva purificació mitjançant cromatografia d'afinitat en columnes de Ni<sup>2+</sup>. Es va comprovar que les fusions estaven en la pauta de lectura adequada per seqüenciació dels inserts i les construccions es van transformar en cèl·lules BL21 per a induir l'expressió de la proteïna. En ambdós casos vam observar que les proteïnes recombinants (les hem designat com a NT i CT) s'acumulaven en cossos d'inclusió (s'extrauen a la fracció insoluble dels extractes proteics) com es mostra a la Figura 2. Per aquesta raó la purificació de les proteïnes recombinants es va realitzar en condicions desnaturalitzants, utilitzant 6M urea com a agent solubilitzant i les proteïnes recombinants, un cop purificades, es van renaturalitzar per diàlisi successives amb concentracions progressivament menors d'urea. No obstant, durant el procés de renaturalització s'observà que les proteïnes precipitaven i esdevenien totalment insolubles. Es per això que en últim terme els conills van ser immunitzats amb les proteïnes desnaturalitzades i purificades d'un gel SDS-PAGE preparatiu. Es va immunitzar un total de 4 conills, dos amb la proteïna NT (els sèrums d'aquests conills s'anomenaren Nt3 i Nt4) i dos amb la CT (els sèrums s'anomenaren Ct5 i Ct6). Després d'una immunització inicial i tres immunitzacions recordatoris dels conills amb l'antigen, s'obteniren sèrums amb un títol suficientment alt per poder ser utilitzats en els experiments d'immunodetecció.



**Figura 2. Expressió de les proteïnes recombinants NT i CT.** Es mostren les fraccions proteiques solubles (S) e insolubles (I) obtingudes a partir de les cèl·lules *E.coli* BL21 transformades amb les construccions pET23a/NT i pET28a/CT, després de 3 hores d'inducció amb 0.4mM IPTG a 30°C. Les proteïnes es separaren en un gel SDS-PAGE al 12,5% d'acrilamida, i es carregà uns 50 µg d'extracte per carril. A) Tinció amb Coomassie Blue. B) Detecció específica de les cues de 6-10 Histidines amb el Kit Indiana™ HisProbe-HRP (Pierce) on s'observen les proteïnes recombinants CT i NT. L'autorradiografia es va exposar un minut.

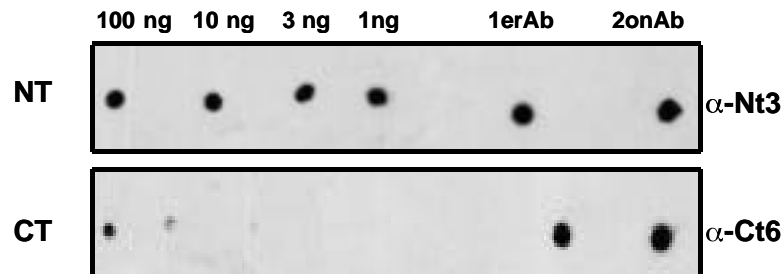
Els sèrums obtinguts s'analitzaren per western-blot per tal de determinar el seu títol i especificitat. A la Figura 3, es mostra que els sèrums obtinguts dels conills Nt3 i Nt4 foren ambdós capaços d'immunodetectar la proteïna recombinant NT. Mentre que el sèrum del conill Nt3 és capaç d'immunodetectar específicament la proteïna NT a una dilució 1/10.000, i només reconeix la banda proteica corresponent a aquesta proteïna, el sèrum del conill Nt4 s'havia d'utilitzar a una dilució menor (1/2.000) per tal de que reconegués la proteïna recombinant. A més a més, aquest antisèrum reconeix dues bandes addicionals corresponents a proteïnes d'*E.coli*, les quals són també detectades per l'antisèrum pre-immune. Els sèrums dels conills Ct5 i Ct6 foren també capaços de detectar la proteïna recombinant CT. No obstant, mentre que el sèrum del conill Ct6 es capaç de detectar específicament aquesta proteïna recombinant a una dilució 1/5000 i no dona reacció creuada amb cap altre proteïna, el sèrum del conill Ct5 s'ha d'utilitzar a dilucions molt baixes (1/500) i a aquestes dilucions presenta immunodetecció creuada amb d'altres proteïnes d'*E. coli*. Aquest resultat mostra doncs que només els sèrums dels conills Nt3 i Ct6 eren específics per la proteïna PHOR1, ja que no reconeixen cap altre proteïna d'*E.coli*. Per aquesta raó, es va descartar els sèrums dels conills Nt4 i Ct5, i es va fer servir els antisèrums Nt3 i Ct6 per a la resta d'immunodeteccions.



**Figura 3. Western-blot dels anticossos preparats en front de les proteïnes PHOR1 recombinants NT i CT.** Els filtres amb la proteïna s'incubaren amb els antisèrums (4a extracció de sang) corresponents als conills Nt3, Nt4, Ct5 i Ct6. Les proteïnes NT i CT directament expressades a *E. coli* (T) i un cop purificades (P) es separaren per electroforesi en un gel SDS-PAGE al 12,5% (Coomasie) i es van ser transferir a dues membranes de nitrocel.lulosa. Una de les membranes es va incubar amb el sèrum pre-immune (NI) a la mateixa dilució que el sèrum immune i l'altre amb l'antisèrum (Ab). Els antisèrums es van utilitzar a les dilucions següents: Nt3 1/10.000, Nt4 1/2.000, Ct5 1/500 i Ct6 1/5.000.

Per tal de determinar la mínima quantitat de proteïna que es pot detectar amb aquests anticossos, es van preparar dot-blots que contenien dilucions successives de la proteïna purificada i s'incubaren amb els antisèrums com abans. A la figura 4 s'observa que el sèrum del conill Nt3, a una dilució 1/10.000 es capaç de reconèixer fins a 1 ng de proteïna NT purificada. El sèrum del conill Ct6 té un títol més baix i a una dilució 1/10.000 pot reconèixer fins a 100 ng de la proteïna CT. D'altre banda, els assaigs

western demostraren que els sèrums Nt3 i Ct6 són específics per a cada domini de la proteïna PHOR1 ja que el sèrum del conill Nt3 només reconeix el domini NT mentre que el sèrum del conill Ct6 només reconeix el domini CT (dada no mostrada).



**Figura 4. Sensibilitat dels antisèrums en front de les proteïnes NT i CT recombinants. Assaig dot-blot.** A dues membranes de nitrocel.lulosa es van deixar assecar mostres de 1  $\mu$ l que contenien diferents concentracions (100 ngs, 10 ngs, 3 ngs i 1 ng) de les proteïnes NT i CT purificades. Com a control de l'immunodetecció es va aplicar a les membranes 1  $\mu$ l d'una dilució 1/5.000 dels anticossos Nt3 (membrana NT) i Ct6 (membrana CT), respectivament (1erAb). Com a control de la reacció de revelat quimioluminiscent es va aplicar 1  $\mu$ l d'una dilució 1/5.000 de l'anticòs anti-IgG de conill fusionat a la peroxidasa (2on Ab). Els filtres es van incubar amb una dilució 1/10.000 dels respectius antisèrums ( -Nt3 i -Ct6).

## 1.2 Detecció de la proteïna PHOR1 en extractes totals de plantes de patatera.

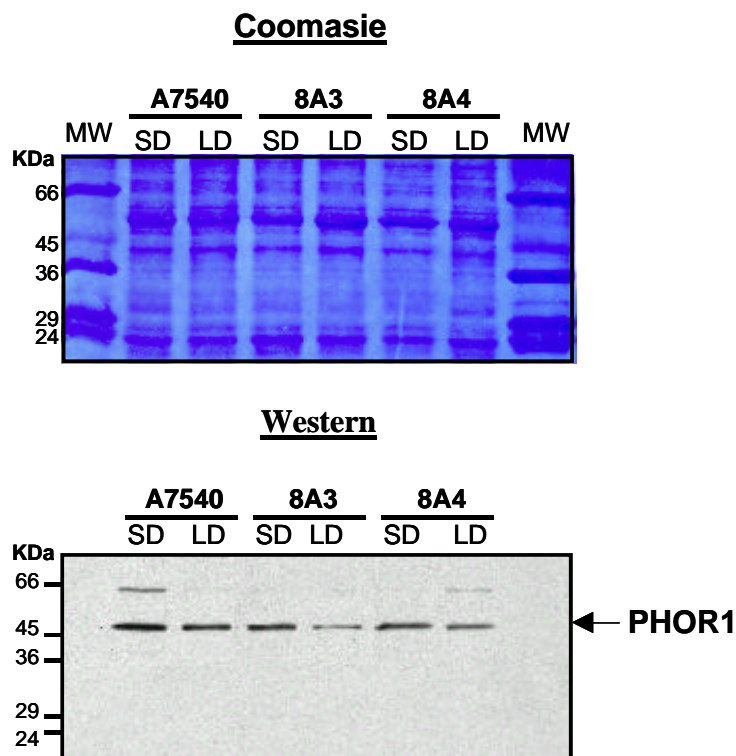
Amb l'objectiu de comprovar si els sèrums obtinguts eren capaços d'immunodetectar la proteïna PHOR1 a fulles de patatera, es van preparar extractes proteics de plantes de *S. tuberosum* ssp. *andigena* que s'havien crescut en condicions de dies curts i dies curts amb interrupció de la nit (SD+NB). Anàlisis anteriors de l'expressió del transcrit *Phor1* havien demostrat que el mRNA corresponent a aquest gen s'expressa a nivells més elevats en plantes crescudes en condicions inductores de la tuberització (SD) que en plantes crescudes en condicions no-inductores (SD+NB), pel que esperaríem que la proteïna seguís un patró d'acumulació similar. D'altre banda, s'havia vist que el transcrit *Phor1* segueix un patró rítmic d'expressió que es caracteritza per dos pics de mRNA, un a l'inici del dia i un segon a l'inici del període fosc, en plantes crescudes en SD, i un únic pic d'expressió, a l'inici del dia, en plantes crescudes en SD+NB (Monte, 1998).



## RESULTATS

Donat que el mRNA de *Phor1* s'acumula a fulles majoritàriament 1 hora després de l'inici del dia, tant en plantes crescudes en condicions de SD com de SD+NB, les mostres per a l'extracció de proteïnes es van recollir 1 hora i 3 hores després d'encendre les llums a les cambres de fotoperíode.

A la figura 5 es mostren el resultats de l'immunodetecció amb l'antisèrum -Nt3 dels extractes proteics de fulla. Es pot observar que aquest sèrum detecta una banda de 46 KDa, que coincideix amb el pes molecular esperat per a la proteïna PHOR1. A la figura s'observa també una variació en els nivells de la proteïna PHOR1 entre plantes crescudes en condicions inductores de SD i no inductores de SD+NB, el que confirma els resultats previs obtinguts per northern que indicaven que els nivells de mRNA eren més elevats en condicions de SD que no pas en SD+NB.



**Figura 5. Immunolocalització de la proteïna PHOR1 en extractes totals de plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena*.**

Les plantes es van créixer en condicions de SD o SD+NB, i les fulles es van recollir 3 hores després que s'encenguin els llums de les cambres de fotoperíode.

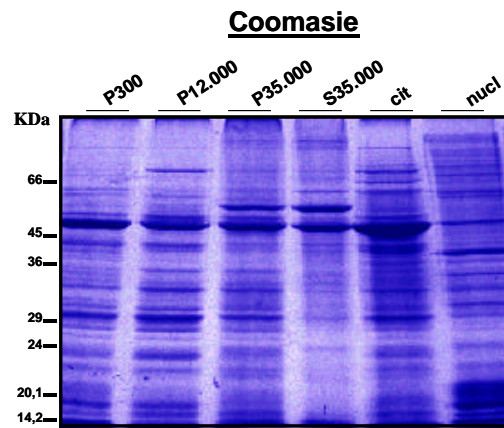
Els extractes proteics (40 µg de proteïna) es van separar per electroforesi en un gel SDS-PAGE al 12,5% (Coomasie) i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. La membrana es va incubar amb una dilució 1/2.000 de l'antisèrum -Nt3.

### 1.3 Immunodetecció de la proteïna PHOR1 en diferents fraccions subcel·lulars.

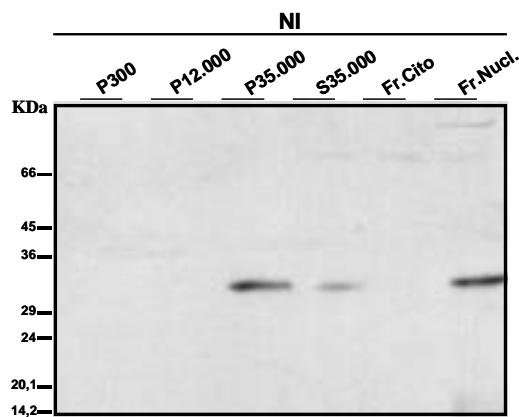
Considerant els resultat obtingut de l'anàlisi amb el programa informàtic PSORT, que predeïa una localització de la proteïna PHOR1 associada a la membrana plasmàtica, es va procedir a la obtenció de preparacions subcel·lulars enriquides en components membranosos (membrana plasmàtica, cloroplastes, mitocondris, peroxisomes, així com la fracció microsomal) a partir de fulles joves de plantes de patatera, per tal de intentar detectar la proteïna en aquestes fraccions. Les preparacions membranoses es fan fraccionar per centrifugació diferencial a 300 g (sedimenten els nuclis i una part del cloroplastes), 12.000 g (sedimenten el romanent de cloroplastes, els mitocondris i peroxisomes) i 35.000 g (en aquest sediment es recull la fracció microsomal conjuntament amb les proteïnes integrades o associades a membrana plasmàtica), i les diferent fraccions així obtingudes es van dissoldre en un tampó que contenia SDS, analitzant tot seguit la presència de PHOR1 en aquestes fraccions per western blot. A la figura 6, es mostra el resultat obtingut de l'immunodetecció d'aquestes preparacions, en la que s'observa una banda de 46 KDa, que coincideix amb el pes molecular de la proteïna PHOR1, únicament al sediment P300 però no a la fracció microsomal P35.000, ni a la fracció soluble que es a on s'esperaria trobar la proteïna si aquesta fora una proteïna integral de membrana o associada a la membrana plasmàtica.

En aquesta immunodetecció s'observa que l'antisèrum -Nt3 detecta també una banda de 67 KDa que es troba principalment a la fracció P300 i a la fracció soluble (S35.000). Actualment desconexim si aquesta banda correspon a una proteïna relacionada amb PHOR1 o es una immunodetecció creuada de l'antisèrum, tot i que no l'observem en els filtres incubats amb l'antisèrum pre-immune (NI). Malgrat que no podem descartar que PHOR1 podria estar dèbilment associada a la membrana plasmàtica, i que aquesta unió podria trencar-se durant el protocol de preparació de la fracció membranal, aquest resultat semblaria indicar que PHOR1 no es una proteïna associada a la membrana plasmàtica, i suggeriria més aviat que la localització de la proteïna es nuclear (a la fracció P300 sedimenten majoritàriament cèl·lules senceres i nuclis).

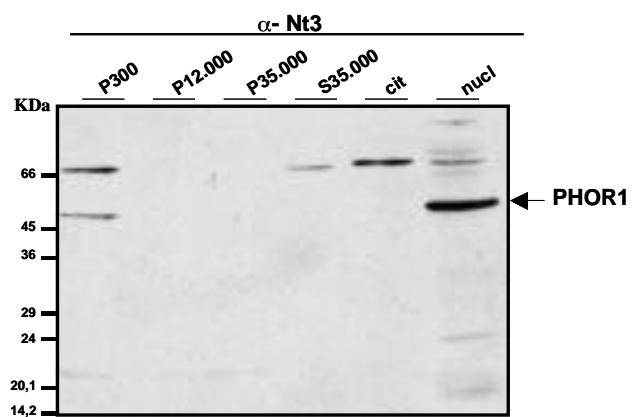
A)



B)



C)

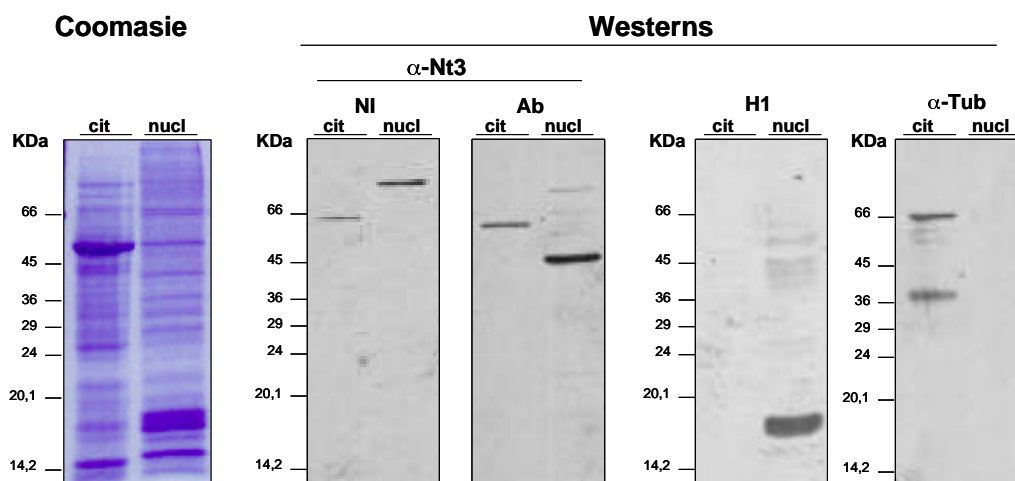


**Figura 6. Immunodetecció del fraccionament subcel·lular de fulles joves de patatera *S. tuberosum* ssp. *andigena*.**

Les plantes es van créixer en condicions de SD i les mostres van ser agafades 1 hora després que s'encengués el llum a les cambres de fotoperíode.

- A) Electroforesi en gel SDS-PAGE al 12,5% (Coomasie)
- B) Membrana incubada amb una dilució 1/2.000 del sèrum pre-immune (NI)
- C) Membrana incubada amb una dilució 1/2.000 de l'antisèrum  $\alpha$ -Nt3. La proteïna PHOR1 s'observa a la fracció P300, però no a les fraccions P12.000 i P35.000 o a la fracció S35.000 corresponent al sobrenedant restant, després d'una centrifugació diferencial segons el protocol d'extracció de proteïnes microsomals (Veure 11, material i mètodes). (cit) correspon a la fracció citoplasmàtica i (nucl) a la fracció nuclear obtingudes segons el protocol d'extracció de proteïnes nuclears (veure 10, material i mètodes).

En tots els casos es van carregar 40  $\mu$ g de proteïna per carril.



**Figura 7. Immunodetecció de la proteïna PHOR1 en extractes nuclears.**

Electroforesi en gel SDS-PAGE al 12,5% e immunodetecció amb el sèrum preimmune (NI, dilució 1/2000), els antisèrums -Nt3 (Ab, dilució 1/2000), i anti-histona H1 (H1, dilució 1/1000) i l'anticòs monoclonal anti- -tubulina ( -Tub, dilució 1/2000).

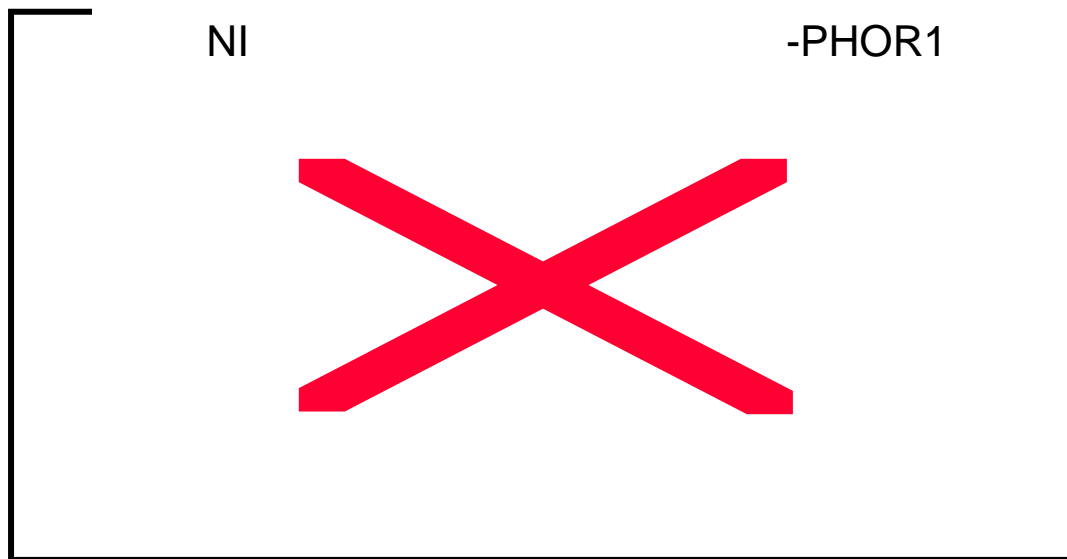
(cit) correspon a la fracció citoplasmàtica i (nucl) a la fracció nuclear obtingudes d'acord amb el protocol d'extracció de proteïnes nuclears (veure apartat 10 de material i mètodes).

Es van carregar 40 µg de proteïna per carril.

Amb l'objectiu de confirmar els resultats anteriors es va procedir a la preparació d'extractes nuclears crus a partir de fulles joves de patatera, fent servir un protocol específic per a l'aïllament de nuclis i la posterior extracció de proteïnes nuclears. Els resultats de l'assaig western d'aquests extractes es mostren a les figures 7, on s'observa una banda de 46 KDa corresponent a la proteïna PHOR1 únicament als extractes de nuclis. Exposicions molt llargues de la reacció de quimio-luminiscència detectaven també la presència de la proteïna PHOR1 a la fracció soluble, que inclou el citoplasma, membrana plasmàtica i la resta d'òrgànuls cel·lulars (dada no mostrada). A fi de comprovar el grau de puresa de la fracció nuclear, i quina proporció de nuclis copurificava amb la fracció citoplasmàtica, aquests mateixos extractes es van incubar amb un antisèrum de conill anti histona H-1 (control de nuclis) i amb un anticòs monoclonal en front de la -tubulina (control de citoplasma). Tal com s'observa a la Figura 7, el fraccionament era prou correcte ja que pràcticament no es detectaren tubulines a la fracció nuclear, ni histones a la fracció citoplasmàtica

#### **1.4 Immunolocalització de la proteïna PHOR1 en talls ultrafins de fulla de patatera.**

Donat que el resultat de l'anàlisi de les fraccions microsomals fou força inesperat, es va intentar estudiar la localització nuclear de la proteïna PHOR1 mitjançant immunodetecció al microscopi electrònic. Per això, es va fixar trossos de fulla de patatera *S. tuberosum* ssp. *andigena*, es va incloure aquests trossos en la reïna d'inclusió LR-White, i es van fer talls semifins i ultrafins de les cèl·lules del mesòfil de la fulla. Les reixetes que contenien els talls ultrafins es van incubar amb una dilució 1/500 del sèrum pre-immune, o amb l'antisèrum -Nt3 (dilució 1/500), seguit de proteïna-A/or. Després d'extensius rentats, els talls es van contrastar i s'observaren al microscopi electrònic. A la Figura 8 es mostren les micrografies electròniques corresponents a totes dues incubacions. Podem observar que tot i que als talls incubats amb l'antisèrum -Nt3 s'observa una localització majoritàriament nuclear de la proteïna PHOR1, les incubacions presenten molt de soroll de fons i es detecten també grans de or en d'altres estructures. De fet, per a detectar la proteïna va ser necessari utilitzar dilucions molt baixes (1/500) de l'antisèrum i a aquestes dilucions també el sèrum pre-immune donava soroll de fons. Alhora, els assaigs western havien demostrat que a aquestes dilucions de l'antisèrum, aquest presenta una reacció creuada amb, al menys dos proteïnes més (Figura 7), el que complica la interpretació dels resultats obtinguts.



**Figura 8.** Micrografia electrònica corresponent als talls ultrafins de fulles joves de patatera (*S. tuberosum* ssp. *andigena*) incubats amb dilucions 1/500 del sèrum pre-immune (NI) o de l'antisèrum -Nt3 (-PHOR1).

### **1.5 Localització de la proteïna de fusió PHOR1:GFP a cèl·lules de tabac BY-2.**

Per tal de confirmar el resultat obtingut per microscopia electrònica i ja que en aquests estudis s'observà que l'anticòs -Nt3 no era capaç de reconèixer de manera gaire eficient la proteïna nativa (els conills es van immunitzar amb proteïna desnaturalitzada, degut a que no es va aconseguir solubilitzar la proteïna) ens vam plantejar d'estudiar la localització subcel·lular de la proteïna PHOR1 per una mètode diferent basat en l'anàlisi de la fluorescència corresponent a la proteïna fluorescent GFP (*green fluorescent protein*, Reichel *et al.*, 1996) mitjançant expressió transitòria en suspensions cel·lulars de tabac BY2 (*Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2, Gomord *et al.*, 1998), les quals no contenen cloroplastes i per tant no donen problemes d'autofluorescència deguts a la clorofil·la. Aquest mètode presenta també l'avantatge que no requereix fixar o incubar les cèl·lules amb cap substrat per a observar la fluorescència deguda a la proteïna GFP, el que fa possible estudiar directament la localització de la proteïna en cèl·lules vives.

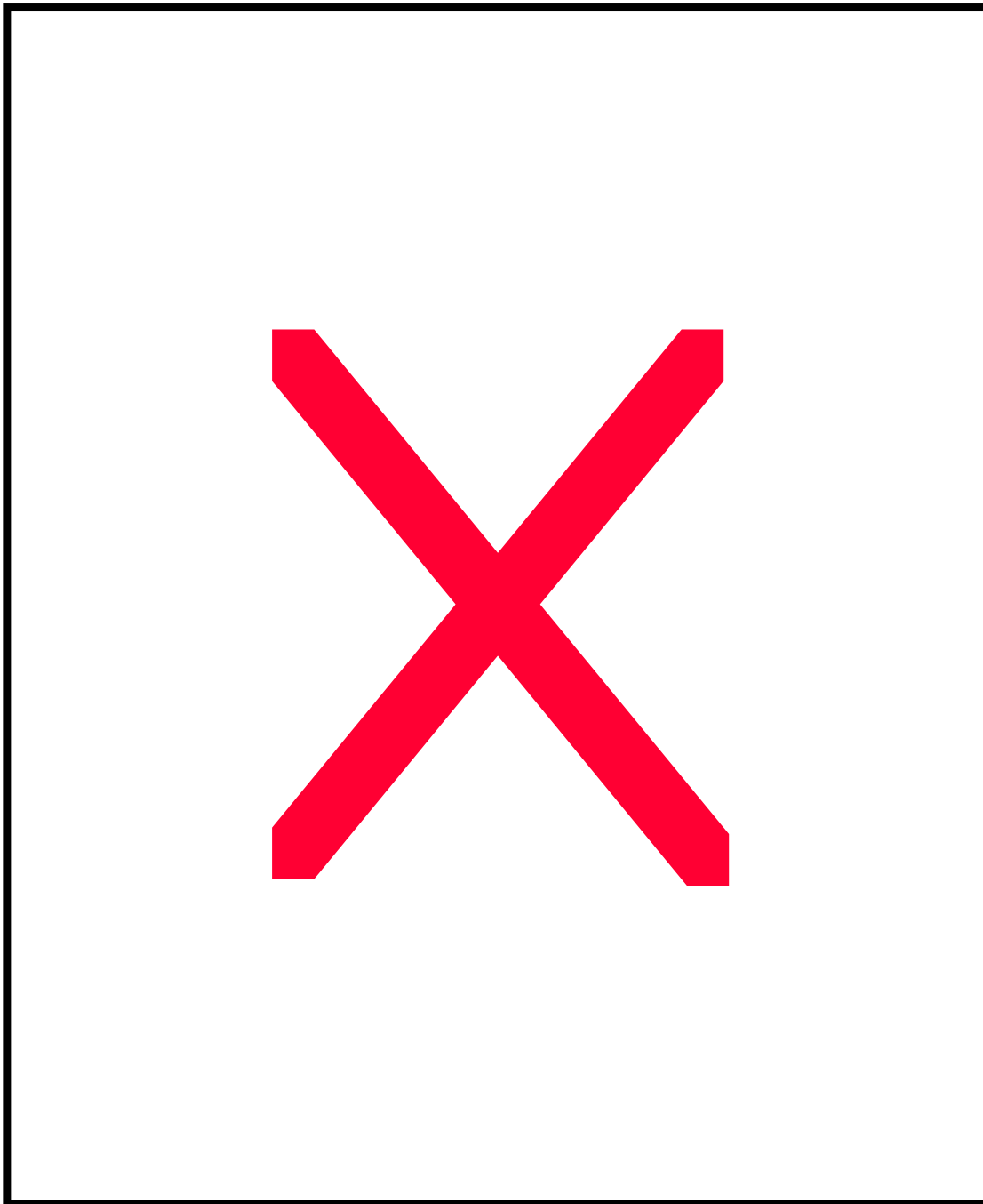
Amb aquest objectiu, es van sintetitzar dos oligonucleòtids que es van fer servir com encebadors en reaccions de PCR per a amplificar la regió codificant de la proteïna PHOR1. Aquests encebadors contenien una diana *Bsp*HI que genera extrems 5'-protuberant compatibles amb els extrems *Nco*I. Després de la reacció de PCR, el producte d'amplificació es va tallar amb l'enzim *Bsp*HI (la regió codificant per a la proteïna PHOR1 inclou una diana *Nco*I, però no dianes *Bsp*HI) i es va clonar en fase en la diana *Nco*I del plasmidi *pUC/GFP S65C/T*, rera del promotor constitutiu *2X35S CaMV*. Es va obtenir així la construcció *pUC-2X35S-PHOR1-GFP*, que codifica per la proteïna de fusió PHOR1:GFP en que la proteïna fluorescent GFP es fusionada a l'extrem C-terminal de PHOR1 (Figura 1, de material i mètodes ). Un cop comprovat que la fusió era en la pauta de lectura correcta, es va transformar les cèl·lules de tabac BY2 de manera transitòria amb aquesta construcció. Després de 4-6 hores del bombardeig, les cèl·lules s'observaren al microscopi òptic, sota llum ultraviolada i fent servir els filtres adequats, per a observar la fluorescència deguda a la proteïna GFP. En aquestes condicions vam poder observar que aproximadament el 40% de les cèl·lules transformades, presentaven una localització citoplasmàtica de la proteïna PHOR1:GFP, mentre que a la resta de cèl·lules transformades la proteïna es trobava també al nucli (Figura 9). Aquesta distribució subcel·lular no es va observar en cèl·lules que havien estat bombardejades amb les construccions control *pUC-2X35S-GFP* o *pUC-2X35S-GFP-GUS*, les quals codifiquen respectivament per la proteïna GFP (control de localització nuclear) i la fusió GFP:GUS (control de localització citoplasmàtica). El 100% de les cèl·lules transformades amb la construcció *pUC-2X35S-GFP* presentaven una localització nuclear/citoplasmàtica de la proteïna GFP ja que la proteïna GFP té un pes molecular menor que el tamany d'exclusió del porus nuclear (Figura 9). D'altre banda el 100% de les cèl·lules transformades amb la construcció *pUC-2X35S-GFP-GUS* presentaven una localització citoplasmàtica de la proteïna (la fusió GFP:GUS té un pes molecular major que el tamany d'exclusió del porus nuclear i la proteïna no pot entrar per difusió a través del porus).

El resultat obtingut amb la construcció PHOR1:GFP, en que poguérem observar que un percentatge de cèl·lules presentaven una localització de la proteïna en el citoplasma i la resta una localització nuclear, pot interpretar-se com a indicatiu de una migració de la proteïna al nucli en resposta a algun estímul extern, semblant a la descrita per exemple a la bibliografia per a les proteïnes COP1 i PhyB d'*Arabidopsis thaliana*, les quals

presenten una localització a citoplasma o nucli regulada per llum, trobant-se al citoplasma en condicions de foscor, però migrant ràpidament al nucli en presència de llum. Alhora, s'ha vist que la proteïna  $\beta$ -Catenina de *Drosophila melanogaster*, que com veurem més endavant presenta una forta similitud estructural amb la proteïna PHOR1, també mostra una migració al nucli regulada pel senyal *Wingless/Wnt* (veure discussió). Tenint en compte que els resultats obtinguts en plantes transgèniques portadores de una construcció antisentit pel cDNA *Phor1* posaven en evidència una relació entre la proteïna PHOR1 i les hormones GAs, ja que s'observà que aquestes plantes presentaven un fenotip semi-nan que podia ser revertit per aplicació exògena de GAs (Elena Monte, 1998), vam decidir fer els estudis de localització de la proteïna PHOR1:GFP en cèl·lules que havien estat tractades amb GAs o amb el inhibidor de síntesis de GAs ancimidol. Les cèl·lules, després de filtrades, es van incubar durant 4 hores en un medi que contenia GA<sub>3</sub> o ancimidol i es mantingueren de nou en aquest medi després de bombardejar fins a l'anàlisi al microscopi.

A la figura 9 i a la taula 1 es mostren els resultats d'aquests experiments. Es pot veure que mentre que en més del 90% de les cèl·lules tractades amb ancimidol s'observa una localització al citoplasma de la proteïna de PHOR1:GFP, en més del 90% de les cèl·lules tractades es GA<sub>3</sub> la localització de la proteïna PHOR1:GFP era nuclear. Aquesta distribució diferencial de la proteïna GFP no s'observa en les cèl·lules control transformades amb les construccions GFP o GFP:GUS. Com s'observa a la Figura 9, aquestes construccions mantenen sempre una localització bé nuclear o citoplasmàtica de la proteïna GFP, independentment de si les cèl·lules han estat tractades amb GA<sub>3</sub> o amb ancimidol. Per tant, la migració al nucli depenent de GA<sub>3</sub> de la proteïna de fusió PHOR1:GFP, semblaria ser exclusiva d'aquesta construcció i ser, per tant, mitjançada per la proteïna PHOR1. D'altre banda, vam poder observar que la migració de la proteïna PHOR1:GFP al nucli no es permanent ja que 24 hores després del bombardeig la proteïna de fusió es localitza de nou al citoplasma en el 100% de les cèl·lules transformades, tant si aquestes eren incubades amb GA<sub>3</sub> com si eren incubades amb ancimidol. Les proteïnes GFP i GFP:GUS, per altre part mantenen la seva localització després de 24 hores del bombardeig.





r  
s  
5  
il  
i  
,  
5

mg/L d'acetic acid (acetic acid).

### **1.5.a PHOR1 migra al nucli de manera ràpida i transitòria.**

El resultat anterior és indicatiu d'una migració transitòria de la proteïna PHOR1 en resposta a les GAs. Així doncs suggeriria que les GAs posen en marxa una ruta d'inducció que dirigeix la proteïna PHOR1 cap al nucli a on podria tenir una funció en l'activació algun altre intermediari de senyalització o inclusiu en l'activació de l'expressió gènica, essent la proteïna de nou exportada al citoplasma un cop ha realitzat

aquesta funció. Amb l'objectiu de corroborar aquests resultats, i d'estudiar la cinètica de migració de PHOR1 al nucli, la construcció *2X35SCaMV-PHOR1-GFP* es va clonar en el vector binari pBin19 i es va transformar en la soca GV2260 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Es van transformar cèl·lules BY2 de manera estable per infecció amb aquesta soca d'Agrobacteria, i es van seleccionar els calls transgènics per creixement en un medi selectiu que contenia 50 mg/L de Kanamicina. Els calls obtinguts després de 3 setmanes de la infecció, es van analitzar per expressió de la proteïna de fusió mitjançant observació de la fluorescència deguda a la proteïna GFP al microscopi òptic, així com per western blot, després d'incubar els filtres amb una dilució 1/2000 de l'antisèrum comercial anti-GFP de conill (Molecular Probes). Es van obtenir suspensions cel·lulars de dos calls independents, els quals sobre-expressen la proteïna PHOR1:GFP a nivell alts (call 33) i nivells intermedis (call 39). Aquestes suspensions es van utilitzar per a estudiar la cinètica de migració al nucli de la proteïna de fusió, després de tractar-les amb GA<sub>3</sub> o ancimidol. Dos, quatre, sis i vint-i-quatre hores després del tractament es va observar la localització de la fluorescència deguda a la proteïna GFP al microscopi òptic (veure figura 10A) i es va confirmar la localització dins del nucli de la proteïna de fusió per microscopia confocal (veure figura 10 B).

A la figura 10A s'observa que a les dues hores després del tractament amb GA<sub>3</sub> ja s'observa una localització de la proteïna PHOR1:GFP en el nucli en el 80% de les cèl·lules i que quatre hores després del tractament, aquesta localització s'observa en el 100% de les cèl·lules. Aquesta localització es mantenia, d'altre banda, fins a sis hores després del tractament. A les vint-i-quatre hores, no obstant, el 100% de les cèl·lules presentaven PHOR1:GFP localitzada de nou al citoplasma. Les suspensions cel·lulars tractades amb ancimidol van presentar en tots els casos una localització citoplasmàtica de la proteïna PHOR1:GFP. Aquest resultat indicaria que el tractament amb GA<sub>3</sub> indueix una migració ràpida i transitòria de la proteïna PHOR1 cap al nucli, tal com s'esperaria per a una proteïna amb una funció en la via de transducció del senyal d'aquesta hormona.

Per comprovar que aquesta localització diferencial era mitjançada per un senyal específic present a la proteïna PHOR1 i no per una degradació de la proteïna de fusió, que al donar un producte de pes molecular menor pogués permetre la difusió de la

## RESULTATS

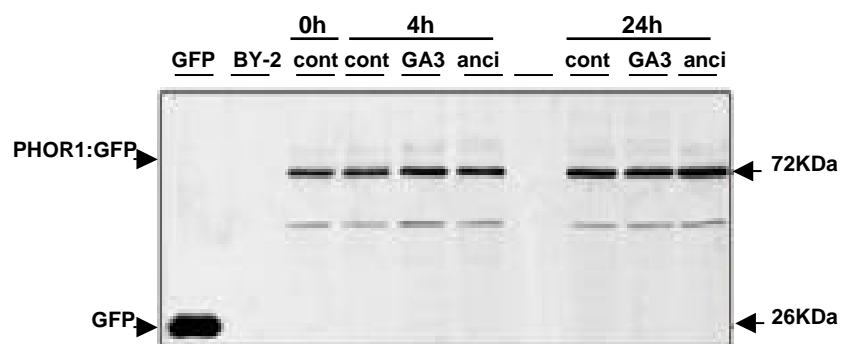
---

proteïna GFP truncada al nucli, es van preparar extractes proteics totals de les suspensions cel·lulars tractades amb GA<sub>3</sub> i ancimidol, i es van analitzar per incubació western fent servir un anticòs comercial contra la proteïna GFP. La immunodetecció de les transferències dels extractes proteics, tant quan s'incubaren amb l'anticòs -GFP com amb l'antisèrum contra la proteïna PHOR1 ( -Nt3), detectaren una banda de 72 KDa corresponent a la proteïna de fusió PHOR1:GFP (veure Figura 10C). Això demostra que cap dels tractaments indueix una degradació de la proteïna de fusió PHOR1:GFP, i per tant que la migració d'aquesta proteïna al nucli ve donada per un senyal específic present a PHOR1.

A)



C)



**Figura 10. Localització de la proteïna de fusió PHOR1:GFP en suspensions cel·lulars BY2 transformades amb la construcció *pBin19-2X35SCaMV-PHOR1-GFP*, que sobreexpressen nivells elevats de la proteïna (call 33).**

La suspensió cel·lular es va créixer en medi NT líquid (control). Aliquotes de la suspensió es van tractar amb 50  $\mu$ M GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) o amb 5 mg/L d'ancimidol (ancimidol) i la localització de la fluorescència deguda a la proteïna de fusió PHOR1:GFP es va analitzar a diferents temps després del tractament.

**A)** Localització de la proteïna de fusió PHOR1:GFP a les 0 hores (0h), 4 hores (4h) i 24 hores (24h) després dels tractaments.

**B)** Microscopia confocal de les cèl·lules a les 4 hores de tractament. Es mostra una imatge del nucli a on es pot distingir entre una localització a l'interior del nucli o perinuclear de la proteïna.

**C)** Immunodetecció de la proteïna PHOR1:GFP.

Es van preparar extractes proteics totals de les suspensions cel·lulars crescudes en medi NT líquid (cont), o tractades amb 50  $\mu$ M GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) o 5 mg/L d'ancimidol (anci), a les 0 hores (0h), 4 hores (4h) i 24 hores (24h) després dels tractaments. 40  $\mu$ g dels extractes proteics total es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12,5% i es van transferir a un filtre de nitrocel·lulosa. El filtre es va incubar amb una dilució 1/2.000 d'un antiserum comercial anti-GFP de conill (Molecular Probes) i es va revelar per ECL. Com a controls es van carregar també extractes proteics d'una suspensió que expressava la proteïna GFP (GFP) i una suspensió no transformada (BY-2).

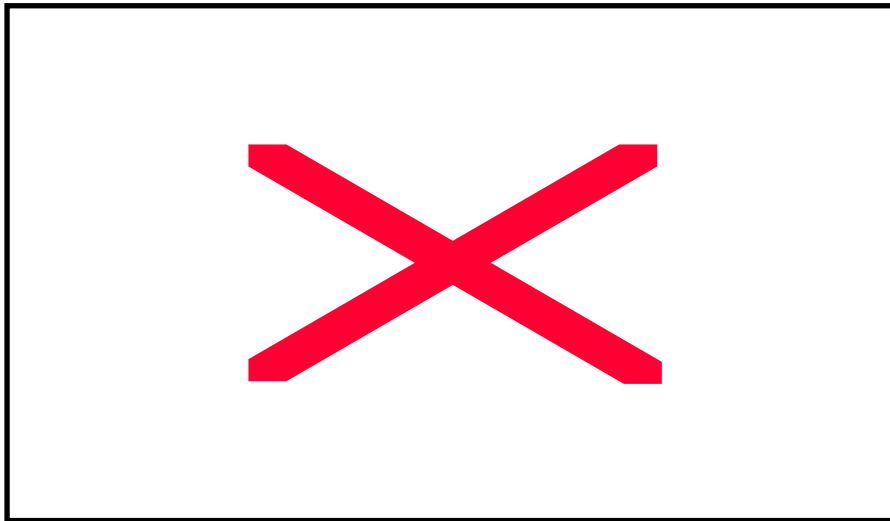
### **1.5.b Les cèl·lules BY2 mostren una resposta fisiològica a GAs.**

Amb l'objectiu de verificar que les cèl·lules BY-2 responien a les aplicacions exògenes de GAs i ancimidol es va analitzar l'expressió dels gens GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa en aquestes cèl·lules mitjançant experiments per anàlisi northern. Es van realitzar extraccions de RNA total de cèl·lules BY-2 no transformades i les cèl·lules transformades amb la construcció *pBin19-2X35SCaMV-PHOR1-GFP* (call 33), després dels tractaments amb GA<sub>3</sub> i ancimidol. Un cop transferits a una membrana de Nylon, els filtres es van hibridar amb les sondes *NtGA20ox* i *NtGA2ox* corresponents a dos clons cDNA parcials dels missatgers que codifiquen per als enzims biosintètics GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa de tabac. Experiments a diferents laboratoris han posat en evidència que els darrers passos en la ruta de biosíntesi de GAs, catalitzats per els enzims GA 20-oxidasa, GA 3 -hidroxilasa i GA 2-oxidasa es troben regulats pel producte final de la via GA<sub>1</sub>. Així per exemple, s'ha vist que els gens que codifiquen les activitats GA 20-oxidasa i GA 3 -hidroxilasa són regulats per retroalimentació negativa per GA<sub>1</sub>, en espècies con *A. thaliana*, espinac i patatera (Carrera et al., 1999 i Jordi Bou, 2000, Wu et al., 1996; Xu et al., 1995), al contrari que els gens que codifiquen l'activitat GA 2-oxidasa els quals són regulats positivament per les GAs (Thomas et al., 1999). Degut a aquest mecanisme de regulació, l'expressió dels gens GA 20-oxidasa i 3 -hidroxilasa es veu reduïda quan s'apliquen GAs exògenes i s'incrementa als mutants deficientes en GAs o amb el tractament amb ancimidol o paclobutrazol. Al contrari passa amb els nivells dels tràncrits corresponents a GA 2-

---

oxidasa, els quals incrementen en aplicar GAs, i estan reduïts als mutants deficients en GAs així com en plantes tractades amb ancimidol.

Tal com s'observa a la figura 11, els nivells del transcrit corresponent a GA 2-oxidasa eren més elevats a les cèl·lules BY-2 tractades amb GA<sub>3</sub>, al contrari que en les cèl·lules tractades amb ancimidol en que s'observaren nivells reduïts d'aquest transcrit respecte a les cèl·lules control (no tractades). Aquest resultat demostra que les cèl·lules BY-2 que sobreexpressen la proteïna PHOR1:GFP responen a l'aplicació exògena de GAs i ancimidol, i per tant ens permet afirmar que la migració al nucli de la proteïna PHOR1:GFP és donada realment com a resposta fisiologia al tractament d'aquestes cèl·lules amb GAs i ancimidol, afegides al medi. Com es pot veure a la figura 11, a les cèl·lules BY2 no transformades (control) no es detectà el transcrit *NtGA2ox*. Tot i que de moment es desconeix quina es la raó exacta d'aquest resultat, podria ser que en absència de la proteïna PHOR1:GFP els nivells d'aquest transcrit són molt baixos en les cèl·lules BY2 i no es poden detectar mitjançant experiments northern. Aquesta observació suggereix que la sobreexpressió de la proteïna PHOR1:GFP a les cèl·lules BY2 fa que aquestes cèl·lules incrementin la seva resposta a GAs, el que resulta en un augment en els nivells d'expressió del gen *NtGA2ox*. No obstant, farien falta experiments addicionals per a poder corroborar aquesta hipòtesis. En cap dels casos es va detectar el transcrit *NtGA2ox*.



**Figura 11. Nivells d'expressió del gen *NtGA2ox*, que codifica per l'enzim GA 2-oxidasa de tabac, en cèl·lules BY-2 transformades amb la construcció *pBin19-2X35SCaMV-PHOR1-GFP*, que expressen nivells alts de la proteïna de fusió PHOR1:GFP (call 33).**

Suspensions cel·lulars no transformades o que sobre-expressen la proteïna PHOR1:GFP es van créixer en medi NT líquid (control), i en medi NT que contenia 50  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) o 5 mg/L d'ancimidol (ancimidol). Es recolliren mostres a les 4 hores (4h) i 6 hores (6h) després dels tractaments. En cada carril s'ha carregat 30  $\mu$ g de RNA total.

### **1.6 PHOR1 presenta un domini N-terminal CPI conservat i un domini C-terminal amb una estructura Armadillo repetida.**

Les dades anteriors, i sobre tot la migració dependent de GAs de PHOR1 al nucli, estan d'acord amb una funció de PHOR1 en la transducció del senyal de GAs. Anàlisi anteriors en que s'havia comparat PHOR1 amb les proteïnes en les bases de dades, no varen mostrar cap tipus de similitud en la seqüència aminoacídica que donés una indicació sobre la possible funció de d'aquesta proteïna. No obstant, anàlisi posteriors una vegada ja es disposava de una part important de la seqüència del genoma de *Arabidopsis*, va permetre de detectar mitjançant el programa BLAST que PHOR1 presentava certa homologia amb un grup de ESTs d'*Arabidopsis thaliana* (les similituds detectades oscil·len entre un 26 i 70%). Es detectà també un 48% de similitud amb la

proteïna ARC1 (per Arm Repeat Containing 1) de *Brassica napus*, isolada en un criatge de tipus doble-híbrid en llevat per a cercar proteïnes que mostressin una interacció amb el domini kinasa del locus receptor kinasa-S d'autoincompatibilitat (Gu et al., 1998).

Totes aquest grup de proteïnes mostren una seqüència d'uns 70 amino àcids molt conservada al extrem N-terminal de la proteïna (posicions 13-79 de PHOR1) el qual hem anomenat domini CPI per presentar molt conservat el motiu format pels aminoàcids Cys-Pro-Ile. A la figura 12A, es mostra la comparació de la seqüència amino acídica del domini CPI de PHOR1 i les proteïnes deduïdes de les seqüències ESTs d'*Arabidopsis*. La identitat en aquesta regió es del 50% entre les diferents proteïnes. Aquesta regió presenta també un 35% d'identitat amb la proteïna UFD2 de llevat, un 33% d'identitat amb la proteïna NOSA de *D. discoideum* i un 30% d'identitat amb una regió a l'extrem C-terminal de la proteïna CHIP que interacciona amb la proteïna *heat shock* HSP-70 humana (veure figura 12B). Aquestes últimes, són proteïnes relacionades amb el sistema de ubiquitinació i posterior degradació específica de proteïnes pel proteasoma, el que podria indicar que a PHOR1 aquesta regió té també una funció en el control de la vida mitja i degradació específica de la proteïna pel signalosoma (Koepl et al., 1999)

Així mateix, es va poder observar que tant PHOR1 com totes les proteïnes deduïdes de les seqüències EST d'*Arabidopsis*, presentaven una segona regió conservada a l'extrem C-terminal de la proteïna (posicions 109–418 de PHOR1) amb una estructura repetida. Aquesta regió mostra un 30-35% d'identitat amb el domini “arm-repeat” de les proteïnes armadillo de *Drosophila melanogaster* (Peifer i Wieschaus, 1990) i el seu homòleg vertebrat  $\beta$ -catenina (McCrea et al., 1991), el qual consisteix en 8-12 còpies en tàndem d'un motiu conservat de 38-45 residus. Malgrat que aquest percentatge d'identitat es molt baix, es pot considerar significatiu ja que la homologia entre els diferents motius repetits de les proteïnes armadillo/  $\beta$ -catenina es també només del 40%. De fet, els dominis armadillo són regions amb una forta estructura secundària essent la naturalesa química dels diferents residus, més que el propi residu amino acídica el que es troba fortament conservat entre les diferents còpies repetides. Recentment s'han pogut obtenir cristalls de la  $\beta$ -catenina i s'ha resolt l'estructura d'aquesta proteïna. Això ha permès determinar que cadascun dels motius repetits es pleguen formant tres hèlices, les quals interaccionen entre elles i amb les hèlices dels motius repetits veïns, per a formar



## RESULTATS

---

una estructura de tipus superhèlix molt estable. Aquesta estructura deixa a l'exterior un solc amb càrrega negativa, el qual serveix com a domini específic d'interacció proteïna-proteïna amb afinitat per a regions acídiques d'altres proteïnes (Huber et al., 1997).

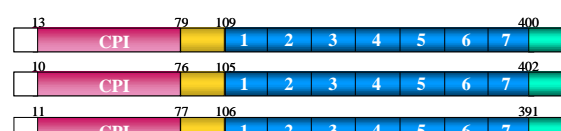
PHOR1 a l'igual que moltes de les seqüències aminoacídiques deduïdes de les ESTs d'*Arabidopsis* té només 7 motius repetits armadillo (figura 12A). L'anàlisi de l'estructura de formes truncades de la proteïna  $\beta$ -catenina han mostrat que el mínim nombre de còpies per a formar l'estructura superhèlix són 5 còpies. Per tant, es molt probable que el domini C-terminal de PHOR1 pugui adoptar una estructura superhèlix similar a la de la proteïna armadillo, i que aquest domini funcioni com a un domini d'interacció proteïna-proteïna. A la Figura 13B es mostren alineats els diferents motius repetits del domini armadillo de PHOR1 amb els motius repetits 2on a 8è de la proteïna  $\beta$ -catenina de *Drosophila*. S'observa que les diferents còpies repetides del domini armadillo de PHOR1 conserven el consens descrit per aquest motiu proteic. Tot i que el nombre de variacions entre ambdues seqüències proteiques es elevat, la naturalesa química dels diferents residus es troba conservada en tots els motius repetits, especialment en aquells residus importants per a mantenir l'estructura secundària del domini. A la Figura 13C es mostra l'estructura secundària predita per al motiu repetit 6 de la proteïna PHOR1. Es pot apreciar que els residus hidrofòbics conservats participen en l'interacció de les hèlices 2 i 3. Aquesta estructura s'obtení a partir del motiu repetit 7 de la  $\beta$ -catenina, en la que es canviaren els amino àcids d'aquest repeat per els residus respectius presents en el motiu 6 de PHOR1. S'observa que cap dels nous residus determina un canvi notable en l'estructura del motiu repetit (veure figura 13C), el que suggereix que els dominis armadillo de les dues proteïnes adopten una estructura secundària molt similar.

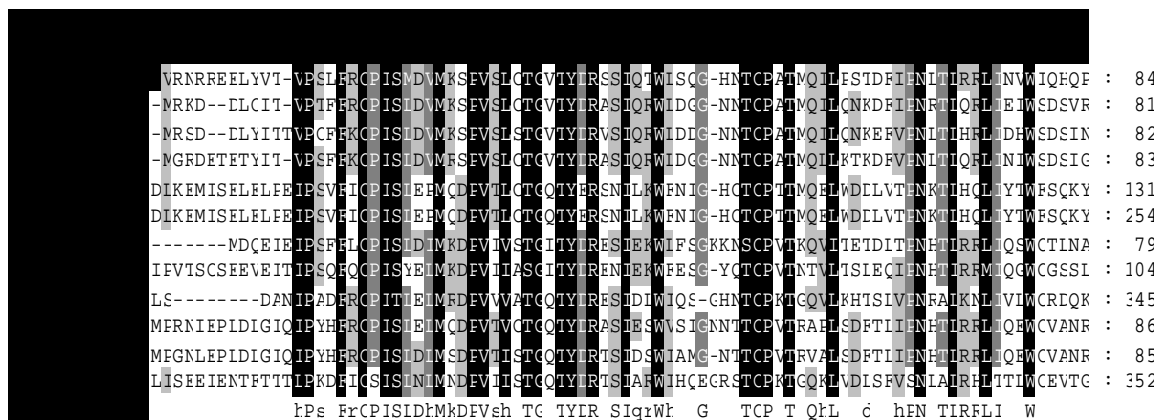
### A)

**PHOR1**

**AB010076 (*A. thaliana*)**

**AL353994 (*A. thaliana*)**





C)



Figura 12. Dominis CPI i armadillo de PHOR1.

A) Representació esquemàtica de la proteïna PHOR1 de patata, ARC1 de *Brassica napus*, i les proteïnes deduïdes de les seqüències EST d'*Arabidopsis*. Tot aquest grup de proteïnes presenten molt conservats el domini CPI (marcat de color vermell) i el domini armadillo (marcat de color blau; es mostra el nombre de motius repetits en aquest domini). Els números indiquen la posició dels dominis conservats en la seqüència aminoacídica.

B) Aliniament de les seqüències aminoacídiques del domini CPI de la proteïna PHOR1 amb el domini CPI de la proteïna ARC1 de *Brassica napus* (número d'accés AF024625) i els dominis deduïts a partir de les seqüències EST d'*Arabidopsis* amb un major percentatge d'identitat (el números d'accés de les ESTs es mostren davant de les seqüències aminoacídiques). El motiu conservat format pels aminoàcids Cys-

## RESULTATS

---

Pro-Ile es mostra enquadrat en vermell. A la part de baix de les seqüències s'indica el consens trovat per aquest motius.

C) Aliniament de la seqüència amino acídica del domini CPI de PHOR1, ARC1 de *B. napus* i els dominis deduïts a partir dos de les seqüències EST d'*Arabidopsis*, amb la regió U-box (UFD2-homology domain) conservada de les proteïnes HSP70-interacting protein CHIP humana (número d'accés NM005861); UFD-2 de *S. cerevisiae* (número d'accés U22154) i NOSA de *D. discoideum* (número d'accés AF044255).

Els residus idèntics estan indicats amb color negre i els residus conservats amb gris. Els números a l'inici i final de les seqüències indiquen la posició d'aquestes regions conservades a les seqüències amino acídiques originals.