



Universitat de Girona

**ESTUDI D'UN RECEPTOR QUINASA ATÍPIC
(MARK) I DE LES PROTEÏNES QUE
INTERACCIONEN AMB EL SEU DOMINI
INTRACEL·LULAR. TRANSDUCCIÓ DEL
SENYAL I DESENVOLUPAMENT DEL SENYAL
EN BLAT DE MORO (Zea mays)**

Blanca LLOMPART ROYO

ISBN: 978-84-690-5948-7

Dipòsit legal: GI-325-2007



Universitat de Girona

Facultat de Ciències

Departament de Biologia

**ESTUDI D'UN RECEPTOR QUINASA ATÍPIC (MARK) I DE
LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB EL SEU
DOMINI INTRACEL·LULAR. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL
I DESENVOLUPAMENT EN BLAT DE MORO (*Zea mays*).**

Blanca Llompart i Royo

Barcelona, Febrer de 2002

ABSTRACT

In our laboratory we are interested in the study of genes that are expressed in earliest period of maize embryogenesis. In order to look for genes expressed in this morphogenetic period, we realized a differential screening with adult plant tissue and embryo tissue. From this screening we obtained a partial clone that codify to a receptor kinase. We have named this receptor MARK (from Maize Atypical Receptor Kinase). MARK presents a putative extracellular domain with 6 imperfect leucine-rich repeats (LRR), a region presenting all the characteristics of a transmembrane domain and an intracellular kinase domain. Although the intracellular domain of MARK contain the 11 conserved subdomains of protein kinases, it presents substitutions of some of the aminoacids that are highly conserved among kinases. Probably because of that, MARK is not able to phosphorylate. Yeast two-hybrid screenings performed with the intracellular domain of MARK allowed us to clone different putatives proteins that interacting with MARK. Among them, the most interesting is a kinase related to the GCK subfamily of MAPKinases that we have named MIK (MARK Interacting Kinase). Some GCK proteins have been shown to connect cell-surface receptors to intracellular MAPKinase signalling cascades. *MARK* and *MIK* are expressed in the early embryogenesis with a pick at 15 DAP embryos. Proteins MARK and MIK are accumulated also in embryogenesis at 15 and 20 DAP embryos and by immunolocalization we could detected both proteins in meristematic zones and provasculars tissues.

The direct interaction of a GCK-like kinase with the intracellular domain of a kinase-impaired receptor suggests a new mechanism by which these atypical RPK could participate in signal transduction mechanisms.





Universitat de Girona

Facultat de Ciències

Departament de Biologia

**ESTUDI D'UN RECEPTOR QUINASA ATÍPIC (MARK) I DE
LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB EL SEU
DOMINI INTRACEL·LULAR. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL
I DESENVOLUPAMENT EN BLAT DE MORO (*Zea mays*).**

Memòria presentada per BLANCA LLOMPART I ROYO, inscrita en el programa de doctorat del Departament de Biologia de la Universitat de Girona en el bienni 1996-1998, per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat de Girona.

El present treball s'ha realitzat a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona del Consell Superior d'Investigacions Científiques, sota la direcció dels Drs. JOSEP M^a CASACUBERTA i PERE PUIGDOMÈNECH, i la tutoria de la Dra. M^a LLUISA MOLINAS.

Vist i plau de,

Directors de Tesi

Tutora

Autora

Dr. Josep M^a Casacuberta

Dr. Pere Puigdomènech

Dra. M^a Lluïsa Molinas

Blanca Llompart





CONSELL SUPERIOR D'INVESTIGACIONS CIENTÍFIQUES
Institut de Biologia Molecular de Barcelona
Departament de Genètica Molecular

**ESTUDI D'UN RECEPTOR QUINASA ATÍPIC (MARK) I DE
LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB EL SEU
DOMINI INTRACEL.LULAR. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL
I DESENVOLUPAMENT EN BLAT DE MORO (*Zea mays*).**

Blanca Llompart i Royo

Barcelona, Febrer de 2002



Agraïments

M'agradaria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que m'han ajudat a realitzar aquesta memòria durant aquests quatre anys tant en el treball científic com a nivell personal.

En primer lloc a en Pep, el Dr. Josep M^a Casacuberta, per haver dirigit aquest treball d'una manera immillorable. Per tot el que he après al seu costat, però també per les xerrades de música, els consells de restaurants barcelonins, els sopars, l'amistat, els "marujeos"..., merci per tot Pep.

M'agradaria donar les gràcies al Dr. Pere Puigdomènech per la co-direcció d'aquest treball i per donar-me la oportunitat de realitzar una tesi en l'embriogènesi del blat de moro. Gràcies per la confiança.

A la Dra. M^a Lluïsa Molinas, qui em va permetre començar els meus primers experiments a casa, a Girona. Si aquesta experiència no hagués sigut més que satisfactòria no estaríem aquí. I aquest bon començament va ser així bàsicament per tenir al costat a la Dra. Maria Pla. Els agraïments a la Maria són dobles, pels primers westerns i pel contacte amb en Pep al CSIC.

Als verds, amb qui he passat moments inoblidables tant al laboratori com a la Noguera Pallaresa... Per un ambient de laboratori que feia passar les hores volant i per un companyerisme únic.

A la Míriam per tots els resultats científics que hem discutit al llarg de les nostres tesis i les nostres aspiracions que ens han portat a fer "planings" de futur. Per les innumerables xerrades sobre tot, tot i més. Moltes gràcies per la teva gran amistat.

A en Thierry, el gavatxo, per ser únic. Per estar sempre a punt per escoltar, anar al cine, per anar al Camp Nou, parlar del Tour, anar a la tercera..., i sobretot, per riure de qualsevol cosa. Tots els que em tingut la sort d'estar al seu costat el trobem a faltar.

A en Torben, perquè no té mai un no per ningú, per l'ajuda informàtica en el meu primer poster i pel seu humor no gens alemany.

A l'Ignacio, donar-li les gràcies per ser tant permissiu amb la música, que jo crec que en fons no li desagradava tant; be, no n'estic segura. A! i per molts anys!

Al Néstor, que va ser una mica verd i que ara és del tot gris. Per la seva amabilitat, amistança, simpatia, naturalitat (de Huesca, es clar!) i joventut!!!! Estic segura que t'anirà tot molt i molt be. I a veure si un dia anem de marxa!

Al Bosqui, un negre exiliat al verd, pels consells cinematogràfics, pels sopars i per les farres, gràcies per ser un bon amic. Espero que tot et vagi súper be!

A la Lluïsa, no només per ensenyar-me el doble-híbrid, els pull-downs i les immunoprecipitacions sinó sobretot per la seva simpatia i bon humor diaris.

A l'Adolfo, de qui vaig adoptar la quinasa. Merci pels consells, per les 2 D i et desitjo el millor.

A l'Alejandro, desitjar-li molta sort amb la MIK.

Als taronges, amb qui vaig passar el meu primer any al CSIC. Quins records...

A l'Elena, la casacube, perquè amb ella em vaig iniciar en el cinema de Bcn i a conèixer el barri, el Verdi, la plaça del Sol, la Singular, la Ceba... i gràcies per les festes retro i les guerres de retoladors!!!! Perquè ho repetim d'aquí a dos dies, vale?

A l'Amparo, per la seva paciència amb els novatos i per estar sempre allà. Gràcies per ensenyar-me on era tot, com funcionava tot i gràcies per l'amistança.

A en Xavi, un pare culé a Alemanya, espero que tot et vagi molt be.

Al Carles, el ciclista i submarinista, per la simpatia.

A lab vermell, per ser el laboratori que manté el nivell d'aperitiu del departament.

A la Teresa, perquè hem compartit moltes coses, l'inici de la tesi, un dia inoblidable i ara el final de la tesi. No canviïs mai.

A la Lola, pels consells, la confiança i futur.

A la Marga perquè una xerrada amb ella et fa sentir be.

A la Carme, perquè tothom sap que sense ella el departament no seria així.

A en Pau pel seu bon rotllo i les seves bromes!

Al Jaume, gràcies pel teu bon humor i pels ànims en l'últim western!

A la Mònica, per les hores de confocal i per la teva simpatia.

A la Mercè de seqüència, gràcies per la paciència i la feina i per les xerrades de viatges.

Al Fathy, gràcies per la teva simpatia, alegria i bon rotllo, tot i que les coses no sempre són com un voldria.

A la Mina, per la seva sinceritat.

A la Maite per fer molt més fàcil la feina.

A la Marta (blava) per les xerrades de passadís.

A la Sabine, a la Salo, a l'Eli, a la Imma, a la Laura, a la Mar, a la Maria, el Juanma... per la simpatia.

També vull donar les gràcies a tota la colla de Girona, a tots els amics i amigues amb els que he passat uns súper caps de setmana. A en Pitu i l'Eli, en David i la Clara, en Toti i l'Eva (i el petit), en Pau i la Marta, l'Alfons, la Nuri i la Clara, a en Franki i la Marta...

A les meves amigues de tota la vida, la Roser, la Susanna, la Nuri i la Maria, pels sopars de nenes!!!

A en Gori, en Kiko, l'Albert, l'Andreu...

Als pares, perquè res no seria igual sense el seu suport, la seva confiança i per donar-me sempre el millor. Al iaio, pel seu bon humor. A en Xevi, la Susanna i l'Anna i a en Jordi i la Sílvia, que sigueu molt feliços!!!!

A la família Cristina, merci pel suport incondicional, pels ànims i la confiança.

A en Xevi, gràcies per tot, perquè sense tu res d'això tindria sentit. Pel futur.

Als pares

A en Xevi

Abreviatures

<i>Ac</i>	Activator
BrEt	Bromur d'etidi
cDNA	DNA còpia
cpm	comptes radioactives per minut
CRIB	Cdc42/Rac-interactive binding
DNAsa	desoxirribonecleasa
EDTA	àcid etilen-diaminotetraacètic
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EST	seqüències parcials codificants
EtOH	etanol
FYVE	Fab1, YGLO23, VPS27, EEA1
GCG	genetics computer group
Grb2	Growth factor receptor-binding protein 2
GST	Gluthatione-S-Transferase
IPTG	isopropil-b-D-tiogalactopiranòsid
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
Lr10	Leaf Rust 10
Mes	àcid 2-N-morfolino-etanosulfònic
o.n.	tota la nit
pb	parells de base
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PKB	Protein Kinase B
PLC γ	Phospholipase C-gamma1
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNAsa	ribonucleasa
RPS2	Resistance Pseudomonas syringae
SD	Synthetic Dropout
SH2	Scr Homology 2
SH3	Scr Homology 3
Shp2	Scr homology-2 PTPase
SMART	Simple Modular Architecture Research Toll.
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF/SAMDS	Transforming Growth Factor/Mother Against Decapentaplegic Homology
TRAF	Factor receptor-associated factors
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometà
WW	Triptona-Triptona
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indotil-b-D-galactopiranòsid



Índex temàtic

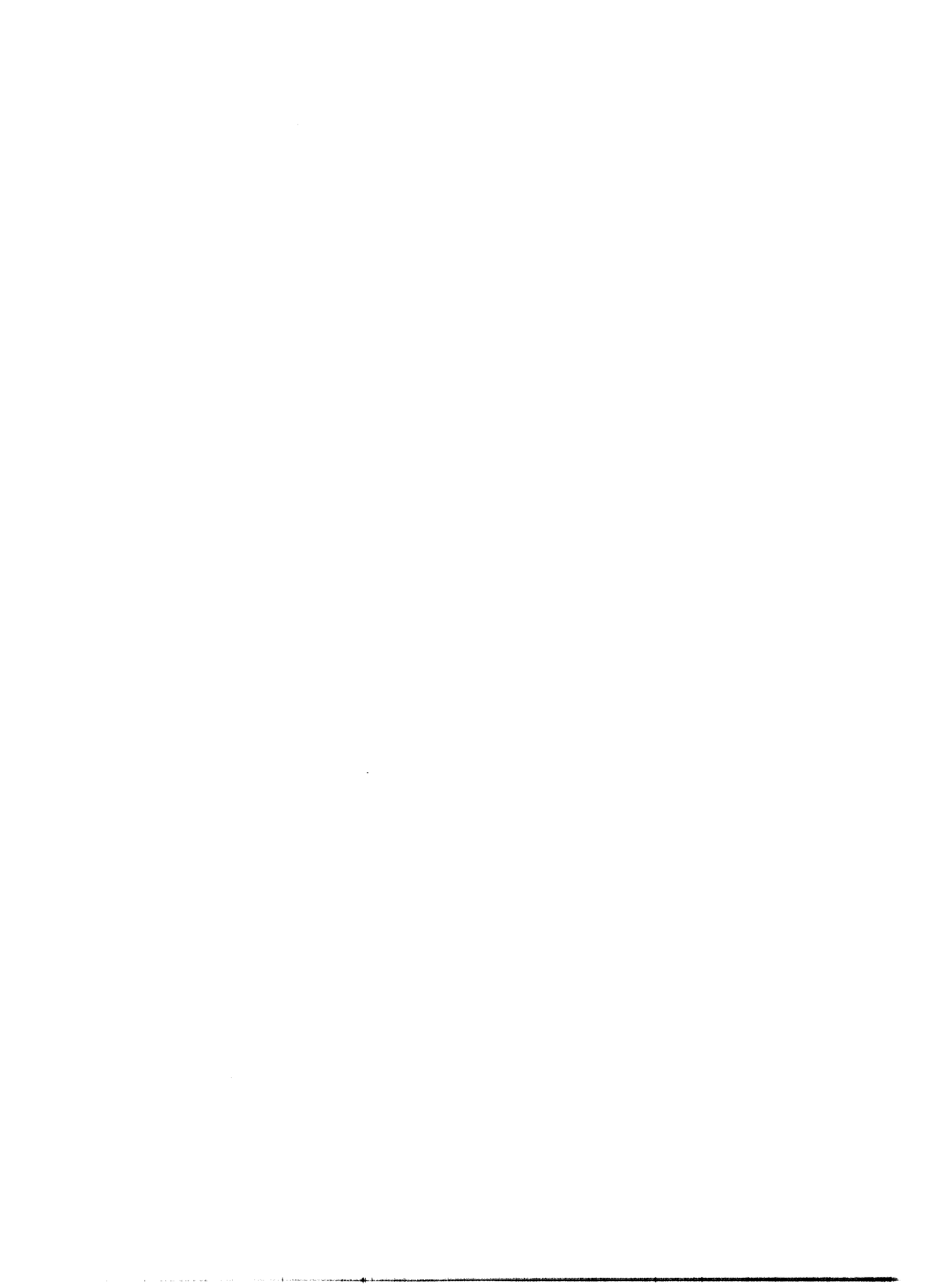
Introducció	1
1. La senyalització cel.lular i els receptors quinasa en animals	1
1.1 Principis generals de la senyalització cel.lular en sistemes animals.	
Tipus de receptors de membrana	1
1.2 El mecanisme d'acció dels receptors quinasa	3
1.2.1 Mecanisme d'acció de receptors atípics	7
1.3 La transducció del senyal, la via de les MAPKs	10
1.3.1 El grup de quinases Ste20 com a reguladors de la cascada MAPK ...	13
1.3.2 Mecanisme d'acció de les proteïnes GCK de mamífer	15
2. Senyalització cel.lular en plantes	18
2.1 Proteïnes quinasa amb dominis similars a receptors (RLK)	18
2.2 Diversitat de RLKs d' <i>Arabidopsis</i> : comparació entre genomes seqüenciats ...	23
2.3 La funció dels RLKs en plantes	26
2.3.1 La percepció i senyalització hormonal dels Brassinosteroids	27
2.3.2 Sistema d'auto-incompatibilitat a <i>Brassica</i>	29
2.3.3 Els RLKs en la resposta a patògens	32
2.4 La transducció intracel.lular. MAPK en plantes	35
3. Processos de desenvolupament en plantes	40
3.1 L'embriogènesi	40
3.1.1 L'embriogènesi en la planta model dicotiledònia	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.1.2 L'embriogènesi del blat de moro	46
3.2 Els meristems	50
3.2.1 El meristem apical	51
3.2.2 Control del meristem apical. La via de transducció de CLAVATA..	53

Objectius	63
Resultats	69
1. Crivellat de doble-híbrid i anàlisi dels clons obtinguts	69
1.1 Tècnica del doble-híbrid.....	69
1.2 Crivellat d'una llibreria de doble híbrid de cDNA d'embrions de 7 DAP amb la proteïna MARK-KD	71
1.3 Anàlisi de seqüència dels clons de doble-híbrid obtinguts	72
1.4 Anàlisi dels clons obtinguts pel sistema MATCHMACKER 3	80
1.5 Estudi <i>in vitro</i> per <i>pull-down</i> de les interaccions MARK-KD i els clons obtinguts del crivellat	83
2. Caracterització de la proteïna MIK	85
2.1 Anàlisi de seqüència dels clons DH5 i DH58	85
2.2 Anàlisi de la interacció MARK-KD i DH5	86
2.2.1 Interacció de DH5 amb diferents proteïna control en llevat	86
2.2.2 Estudis d'interacció entre MARK-KD i DH5 <i>in vitro</i>	87
2.2.3 Anàlisi de la interacció MARK-KD i DH5 per co-immunoprecipitació.....	90
2.2.4 Co-localització de MARK i MIK en un gradient de sacarosa.....	92
2.3 Anàlisi de la seqüència del gen <i>MIK</i>	94
2.4 Estudi de la proteïna MIK	97
2.5 Anàlisi southern de <i>MIK</i>	102
2.6 Patró d'expressió de <i>MARK</i> i <i>MIK</i> durant l'embriogènesi.....	103
2.7 Patró d'acumulació de les proteïnes MARK i MIK durant l'embriogènesi..	104
2.7.1 Obtenció d'un anticòs policlonal contra la proteïna MIK.....	104
2.7.2 L'acumulació de les proteïnes MARK i MIK coincideix en el temps durant l'embriogènesi	105
2.7.3 Immunolocalitzacions de les proteïnes MARK i MIK en embrions de blat de moro de 15 DAP	107

Discussió	115
1. Possible interacció de MARK amb una proteïna γ -adaptina	116
2. MARK interacciona amb MIK, una MAPK relacionada amb la subfamília GCK-III.....	119
3. La diversitat funcional de les proteïnes GCK-III i el possible paper de la proteïna MIK.....	122
4. Activació de les proteïnes GCK-III. Model d'interacció MARK-MIK.....	127
Conclusions	135
Material i mètodes	139
1. Anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna	139
1.1 La tècnica del doble-híbrid	139
1.1.1 Transformació de llevats	139
1.1.2 Cotransformació seqüencial de llevats a gran escala	140
1.1.3 Selecció per histidina i assaig β -galactosidasa.....	141
1.1.4 Anàlisi de fusió (matings)	142
1.1.5 Reacció de PCR sobre colònies de llevat	142
1.2 Anàlisi d'interaccions	143
1.2.1 Mètode de pull-down	143
1.2.1.1 Inducció i purificació de proteïnes GST	143
1.2.1.2 Pull-down.....	144
1.2.2 Immunoprecipitació	145
1.3 Gradient de sacarosa	147
2. Anàlisi d'àcids nucleics	148

2.1	Obtenció de DNA plasmídic	148
2.2	Preparacions de DNA a gran escala (midipreparacions de DNA)	148
2.3	Extracció de DNA genòmic.....	148
2.3.1	Southern genòmic	150
2.4	Extracció de RNA	151
2.4.1	Northern blot.....	152
2.5	Preparació d'una transferència capil.lar en líquid i en sec	153
2.6	Hibridació d'àcids nucleics	155
2.6.1	Marcatge d'àcids nucleics	155
2.6.2	Hibridació i rentats	156
2.6.3	Deshibridació de les membranes	157
2.7	Clonatge	157
2.7.1	Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa.....	157
2.7.2	Lligació.....	158
2.7.3	Transformació en cèl.lules d' <i>E.coli</i> per xoc tèrmic.....	158
2.7.4	Reacció de PCR.....	159
2.8	Crivellat d'una llibreria de DNA genòmic.....	160
2.9	RACE	160
3.	Anàlisi de proteïnes	162
3.1	Extracció de proteïnes totals.....	162
3.2	Electroforesis de proteïnes	163
3.3	Western blot.....	164
3.4	Expressió proteica. Sistema pET28.....	165
3.4.1	Expressió i inducció de proteïnes recombinants en el sistema pET28. Assaig de solubilitat.....	166
3.4.2	Obtenció de proteïna recombinant a gran escala	166
3.4.3	Purificació mitjançant columna d'afinitat His-tag	167
3.5	Obtenció d'anticossos	167
3.6	Immunolocalització.....	167
3.6.1	Fixació del material vegetal	168

3.6.2 Inclusió en parafina.....	168
3.6.3 Preparació dels blocs de parafina.....	169
3.6.4 Preparació dels portaobjectes.....	169
3.6.5 Preparació de les seccions.....	170
3.6.6 Immunolocalització en talls de parafina per fluoròfors	170
3.7 Material biològic.....	171
3.7.1 Esterilització de les llavors de blat de moro	171
3.7.2 Germinació.....	172
4. Apèndix	173
Bibliografia.....	177



1. Introducció



1. La senyalització cel.lular i els receptors quinasa en animals.

Totes les cèl.lules eucariotes reben constantment conjunts de senyals externs que afecten el seu metabolisme, el seu estadi proliferatiu i el seu destí cel.lular. Els senyals intercel.lulars han de permetre a cada cèl.lula determinar la seva posició i el seu paper específic en cada moment. Si bé un organisme unicel.lular està exposat a molts senyals diferents, en els organismes multicel.lulars és, a més, necessari el desenvolupament de mecanismes de senyalització per comunicar i coordinar el comportament de les diferents cèl.lules pel benefici de l'organisme.

1.1 Principis generals de la senyalització cel.lular en sistemes animals. Tipus de receptors de membrana.

Les cèl.lules dels animals superiors es comuniquen mitjançant molts tipus diferents de molècules de senyalització com ara proteïnes, petits pèptids, aminoàcids, nucleòtids, esteroides, derivats d'àcids grassos i, fins i tot, gasos com l'òxid nítric o el monòxid de carboni. Aquests senyals poden trobar-se solubilitzats, units a la matriu extracel.lular o units a la superfície de la cèl.lula veïna (Alberts *et al.*, 1994).

La comunicació intercel.lular té lloc per la percepció del senyal mitjançant un receptor de la cèl.lula diana. Cada cèl.lula està programada per respondre a una combinació específica de molècules senyal. D'aquesta manera, la cèl.lula respon selectivament als diferents tipus de senyals que rep del seu entorn segons l'especialització que ha patit durant el desenvolupament (Alberts *et al.*, 1994). La reacció cel.lular davant un entorn determinat depèn tant del conjunt de receptors que expressa la cèl.lula en aquell moment, com de la maquinària intracel.lular de la que disposa amb la qual la cèl.lula integra i interpreta la informació que rep. Així doncs, una molècula senyalitzadora sovint té diferents efectes en les cèl.lules diana (figura 1.1).

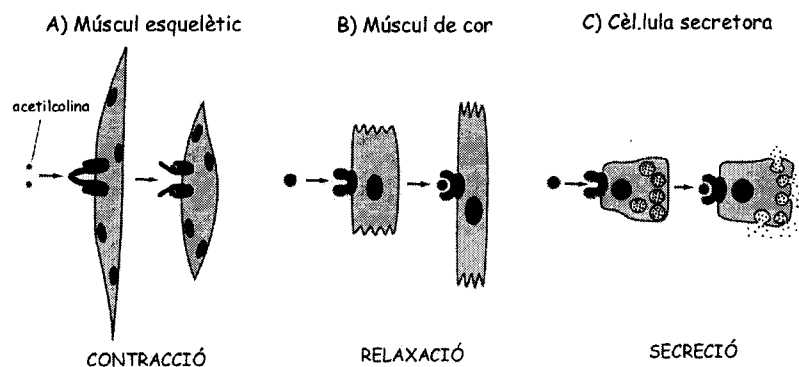


Figura 1.1. Efecte d'un mateix senyal en tres tipus cel·lulars diferents. L'acetilcolina sobre cèl·lules diana del múscul esquelètic provoca la contracció muscular, mentre que si és reconeguda per receptors de cèl·lules del múscul de cor, provoca l'efecte contrari. D'altra banda, aquest mateix receptor en cèl·lules secretores indueix un efecte secretor. Adaptat d'Alberts et al., (1994).

A excepció dels receptors intracel·lulars de senyals solubles, com per exemple les hormones esteroides i tiroides, els receptors són proteïnes de membrana. S'han descrit tres classes de receptors de membrana:

- Receptors lligats a un canal iònic: responsables de senyalitzacions ràpides sinàptiques entre cèl·lules excitablement elèctricament.
- Receptors units a una proteïna G: actuen indirectament regulant l'activitat de diferents proteïnes dianaes que poden ser enzims o canals iònics mitjançant una proteïna G. Aquest tipus de receptors formen la família més gran de receptors de membrana.
- Receptors units a enzim: activen directament el seu domini catalític quan reben un senyal.

S'han descrit cinc classes de receptors units a enzims:

- receptors guanilil-ciclasas: generen directament GMP cíclic.
- receptors tirosina fosfatases: eliminen el fosfat de fosfotirosines de proteïnes específiques.
- receptors transmembrana serina/treonina quinasa: afegeixen un grup fosfat a una serina i/o treonina de proteïnes diana.

- receptors tirosina quinasa: afegeixen un grup fosfat a una tirosina de proteïnes diana.
- receptors associats a tirosina quinases: s'associen amb proteïnes que presenten activitat tirosina quinasa.

Aquests dos últims grups són els receptors units a enzim més nombrosos en sistemes animals i on s'ha estudiat més detalladament el mecanisme d'acció mitjançant el qual transdueixen el senyal a l'interior de la cèl.lula.

1.2 El mecanisme d'acció dels receptors quinasa.

Els receptors tirosina quinasa (RTK) tenen un paper molt important en el control de processos cel.lulars fonamentals com el cycle cel.lular, la migració, el metabolisme, la proliferació i la diferenciació (Schlessinger, 2000). Catalitzen la transferència d'un fosfat γ de l'ATP a grups hidroxils de tirosines de proteïnes diana (Hunter, 1998). L'estructura dels RTK consisteix en un domini intracel.lular tirosina quinasa, un únic domini transmembrana i una regió extracel.lular que generalment està glicosilada i presenta varis dominis segons les característiques estructurals dels quals es classifiquen en diferents famílies (figura 1.2).

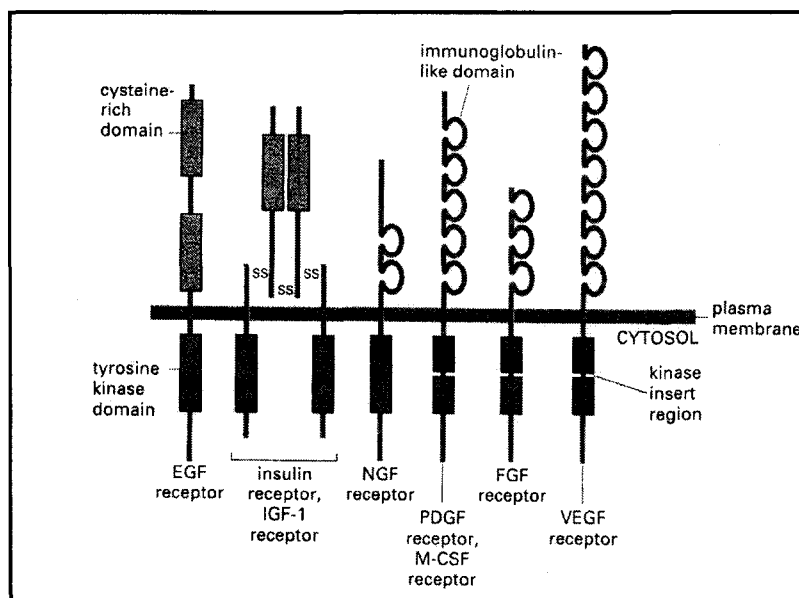


Figura 1.2. Família de receptors RTK de mamífers.

D'Alberts et al., (1994).

S'ha establert un mecanisme general per a l'activació dels receptors tirosina quinasa on la unió d'un lligand específic provoca la dimerització del receptor (van der Geer *et al.*, 1994). Aquesta dimerització dona lloc a l'autofosforilació del receptor, que normalment té lloc per un mecanisme intermolecular (Ullrich *et al.*, 1990; Schlessinger, 1997).

Tot i que tots els RTK són activats per dimerització, diferents lligands utilitzen diferents estratègies per induir la dimerització del receptor. Molts lligands són molècules dimèriques que contenen dos epítops idèntics d'unió a receptor com per exemple el factor de creixement de plaquetes (PDGF) que és un dímer unit per ponts disulfur o el factor de cèl.lules mare (SCF; *stem cell factor*) que forma un dímer per unions no covalents (Heldin, 1995). D'altres, com la hormona de creixement (GH) o la eritropoietina (EPO) són citoquines bivalents i uneixen simultàniament dues molècules de receptors (Kossiakoff *et al.*, 1998). Una altra estratègia més complexa és la utilitzada per la família de factors de creixement fibroblàstics (FGF) formada per 21 factors de creixement (Marski *et al.*, 1998) on l'activació del receptor FGFR requereix la cooperació d'una molècula accessòria de proteoglican sulfat heparina (HSPG) (Yayon *et al.*, 1991).

La dimerització pot tenir lloc entre dos receptors idèntics (homodimerització) o entre diferents receptors de la mateixa família (heterodimerització). Sembla ser que la dimerització per si sola és capaç d'activar la majoria de receptors. Així, mutacions en els receptors del EGF o de la EPO que estableixen la forma dimèrica del receptor en absència de lligand presenten una activitat constitutiva (Heldin, 1995).

La dimerització ve seguida de l'autofosforilació dels receptors on una molècula de receptor fosforila l'altra (Ullrich *et al.*, 1990). No es coneix, pel moment, com s'inicia l'autofosforilació. Una hipòtesi seria que el receptor monomèric tingués una activitat quinasa basal suficient per fosforilar i activar el receptor del dímer que, seguidament, podria fosforilar de manera recíproca. Una altra alternativa podria ser que la interacció dels dominis catalítics intracel.lulars induís un canvi conformacional que permetés un increment de l'activitat quinasa (Heldin, 1995).

L'autofosforilació té lloc en dues classes principals de residus de tirosina: residus tirosina conservats del domini quinasa i seqüències reguladores susceptibles d'autofosforilació. La

fosforilació d'aquestes regions no catalítiques té una funció important com a lloc d'unió de molècules per la transducció del senyal que contenen dominis SH2 (Src-homology 2) o dominis PTB (*phosphotyrosine binding*). Per exemple, el receptor PDGF β (figura 1.3) presenta nou llocs d'autofosforilació en el domini intracel.lular, un d'ells és important per l'activitat catalítica, mentre que la resta són capaços d'interaccionar amb, com a mínim, vuit molècules diferents implicades en la transducció del senyal (Heldin, 1995).

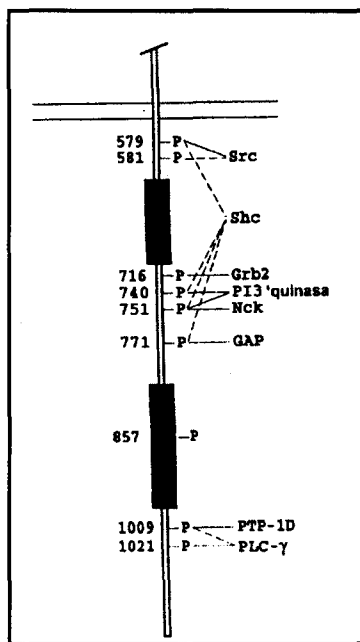


Figura 1.3. El receptor PDGF β presenta nou llocs d'autofosforilació en el domini intracel.lular. Un d'ells, la tirosina 857, localitzada en el domini quinasa, és important per l'activitat catalítica. La resta de residus fosforilats es troben en la regió no-catalítica i són capaços d'interaccionar amb, com a mínim, vuit molècules diferents implicades en la transducció del senyal. De Heldin (1995).

Les proteïnes de senyalització que contenen dominis SH2 i PTB són modulars (Kuriyan *et al.*, 1997). Moltes d'aquestes proteïnes contenen activitats enzimàtiques i motius proteics que els permeten la interacció amb altres proteïnes, fosfolípids o àcids nucleics (Schlessinger, 2000). En la figura 1.4 es representen diferents motius que participen en la senyalització cel.lular dels RTK. Els dominis SH2 i PTB ja esmentats s'uneixen de manera específica a motius pTyr, tot i que també s'han descrit alguns dominis PTB que s'uneixen a seqüències peptídiques no fosforilades (Margolis, 1999).

S'han identificat altres dominis d'interacció proteics. Els dominis SH3 i WW s'uneixen específicament a seqüències riques en prolines (Kuriyan *et al.*, 1997). Els dominis homòlegs Pleckstrin (PH) comprenen una gran família d'un centenar de dominis que

s'uneixen a molècules del tipus fosfoinositides permetent l'associació a membrana (Czech, 2000). Un altre tipus de dominis, els FYVE, formen part d'una petita família de proteïnes que s'uneixen específicament a PtdIns(3)P (Fruman *et al.*, 1999). Finalment els dominis PDZ pertanyen a una gran família de proteïnes modulares independents que s'uneixen específicament a residus hidrofòbics de la part C-terminal de proteïnes diana (Gomperts, 1996). Per altra banda, mentre que algunes proteïnes adaptadores com Grb2 o Nck només contenen dominis SH2 i SH3 mitjançant els quals interaccionen amb proteïnes involucrades en la transducció del senyal, altres proteïnes contenen activitats enzimàtiques addicionals com activitat tirosina quinasa (Src, PKB), activitat tirosina fosfatasa (Shp2), activitat fosfolipasa C (PLC γ) o activitat Ras-GAP.

Així doncs, cada RTK hauria de ser considerat no només com un receptor amb activitat quinasa sinó també com una plataforma de reconeixement i reclutament de proteïnes de senyal específiques (Pawson *et al.*, 1993).

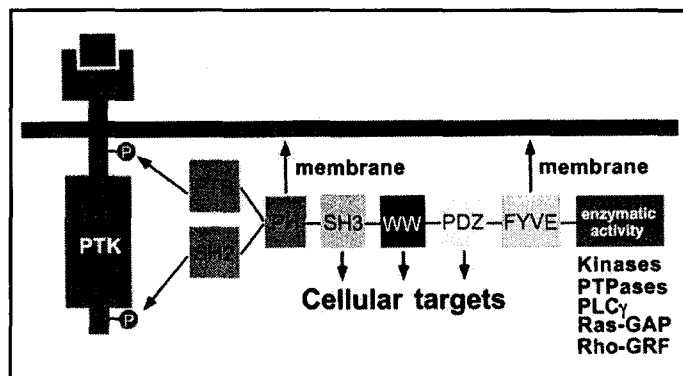


Figura 1.4. Les proteïnes modulares contenen diferents dominis d'interacció implicats en el control de les vies de senyalització intracel·lulars. De Schlessinger (2000).

La dimerització no és un mecanisme exclusiu dels RTK, també es dona en els receptors serina/treonina quinasa. En mamífers només s'ha descrit una família de receptors serina/treonina, el receptor β del factor de creixement transformant (TGFR). Hi ha dos tipus de receptors TGFR, el tipus I i el tipus II, ambdós necessaris per la senyalització (Wrana *et al.*, 1992). El receptor de tipus II forma un dímer en absència de lligand que té activitat quinasa constitutiva capaç d'unir-se al lligand TGF β . Seguidament, el TGFR de tipus I

s'uneix al complex i és fosforilat en un residu serina (figura 1.5). Aquesta fosforilació sembla ser la responsable de l'activació del receptor que activarà altres molècules de la via de transducció del senyal.

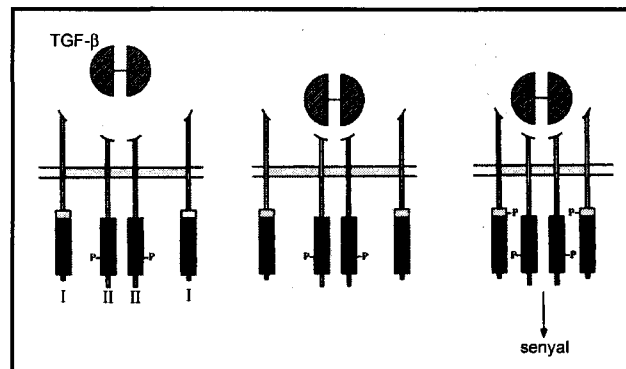


Figura 1.5. Mecanisme d'acció del receptor serina/treonina quinasa TGFR. El TGFβ s'uneix primer al dímer de receptors de tipus II amb activitat serina/treonina constitutiva. Aleshores, el receptor de tipus I s'incorpora al complex i és activat per fosforilació. Adaptat de Heldin (1995).

1.2.1 Mecanismes d'acció de receptors atípics.

Tot i que la majoria de RTK transdueixen el senyal segons el mecanisme d'acció descrit en l'apartat anterior. Aquests receptors atípics es caracteritzen per presentar un domini intracel·lular que conté els 11 subdominis típics dels dominis quinasa amb canvis en alguns aminoàcids conservats i invariables. Aquests residus es troben implicats en la unió de l'ATP, el reconeixement del substrat i la transferència dels substrat (Hubbard *et al.*, 1994). Alguns d'aquests receptors atípics són ErbB3, H-Ryk, Cck4, H-Ror o Mec (veure figura 1.6).

	III	VIIb	VII	
H-Ryk	IQVTMMLTES	IHKDLAARNC	VIDDTLQVKI	TDNALSRLD
Cck4	QQQLDFRREL	VHKDLAARNC	LVSAQRQVKV	SALGLSKDV
M-Mep1	SLKMTFLGRA	VHRALSARSV	LVNSHLVCKV	ARLGHSPQG
H-Ror1	QQWMEFQQEA	VHKDLAARNI	LIGEQLHVKI	SDLGLSREI
H-Erb3	QSFQAVTDHM	VHRNLAARNV	LLKSPSQVQV	ADFGVADLL
CONS	E	D		DFG

Figura 1.6. (pàgina anterior) Seqüències dels dominis III, VIb i VII d'alguns receptors quinasa on es poden observar canvis en residus aminoacídics essencials per l'activitat quinasa. H-Ryk: Human-receptor-like tyrosine kinase (P34925). H-Cck4: Human-Colon Carcinoma Kinase-4 (AAA87565). M-Mep1: Mouse-Murine eph-family protein (AAB51430). H-Ror1: Human-receptor tyrosine Kinase-like orphan receptor1 (XP_046818). H-ErbB3 (P21860).

Un dels casos més ben estudiats és el de la família de receptors del factor de creixement de l'epidermis (EGFR) formada per quatre membres: EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 i ErbB4. La regulació de l'activació dels receptors ErbB és molt complexa. El receptor EGFR s'uneix a una gran varietat de lligands com el EGF, el TGF α (*transforming growth factor*), l'amphiregulina (AR), l'HB-EGF (*heparina-binding EGF-like growth factor*), la betacellulina (BTC) i l'epiregulina (Higashiyama *et al.*, 1991; Marquart *et al.* 1984; Savage *et al.*, 1972; Shing *et al.*, 1993; Shoyab *et al.*, 1989; Toyoda *et al.*, 1995). Per altra banda, no s'ha identificat cap lligand pel receptor ErbB2. Els altres dos membres de la família, ErbB3 i ErbB4, s'uneixen a heregulines (HRGs) (Carraway *et al.*, 1994; Plowman *et al.*, 1993a, 1993b). Aquests polipèptids, també coneguts com neuregulines (Neu), són glicoproteïnes que contenen dominis d'immunoglobulines i EGF-like. Hi ha almenys 12 isoformes diferents de HRG que provenen de *splicing* alternatiu d'un únic gen (Holmes *et al.*, 1992; Falls *et al.*, 1993; Marchioni *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1992). El reconeixement del lligand indueix a la formació d'homodímers o heterodímers dels diferents receptors ErbBs. S'han descrit fins a deu combinacions diferents d'homo i heterodímers d'ErbBs, les quals no són igualment favorables (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996). El receptor ErbB2 s'ha proposat com la parella heterodimèrica més estable (Graus-Porta *et al.*, 1997). En experiments de co-expressió es pot veure com la baixa afinitat que presenta el receptor ErbB3 per HRG es veu incrementada quan es co-expressa amb ErbB2 (Sliwkowski *et al.*, 1994). L'existència d'aquest heterodímer és molt interessant, ja que el receptor ErbB3 presenta un domini quinasa no catalític. La manca d'activitat del domini quinasa d'ErbB3 s'ha demostrat en varis sistemes com per exemple en cèl.lules d'insecte (Guy *et al.*, 1994) i en anàlisis bioquímiques amb el domini quinasa purificat (Sierke *et al.*, 1997). L'anàlisi de la seqüència aminoacídica del domini quinasa mostra la substitució de quatre residus

aminoacídics conservats en totes les tirosines quinasa (Hanks *et al.*, 1988). En la figura 1.7 es mostra un d'aquests canvis aminoacídics.

ErbB3	MVHRNLAARN
ErbB1	LVHRDLAARN
ErbB2	LVHRDLAARN
ErbB4	LVHRDLAARN
	D
	VIb

Figura 1.7. Substitució en el subdomini VI del domini catalític d'ErbB3 de l'àcid aspàrtic essencial per l'activitat quinasa per una asparagina.

Tot i que ErbB3 no té activitat catalítica, no només participa en la transducció del senyal interaccionant amb altres membres de la seva família formant heterodímers, sinó que té una funció imprescindible. Embrions de ratolins *knock-out* per ErbB3 presenten severes neuropaties letals (Riethmacher *et al.*, 1997). Anàlisis evolutives del receptor ErbB3 mostren la conservació del seu domini quinasa defectiu, suggerint que aquest domini quinasa té una funció independent de l'activitat catalítica (Stein *et al.*, 2000). Aquesta funció podria ser la interacció amb altres membres de la família de receptors i altres proteïnes. ErbB3 presenta una cua C-terminal més llarga amb més residus tirosina susceptibles de ser fosforilats (Waterman *et al.*, 1999). S'ha pogut comprovar que aquests residus es fosforilen en l'heterodímer ErbB2-ErbB3. Per altra banda, un cop fosforilat, s'ha proposat que el domini C-terminal d'ErbB3 pot interaccionar amb altres proteïnes intracel.lulars.

Un altre exemple de receptor atípic on s'ha estudiat el mecanisme d'acció és el receptor H-Ryk. Els canvis aminoacídics més importants que conté H-Ryk són en el subdomini I i en el triplet DFG del subdomini VII (DNA en H-Ryk) on s'ha demostrat que els residus de fenilalanina i glicina d'aquest motiu DFG són essencials per l'activitat catalítica dels RTK (Katso *et al.*, 1999). Per tal d'estudiar l'efecte d'aquestes substitucions es van realitzar receptors quimèrics on el domini extracel.lular de H-Ryk era substituït pel del receptor TrkA (*Human nerve growth factor* [NGF] *receptor*) (Katso *et al.*, 1999). Aquesta aproximació permet l'anàlisi molecular de receptors de lligand desconegut. Els resultats

d'aquest estudi van mostrar com tot i ser catalíticament inactiu, l'estimulació del lligand del receptor quimèric provoca l'activació de la via MAPK. Aquests resultats impliquen que el receptor podria transduir el senyal a través de proteïnes auxiliars per mecanismes encara no caracteritzats.

1.3 La transducció del senyal, la via de les MAPKs.

Un cop el senyal s'ha unit a un receptor, cal que s'activi una via de transducció específica per tal que els gens diana que representen la resposta cel·lular al senyal extracel·lular puguin activar-se.

La via de transducció de senyal de les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) és el mecanisme més estès i conservat de la regulació cel·lular eucariota (Kyriakis *et al.*, 2001).

Totes les cèl·lules eucariotes tenen múltiples vies de MAPK que els permeten respondre a molts estímuls extracel·lulars com factors hormonals i de creixement, citoquines i estressos ambientals com el xoc osmòtic o les radiacions ionitzades a través de diversos receptors (Whitmarsh *et al.*, 1995). Una de les grans famílies de receptors que activa la via MAPK és la família Ras formada per proteïnes GTPases monomèriques ancorades a membrana, tot i que també alguns receptors quinasa són capaços d'activar MAPKs.

Totes les vies de MAPK presenten tres passos claus per a la transducció del senyal (figura 1.8). L'activació d'una proteïna MAPK per la fosforilació de residus treonina i tirosina és catalitzada per la família de proteïnes quinases MAPK kinases (MAPKK) també anomenada MAPK/ERK kinases (MEK) que, a la vegada, està regulada per una fosforilació serina/treonina catalitzada per la família de proteïnes quinases MAPK-Kinase-Kinase (MAP3Ks) (Herskowitz, 1995; Kyriakis *et al.*, 1996). Aquestes dues fosforilacions seqüencials tenen lloc en residus conservats del subdomini VIII del domini quinasa. L'elevada diversitat de proteïnes amb activitat MAP3K reflecteix la varietat d'estímuls que poden ser transduïts per aquesta via. Conseqüentment, les proteïnes MAPK tenen una gran especificitat de substrat podent regular un ampli rang de processos cel·lulars com l'organització del citoesquelet, l'homeòstasi de metabolits, el creixement cel·lular i l'apoptosi (Kyriakis *et al.*, 1996). Mentre que es coneix amb detall els components moleculars que regulen el triple mòdul de quinases, els mecanismes pels quals les proteïnes MAP3K reben la informació dels receptors són molt menys coneguts. En l'apartat 1.3.1 es

descriurà una família de proteïnes MAPKinasa identificada recentment que suposadament actua com a reguladora de la cascada MAPK.

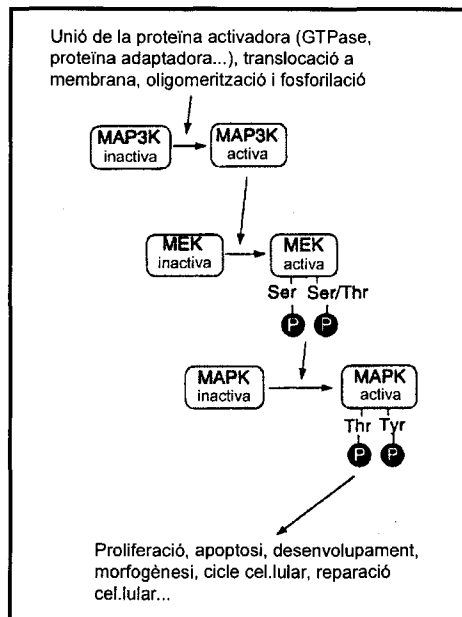


Figura 1.8. Esquema general de la via MAPK, la senyalització es dona per una fosforilació seqüencial lineal d'un mòdul triple de quinases que consisteix en MAP Kinase Kinase Kinase (MAP3K), MAP kinase Kinase (MAP2K) i MAPK. Adaptat de Kyriakis et al. (2001).

En els sistemes animals s'han definit tres famílies de MAPKs: ERKs (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNKs (*cJun NH₂-terminal kinase*) també anomenades SAPK (*Stress-activated protein kinase*) i p38 kinases (Abe et al., 1999). Les proteïnes ERKs es divideixen alhora amb 4 subfamílies de les qual ERK1 i ERK2 són les més ben caracteritzades i s'han relacionat amb processos de proliferació, diferenciació, control del cicle cel.lular i supervivència cel.lular (Ligterink i Hirt, 2001). La família SAPK/JNK pot ser activada per diferents tipus d'estrès com un xoc de calor, l'estrès hiperosmòtic i la irradiació ultravioleta. D'altra banda, les MAPK de la família p38 també s'activen per determinats estressos cel.lulars i per citoquines (Ligterink i Hirt, 2001).

El control dels diversos processos cel.lulars en resposta al conjunt d'estímuls extracel.lulars per les MAPKs implica una especificitat de l'activació de les MAPKs (Chang i Karin, 2001). En termes generals, s'han descrit alguns mecanismes bàsics per assegurar una activitat específica MAPK. Un d'aquests mecanismes es basa en l'organització dels components de la cascada MAPK gràcies a proteïnes que fan una funció de sosteniment

(*scaffold*). Un exemple d'aquest mecanisme és la proteïna JIP1 de mamífers que organitza JNK1/2, MKK7 i la MAP3K MLK1 en una estructura específica de senyalització (figura 1.9a). Un segon mecanisme es base en la interacció física entre els diferents membres de la cascada per la seva activitat. Cada interacció és inhibida per l'activació de la quinasa que es troba més avall de la via (figura 1.9b). Mentre que el primer mecanisme descrit incrementa l'especificitat a expenses de l'amplificació del senyal, la interacció seqüencial provoca una amplificació de senyal alhora que manté l'especificitat. Un tercer mecanisme més complex es basa en la capacitat de les MAPKs de regular indirectament l'expressió dels lligands i els inhibidors dels receptors de membrana (figura 1.9c).

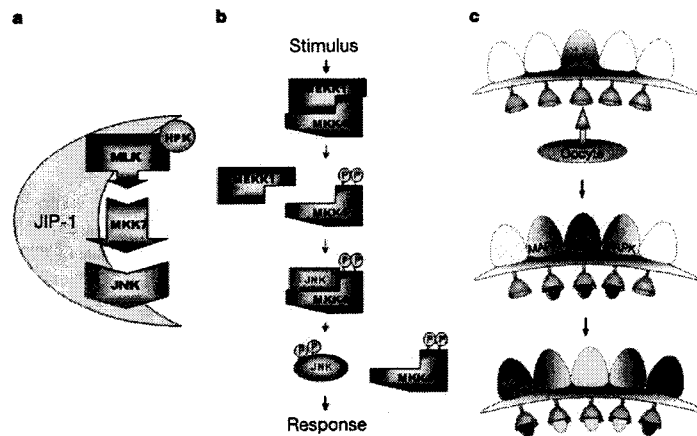


Figura 1.9. Mecanismes d'activació MAPKs. **a:** Modul de senyalització específic de JIP1. **b:** Interacció específica i seqüencial entre membres MAPKs. MEKK1 interacciona amb MKK4 inactiva formant el complex MEKK1-MKK4. MEKK1 fosforila i activa MKK4 dissociant el complex. MKK4 activa és capaç d'interaccionar amb JNK, que és activat i alliberat podent fosforilar altres efectors com a resposta de la via. **c:** Patró específic espacial d'activació MAPK dels bucles autocrins positius i negatius en oòcits de *Drosophila*. De Chang i Karin (2001).

En mamífers els components de les vies MAPK (MAP3K, MAP2K i MAPK) estan ben caracteritzats així com els diferents mecanismes d'activació (com s'ha vist en la figura 1.9). Malgrat tot, el pas de més amunt de la via, l'activació i fosforilació de MAP3K és un dels

punts menys coneguts. En el següent apartat es descriu una família de proteïnes, les Ste20, que s'han identificat en els darrers anys amb una suposada funció MAP4K.

1.3.1 El grup de quinases Ste20 com a reguladors de la cascada de MAP Kinasa.

La proteïna Ste20p fou descrita per primera vegada com una proteïna quinasa involucrada en la via de transducció de creuament cel.lular en *Saccharomyces cerevisiae* (Wu *et al.*, 1995). Aquesta via (figura 1.10) s'inicia per la unió de la feromona peptídica al seu receptor que activa una proteïna G heterotrimèrica permetent l'activació de la via de MAPK Ste11p (MAP3K), Ste7p (MAP2K) i Fus3p i Kss1p (MAPKs) (Gustin *et al.*, 1998). Recentment s'ha descrit la fosforilació directa de la MAP3K Ste11p per la proteïna Ste20p, demostrant que Ste20 actua com una MAP4K (Wu *et al.*, 1995; Drogen *et al.*, 2000).

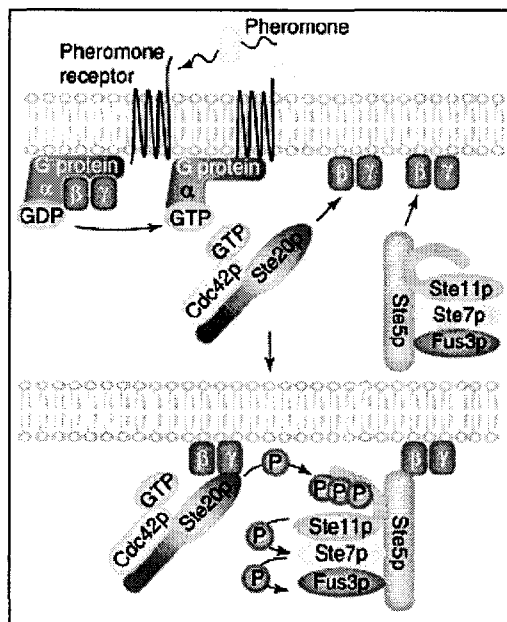


Figura 1.10. L'activitat MAP4K de la proteïna Ste20 de *S. cerevisiae*. La unió de la feromona activa el receptor trimèric de proteïna G provocant l'intercanvi de GTP i alliberant les subunitats G β i G γ . Seguidament, G β recluta la proteïna de sosteniment Ste5 i la proteïna Ste20, activada per la unió de Cdc42. Ste20 fosforila la MAP3K Ste11 que seqüencialment fosforila Ste7 i Fus3. De Dan *et al.* (2001).

En els darrers anys s'han identificat proteïnes similars a Ste20 en humans (fins a 30 proteïnes), en *Drosophila*, en *Caenorhabditis elegans* i en d'altres organismes. Les proteïnes de la família Ste20 estan formades per dues regions: un domini quinasa i un domini no catalític regulador. El domini quinasa està format pels 11 subdominis conservats

de les proteïnes quinasa (Hanks *et al.*, 1995). En el subdomini VIII les proteïnes Ste20 contenen un pèptid específic i conservat (v/iGTPyWMAPEu) que és el responsable del reconeixement del substrat. Segons la posició del domini quinasa, les proteïnes Ste20 es classifiquen en dues famílies:

- la família PAK (*p21-Activated Kinase*) que presenta el domini quinasa en la part C-terminal i conté motius CRIB en la regió reguladora.
- la família GCK (*Germinal Center Kinase*) que tenen el domini quinasa a la regió N-terminal i mostren una elevada diversitat estructural en la regió no catalítica.

Segons una anàlisi filogenètica realitzada per Dan i col.laboradors (2001), les famílies PAK i GCK es poden dividir en dos i vuit subfamílies respectivament (figura 1.11).

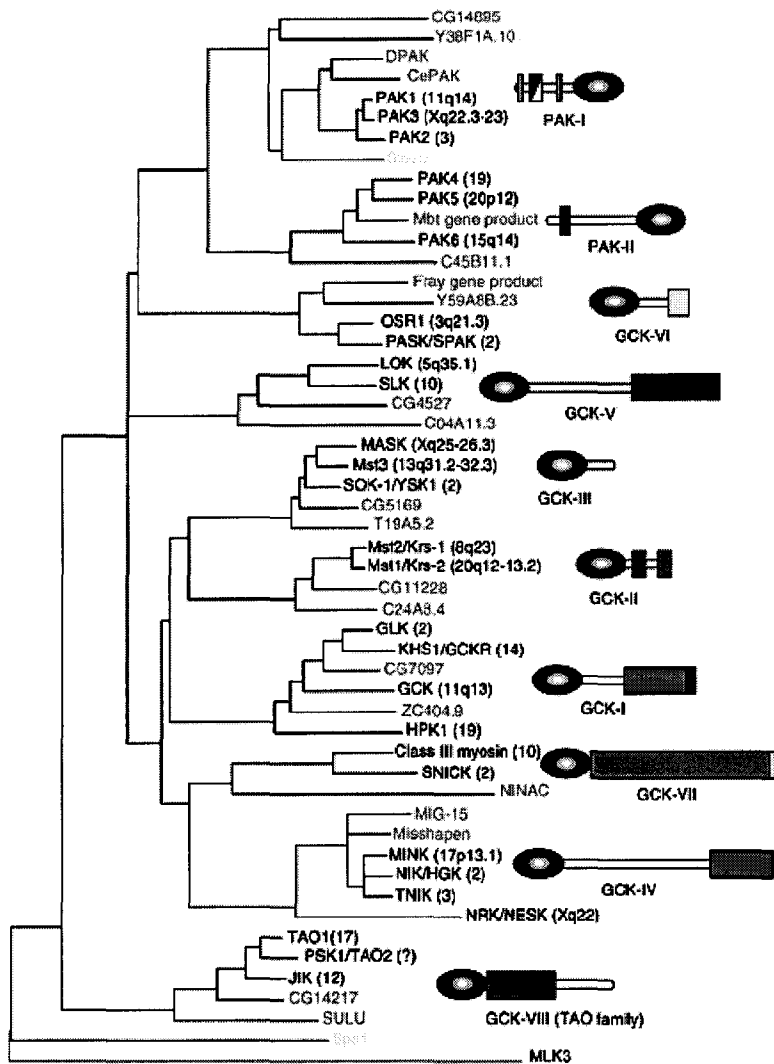


Figura 1.11. Arbre filogenètic realitzat amb els dominis quinasa de les proteïnes Ste20 de mamífers i l'esquema estructural de cada subfamília. En negra es mostren les Ste20 humanes, en vermell les de *Drosophila* i en blau les de *Caenorabditis elegans*. De Dan *et al.* (2001).

Aquesta família proteica s'ha descrit molt recentment i el mecanisme d'acció a través del qual poden activar proteïnes MAP3K roman encara molt desconegut. A continuació s'expliquen els dos models d'activació que s'han establert fins ara per proteïnes de la família GCK.

1.3.2. Mecanisme d'acció de proteïnes GCKs de mamífers.

La capacitat de fosforilar proteïnes MAP3Ks, presentant una funció MAP4K, s'ha pogut observar només en algunes proteïnes Ste20 de mamífers. En la família PAK, s'ha demostrat que la proteïna PAK2 és la responsable d'activar MAP3K Raf-1 a partir de la GTPase Ras (Sunn *et al.*, 2000). Per altra banda, s'ha proposat que la proteïna Ste20 de llevat activa el mòdul Hog1 de MAPK presumiblement per fosforilació de la MAP3K Ste11 (Raitt *et al.*, 2000). Pel que fa a les proteïnes de la família GCK s'han descrit dos possibles mecanismes d'acció, en concret amb membres de la subfamília GCK-I (figura 1.12).

Una de les vies estudiades és la de la proteïna HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase*), que pertany al grup GCK-I (figura 1.12A). L'inici de la via no es coneix, ja que no s'ha identificat el receptor que regula o interacciona amb HPK1. HPK1 fosforila les proteïnes MEKK1 (MAPK kinase kinase1) i MLK3 (*mixed-lineage kinase 3*) *in vitro* que activen la via SAPK/JNK. Tot i que el mecanisme d'activació de HPK1 no es coneix, es proposa que la seva autofosforilació indueix un canvi conformacional que provoca l'accessibilitat de HPK1 a les proteïnes MAP3K (Kiefer *et al.* 1996). L'activació de SAPK per la sobreexpressió de HPK1 és inhibida per una forma dominant negativa de MEKK1 i MLK3, mentre que una forma quinasa deficient de HPK1 no pot activar la via SAPK (Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996). Aquests fets suggereixen una via de fosforilació seqüencial HPK1-MEKK1/MLK3-MKK4-SAPK (Dan *et al.*, 2001) representada en la figura 1.12A. Aquests estudis van ser la primera evidència experimental de l'existència d'activitat MAP4K en cèl·lules de mamífer. Només hi ha una altra proteïna GCK que s'ha demostrat que fosforili MAP3K, la GLK (GCK-like) també de la subfamília I (Diener *et al.*, 1997).

Altres membres de la subfamília GCK-I transdueixen el senyal del factor de necrosis tumoral (TNF α) a la via de SAPK per un mecanisme d'acció diferent a l'anterior (figura 1.12B). El receptor TNFR α no presenta un domini catalític, sinó que la unió del lligand

provoca la homotrimerització activant el reclutament dels efectors de la via de transducció. El trimer $\text{TNFR}\alpha$ interacciona amb TRADD (*TNFR-associated death domain protein*), que a la vegada interacciona amb TRAF2 (Arch *et al.*, 1998). TRAF2 forma part de la família de proteïnes TRAF caracteritzada per un domini C-terminal conservat TRAF, unes repeticions de dits de zinc en la regió central i un domini RING a N-terminal (Kyriakis, 1999). Les proteïnes GCK i GCKR s'han descrit com a proteïnes efectores de TRAF (Pombo *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1997; Yuasa *et al.*, 1998). Aquestes proteïnes s'associen *in vivo* al domini TRAF de TRAF2, on la regió no catalítica de GCK és fonamental per aquesta unió (Yuasa *et al.*, 1998). De fet, totes les proteïnes GCK que activen la via $\text{TNFR}\alpha$ presenten motius conservats en les seves regions no catalítiques, suggerint que tots ells podrien ser dianes de proteïnes TRAF (Kyriakis, 1999).

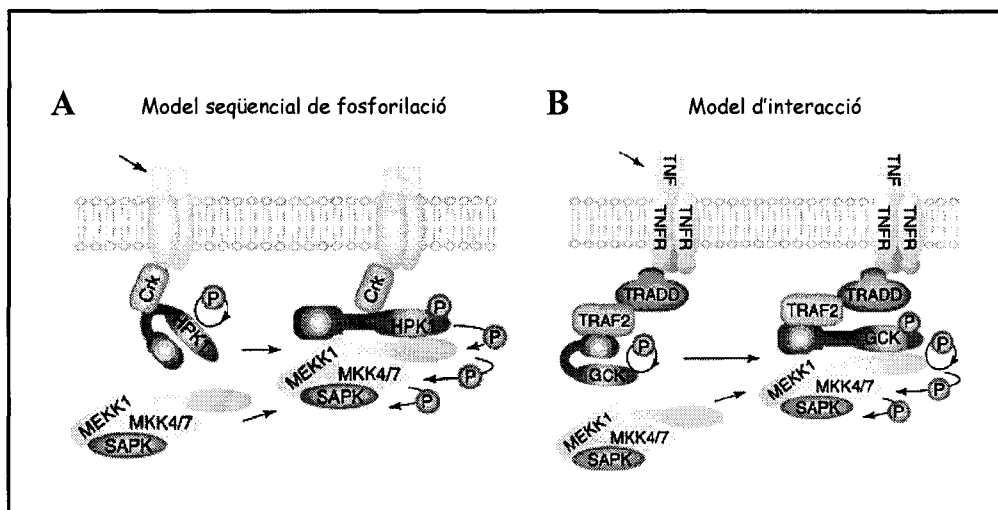


Figura 1.12. Models de transducció del senyal de proteïnes GCK-I. **A:** Mecanisme d'acció de la proteïna HPK1 que activa el seu efectors MAP3K per una fosforilació directa. **B:** Mecanisme d'acció en la via de transducció del TNFR. La proteïna GCK és reclutada per TRAF2, pateix un canvi conformational autofosforilant-se i fent-se accessible al seu efectors MAP3K, actuant d'aquesta manera com una MAP4K. Adaptat de Dan *et al.* (2001).

Sembla que l'activació de SAPK per algunes quinases GCK-I té lloc per la interacció amb proteïnes MAP3K, i no pas per la seva fosforilació. En aquest sentit, cèl·lules que sobreexpressen GCKs activen SAPK constitutivament tant si presenten o no el domini quinasa (Pombo *et al.*, 1995; Yuasa *et al.*, 1998). Aquest model d'activació de MAP3K independent del domini quinasa s'ha observat també en membres de la subfamília IV com NIK/HGK, TNIK i MINK (Dan *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1997). Una possible explicació d'aquests fets podria trobar-se en uns estudis que demostren que proteïnes MAP3K, com la MEKK1, s'activen per una autofosforilació intermolecular després de la unió amb un cofactor (Deak i Templeton, 1997). També la MAP3K MLK3 s'ativa per una autofosforilació intermolecular per la formació d'homodímers (Leung *et al.*, 1998). Això indica que els mecanismes que promouen la dimerització de proteïnes MAP3K o que estableixen les estructures de MAP3K per permetre una fosforilació intramolecular són importants per la seva activació, suggerint que les proteïnes MAP4K podrien ser responsables d'estabilitzar les estructures de MAP3K activades (Dan *et al.*, 2001). El paper del domini catalític de les proteïnes MAP4K es desconeix en molts casos, però una hipòtesi seria que la seva autofosforilació incrementés la seva afinitat per la unió amb MAP3K (Dan *et al.*, 2001). De fet, l'activació de SAPK més forta s'aconsegueix quan el domini no-catalític està lliure. Per tant, l'autofosforilació de la GCK probablement canviï la conformació intramolecular permetent que la regió no catalítica estigui més accessible a proteïnes MAP3K (Yuasa *et al.*, 1998).

2. La senyalitació cel.lular en plantes.

La naturalesa sèssil de les plantes fa que hagin d'adaptar-se a un gran nombre d'estímul externs ambientals com la temperatura, l'atac de patògens, la presència o absència de nutrients, les agressions físiques, la qualitat de la llum, la manca o excés d'aigua i la gravetat. Les plantes utilitzen una gran varietat de molècules senyal que són reconegudes per una àmplia diversitat de receptors. Els receptors serina/treonina quinasa representen la classe de receptors més nombrosa i diversificada en plantes. També s'han descrit altres tipus de receptors com per exemple els fotoreceptors, com el criptocrom (Ahmad i Cashmore, 1993) o receptors histidina quinasa relacionats amb les proteïnes quinasa de procariotes, com el receptor de la llum fitocrom i el de l'etilè (Fankhauser *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999). Altres receptors descrits en plantes són proteïnes canals de membrana com per exemple EIN2, una proteïna amb 12 dominis transmembrana similar als transportadors de metall d'animals NRAMP implicada en la via de l'etilè, l'àcid jasmònic i l'àcid absíssic (Alonso *et al.*, 1999). D'altra banda, a *Arabidopsis* també s'han identificat alguns receptors units a proteïnes G (Plakidou-Dymoc *et al.*, 1998).

En aquest treball ens centrarem amb la família de receptors serina/treonina quinasa, en la seva diversitat i les funcions en les que estan implicats.

2.1 Proteïnes quinasa amb dominis similars a receptors (RLK).

Els receptors quinasa de plantes, o RLKs (*Receptor-like Kinase*), presenten una estructura transmembrana similar a la dels RTK d'animals amb un domini extracel.lular, una única regió transmembrana i un domini citoplasmàtic quinasa. Mentre que en animals tots els receptors units a enzim són tirosina quinasa, amb l'excepció del receptor TGFR, en plantes tots els RLKs són serina/treonina quinases. Segons els dominis que presenten en la regió extracel.lular, els RLKs s'han classificat en cinc famílies (Walker, 1994) (figura 1.13).

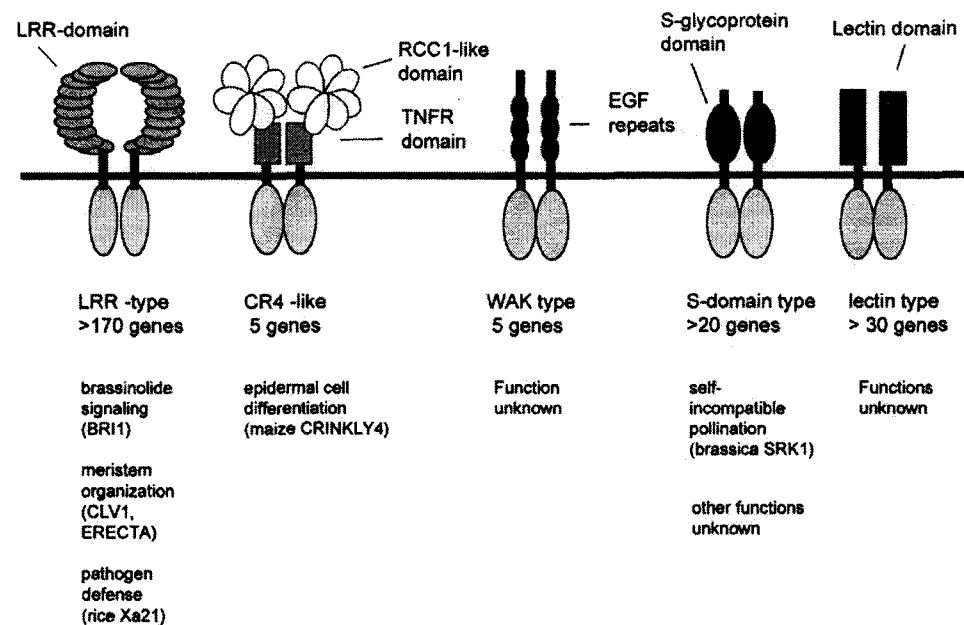


Figura 1.13. Classificació dels RLKs segons els dominis estructurals extracel·lulars. S'indica el n° de gens aproximat de cada subfamília a *Arabidopsis* així com les funcions que es coneixen d'alguns RLKs. De McCarty et al. (2000).

La classe més representada de RLKs és la que presenta en el domini extracel·lular repeticions riques en leucines (LRR, *leucine-rich repeats*), un domini típic d'interacció proteïna-proteïna. En el genoma d'*Arabidopsis* inicialment es van identificar 170 gens d'aquesta classe, com s'indica en la figura 1.13, tot i que en estudis posteriors se n'han detectat fins a 200. Algunes d'aquestes proteïnes RLKs amb funció coneguda es presentaran en més detall en apartats posteriors.

Un altre tipus de RLK són els receptors que presenten un domini extracel·lular similar a les glicoproteïnes del locus S de *Brassica*, implicades en mecanismes d'autoincompatibilitat (Nasrallah et al., 1993). Aquest mecanisme es presenta més endavant en l'apartat 2.3.1.

En la classe EGF s'hi inclouen aquells receptors que contenen en el domini extracel·lular repeticions similars a les del receptor del factor de creixement epidermal (EGFR). Aquest grup està representat per la família d'*Arabidopsis* WAKs (*wall associated serine-threonine kinases*) (He et al., 1996).

Un altre grup de RLKs es defineix per la presència d'un domini tipus TNFR-like que conté dues regions conservades: un domini ric en cisteïnes similar a la del receptor del factor de necrosis tumoral de mamífers (TNFR) i una regió que conté 7 còpies d'uns 39 aminoàcids que estan relacionats amb proteïnes GTPases RCC1 eucariòtiques (Renault *et al.*, 1998). Aquesta classe es va identificar per l'aïllament i anàlisi del gen *CRINKLY4 (CR4)* de blat de moro (Becraft *et al.*, 1996). A *Arabidopsis* hi ha almenys cinc gens relacionats de funció desconeguda.

La classe de receptors *lectin-like* està representada per receptors quinasa que contenen un domini extracel.lular similar a les lectines d'algunes lleguminoses i que podrien tenir algun paper en la transducció de senyal per oligosacàrids (Hervé *et al.*, 1996).

A *Arabidopsis* s'ha descrit un únic receptor que no presenta cap dels dominis descrits en les cinc famílies descrites. Es tracta d'un receptor del tipus PR5, PR5K (*pathogenesis-related 5 kinase*) (Wang *et al.*, 1996) que està format per un domini extracel.lular similar a les proteïnes PR5 que s'acumulen en l'espai extracel.lular en presència de microorganismes patògens. Els inductors de les proteïnes PR5 no tenen cap efecte en l'expressió de PR5K (Wang *et al.*, 1996), per tant, tot i les semblances estructurals, no està clara la relació amb proteïnes PR5.

A partir de crivellats de llibreries de diferents teixits, sota diferents estressos o entre diferents espècies, de l'anàlisi de mutants o mitjançant la tècnica de PCR s'han clonat molts RLKs en els darrers anys. Si bé els RLKs que s'han clonat a partir d'un mutant es pot hipotetitzar sobre la via on actuen, de la gran majoria de RLKs clonats no se'n coneix la funció, ni els lligands, ni els efectors. En la taula 1.1 es mostren els RLKs clonats fins al moment en les diferents espècies vegetals.

Taula 1.1. Taula dels RLKs clonats en plantes on s'especifica la classe de receptor i la funció que duen a terme en els casos que es coneix.

	espècie	classe	funció	bibliografia
CLAVATA 1 (CLV1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	23 LRR	desenvolupament meristems	Clark <i>et al.</i> , 1997
CLAVATA 2 (CLV2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LRR	desenvolupament meristems	Kayes and Clark, 1998
ERECTA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LRR	formació d'òrgans (morfogènesi)	Torii <i>et al.</i> , 1996
FLS2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LRR	percepció flagelina	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2000
Crinkly4 (CR4)	<i>Zea mays</i>	EGF	desenvolupament fulla	Becraft <i>et al.</i> , 1996
Brassinosteroid 1 (BR1)	<i>Arabidopsis, tomàquet i pèsol</i>	25 LRR	senyalització Brassinosteroids	Li <i>et al.</i> , 1997
OsBRI1	<i>Oryza sativa</i>	LRR	senyalització Brassinosteroids	Sharma <i>et al.</i> , 2001
SRK	<i>Brassica</i>	S-domain	Resposta SI	Stein <i>et al.</i> , 1991
HAESA (RLK5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	21 LRR	Abscisió floral	Jinn <i>et al.</i> , 2000
Xa21	<i>Oryza sativa</i>	22 LRR	resistència a patògens	Song <i>et al.</i> , 1995
LRK10	<i>Blat</i>	domini-S	resistència	Feuillet <i>et al.</i> , 1997
SERK1-5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5 LRR	desenvolupament embrió	Hecht <i>et al.</i> , 2001
DcSERK	<i>Daucus carota</i>	5 LRR	desconeguda	Schmidt <i>et al.</i> , 1997
ZmSERK	<i>Zea mays</i>	5LRR	desconeguda	Baudino <i>et al.</i> , 2001
PRK1	<i>Petunia inflata</i>	5 LRR	desenvolupament del pol.len	Mu <i>et al.</i> , 1994
LePRK1 i 2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	6 i 5 LRR	desenvolupament post-polinització	Muschietti <i>et al.</i> , 1998
RLK1 i 4	<i>Zea mays</i>	S-domain	desconeguda	Walker i Zhang, 1990
RLK3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CX ₈ CXX CX ₁₁ *	desconeguda	Czenic <i>et al.</i> , 1999
TMK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13 LRR	desconeguda	Chang <i>et al.</i> , 1992
OsTMK	<i>Oryza sativa</i>	LRR	desconeguda	van der Knaap <i>et al.</i> , 1999

Introducció

NtTMK1	<i>Nicotiana tabacum</i>	11 LRR	desconeguda	Cho i Pai, 2000
TMKL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7 LRR	desconeguda	Valon <i>et al.</i> , 1993
SARK	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3.5 LRR	senescència	Hajouj <i>et al.</i> , 2000
WAK 1-5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGF	elongació cel.lular	He <i>et al.</i> , 1996
LLRPK	<i>Arabidopsis thaliana</i>	leucin-zipper	possible funció en recepció de la llum	Deken i Kaldenhoff, 1997
RPK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5 LRR	(s'indueix amb diferents estressos)	Hong <i>et al.</i> , 1997
CrRLK1	<i>Catharanthus roseus</i>	desconeguda	desconeguda	Schulze-Muth <i>et al.</i> , 1997
INRPK1	<i>Ipomoea nil</i>	26 LRR	desconeguda	Basset <i>et al.</i> , 2000
RFK1, 2 i 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13 LRR	desconeguda	Takahashi <i>et al.</i> , 1998
PR5K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PR5	desconeguda	Wang <i>et al.</i> , 1996
RKC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CX ₈ CX ₂ C*	desconeguda	Ohtake <i>et al.</i> , 2000
RKS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S-domain	desconeguda	Ohtake <i>et al.</i> , 2000
lecRK-a1, 2, 3 i 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	lectina	desconeguda	Herve <i>et al.</i> , 1999
SbRLK1	<i>Sorghum bicolor</i> (L.)	5 LRR	desconeguda	Annen i Stockhans, 1999
LTK1, 2 i 3	<i>Zea mays</i>	8 LRR	desconeguda	Li <i>et al.</i> , 1998
KIK1	<i>Zea mays</i>	S-domain	desconeguda	Braun <i>et al.</i> , 1997
ZmPRK1	<i>Zea mays</i>	S-domain	desconeguda	Zhang i Walker, 1993
GmRLK1, 2 i 3	<i>Glicine max</i>	LRR	desconeguda	Yamamoto i Knap, 2001
GmCLV1A i B	<i>Glicine max</i>	LRR	desconeguda	Yamamoto <i>et al.</i> , 2001
ARK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S-domain	desconeguda	Tobias <i>et al.</i> , 1992

(*) Motiu identificat en proteïnes que s'indueixen sota àcid salicilic (SA).

2.2 Diversitat de RLKs d'*Arabidopsis*: comparació entre genomes seqüenciats.

Fa poc més d'una dècada que es va clonar en plantes el primer gen que codifica per un RLK (*Receptor-Like Kinase*) (Walker i Zhang, 1990). Durant aquests darrers anys s'han clonat i estudiat molts gens que codifiquen per proteïnes que presenten una estructura similar a RLK. Anàlisis filogenètiques de totes les seqüències que presenten homologia amb RLK d'*Arabidopsis* apunten la xifra de 620 segons les dades més recents del genoma complet d'*Arabidopsis* (Shiu i Bleecker, 2001). D'aquestes seqüències, 10 van mostrar més similitud amb la família Raf quinases i 193 no presentaven una configuració de receptor per no presentar el pèptid senyal i/o la regió transmembrana. Els 417 gens restants amb configuració de receptors s'han classificat en 21 classes estructurals diferents (figura 1.14) on el grup més representat és el que presenta els motius LRR amb 216 gens (Shiu i Bleecker, 2001).

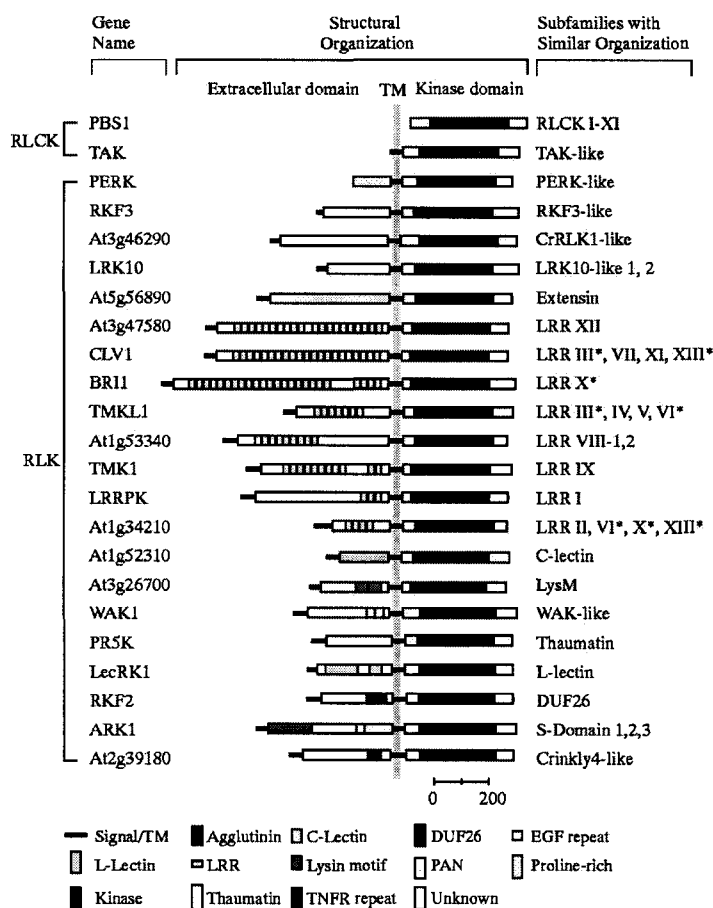


Figura 1.14. Esquema de la família RLK d'*Arabidopsis*. La línia gris vertical representa la posició de la membrana. Les diferents subfamílies s'han assignat segons la filogenia del domini quinasa. Les subfamílies amb més d'un 30% de membres estan senyalades amb un asterisc. De Shiu i Bleecker (2001).

La finalització de les seqüències dels genomes d'*Escherichia coli*, *Synechocystis* sp., *Sacchromyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila* i *Homo sapiens* ha permès la realització d'estudis comparatius. L'esquema de la figura 1.15 mostra una comparació de proteïnes entre els diferents genomes seqüenciats fins al moment. En aquest estudi es pot observar una evolució independent de la majoria dels factors de transcripció de plantes on només entre el 8-23% de factors estan relacionats amb la resta de genomes eucariòtics. De manera oposada, entre el 48 i el 60% de gens involucrats en la síntesi de proteïnes tenen el seu equivalent en els genomes eucariotes, reflexant una elevada conservació. D'altra banda, l'elevada proporció entre proteïnes metabòliques i energètiques d'*Arabidopsis* i bacterianes reflecteixen l'adquisició ancestral d'aquests gens bacterians. Finalment, és important destacar la comparació entre organismes eucariotes unicel.lulars i multicel.lulars que mostra com els gens d'*Arabidopsis* involucrats en la comunicació cel.lular i la transducció del senyal tenen més homòlegs en eucariotes multicel.lulars que no en llevats; indicant la necessitat d'aquest conjunt de gens per la comunicació en organismes multicel.lulars (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

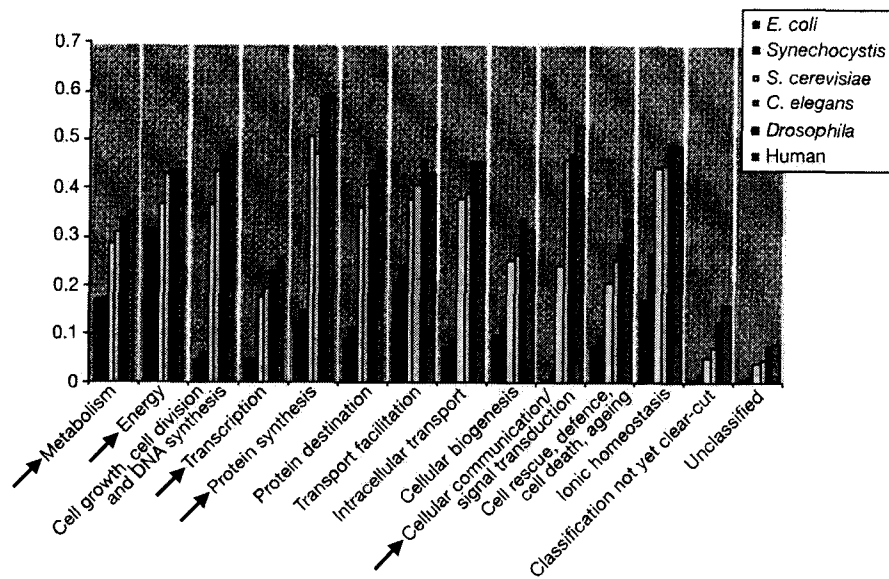


Figura 1.15. Comparació proteica funcional entre els genomes totalment seqüenciats d'*E. coli*, *Synechocystis*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila* i *Homo sapiens* amb *Arabidopsis*. En l'eix de les ordenades, 0.1=10%. Adaptat d'*Arabidopsis* Genome Initiative, (2000).

De fet, anàlisis comparatives entre *Arabidopsis*, *C. elegans* i *Drosophila* donen suport a la idea de que les plantes han evolucionat les seves pròpies vies de transducció del senyal (McCarty i Chory, 2000). En aquest sentit, cap dels components majoritaris de les vies de senyalització de vertebrats, mosques o cucs, com Wingless/Wnt, Hedgehog, Notch/lin12, JAK/STAT, TGF- β /SMADs, receptors tirosina quinasa/Ras o receptors esteroides hormonals nuclears, s'han trobat a *Arabidopsis*. Per altra banda, els receptors lligats a proteïnes G, que són molt abundants en els genomes de mamífers, només estan representats amb 27 membres a *Arabidopsis*, segons el programa d'anàlisis de seqüències INTER-PRO (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Per tal de comparar les proteïnes quinases eucariotes (tant les serina/treonina com les tirosina quinases) amb els RLKs descrits a *Arabidopsis* s'han realitzat estudis filogenètics. En aquest estudi, tant les 16 subfamílies de RTKs, les proteïnes Raf quinases, les serina/treonina quinases com les RLKs formen un grup monofilètic indicant un origen diferent per cadascun d'ells (Shiu i Bleecker, 2001). D'altra banda, per tal de determinar la presència de proteïnes similars als RLKs en eucariotes, es va utilitzar com a model la seqüència del domini quinasa de l'RLK d'*Arabidopsis* CLV1. Aquest estudi va permetre la descripció de 5 proteïnes similars a RLK: una a *Drosophila* (DmPelle), una a *C. elegans* i tres en humans. En la taula 1.2 es mostren els ESTs de les bases de dades similars a CLV1 i al domini quinasa de Pelle. Les 7 plantes florals, tant dicotiledònies com monocotiledònies, presenten entre un 0,18 i el 0,6% d'ESTs que corresponen a membres de la família RLK/Pelle. Mentre que, per altra banda, a excepció dels tres ESTs de *Drosophila*, cap dels altres organismes presenta proteïnes similars a RLKs. De fet, el baix nombre de representants de la família RLK/Pelle en animals comparat amb l'elevat número d'*Arabidopsis* indica que l'expansió dels RLKs en plantes va tenir lloc després de la divergència dels llinatges de plantes i animals. La hipòtesi alternativa d'una important pèrdua en els animals sembla menys probable, ja que ni *Porphyra* ni *Chlamydomonas* presenten RLKs (Shiu i Bleecker, 2001). A part, totes les plantes presenten un percentatge similar de quinases RLK/Pelle suggerint que aquesta família gènica tenia una mida similar abans de la diversificació dels llinatges vegetals.

Taula 1.2. ESTs homòlegs a RLK descrits en diferents organismes.

De Shiu i Bleecker (2001).

Organism	Total EST*	RLK homologs	%EST
<i>Porphyra yezoensis</i>	10,185	0	0
<i>C. elegans</i>	109,095	0	0
<i>D. melanogaster</i>	95,211	3	0.003
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	55,860	0	0
<i>Marchantia polymorpha</i>	1,307	1	0.077
Mosses	9,159	19	0.207
<i>Ceratopteris richardii</i>	2,838	7	0.247
<i>Pinus taeda</i>	21,797	100	0.459
<i>Arabidopsis thaliana</i>	112,467	620	0.551
<i>Glycine max</i>	122,843	704	0.573
<i>Lotus japonicus</i>	26,844	135	0.503
<i>Lycopersicon esculentum</i>	87,680	526	0.6
<i>Oryza sativa</i>	62,390	185	0.297
<i>Triticum aestivum</i>	44,132	178	0.403
<i>Zea mays</i>	73,965	135	0.183

*The searches were conducted based on EST available from GenBank as of Dec. 15, 2000.

Tenint en compte el model d'unió del lligand als dominis extracel·lulars dels receptors, l'elevat nombre de gens que codifiquen per receptors quinasa del tipus LRR, CR4 i amb dominis-S a *Arabidopsis*, suggereix que el potencial d'hormones peptídiques en plantes és molt gran. Contràriament a les hormones peptídiques animals, els suposats lligands peptídics identificats en plantes no corresponen a famílies gèniques suggerint que són altament especialitzats (McCarty i Chory, 2000).

2.3. La funció dels RLKs en plantes.

Hi ha molt pocs casos on es coneixi la funció dels RLKs i aquests estan implicats en un rang molt divers de processos de senyalització com la via de senyalització dels brassinosteroids BRI1 (Li *et al.*, 1997); el desenvolupament meristemàtic controlat per CLV1 (Clark *et al.*, 1997); la percepció de la flagelina per FLS2 (Gómez-Gómez i Boller, 2000); el control del desenvolupament de la fulla per Crinkly4 (Becraft, 1996); la regulació de l'abscissió per HAESA (Jinn *et al.*, 2000); el control d'autoincompatibilitat per SRKs (Stein *et al.*, 1991) i la resistència a bacteris mitjançant Xa21 (Song *et al.*, 1995).

Recentment s'han pogut identificar els lligands de SRK (Schopfer *et al.*, 1999), CLV1 (Brand *et al.*, 2000), BRI1 (Wang *et al.*, 2001) i FLS2 (Gómez-Gómez *et al.*, 2001). Així com també s'han descrit algunes proteïnes que interaccionen *in vitro* amb el domini quinasa de RLK (Stone *et al.*, 1994; Trotochaud *et al.*, 1999; Bower *et al.*, 1996; Skirpan *et al.*, 2001). Aquests mecanismes d'acció més ben estudiats s'expliquen en més detall en aquest treball en els apartats següents.

2.3.1 La percepció i senyalització hormonal dels Brassinosteroids.

Als sistemes animals s'han descrit dos mecanismes d'acció diferents per l'acció d'hormones esteroides: la regulació gènica per receptors nuclears on les hormones entren per difusió en la cèl.lula pel seu caràcter hidrofòbic (Beato *et al.*, 1995) i una resposta mitjançant la unió a receptors de membrana (Wehling, 1997). En plantes, no s'ha identificat cap homòleg de receptor nuclear (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), però el mecanisme a través de receptors de membrana sembla que podria estar conservat en els dos sistemes.

Els brassinosteroids (BRs) són les hormones esteroides més representatives en els vegetals i, com les hormones esteroides animals i humanes, deriven del colestà (Sakurai i Fujioka, 1997). Plantes mutants defectives en la via de síntesi o en la percepció de BRs mostren un fenotip nan, una reducció de la fertilitat, un retard en la senescència i un desenvolupament independent de la llum (Wang *et al.*, 2001). S'han descrit dos tipus de mutants BRs en *Arabidopsis*, tomàquet i pèsol que mostren el mateix fenotip: mutants defectius BRs que estan afectats en algun enzim o substrat de la via de síntesi de BRs, com per exemple *det2* o *dwf4*, i mutants insensibles a BR anomenats *bri1*, *cbb2* o *bin* (Altmann, 1998). A diferència dels primers, aquests tres mutants *bri1* no són rescatats per l'aplicació exògena de BRs, mentre que són sensibles a altres hormones com les giberelines, l'auxina i l'àcid jasmònic (Kauschmann *et al.*, 1996). Aquests tres mutants *bri1*, *cbb2* i *bin* al·lèlics afecten al mateix gen *BRI1*, suggerint el paper específic d'aquest gen en la percepció de BRs o en la transducció del senyal (Schumaker i Chory, 2000). *BRI1* codifica per un RLK que presenta un motiu *leucin-zipper* en el seu domini extracel.lular seguit de 25 LRR amb un domini de 70 aminoàcids entre el LRR 21 i el 22, un domini transmembrana i un domini intracel.lular serina/reonina quinasa, l'activitat quinasa del qual ha sigut demostrada (Wang *et al.*,

2001). L'expressió de *BRI1* és ubíqua i la proteïna es localitza a la membrana (Friedrichsen *et al.*, 2000). L'estructura de *BRI1* i la seva localització suggereix que uneix un lligand extracel.lular i transdueix el senyal pel domini quinasa. En la bibliografia, dos treballs demostren la funció receptora de *BRI1* pel Brassinolid (BL), el brassinosteroid biològicament més actiu (He *et al.*, 2000). He i col.laboradors (2000) han desenvolupat un receptor quimèric amb el domini extracel.lular i el domini transmembrana de *BRI1* fusionat amb el domini quinasa de *Xa21*, un receptor d'arròs de resistència a patògens. L'expressió de *Xa21* inicia mort cel.lular quan s'inocula amb un fong incompatible, provoca un estrès oxidatiu i indueix la transcripció de gens específics. Tots aquests efectes són excel.lents marcadors que mostren l'activitat de la via de senyalització de *Xa21*. Els resultats de l'expressió del receptor quimèric *BRI1-Xa21* van mostrar que aquest receptor era capaç de reconèixer BL activant tots aquests processos marcadors (He *et al.*, 2000). A més, mutacions en el domini extracel.lular de 70 aminoàcids i en el domini quinasa van demostrar que aquests eren imprescindibles per la transducció del senyal, ja que mutacions en aquestes zones redueixen molt l'activitat d'unió del BL. D'altra banda, la unió BL-*BRI1* també es va poder determinar en fraccions microsomals de plantes salvatges i en plantes que sobreexpressen *BRI1-GFP*, demostrant que l'activitat d'unió s'incrementava dramàticament en les fraccions de membrana de les plantes transgèniques *BRI1-GFP*, degut a l'augment de llocs d'unió (Wang *et al.*, 2001).

Un altre gen que podria estar involucrat en aquest mecanisme d'acció dels Brassinosteroids és el gen *BRS1* (*bri1 suppressor-Dominant*) (Li *et al.*, 2001). *BRS1* va ser aïllat a partir d'un mutant *bri1* causat per *actication tagging* i codifica per una proteïna carboxipeptidasa-like. Mentre que la pèrdua de funció en el mutant *brs1* no presenta un fenotip associat, la seva sobreexpressió pot suprimir molts defectes del mutant *bri1* suggerint que té un paper important a l'inici de la via. La presència d'un pèptid senyal prediu que la proteïna *BRS1* és secretada extracel.lularment (Li *et al.*, 2001).

Tot i que fins ara no s'ha descrit el possible lligand de *BRI1*, hi ha dues hipòtesis per explicar el mecanisme d'interacció entre *BRI1* i el brassinolid. Una primera hipòtesi preveu la unió directa *BRI1-BL*, mentre la segona hipòtesi manté que aquesta unió depen de la interacció prèvia del BL a unes proteïnes d'unió a esteroides (SBP) (Li *et al.*, 2001). De fet,

la carboxipeptidasa BRS1 podria estar involucrada en un processament d'aquestes proteïnes SBP permetent la seva unió a BL (Li *et al.*, 2001).

La via de transducció de BRI1 no es coneix encara, tot i que potser hi està involucrada la proteïna fosfatasa 2C KAPP (*kinase-associated protein phosphatase*), ja que interacciona *in vitro* amb BRI1 (Li i Chory, 1999). La proteïna KAPP està involucrada en altres vies de transducció de plantes com la de l'àcid abscísic, CLV1 i HAESA actuant com a regulador negatiu defosforilant el seu efector (Merlot *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1994).

Recentment s'ha identificat l'homòleg de BRI1 en arròs (*OsBRI1*) i s'ha demostrat que es requereix per la resposta a BR (Yamamuro *et al.*, 2000), suggerint, doncs, que la via de senyalització dels brassinosteroids està conservada en els vegetals.

En els sistemes animals, es coneix molt poc dels mecanismes d'unió d'esteroides a receptors de membrana iniciant la transducció del senyal (Schmidt *et al.*, 2000). Si es té en compte la conservació dels enzims biosintètics dels esteroides i la funció similar en el creixement i diferenciació de plantes i animals, pot ser interessant estudiar si el mecanisme de senyalització d'esteroides des de la membrana es dona tant en plantes com en animals (Wang *et al.*, 2001).

2.3.2 Sistema d'auto-incompatibilitat a *Brassica*.

Un dels mecanismes de senyalització més ben estudiats en plantes és el sistema d'auto-incompatibilitat en el gènere *Brassica*. El sistema d'auto-incompatibilitat o SI (*self-incompatibility*) és un mecanisme genètic àmpliament distribuït en les plantes florals que impedeix l'auto-fertilització (De Nettancourt, 1977; Nasrallah *et al.*, 1994). Aquesta barrera d'auto-fertilització es basa en l'habilitat de les cèl·lules epidèrmiques de l'estigma per identificar un pol·len genèticament idèntic al seu i bloquejar específicament el desenvolupament del tub pol·línic (Nasrallah, 2000). L'únic sistema de SI on s'han identificat els components del pistil i del pol·len és el del gènere *Brassica*. L'especificitat de la resposta SI està determinada genèticament per uns 50 haplotips d'un únic locus denominat locus-S (*Self-incompatibility locus*) (De Nettancourt, 1977). Així, per poder germinar i fertilitzar l'òvul, el pol·len ha de contenir un al·lel S diferent al del pistil.

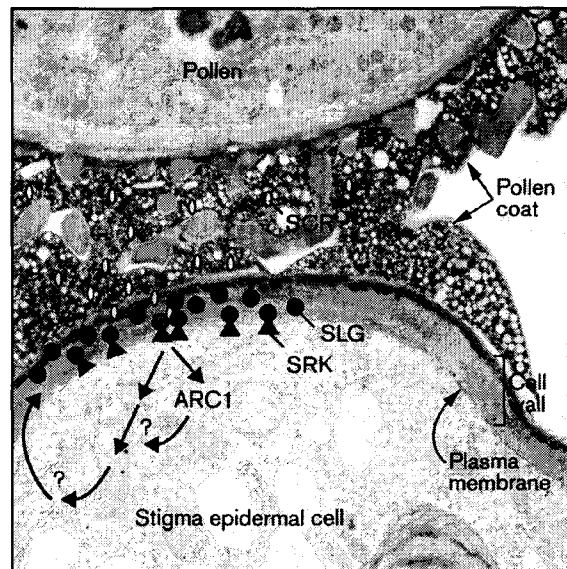
S'han identificat dues proteïnes polimòrfiques lligades al locus S i que s'expressen específicament en les cèl·lules epidèrmiques de l'estigma o cèl·lules papil·lars. La proteïna SLG (*S-locus glycoprotein*), soluble i localitzada extracel·lularment a la paret de les cèl·lules papil·lars (Nasrallah *et al.*, 1987), i el receptor de membrana SRK (*S-locus Receptor Kinase*) (Stein *et al.*, 1991). El receptor SRK presenta tres dominis diferenciats: un domini N-terminal glicosilat (domini S) molt similar a la proteïna SLG, un domini transmembrana i un domini serina/treonina quinasa, l'activitat del qual ha sigut demostrada en cèl·lules d'*E. coli* (Goring *et al.*, 1992). Recentment, s'ha pogut demostrar que l'especificitat de la resposta SI en l'estigma ve donada per la proteïna SRK. Així, en plantes homozigòtiques per un haplotip S transformades amb un al·lel aïllat d'un altre haplotip donen lloc a l'adquisició de l'especificitat en l'estigma per l'haplotip transformat (Takasaki *et al.*, 2000). De fet, la polinització d'aquests estigmes amb l'haplotip del gen S transgènic produeix un petit nombre de llavors indicant una resposta SI dèbil que s'inhibeix per la co-expressió de SRK i SLG (Takasaki *et al.*, 2000). Tot i que aquests resultats semblen indicar que SLG induiria d'alguna manera la resposta SI, el seu paper no es coneix encara. A més, mutants que han perdut el gen SLG presenten una fertilització aparentment normal (Nasrallah *et al.*, 2000). D'altra banda, en mutants auto-fertilitzats on s'ha eliminat el gen SLG, es perd la proteïna SRK, tot i que els seus nivells de transcrit s'acumulen normalment (Dixit *et al.*, 2000). Aquests resultats en plantes homozigòtiques semblen indicar que SLG podria tenir un paper en la maduració posttraduccional del receptor.

Recentment, s'ha pogut identificar el determinant del pol·len de la resposta SI, el gen *SCR* (*S-locus Cysteine-Rich*) (Schopfer *et al.*, 1999). *SCR* s'expressa exclusivament en les anteres durant el desenvolupament del pol·len i codifica per una petita proteïna secretada que suposadament es localitza en l'embolcall del pol·len (Schopfer *et al.*, 1999). *SCR* és necessària i suficient per determinar l'especificitat de SI en el pol·len, ja que una mutació funcional provoca la pèrdua d'especificitat. El gen *SCR* presenta un elevat polimorfisme on només el pèptid senyal i 9 residus aminoacídics es troben conservats (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000).

El model proposat del reconeixement pol·len-estigma en el sistema d'auto-incompatibilitat de les plantes es presenta en la figura 1.16. El receptor quinasa SRK localitzat en la membrana de la cèl·lula papil·lar interaccionaria amb el lligand SCR que difondria per

l'embolcall del pol.len. Aquesta interacció podria provocar la oligomerització i la transfosforilació del receptor amb el consegüent reclutament de substractes citoplasmàtics (Nasrallah, 2000).

Figura 1.16. Model de reconeixement pol.len-estigma en el sistema de SI. Els components del model estan sobreposats a una micrografia electrònica de la zona de contacte entre la cèl.lula epidèrmica de l'estigma i el pol.len. Es proposa que SCR actua de lligand del receptor SRK provocant l'inducció d'una via de senyalització poc coneguda. El paper de la proteïna extracel.lular SLG no es coneix encara tot i que se l'ha relacionada amb una inducció de la resposta SI. De Nasrallah (2000).



Pel que fa a la transducció del senyal en la via SRK, mitjançant la tècnica del doble híbrid s'han identificat dos tipus de proteïnes que interaccionen amb el domini citoplasmàtic de SRK: dues tioredoxines (Bower *et al.*, 1996) i una proteïna ARC1 (*arms repeat-containing*) (Gu *et al.*, 1998). La proteïna ARC1 s'expressa específicament en l'estigma de *Brassica* i interacciona només amb la forma autofosforilada del domini citoplasmàtic de SRK. S'ha demostrat que ARC1 és un efector positiu de la resposta SI, ja que en plantes transgèniques *Brassica napus* amb el missatger d'ARC1 silenciats s'observa una clara disminució parcial de SI, donant lloc a la producció de llavors (Stone *et al.*, 1999).

Per altra banda, recentment s'ha demostrat la funció de les tioredoxines en la via de transducció de SRK. Cabrillac i col.laboradors (2001) hipotetitzen l'existència d'algun inhibidor en els extractes cel.lulars després d'observar resultats oposats en l'activació *in vivo* i *in vitro* de SRK (*in vitro* SRK és constitutivament actiu). S'ha demostrat que aquest efecte inhibidor dels extractes de l'estigma està causat per l'activitat catalítica tioredoxina

de les proteïnes THL1 i THL2 (*thioredoxin-h-like*). Els resultats obtinguts en aquest treball donen suport a un model on THL1 (i THL2) interacciona amb SRK en l'estigma i evita l'activació espontànea de la via de transducció d'auto-incompatibilitat. En aquest model, la inhibició del receptor SRK per la tioredoxina deixa de tenir lloc després de l'autopol.linització pel lligand SCR. És provable, doncs, que en absència de regulació el sistema SI fos actiu constitutivament (Cabrillac *et al.*, 2001).

En altres plantes s'han descrit proteïnes que presenten similitud amb SRK, com la ZmPRK1 de blat de moro, suggerint una conservació del mecanisme SI. Tot i això, aquesta conservació no s'ha pogut demostrar fins ara. Per altra banda, *Arabidopsis* també té receptors homòlegs al S-domain però la seva funció és desconeguda, ja que aquesta dicotiledònia no presenta el mecanisme SI.

2.3.3 Els RLKs en la resposta a patògens.

La resistència de la planta davant un patògen depèn de la seva habilitat per reconèixer-lo ràpidament en el procés d'infecció (Blumwald *et al.*, 1998). Les molècules que indiquen la presència del patògen s'anomenen el·licitors i activen receptors de la cèl.lula hoste que ràpidament internalitzen el senyal per donar lloc a una resposta de defensa. Es poden diferenciar dos tipus d'el·licitors: els no-específics, com per exemple determinats oligosacàrids bacterians o fúngics, i els el·licitors específics o molècules codificades per un gen d'aviorulència (Avr) del patògen (De Wit, 1998). La resistència es dona pel reconeixement específic de l'el·licitor per una proteïna codificada per un gen de resistència (R) de la planta en una interacció que s'anomena gen-a-gen (Flor, 1971). Durant els darrers anys, estudis genètics de la interacció patògen-planta han permès la identificació de molts gens de resistència que es proposa que funcionen com a receptors d'el·licitors específics. Les proteïnes codificades pels gens R, que aporten resistència a bacteris, virus, fongs i nemàtodes, es classifiquen en quatre classes segons els seus motius estructurals:

- NB-LRR (*nucleotide binding-leucine rich repeat*) com per exemple *RPS2* d'*Arabidopsis* o el gen *N* de tabac. Representen la família més abundant.
- Proteïnes quinasa intracel.lulars com el gen de tomàquet *Pto* (*Pseudomonas tomato resistance*).

- LRR extracel.lulars ancorats a membrana com el gen *Cf9* de tomàquet.
- Receptors LRR quinasa (RLK) com per exemple el gen *Xa21* d'arròs i el gen *Lr10* de blat (*leaf rust10*).

Malgrat que hi ha nombrosos estudis en la caracterització de gens de resistència del tipus NB-LRR, *Pto* i *Cf-9*, en aquesta introducció als RLKs de plantes ens centrarem en els estudis dels mecanismes d'acció dels gens de resistència que codifiquen per RLKs.

El gen d'arròs *Xa21* que dona resistència al bacteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 6 fou aïllat per clonatge posicional (Song *et al.*, 1995). *Xa21* conté un pèptid senyal en la regió N-terminal, seguit de 24 còpies imperfectes del motiu LRR, un domini transmembrana i un domini catalític quinasa intracel.lular (Song *et al.*, 1995). *Xa21* forma part d'una família multigènica en la qual s'han identificat 7 gens que s'agrupen en dues classes segons la seva similitud de seqüència (Song *et al.*, 1997). La classe *Xa21* conté els gens *Xa21*, *D* i *F* mentre que la classe dita *A2* conté els membres *A1*, *A2*, *C* i *E*. Només un membre de cada família codifica per un receptor quinasa, els 5 membres restants contenen alteracions que provoquen una parada prematura de l'ORF (*open reading frame*) del receptor quinasa predit. S'ha demostrat que mecanismes de transposició, recombinació i duplicació contribueixen a la diversitat genètica de la família *Xa21* (Song *et al.*, 1997).

Segons models del sistema animal, s'ha proposat que el domini LRR de *Xa21* podria ser el responsable d'interaccionar amb el suposat lligand per determinar la resposta de resistència específica (Wang *et al.*, 1998). Donant suport a aquesta proposta, treballs amb el locus M del lli han demostrat que alteracions en el domini LRR juguen un paper important en l'evolució del gens de resistència i en la producció de nous reconeixements específics (Anderson *et al.*, 1997). Comparativament, les diferències aminoacídiques dels LRR dels diferents membres de la família *Xa21* suggereixen que podrien estar involucrats en el reconeixement de diferents soques. Per comprovar aquesta hipòtesis, Wang i col.laboradors (1998) van assajar l'especificitat de resistència de soca amb els set membres *Xa21* clonats en plantes transgèniques. Els resultats van mostrar que només dues proteïnes, *Xa21* i *Xa21D* conferien resistència. El gen *Xa21D* codifica per una suposada proteïna secretora extracel.lular que conté el pèptid senyal, un domini ric en GC i dominis LRR i que ha perdut els dominis transmembrana i quinasa per la inserció del retrotransposó *Retrofit*

(Wang *et al.*, 1998). Aquest no és l'únic mecanisme on intervé una proteïna extracel.lular, per exemple el mecanisme d'acció de la proteïna SLG del locus-S relacionada amb la resposta d'auto-incompatibilitat, que s'ha comentat en l'apartat anterior 3.2.2. S'ha proposat un model per explicar com la proteïna extracel.lular Xa21D pot transduir una resposta de defensa cel.lular (figura 1.17A). Segons aquest model, en plantes transgèniques que expressen Xa21D, la proteïna Xa21D secretada podria formar un heterodímer amb RLK endògens que han perdut el reconeixement d'especificitat. La unió del lligand a Xa21D provocaria l'activació del domini quinasa del RLK transduint el senyal que donarà lloc a un fenotip de resistència (Wang *et al.*, 1998). Per altra banda, la transducció del senyal per Xa21 consistiria amb la formació d'un homodímer o un heterodímer amb un altre RLK (figura 1.17B). En aquest cas, la unió del lligand provocaria la fosforilació del domini quinasa donant lloc al fenotip de resistència (Song *et al.*, 1995).

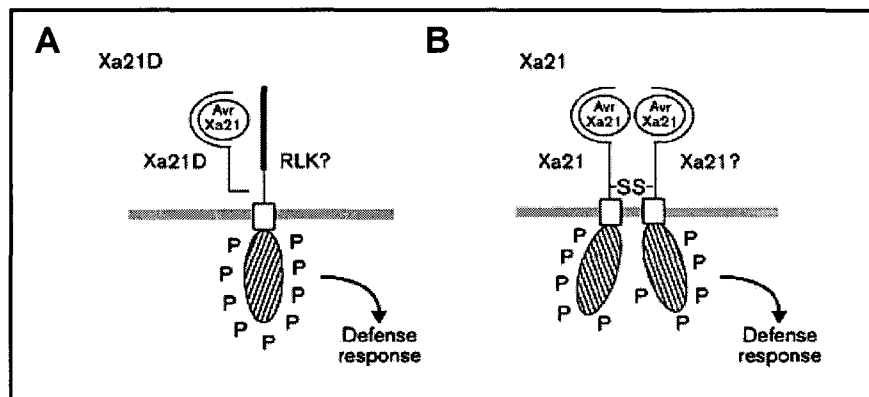


Figura 1.17. Sistema de senyalització per Xa21. **A:** plantes transgèniques que expressen Xa21D. Xa21D podria formar un heterodímer amb RLKs que han perdut el reconeixement específic. La unió del lligand a Xa21D activaria el domini quinasa del RLK transduint el senyal. **B:** Xa21 podria formar un homodímer (com mostra la figura) o un heterodímer amb altres RLKs. La unió del lligand AvrXa21 al domini LRR induiria la fosforilació del domini quinasa, donant lloc a un fenotip de resistència. De Torii (2000).

Un altre mecanisme analitzat per estudiar la interacció patògen-planta on s'ha implicat la participació d'un RLK ha sigut la interacció entre plàntules d'*Arabidopsis* i l'elicitòr flagelina (Gómez-Gómez i Boller, 2000). La flagelina és la proteïna majoritària del flagel

bacterià i actua d'elicitora de la resposta de defensa en diferents espècies de plantes (Felix *et al.*, 1999). En plàntules d'*Arabidopsis* la flagelina provoca una inhibició del creixement i una inducció de gens PR1 i PR5 (*Pathogenesis-Related*) (Gómez-Gómez *et al.*, 1999). Per contra, altres flagelines amb diferents seqüències aminoacídiques com les que presenten bacteris associats a plantes com *Rhizobium* i *Agrobacterium* no indueixen cap resposta cel·lular (Felix *et al.*, 1999). El gen *FLS2* (*flagellin sensing 2*) es va aïllar mitjançant un crivellat de mutants insensibles a la flagelina que presentaven un fenotip similar al salvatge (Gómez-Gómez *et al.*, 2000). L'expressió ectòpica del cDNA *FLS2* en plantes d'*Arabidopsis* dona lloc a una correlació directa entre la resposta a la flagelina i els seus nivells d'expressió mostrant un dels pocs casos de RLKs on s'ha identificat el lligand. El gen *FLS2* codifica per una proteïna amb una regió extracel·lular LRR, un domini transmembrana i un domini serina/treonina quinasa. Aquesta estructura és similar a la proteïna Xa21, suggerint un possible mecanisme comú d'interacció i activació de les vies de defensa en resposta a patògens (Gómez-Gómez i Boller, 2000).

2.4 La transducció intracel·lular. MAPKs en plantes.

Actualment, el coneixement de les vies de transducció del senyal en plantes es limita en la majoria dels casos a la identificació dels receptors que perceben el senyal, els factors de transcripció i alguns gens diana que coordinen la resposta (McCarty i Chory, 2000). Els components que fan de lligam entre els receptors i els gens diana responsables de la resposta cel·lular no es coneixen. Fins ara s'han caracteritzat un nombre molt petit de proteïnes que interaccionen amb el domini intracel·lular de RLKs. La proteïna KAPP es va caracteritzar en primer lloc com una proteïna d'interacció amb el receptor d'*Arabidopsis* HAESA implicat en l'abscisió floral tot i que actualment se l'ha implicat amb BRI1 i amb CLV1, com s'explicarà en l'apartat 3.1.3.2. Per altra banda, com ja s'ha comentat, el receptor SRK interacciona amb tioredoxines intracel·lulars i amb la proteïna ARK1. A banda d'aquests exemples no se sap pràcticament res sobre com els RLKs transduïxen el senyal a l'interior de la cèl·lula.

Tot i que les cascades de MAPK són mòduls de senyalització conservats evolutivament en eucariotes, en plantes no s'ha descrit encara cap mòdul MAPKKK-MAPKK-MAPK *in vivo*. Així com els receptors de membrana i les vies de transducció del senyal no semblen

estar conservats entre plantes i mamífers, com s'ha explicat en l'apartat 2.2, la conservació de les proteïnes MAPK suggereix uns mecanismes de senyalització únics en plantes per enllaçar els receptors vegetals amb les MAPKs. En plantes, estudis recents indiquen que l'activació de les cascades de MAPK juguen un paper molt important en les vies de transducció del senyal que controlen processos tant diferents com la divisió o la mort cel.lular (Tena *et al.*, 2001). Diferents estudis han demostrat l'activació de MAPKs per hormones, estressos abiòtics, patògens i elicitors derivats de patògens així com determinades etapes del cicle cel.lular (Hirt, 2000).

En plantes s'han descrit proteïnes pertanyents als tres tipus de MAPKs que es troben en el mòdul típic de la cascada MAPK: MAP3K, MAP2K i MAPK.

S'han definit dos grups de MAP3K: les PMEKK (Plant MEKK/Ste11) i les proteïnes PRaf (Plant Raf-like) (Zwerger i Hirt, 2001). Tot i que no existeix una evidència de la funció d'aquestes proteïnes, la seva similitud amb proteïnes MAP3K de llevat i mamífer i la capacitat de complementar llevats mutants *Ste11* i *bck1* (proteïnes MAP3K) suggereix que tenen una funció MAP3K. La gran variabilitat d'aquestes proteïnes indica, com en els altres sistemes, una àmplia varietat de substrats específics i mecanismes reguladors. S'han aïllat MAP3Ks a *Arabidopsis* (fins a 12), tomàquet, arròs i tabac i, a més, en les bases de dades s'hi poden trobar moltes seqüències relacionades.

Les proteïnes PMEKK presenten una estructura molt diversa on, fins i tot la posició del domini catalític varia. Un dels membres més representatius d'aquesta família és la proteïna NPK1 (*Nicotiana Protein Kinase1*) de tabac que està involucrada en la formació de la làmina cel.lular (*cell plate*) durant la mitosi (Nishihama *et al.*, 2001) i el seu homòleg a *Arabidopsis* anomenat ANPs (*Arabidopsis NPK1-like protein kinase*). L'estructura de la subfamília PRaf està més conservada, amb un domini C-terminal catalític i una llarga extensió N-terminal. Un exemple d'aquest grup és el gen *CTR1* (*constitutive-triple-response*) aïllat a partir de la pèrdua de funció d'un mutant que presentava una expressió constitutiva dels gens induïbles per etilè (Kieber *et al.*, 1993). Anàlisis epistàtiques han demostrat que *CTR1* actua més avall en la cascada de traducció de ETR1 (*Ethylene-resistance*), un receptor histidina quinasa (Chang *et al.*, 1993).

Les proteïnes MAP2K de plantes (PMKK) són activades per les MAP3K per fosforilació en dos residus de serina i treonina en el motiu conservat S/TXXXXXS/T en plantes (Yang *et al.*, 2001). Estan classificades en tres subfamílies (PMKK1, PMKK2 i PMKK3) segons la seva seqüència aminoacídica. Sembla que l'únic substrat de les MAP2K són les proteïnes MAPKs de plantes (Seger *et al.*, 1992). Recentment, s'ha descrit la funció d'algunes MAP2Ks. Per exemple, la proteïna NtMEK1 (Calderini *et al.*, 2001) i la proteïna SIPKK (Liu *et al.*, 2000) es van identificar en un crivellat de doble híbrid amb les proteïnes NtF6 (*Nicotiana tabacum Fus3-like kinase*) i SIPK (*Salicylic-acid induced protein kinase*) podent ser les responsables d'activar-les per fosforilació.

Per sota de les MAP2Ks, en una cascada típica de MAPK, es troben les MAPK. A *Arabidopsis*, s'han identificat una vintena de proteïnes MAPK que han sigut classificades en 6 subfamílies que podrien representar sis grups funcionals diferents (Zhang i Klessing, 2001). Totes aquestes MAPK descrites en plantes fins al moment presenten homologia amb la subfamília ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) de mamífers. Així doncs, mentre que en animals aquesta subfamília és responsable majoritàriament de la transducció de senyals mitogèniques, en plantes, les MAPkinases tipus ERKs sembla que són capaces de transduir el senyal de diversos estímuls (Ligterink i Hirt, 2001). Les MAPKs més ben caracteritzades són les d'*Arabidopsis*, alfals i tabac. S'han estudiat les vies de MAPK relacionades bàsicament amb la resposta hormonal (com l'auxina o l'etilè), la regulació del cicle cel.lular, els estressos abiòtics i la defensa de patògens. Quatre de les sis subfamílies de MAPK estan implicades en resposta de defensa. A mesura que es va obtenint més informació, augmenta la complexitat de les cascades de MAPK que ja és elevada. Mentre que un component pot ser compartit en diferents vies, un únic estímulo pot activar diverses vies i diferents estímuls poden activar la mateixa via com es pot observar en la figura 1.18.

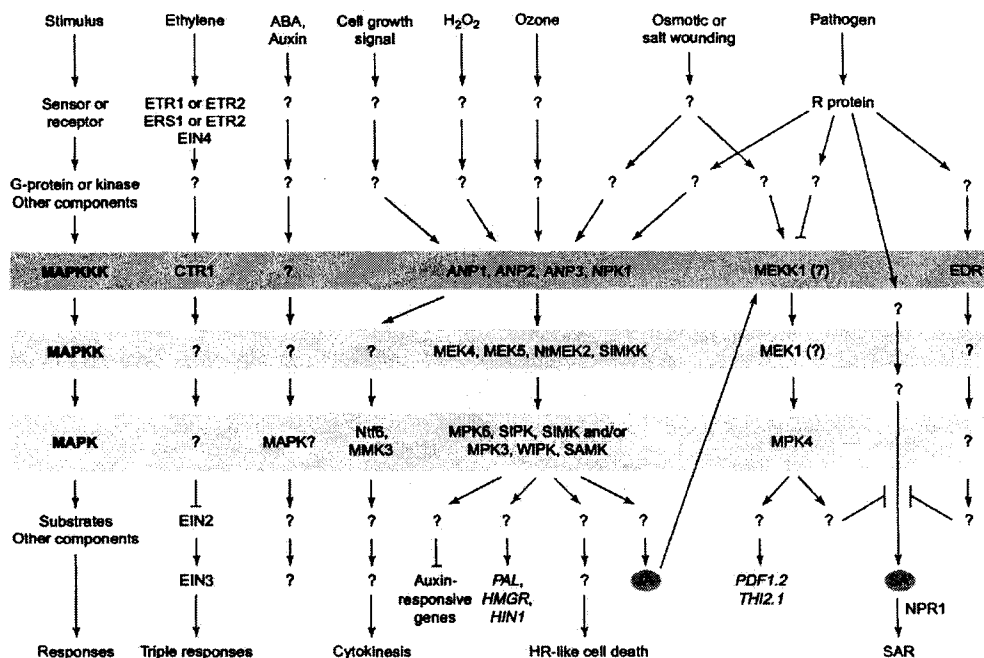


Figura 1.18. Esquema de les possibles funcions de les cascades MAPK en plantes. S'agrupen en un mateix color els components de funció homòloga de diferents cascades MAPK. Les fletxes indiquen activació i les barres inhibició. En aquest esquema es fa evident l'elevada complexitat de les diferents vies MAPKs de plantes. De Zhang i Klessing (2001).

Diverses dades porten a resultats aparentment contradictoris en la literatura (Zhang i Klessing, 2001). Per exemple, les proteïnes ANPs d'*Arabidopsis* són MAPKKKs de les vies de MPK6 i MPK3 que estan involucrades en una regulació negativa de la resposta a auxina mentre que regulen positivament l'activació gènica per H₂O₂ (Kovtun *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 1998). Per altra banda, la proteïna NPK1, un homòleg de ANP de tabac, és un regulador de la formació de la làmina cel.lular durant la citoquinesi (Nishihama *et al.*, 2001). Altres estudis relacionen les proteïnes MKK3 d'alfals i Ntf6 de tabac en el mateix procés de divisió cel.lular que NPK1 (Bögge *et al.*, 1999; Caderini *et al.*, 1998), suggerint que NPK1 podria ser un regulador per sobre d'aquestes proteïnes en la cascada, tot i que també podria ser que NPK1 tingués varies funcions. En resum, les vies de MAPK en plantes presenten components de senyal redundants, antagonismes entre diferents vies i mecanismes reguladors positius i negatius. Per arribar a entendre les cascades de

senyalització de MAPK en plantes, és crucial identificar les tres quinases de la cascada i els seus substrats així com utilitzar aproximacions genètiques, proteòmiques i assajos funcionals *in vivo*.

Tal i com s'ha explicat en l'apartat 1.3.1 i 1.3.2, tant en llevats com en animals s'ha descrit un grup de MAPKinases, anomenades GCK/SPS1, que en alguns casos actuen com activadors de MAP3K podent ser considerades com MAP4K. En plantes, només s'han identificat dues proteïnes a *Brassica napus* (BnMAP4K α 1 i α 2) i una a *Arabidopsis* anomenada SIK1 (*stress-induced kinase 1*) similars a la família GCK/SPS1. No obstant, és possible detectar seqüències genòmiques amb similitud amb la família de proteïnes STE20. Com s'ha dit, en mamífers s'ha demostrat que algunes d'aquestes proteïnes Ste20 actuen com a MAP4K activant la cascada de les MAPK. Per altra banda, la cascada MAPK en mamífers també pot ser activada per la proteïna quinasa-like C (PKC1) i per proteïnes G petites. Malgrat que s'ha observat l'activació d'una proteïna MAP3K per la proteïna PKC1 de llevat i una activitat similar a PKC1 en la resposta de defensa induïda per elicitors, el gen PKC1 de plantes no s'ha pogut aïllar (Xing *et al.*, 1996). Respecte a la possible activació de les vies MAPK de plantes per proteïnes G, tot i que se n'han aïllat algunes (Bischoff *et al.*, 1999), no hi ha cap evidència del seu paper en l'activació de la cascada de MAPK.

Així doncs, tot i que darrerament s'han identificat un gran nombre de proteïnes involucrades en les cascades MAPK de plantes, cap d'aquestes vies està totalment definida en tots els seus passos i sovint hi ha dades contradictòries. No només no hi ha cap via MAP3K-MAP2K-MAPK definida en plantes, sinó que es coneix molt poc dels seus activadors així com dels gens diana. Fins avui dia, no s'ha detectat cap substrat de MAPK. Potser l'anàlisi de mutants de proteïnes MAPK descrites, juntament amb tècniques bioquímiques pot ajudar a entendre i a definir les cascades MAPKs de plantes.

3. Processos de desenvolupament en plantes.

El desenvolupament és un dels processos que necessita de més controls cel·lulars i ambientals i és el resultat d'una complexa regulació fruit de la interpretació de senyals extracel·lulars. El desenvolupament en les plantes superiors té lloc en l'embriogènesi, la formació de l'embrió, i també durant tota la vida de la planta durant el desenvolupament post-embrionari a partir dels dos meristems primaris: l'apical i el radicular.

3.1 L'embriogènesi.

En les plantes superiors la reproducció sexual està caracteritzada per un procés de doble fertilització. Una de les cèl·lules espermàtiques es fusiona a la cèl·lula ou que desenvoluparà l'embrió, mentre que una segona cèl·lula espermàtica es fusiona amb la cèl·lula central bi-nucleada per donar lloc al teixit de l'endosperm (Randolph, 1936). Els programes de desenvolupament del zigot diploide i l'endosperm triploide són molt divergents. Per la seva banda, la cèl·lula primària de l'endosperm es nuclearitza en un seguit de divisions nuclears sense citoquinesi i posteriorment té lloc la cel·lularització. El zigot, per altra banda, inicia una sèrie de divisions cel·lulars i canvis morfològics que donaran lloc a la formació de l'embrió. Aquesta etapa de desenvolupament morfogenètic es denomina embriogènesi.

3.1.1 L'embriogènesi en la planta model dicotiledònia *Arabidopsis thaliana*.

La facilitat de cultiu, el ràpid cicle de vida i el seu genoma petit són les característiques principals per les quals *Arabidopsis* fou escollida com a planta model. L'embriogènesi d'*Arabidopsis* és un dels processos de desenvolupament més ben caracteritzats on s'han descrit un gran nombre de mutants que han permès entendre els mecanismes de la formació de les plantes. Una de les característiques que facilita l'estudi de la morfogènesi en l'embrió d'*Arabidopsis* és el seu patró de divisió invariable durant els primers estadis de l'embriogènesi que permet traçar histològicament els llinatges cel·lulars (Jürgens *et al.*, 1994).

El zigot d'*Arabidopsis* presenta una distribució asimètrica dels components cel·lulars, on el nucli i la major part del citoplasma es troben a la part superior i una gran vacuola domina la regió central i basal (Goldberg *et al.*, 1994). Després de la fertilització, el zigot es divideix de manera asimètrica produint una petita cèl·lula apical i una gran cèl·lula basal. Aquestes dues cèl·lules filles del zigot presenten ja una expressió gènica diferencial. Només la cèl·lula apical expressa el gen homeòtic *MERISTEM LAYER 1 (AtML1)*, l'expressió del qual es troba més tard delimitada en l'epidermis del primordi de l'embrió (Lu *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1999). La divisió asimètrica del zigot establint dues cèl·lules amb diferent destí, suggereix l'establiment de la polaritat apical-basal de l'embrió (figura 1.19).

Aquestes dues cèl·lules generaran diferents parts de l'embrió. Mentre que la cèl·lula apical donarà lloc al propi embrió (del qual derivaran les línies cel·lulars dels cotiledons), el meristem caulinar, l'hipocòtil i part de la radícula, la cèl·lula basal formarà el suspensor i la resta de la radícula (West i Harada, 1993). El suspensor fa una funció d'anclatge entre l'embrió i el sac embrionari fent de conducte pels nutrients que provenen de l'esperofit matern (Yeng *et al.*, 1993). Més endavant, a partir de la fase de cor (observar figura 1.19), la major part del suspensor pateix un procés de senescència i, per tant, no és una part funcional de la llavor madura. La cèl·lula més apical del suspensor, la hipòfisis, contribuirà a la formació del meristem radicular (Goldberg *et al.*, 1994).

La cèl·lula apical es divideix durant l'embriogènesi per donar lloc a grups cel·lulars amb destins diferents que originaran els diferents teixits de l'embrió. En l'estadi de 8 cèl·lules també s'inicia la formació del patró radial on les 8 cèl·lules embrionàries es divideixen tangencialment per donar lloc a cèl·lules filles externes i internes (Goldberg *et al.*, 1994). La primera evidència de diferenciació cel·lular té lloc en l'estadi de 16 cèl·lules, quan es fa visible el protoderm i es forma la hipòfisis en la part apical del suspensor. En aquest període, l'eix apical-basal de l'embrió jove es distribueix amb tres regions: apical, central i basal. Les regions apical i central són clons de les files superiors i inferiors de les cèl·lules embrionàries en l'estadi de 8 cèl·lules. La regió basal correspon a descendents clònics de la hipòfisis. Cadascuna d'aquestes regions presenta un patró de divisió cel·lular i una expressió gènica específica indicant que cada regió es desenvolupa diferencialment. Per exemple, les cèl·lules interiors de la regió apical en l'embrió de 16 cèl·lules expressen el

gen homeòtic *WUSCHELL* (*WUS*) que juga un paper important en el desenvolupament del meristem apical (Mayer *et al.*, 1998). Per altra banda, les cèl.lules més internes de la regió central mostren una polaritat cel.lular apical-basal en la transició de l'estadi de 16 a 32 cèl.lules acumulant la proteïna transportadora del fluxe d'auxina PIN-FORMED 1 (PIN1) en la part basal de les membranes plasmàtiques (Steinmann *et al.*, 1999).

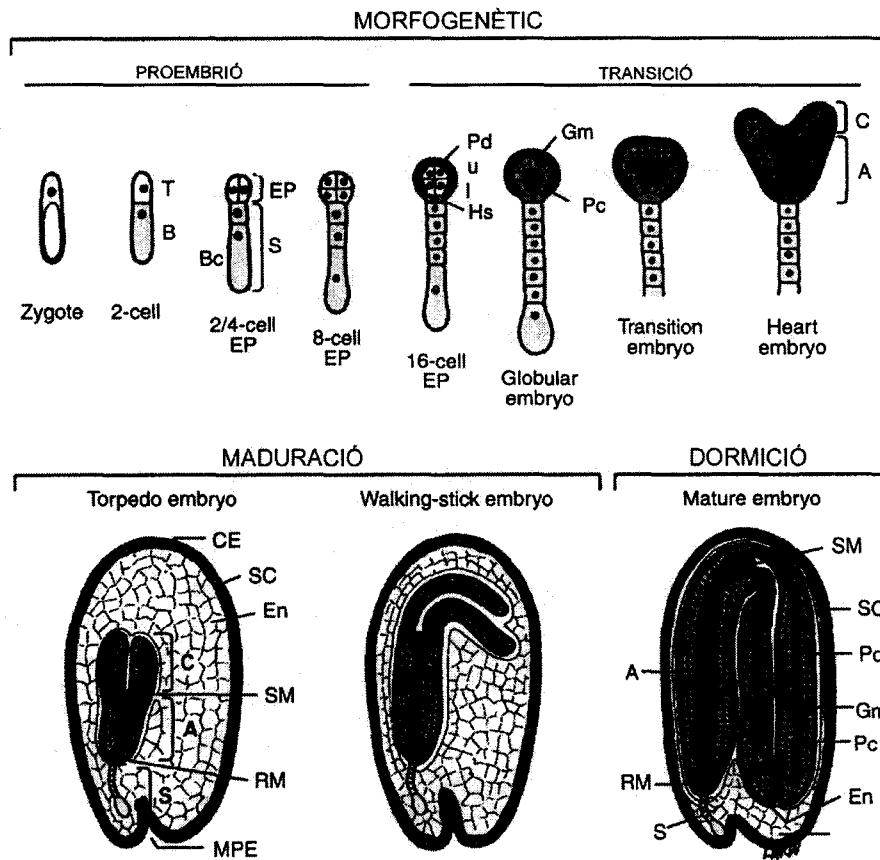


Figura 1.19. Embriogènesi d'*Arabidopsis thaliana*. Representació esquemàtica de les diferents etapes de l'embriogènesi on s'indiquen els diferents estadis del desenvolupament de l'embrió. *T*, cèl.lula apical; *B*, cèl.lula basal; *EP*, embrió propi; *S*, suspensor; *Pd*, protoderma; *Hs*, hipòfisi; *Pc*, procambi; *Gm*, teixit principal; *C*, cotilèdon; *A*, eix; *Sc*, coberta de la llavor; *En*, endosperma; *SM*, meristem apical; *RM*, meristem radicular.

Adaptat de De Goldberg *et al.* (1994).

En l'estadi d'embrió globular de l'etapa morfogènica, queden establerts els eixos radials dels teixits diferenciats. El següent estadi, el de transició, es caracteritza per la formació incipient dels dos cotiledons que tenen una funció d'acumulació de productes de reserva. En aquest període l'embrió passa de tenir simetria radial a presentar simetria bilateral (figura 1.19). La següent fase està descrita com l'etapa de cor per la forma que pren l'embrió amb els dos cotiledons laterals. Durant aquest estadi, el meristem radicular es diferencia a partir de la hipòfisi i, posteriorment, el meristem apical es desenvolupa a la regió situada entre els dos cotilèdons. Finalment, l'embrió comença a acumular productes de reserva en la fase de maduració i a preparar-se per la dormància.

A nivell molecular, l'embriogènesi d'*Arabidopsis* està molt ben caracteritzada per l'estudi de mutants. Per exemple, gràcies a mutants com *gnom*, *gurke* o *monopteros* que afecten al patró apical-basal es coneix a nivell genètic la formació de l'eix longitudinal. La descripció de mutants que afecten l'origen del meristem apical i a la seva organització també ha permès definir un conjunt de gens essencials durant els diferents estadis de l'embriogènesi. El meristem apical té una complexa organització on les cèl.lules mare es mantenen com a centre organitzador. En aquestes cèl.lules té lloc l'expressió de gens com *CLV1*, *CLV3*, *WUS*, *STM* i *ASI*; alhora que té lloc l'inici dels primordis en zones específiques. Per exemple, l'expressió del gen *REVOLUTA (REV)* anuncia el lloc d'inici d'un meristem floral (Otsuga *et al.*, 2001), o l'expressió d'*AINTEGUMENTA (ANT)* en la zona perifèrica indica el lloc on s'iniciarà un primordi (Elliot *et al.*, 1996). En la figura 1.20 es pot observar els diferents patrons d'expressió dels diferents gens involucrats en l'origen i organització del meristem apical.

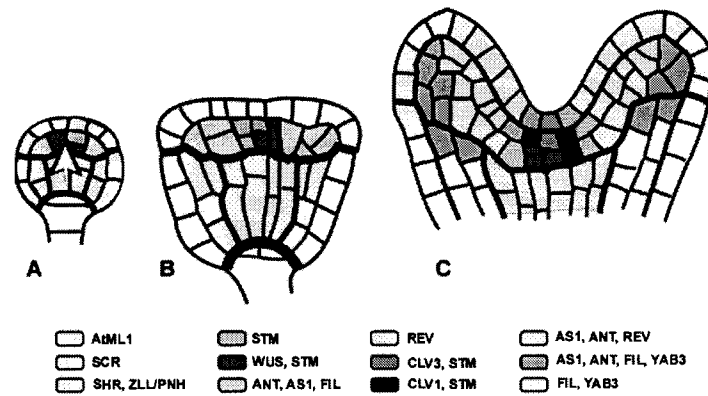


Figura 1.20. Esquema dels diferents dominis involucrats en l'origen i organització del meristem apical primari. **A:** Embrió globular. El gen *AtML1* s'expressa en les regions apical i central (en groc). La fletxa indica el senyal des de la regió central situant els primordis meristemàtics. **B:** Embrió en l'estadi de transició. Presenta aproximadament el mateix patró d'expressió al de l'embrió globular. **C:** Embrió en l'estadi de cor. L'expressió de *CLV1* i *CLV3* es solapen en el meristem apical. En els primordis cotiledonars, s'observen els dominis d'expressió gènica adaxial (*REV*) i l'abaxial (*FIL*, *YAB3*). De Jürgens (2001).

S'han identificat alguns gens que codifiquen per proteïnes RLKs implicades en l'embriogènesi d'*Arabidopsis*. A continuació es comenten els estudis realitzats amb els gens *SERK* i *ERECTA*. El gen *CLAVATA* codifica per un RLK implicat també en l'embriogènesi d'aquesta dicotiledònia s'explicarà en l'apartat 3.4.1.

En l'estudi molecular del procés de l'embriogènesi cal destacar el clonatge del gen *SERK*, que codifica per un RLK implicat en la formació de cèl.lules embrionàries. En un cultiu cel.lular, només una proporció de cèl.lules somàtiques poden ser induïdes a un canvi de destí cap a l'embriogènesi per l'aplicació exògena d'auxina (Schmidt *et al.*, 1997). Aquestes cèl.lules anomenades competents donaran lloc a cèl.lules embriogèniques a partir de les quals es desenvoluparan embrions somàtics (Toonen *et al.*, 1993). La caracterització d'un gen que s'expressa en les cèl.lules competents d'un cultiu cel.lular de pastanaga va permetre la identificació d'un nou RLK-LRR, anomenat *DcSERK* (*Daucus carota Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) (Schmidt *et al.*, 1997). Durant l'embriogènesi zigòtica, *DcSERK* s'expressa a l'inici de l'embriogènesi fins a l'estadi globular (Schmidt *et al.*,

1997). DcSERK presenta dos motius conservats en el domini extracel·lular a part dels 5 LRR: un domini ric en prolines amb dues còpies en tandem del motiu Ser-Pro-Pro (SPP) i un domini *leucin-zipper* (Schmidt *et al.*, 1997). Mitjançant un crivellat d'una llibreria de cDNA amb la sonda de *DcSERK* es va obtenir l'homòleg en *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (Hecht *et al.*, 2001). *AtSERK* conté totes les característiques estructurals de *DcSERK* i, com *DcSERK*, presenta un domini quinasa actiu serina/treonina (Shah *et al.*, 2001a, 2001b). *AtSERK* s'expressa durant la formació de cèl·lules embrionàries en cultius cel·lulars, en les primeres etapes de l'embriogènesi fins a l'estadi de cor i s'observa una lleugera expressió en teixits vasculars de la planta adulta (Hecht *et al.*, 2001). Tot i que la sobreexpressió de *AtSERK1* no dona lloc a cap alteració fenotípica, aquestes plàntules tenen més eficiència per a l'inici de l'embriogènesi somàtica suggerint que l'augment de *AtSERK* és suficient per induir l'embriogènesi en cultiu. Hech i col·laboradors (2001) proposen, doncs, que *AtSERK* podria tenir un paper en la via de senyalització de l'embriogènesi.

Mitjançant una búsqueda en les bases de dades, s'han pogut identificar 4 gens similars a *AtSERK1* (*AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4* i *AtSERK5*). Per altra banda s'han identificat dos gens similars a blat de moro anomenats *ZmSERK1* i *ZmSERK2* (Baudino *et al.*, 2001). Aquests gens de blat de moro presenten les característiques estructurals i genòmiques de la família SERK. *ZmSERK1* s'expressa preferentment als teixits reproductius masculins i femenins, amb una forta expressió en microspora; mentre que *ZmSERK2* té una expressió ubica (Baudino *et al.*, 2001).

L'estudi de mutants del tipus *erecta* (*er*) va permetre clonar el gen *ERECTA* que codifica un RLK-LRR (Torii *et al.*, 1996). Mutants *erecta* presenten un fenotip d'inflorescències compactes per una reducció en la llargada dels internodes i els pedicels. Les anàlisis del patró d'expressió d'*ERECTA* mitjançant hibridacions *in situ*, van mostrar una major acumulació d'aquest gen en el meristem apical i floral i en els primordis (Yokoyama *et al.*, 1998). Mutants *erecta* no presenten canvis en el nombre o en la mida de les cèl·lules del meristem floral, sinó una reducció en la llargada dels internodes. L'internode es deriva de les cèl·lules meristemàtiques i se situa just a sota del meristem apical. La divisió i elongació d'aquesta regió és la responsable de la llargada internodal. Així, *ERECTA* s'acumula en cèl·lules que estan predestinades a dividir-se per a desenvolupar l'internode. Tot i que la

caracterització fenotípica d'al·lels mutants suggereix un paper d'*ERECTA* en la regulació de la formació d'òrgans en el meristem apical, fins ara no s'ha estudiat el possible mecanisme implicat en aquest procés.

3.1.2 L'embriogènesi del blat de moro.

A diferència dels embrions de les plantes dicotiledònies, com *Arabidopsis*, el blat de moro presenta una embriogènesi més complexa que dona lloc a la formació d'un embrió més gran i amb estructures de la planta adulta ja ben diferenciades podent ser considerat com una planta en miniatura (Clark *et al.*, 1991). L'embrió de blat de moro presenta de 4 a 6 primordis foliars (figura 1.21) dependent del genotip abans d'entrar en l'etapa de dormància, aquestes fulles embriogèniques es mantenen enrotllades en el coleòtil fins que té lloc la germinació (Bommert i Werr, 2001).

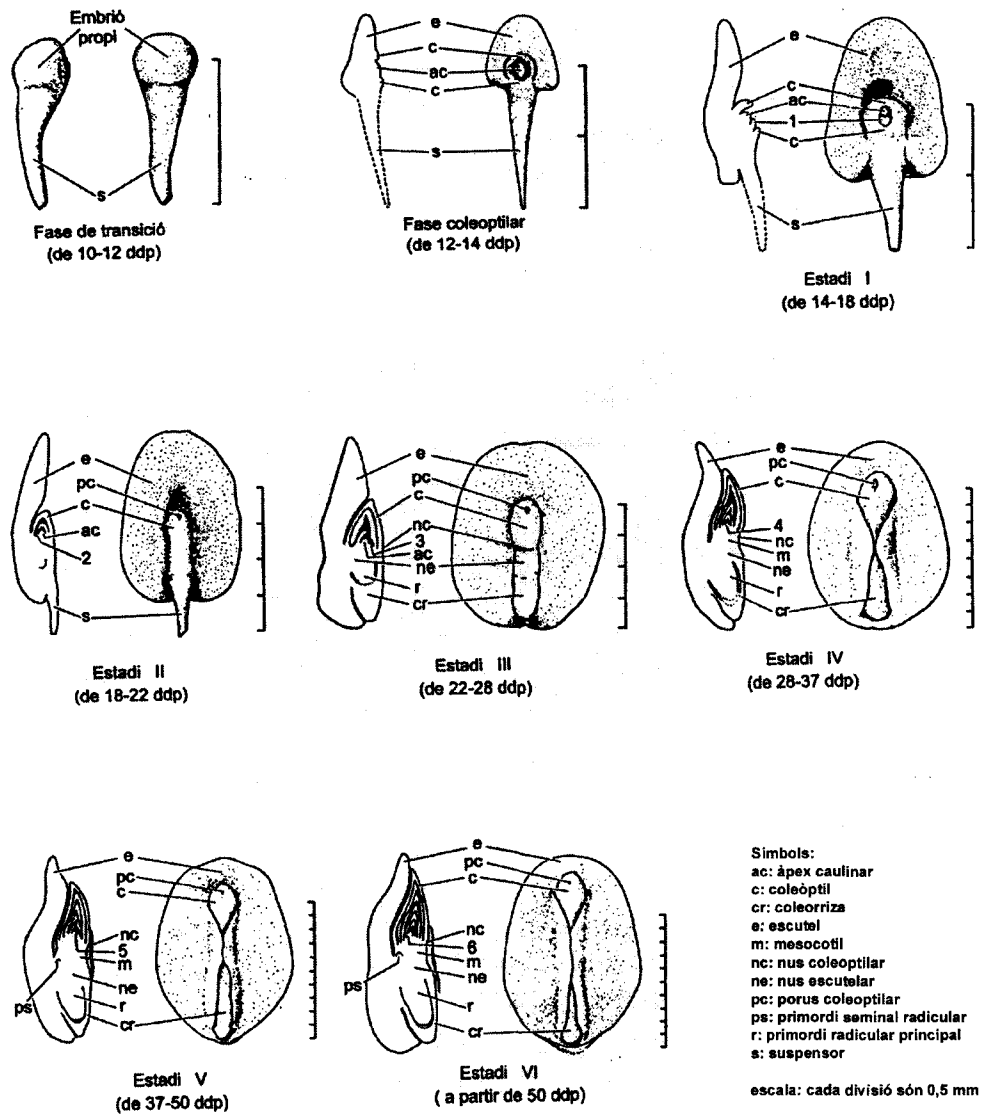
El cicle d'embriogènesi del blat de moro té lloc durant 60 dies i es divideix en tres fases (Abbé *et al.*, 1954). En la primera fase s'estableix l'asimetria apical-basal de l'embrió dividint-se en dos zones: el suspensor i l'embrió propi i compren del 0 al 7 DAP (*days after pollinization*). Durant el segon període (7-11 DAP) apareix la simetria radial i es diferencia l'eix embrionari, l'escutel i els meristems. En la tercera fase s'estableixen les estructures vegetatives (figura 1.21).

A l'inici de l'embriogènesi, la divisió del zigot és transversal, igual que en *Arabidopsis*, originant una cèl.lula apical que formarà l'embrió propi i una cèl.lula basal que originarà el suspensor. A diferència d'*Arabidopsis*, però, les següents divisions són irregulars tant en seqüència com en orientació, pel que no és possible seguir el destí d'un llinatge cel.lular (Steeves *et al.*, 1989). Als 7-8 dies després de la polinització, en la fase de transició, l'embrió es comença a diferenciar i apareix l'epidermis. Cap als 9-12 DAP s'estableix l'eix embrionari donant lloc als meristems apical i radicular. Durant la fase coleoptilar, les cèl.lules que no formen part de l'eix embrionari es divideixen formant l'escutel i s'origina el coleòtil (Randolph, 1936; Abbe *et al.*, 1954). Posteriorment, l'embrió continua desenvolupant-se en els estadis I-VI caracteritzats per l'aparició dels respectius primordis foliars.

Una diferència significativa respecte *Arabidopsis*, és la important funció de l'endosperm en els cereals per l'emmagatzematge de proteïnes i midó. En el blat de moro l'endosperm no és un teixit transitori que desapareix en les darreres etapes de l'embriogènesi, si no que es manté en la llavor fins a la maduració (Bommert i Werr, 2001). Després de la fertilització, la cèl.lula triploide pateix una sèrie de divisions sense citoquinesi produint un gran nombre de nuclis lliures que queden organitzats a la perifèria de la cèl.lula central. La cel.lularització de l'endosperm comença en l'estadi de 1000 nuclis i l'activitat cel.lular continua fins als 45-55 dies després de la polinització, produint un elevat augment de la seva mida fins a més de 200 mg de pes fresc (Sheridan *et al.*, 1987).

Les funcions i els destins de l'embrió i l'endosperm són clarament independents. Els programes de desenvolupament específics de l'embrió i l'endosperm poden ser conseqüència de la dosi genètica (triploidia de l'endosperm) o bé d'una diferent contribució maternal entre la cèl.lula ou o la cèl.lula central (Bommert i Werr, 2001). En el blat de moro, hi ha mutacions que afecten només al desenvolupament de l'embrió que s'anomenen mutants *emb* (Clark *et al.*, 1991) i d'altres que afecten tant a l'embrió com a l'endosperm, mutants *dek* (*defective kernel*). Aquest fet, suggereix que tot i el diferent desenvolupament que presenten l'embrió i l'endosperm hi ha processos que es troben controlats sota un mateix tipus de mecanisme genètic (Dolfini *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1991).

Figura 1.21. (pàgina següent). Representació esquemàtica del diferents estadis de l'embriogènesi del blat de moro. Per cada estadi es mostra una tall lateral (esquerra) i un tall frontal del mateix embrió (dreta). Les fulles s'indiquen amb números seguint l'ordre en que es van formant. Cada divisió és de 0,5mm. Adaptat de Río (1999).



A nivell molecular s'han caracteritzat alguns gens marcadors de determinats dominis cel·lulars (figura 1.22), tot i que el seu estudi és més complex que en el cas d'*Arabidopsis* a causa de les divisions irregulars que pateix l'embrió que fan impossible traçar el destí d'un grup cel·lular. Per exemple el gen *ZmHOX* (*Zea mays homeobox*) és un gen marcador de l'embrió propi que es detecta al 6 DAP (Klinge *et al.*, 1995) el transcrit del qual és absent

en les cèl·lules del suspensor. S'han descrit també gens marcadors de l'establiment del patró radial i que han ajudat a la caracterització d'aquest procés. En la figura 1.22 es poden observar diferents gens marcadors del protoderm, la capa cel·lular que donarà lloc a l'epidermis. El gen *LTP2* (*lipid transfer protein 2*) implicat en el transport lipídic (Sossountzov *et al.*, 1991) o els gens de la família de factors de transcripció *ZmOCL* (*outer cell layer*) que estan relacionats amb el gen *AtML1* d'*Arabidopsis* marcadors de la capa cel·lular epidèrmica.

En l'estadi de transició es distingeixen histològicament les cèl·lules que establiran l'eix embrionari, un conjunt de cèl·lules riques de citoplasma a la zona adaxial de l'embrió propi (Bommert i Werr, 2001). En aquest grup de cèl·lules apareix l'activitat del gen *Knotted 1* (*KN1*) (Smith *et al.*, 1995). Més tard, el mRNA de *KN1* es manté en el sistema vascular i en el meristem apical, mentre que no es presenta en el meristem de la rel (figura 1.22F). El gen *KN1* és un bon marcadors del meristem apical. En l'estadi 1, el gen *KN1* no es detecta en la capa L1, tot i que si que s'observa acumulació de proteïna *KN1* en aquestes cèl·lules (Jackson *et al.*, 1994). Estudis de microinjecció han demostrat que tot i que la proteïna *KN1* és un factor de transcripció nuclear, és transportada intercel·lularment de la capa L2 a la L1 a través dels plasmodesmes (Lucas *et al.*, 1995). El paper del gen *KN1* en l'embriogenès del blat de moro ha estat molt ben caracteritzat, i s'en fa referència més endavant en l'apartat 3.4.1.

En el blat de moro s'ha descrit el gen *CRINKLY4* (*CR4*) que codifica per un RLK que controla la diferenciació cel·lular particularment en l'epidermis de la fulla i en l'aleurona, la capa monocel·lular que envolta l'endosperm implicada en la secreció d'enzims proteolítics (Becraft *et al.*, 1996). Hibridacions *in situ* mostren una expressió de *CR4* en el meristem apical i en els primodis foliars (Becraft *et al.*, 2001). Llavors mutades en el gen *CR4* presenten una aleurona en forma de mosaic on l'endosperm no es diferencia en aleurona, suggerint que *CR4* podria estar involucrat en la percepció posicional que especifica l'entrada cap a la diferenciació de l'aleurona a través del desenvolupament de l'endosperm (Becraft *et al.*, 2000). En les fulles i altres òrgans de la tija els efectes més marcats del mutant s'observen en l'epidermis (Becraft *et al.*, 1996; Jinn *et al.*, 2000). Una anàlisi genètica de mosaic, és a dir, analitzant individus formats per cèl·lules mutants i salvatges,

va mostrar que CR4 regula de manera autònoma la morfogènesi cel.lular, implicant que la transducció de senyal a través de CR4 regula la diferenciació cel.lular per la seva funció intracel.lular i no per la producció de senyals intercel.lulars secundaris (Becraft *et al.*, 2001).

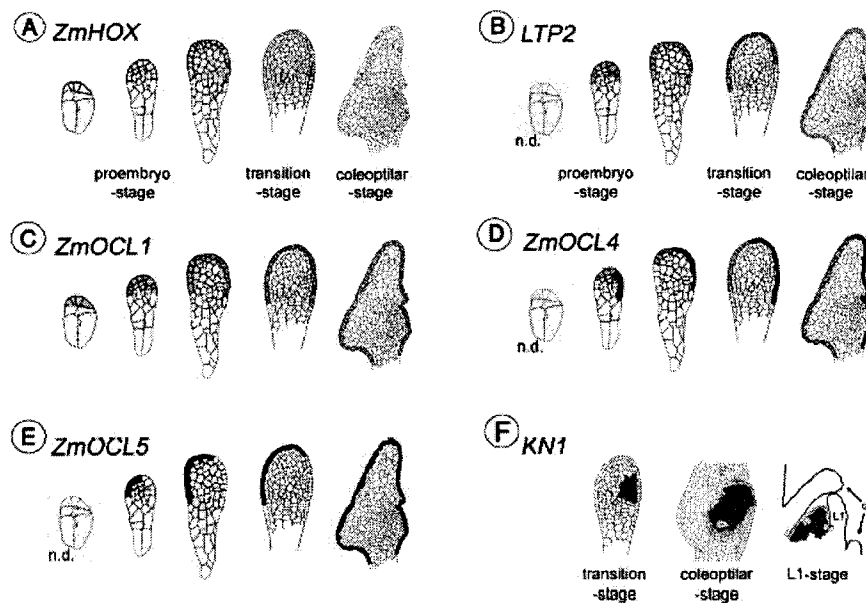


Figura 1.22. Expressió gènica en seccions longitudinals de l'embrió de blat de moro en l'estadi de pro-embrió, de transició i coleoptilar. A: Dominis d'expressió del gen ZmHOX. B: LTP2. C: ZmOCL1. D: ZmOCL4. En taronja (part abaxial) es detecta una dèbil expressió, mentre que en la part adaxial (en vermell) es representa una forta expressió de ZmOCL4. E: ZmOCL5. F: KN1 també en l'estadi L1.

De Bommert i Werr (2001).

3.2 Els meristems.

Com s'ha vist en l'apartat anterior, l'embriogènesi és el primer procés on té lloc el desenvolupament i la morfogènesi dels òrgans de la planta. Tot i això, en les plantes superiors la majoria dels òrgans aeris de la planta adulta així com les estructures de la rel es formen durant el desenvolupament post-embriònic. Els meristems són els responsables de

la formació continuada de nous òrgans durant el desenvolupament post-embrionari. Els dos meristems primaris es formen durant l'embriogènesi en els extrems de l'eix embrionari i s'anomenen meristem apical (*shoot apical meristem*; SAM) i meristem radicular (*root apical meristem*; RAM). Mentre que el meristem apical origina les cèl·lules de nous òrgans com les fulles, la tija, els meristems secundaris i els florals, el meristem radicular produeix les estructures de la rel primària. Els meristems estan formats per dos tipus cel·lulars, les cèl·lules meristemàtiques centrals que romanen indiferenciades i les cèl·lules de la perifèria que es diferenciaran donant lloc als nous òrgans. La funció bàsica dels meristems és la de mantenir una població de cèl·lules mare en la zona central i la iniciació reiterativa de nous òrgans. En aquest treball ens centrarem en l'estructura i el manteniment del SAM, ja que a nivell molecular és un dels mecanismes de senyalització més ben conegut en plantes.

3.2.1 El meristem apical.

El meristem apical és una estructura altament ordenada que està organitzada en dos tipus de dominis solapats: capes i zones (Laufs *et al.*, 1998).

En les angiospermes, les cèl·lules més externes del meristem apical es divideixen sempre perpendicularment a la superfície, donant lloc a una organització en capes cel·lulars (Haecker *et al.*, 2001) (figura 1.23b):

- la capa més externa L1 (*Layer 1*) que forma l'epidermis del brot, les fulles i les flors es divideix exclusivament en plans anticlinals.
- la capa L2, just per sota de L1, origina els teixits subepidèrmics de la tija i els òrgans laterals. Les seves divisions són majoritàriament anticlinals, tot i que també en presenta de periclinals.
- la capa L3, on les cèl·lules es divideixen en tots els plans per donar lloc a la tija i als teixits interiors dels òrgans, com els teixits vasculars.

A *Arabidopsis*, com en moltes dicotiledònies, les capes L1 i L2 s'anomenen túnica i estan formades cadascuna per una única capa de cèl·lules. La capa L3 també rep el nom de corpus i està formada per 2-3 capes cel·lulars (Laufs *et al.*, 1998). Aquestes capes estan molt ben definides i les cèl·lules de cada capa tenen un origen clonal (Doerner, 1999). Tot i aquesta aparent separació clonal dominant en el desenvolupament, hi ha moltes evidències

en plantes quimèriques que mostren com el desenvolupament cel.lular té lloc d'acord amb la seva posició i no segons el seu origen (Haecker *et al.*, 2001). Per exemple, si una cèl.lula de la capa L1 és desplaçada a la capa subepidèrmica, es desenvoluparà com una cèl.lula subepidèrmica (Stewart *et al.*, 1970). Les tres capes participen en el creixement i diferenciació dels nous òrgans i, per tant, han d'estar coordinades. Aquesta coordinació implica un intercanvi de senyals entre les cèl.lules meristemàtiques. Estudis recents en *Arabidopsis* han demostrat l'existència d'un transport simplàstic entre les capes de la túnica a través de plasmodesmes (Gisel *et al.*, 1999; Rinne *et al.*, 1998), alhora que també es proposa una connexió via plasmodesmes entre la túnica i les cèl.lules que formen part del corpus (van der Schoot *et al.*, 1999).

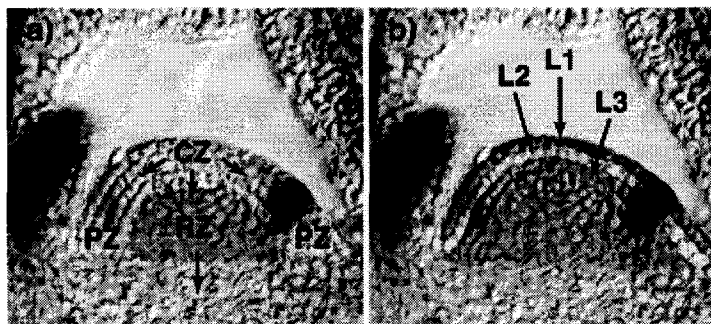


Figura 1.23. Organització del meristem apical d'*Arabidopsis*. **a)** Organització en zones. **CZ:** zona central. **RZ:** zona de suport. **PZ:** zona perifèrica. **b)** Organització en capes cel.lulars. **L1:** capa epidèrmica. **L2:** capa subepidèrmica. **L3** o corpus formada per 2 o 3 capes. De Bowman and Eshed (2000).

Segons estudis morfològics i histològics el meristem es pot dividir en tres zones (Lyndon RF, 1998; Steeves *et al.*, 1989) (figura 1.23a):

- La zona central (ZC), situada en el centre del meristem formada per les cèl.lules mare que presenten una taxa de divisió baixa. Són cèl.lules més grans, amb un nucli prominent i més vacuolades que la resta. Aquestes cèl.lules donen lloc a dos tipus de cèl.lules, aquelles que renoven la població de cèl.lules indiferenciades i que mantenen la zona central i les que es diferencien en diferents tipus cel.lulars. Les cèl.lules de la zona central o pluripotents poden ser substituïdes per cèl.lules veïnes suggerint que no són permanents (Ruth *et al.*, 1985), si

no que s'especialitzen com a cèl.lules de la zona central per la posició que ocupen en el meristem on reben una combinació de senyals de les cèl.lules del voltant (Haecker *et al.*, 2001).

- La zona perifèrica (ZP) envolta la zona central i està formada per cèl.lules més petites que es divideixen activament per iniciar la formació dels òrgans laterals.
- La zona de suport (*rib zone*; RZ) es troba situada en la base del meristem apical. Aquestes cèl.lules també es divideixen activament produint la major part dels teixits de la tija.

3.2.2 Control del manteniment del meristem apical. La via de transducció de CLAVATA.

Una de les propietats del meristem apical és la de mantenir la seva mida constant durant tota la vida de la planta. Les cèl.lules meristemàtiques contínuament valoren les seves posicions relatives respecte a les altres cèl.lules decidint si es diferencien o no. Per tant, les interaccions entre les poblacions cel.lulars en els meristems són crítiques per definir quines cèl.lules es diferenciaran per formar les diferents estructures (Irish *et al.*, 2001). Aquest procés de senyalització en les cèl.lules meristemàtiques està molt ben caracteritzat. Mutants d'*Arabidopsis* que han perdut la població de cèl.lules indiferenciades de la zona central o que acumulen ectòpicament cèl.lules indiferenciades han permès la descripció dels reguladors de l'organogènesi. Molts d'aquests gens s'han clonat i han revelat la seva participació en una via de transducció del senyal, la via de CLAVATA.

La diferenciació de les cèl.lules de la zona central en el meristem apical està regulat pels gens *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2* i *CLV3*) (Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Kayes *et al.*, 1998). Anàlisis genètiques mostren que les funcions d'aquests gens estan relacionades en la mateixa via, doncs plantes mutants en qualsevol d'aquests loci acumulen progressivament cèl.lules mare indiferenciades. Els mutants *clavata* presenten un engrandiment dels meristems apical i floral. El meristem de *clv1* augmenta de manera contínua la seva mida fins arribar a un volum 1000 vegades superior als meristems salvatges (Clark *et al.*, 1997). Aquest augment és degut a l'acumulació contínua de cèl.lules indiferenciades (Clark *et al.*, 1993). En el meristem floral, l'aport continu de cèl.lules meristemàtiques genera uns verticilis més grans així com l'aparició de verticilis addicionals (Clark *et al.*, 1993).

CLV1 codifica per un RLK amb un domini extracel.lular amb dominis LRR (Clark *et al.*, 1997). Assajos de fosforilació amb el domini quinasa de *CLV1*, demostren l'activitat quinasa en cèl.lules d'*Escherichia coli*. Tot i que sembla, doncs, que *CLV1* actua com un receptor quinasa no es coneix el mecanisme pel qual *CLV1* podria interaccionar amb proteïnes intracel.lulars (Clark, 2001). A partir d'extractes d'*Arabidopsis*, *CLV1* es purifica en complexos de 185 i 450 kDa (Trotouchaud *et al.*, 1999).

CLV2 codifica per un receptor amb un domini extracel.lular similar al de *CLV1* però no presenta domini intracel.lular. Anàlisis genètiques han demostrat que *CLV2* és necessària per l'acumulació de *CLV1* (Jeong *et al.*, 1999). Possiblement aquests dos receptors interaccionen entre ells formant un heterodímer que podria correspondre al complex de 185 kDa, ja que *CLV1* té 105 kDa i *CLV2* 80 kDa.

CLV3 codifica per un petit polipèptid de 96 aminoàcids que conté un suposat pèptid senyal secretor (Fletcher *et al.*, 1999) sembla està present a la planta com un complex soluble (Trotouchaud *et al.*, 2000). *CLV3* és necessària per a la formació del complex actiu de *CLV* (complex de 450 KDa), doncs en absència de *CLV3*, *CLV1* només es detecta en la forma inactiva de 185 kDa (Trotouchaud *et al.*, 1999). Estudis de sobreexpressió demostren que *CLV3* actua més amunt de la via que *CLV1* (Brand *et al.*, 2000) mentre que experiments bioquímics *in vivo* i en cultius cel.lulars han demostrat que *CLV3* es lliga a *CLV1* (Trotouchaud *et al.*, 2000). Tots aquests resultats suggereixen un mecanisme d'acció on el polipèptid *CLV3* indueixi la formació i activació de l'heterodímer *CLV1-CLV2* per transduir el senyal a l'interior de les cèl.lules (figura 1.24).

Respecte al complex de 450 kDa s'ha demostrat que depèn de l'activitat quinasa de *CLV1*, ja que en plantes on s'ha mutat el domini quinasa s'observa una disminució o desaparició (segons el percentatge de la pèrdua de funció quinasa) d'aquest complex. Algunes proteïnes intracel.lulars de la via de transducció de clavata han sigut identificades. La proteïna KAPP (*Kinase-associated protein phosphatase*) fou la primera proteïna identificada capaç d'interaccionava amb *CLV1* (Stone *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1997). KAPP conté tres dominis: una senyal d'unió tipus I, un domini d'interacció a quinasa i un domini funcional fosfatasa del tipus 2C. La interacció entre KAPP i *CLV1* s'ha demostrat *in vivo* en el complex de 450 kDa (Trotouchaud *et al.*, 1999). La presència del domini fosfatasa recolza la hipòtesi que KAPP regula negativament a *CLV1*, hipòtesi que s'ha demostrat per estudis

genètics (Williams *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1998). Un altre component conegut del complex de CLV1 de 450 kDa és una proteïna Rho/Rac-GTPase-related. Aquesta proteïna pertany a una família de petites GTPases anomenada ROP de la superfamília Ras, que presenta similituds amb proteïnes animals Rho/Rac (Winge *et al.*, 2000). La funció precisa de ROP en la via de transducció de CLV no es coneix. No obstant, estudis en sistemes animals han demostrat que la proteïna RhoA pot regular l'expressió de gens diana nuclears a través de la cascada de MAPK (Marinissen *et al.*, 2001).

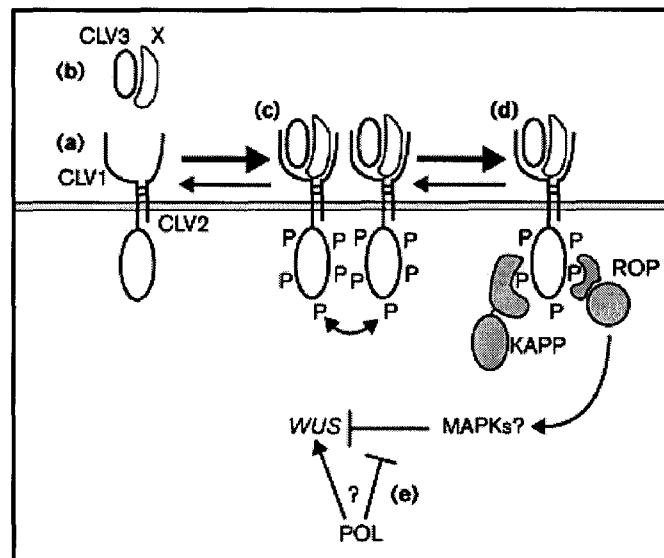


Figura 1.24 . Model de la via de transducció de CLV1. El model prediu que en l'heterodímer CLV1-CLV2 (a) s'hi uneix un multímer CLV3 (b). Aquesta interacció lligand-receptor provoca la transfosforilació del domini químic de CLV1 (c). Els residus fosforilats actuen com a llocs d'unió directes o indirectes d'efectors com les proteïnes KAPP i ROP (d). La via de transducció del senyal no es coneix (MAPKs?). Al final de la via de senyalització, aquest senyal inactiva l'expressió del gen WUS, alhora que seria regulat negativament per POL (e). De Clark (2001).

Contràriament a la funció dels gens *clavata*, el gen *WUSCHELL* (*WUS*) es requereix per promoure la proliferació cel.lular en el meristem apical. Mutacions *wus* provoquen un meristem diferenciat sense capacitat de proliferar (Irish *et al.*, 2001). Els mutants *wus* perden les cèl.lules de la zona central i en el seu lloc, en el centre del meristem apical,

s'observa una població de cèl.lules vacuolades i parcialment diferenciades (Laux *et al.*, 1996). Per tant, sembla que *WUS* és necessari pel manteniment del meristem apical. El gen *WUS* codifica per un putatiu factor de transcripció homeòtic (Mayer *et al.*, 1998).

Diferents resultats suggereixen que *WUS* és un dels gens diana de la via de clavata. La primera evidència fou l'observació que els efectes de la mutació *wus* són epistàtics dels fenotips *clv*, *clv2* i *clv3*, indicant que la funció de *WUS* es troba més avall en la via de transducció dels gens de *CLV* (Laux *et al.*, 1996). Més recentment, dos estudis han demostrat la regulació entre aquests dos loci.

La sobreexpressió de *CLV3* provoca la pèrdua d'expressió de *WUS* i la conseqüent pèrdua de la capacitat proliferativa del meristem (Brand *et al.*, 2000). Per altra banda, la sobreexpressió de *WUS* dona lloc a una expansió del domini de *CLV3* (Schoof *et al.*, 2000) provocant un engrandiment dels mutants *clv* indicant que la via *CLV* suprimeix *WUS* a nivell transcripcional. Aquests resultats permeten postular un model on *CLV3* i *WUS* mantenen el balanç dels diferents tipus cel.lulars en el meristem apical per un *loop feedback*. *WUS* promou la proliferació cel.lular mantenint les cèl.lules mare (i l'expressió de *CLV3*) en un grup de cèl.lules adjacent al seu domini d'expressió, mentre que *CLV3* reprimeix l'efecte de *WUS* restringint la seva expressió a unes poques cèl.lules (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000).

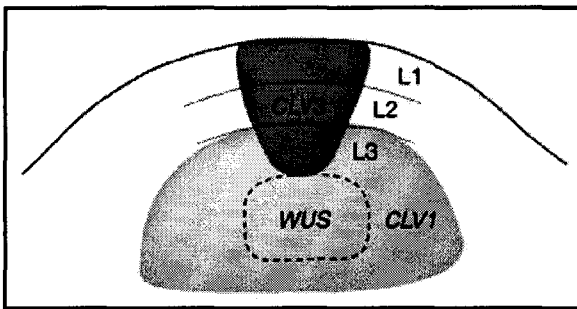


Figura 1.25. Esquema dels dominis d'expressió dels gens *CLV1*, *CLV3* i *WUS* en la zona central del meristem apical. De Haecker *et al.* (2001).

S'ha descrit un possible mecanisme on es reflexen les relacions funcionals entre els gens *CLV1*, *CLV3* i *WUS* i els patrons d'expressió d'aquests gens en el meristem apical. Plantes transgèniques que expressen de manera ubiqua *CLV3* donen lloc a una fenocòpia del mutant *wus*, demostrant que l'activitat de *CLV3* és suficient per reprimir *WUS* (Brand *et al.*, 2000). Això implica que la funció de *CLV3* ha de limitar la repressió de *WUS*. En la figura

1.25 s'observen els dominis d'expressió del gens *CLV1*, *CLV3* i *WUS*. *WUS* s'expressa en un petit grup de cèl.lules localitzades en la part central per sota de la capa L3 que s'ha anomenat centre organitzador (OC). *CLV1* s'expressa en la majoria de cèl.lules de la capa L3 i *CLV3* s'expressa en les capes L1 i L2. En la figura 1.26 es pot observar el model proposat que permet explicar tant la funció de lligand de *CLV3* com la repressió de l'expressió *WUS*. *CLV3* difondria de les cèl.lules apicals cap a les cèl.lules del domini *CLV1* donant lloc a una regulació negativa de *WUS*. Hi ha d'haver, però, una limitació de l'expansió de *CLV3*, ja que en les cèl.lules del domini *WUS* no es detecta senyal de *CLV3*. En el desenvolupament animal hi ha varis exemples on la concentració de receptor és suficient per reclutar el lligand de l'espai extracel.lular, limitant d'aquesta manera la seva difusió (Casanova *et al.*, 1993). Aquest procés es coneix amb el nom de segrest del lligand. Donant suport a aquest model, el 75% del total de proteïna *CLV3* en extractes de meristem de col-i-flor s'ha trobat associada a *CLV1* (Trotouchard *et al.*, 2000). Per altra banda, en un experiment on s'ha doblat el n° de còpies gèniques de *CLV3* no ha sigut suficient per traspasar la barrera i reprimir *WUS* en la zona OC (Brand *et al.*, 2000), suggerint que el domini d'expressió de *WUS* (OC) està protegit del senyal *CLV3* per un gran excés de llocs d'unió.

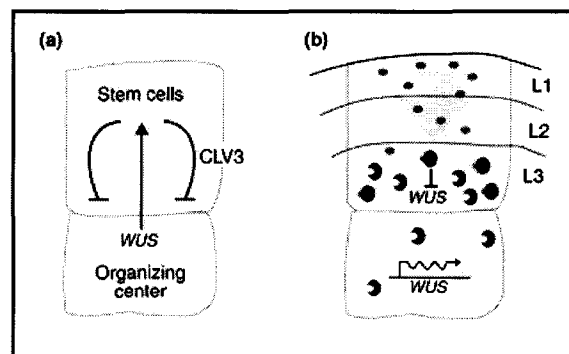


Figura 1.26. Senyalització entre cèl.lules meristemàtiques. **a)** L'expressió de *WUS* en el centre organitzador (OC) promou un senyal, encara no identificat, que provoca l'especialització de les cèl.lules superiors com cèl.lules mare. Les cèl.lules mare retornen el senyal *CLV3* restringint la mida d'OC. **b)** Model de protecció de l'OC del senyal *CLV3*. La unió de *CLV3* (punts vermells) al complex *CLV1* (en blau) dona lloc a una repressió de *WUS* en la capa L3. Un excés del complex

Introducció

receptor *CLV1* preveu que *CLV3* migri cap a la zona de l'OC, permetent l'expressió de *WUS* en aquesta zona.

De Haecker et al. (2001).

Un altre possible gen diana de la via de transducció de clavata podria ser el producte del gen *POLTERGEIST (POL)*. Mitjançant un crivellat d'al·lels supressors de *clv1* i *clv3* es va poder identificar el gen *POLTERGEIST (POL)* que sembla actuar com un regulador negatiu de la via de clavata (Yu et al., 2000). Mutacions *pol* semidominants suprimeixen el fenotip dels mutants *clv*, indicant que la funció de *POL* tindria lloc més avall de la via de *CLV* com un regulador negatiu. Per altra banda, les mutacions *pol* i *wus* mostren interaccions dominants, però *pol* no presenta un fenotip per si sol, suggerint que podria actuar de manera redundant amb *WUS*.

S'ha descrit un altre gen, el *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* que també està implicat en el manteniment del meristem apical. Els mutants *stm*, com els *wus*, no presenten cèl·lules mare. Pel moment, les relacions entre els gens *STM*, *CLV* i *WUS* no són clares. Els diferents mutants *stm* presenten un diferent grau fenotípic segons l'alteració de l'al·lel. Així, en al·lels dèbils o intermitjos, una petita població de cèl·lules centrals meristemàtiques és capaç de produir primordis ectòpics i posteriorment aquestes cèl·lules desapareixen (Endrizzi et al., 1996). La interacció gènica dels mutants *stm* amb *clv* divergeix a la interacció entre *wus* i *clv*. Els al·lels *wus* són epistàtics per les mutacions *clv*, però els dobles mutants *clv stm* presenten un fenotip additiu, suggerint que aquests gens funcionen competitivament (Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). La dificultat per entendre i definir les inter-relacions entre *STM* i *CLV/WUS* podria estar indicant que *STM* podria tenir múltiples funcions (Long et al., 1998). La proteïna codificada per *STM* és una proteïna homeòtica de la família *KNOTTED (KN1)*.

L'homòleg de *STM* en blat de moro, el gen *KNOTTED (KNI)* ha estat molt ben caracteritzat (Sinha et al., 1993). *KNI* s'expressa en el meristem apical i al sistema vascular, mentre que no es detecta als òrgans laterals (Jackson et al., 1994). El paper de *KNI* en el desenvolupament s'ha estudiat en mutants *kn1*. L'expressió ectòpica de *KNI* té com a conseqüència la formació de meristems de manera aleatòria sobre les fulles o sobre

el coleòptil (Sinha *et al.*, 1993), i els mutants de pèrdua de funció no mantenen la integritat del meristem (Kerstetter *et al.*, 1997). En gen *KN1*, doncs, té la funció de proporcionar identitat meristemàtica a les cèl·lules on s'expressa i es veu silenciada a les cèl·lules diferenciades (Kerstetter *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 1993).

Recentment s'ha descrit el gen *Brostm* a *Brassica oleracea*, un KNOTTED-like, que s'indueix en resposta a l'addició de citoquines en el medi. El transcrit *Brostm* es manté fins a la formació *de novo* de meristems (Teo *et al.*, 2001).

La gran majoria de dades moleculars sobre la funció dels meristems fan referència a la planta model d'*Arabidopsis*, mentre que se'n sap molt poc si aquests mecanismes estan o no conservats en altres espècies. En aquest sentit, recentment s'ha descrit un mutant en blat de moro anomenat *fasciated ear2 (fea2)* (Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001). *fea2* s'expressa àmpliament en teixits vegetatius immadurs i inflorescències, mentre que és reprimida en teixits de fulla i no s'expressa en arrel. Durant el desenvolupament vegetatiu l'expressió de *fea2* no mostra cap fenotip en la filotaxi o en el desenvolupament de la fulla, pel que es desconeix la seva funció o en quin mecanisme podria estar implicat. Per altra banda, les plantes *fea2* presenten un increment del nombre d'òrgans florals que és conseqüència d'un engrandiment dels meristems florals (Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001). Les flors masculines presenten un increment del número d'estams i les femenines del número de carpels. Les plantes *fea2*, alhora, tenen uns pedicels més llargs, fenotip que coincideix amb el dels mutants *clv2* (Kayes *et al.*, 1998). *FEA2* codifica una proteïna transmembrana amb LRR que presenta similitud de seqüència amb *CLV2*. Aquestes dades suggereixen, doncs, que la via de transducció de *CLAVATA* d'*Arabidopsis* podria estar funcionalment conservada en les espècies monocotiledònies. Recolzant aquesta hipòtesi, en arròs s'ha identificat un gen relacionat a *CLV1*, *OsLRK1* (Kim *et al.*, 2000). Plantes antisentit pel gen *OsLRK1* desenvolupen un increment en el número d'òrgans florals, tot i que la mida dels meristems no ha estat mesurada. No s'ha pogut identificar un fenotip clar del meristem de la inflorescència en l'expressió de l'antisense de *OsLRK1*, el que podria suggerir un funcionament diferents al de *CLV1*. Tot i això, no està clar si aquestes plantes perden totalment la funció del gen *OsLRK1* i, per tant, l'aïllament del mutant nul és necessari per arribar a una conclusió i poder determinar la funció de *CLV1* en les monocotiledònies.

2. Objectius



Durant els darrers anys al laboratori s'està portant a terme un projecte per a caracteritzar gens que s'expressen en les primeres etapes de l'embriogènesi del blat de moro. Per aïllar gens d'expressió diferencial en aquesta etapa es van seguir diverses aproximacions. Una d'elles fou l'estudi de mutants *Dek* per la inserció de l'element *Ac*, mitjançant la qual es van obtenir els mutants *Lachrima* i *Longcell*, que s'estan caracteritzant en el laboratori (Stiefel *et al.*, 1999; Graciano *et al.*, submitted). Una altra aproximació fou un crivellat diferencial de fulla i embrió, a partir del qual es va obtenir un conjunt de gens d'expressió preferent a l'embrió. Entre ells, es va clonar un clon parcial amb similitud a proteïnes RLK (*Receptor Like-Kinase*) del tipus LRR (*Leucine-rich repeat*) (Roca, 1998; Río, 1999). Posteriorment aquest clon es va anomenar MARK per *Maize Atypical Receptor Kinase*. En la figura 2.1 es presenta la seqüència de completa de la proteïna MARK. La proteïna conté un possible domini extracel.lular, amb sis repeticions riques en leucina (LRR), un domini transmembrana (TM) i un possible domini intracel.lular que presenta els 11 subdominis conservats de les serina/treonina quinases (KD).

```

1  MRSPPPPWR  AGRLLHSPLPM  LLLFVAALAA  RAGADDLASD
41  ARALLAFRDA  VGRRLTWNAS  DVAGACSWG  VSCENGRVAV

81  LRLPGATLSG  AVPAGTLGN  LTALHTLSRL  NGLSGALPAD
121  LASAAALRNV  FLNGNRLSG  GFPQAILALPA  LVRLSLGGND  LRR
161  LSGPIPAELG  SLTHLRVLL  ENNRFSGEIS  DVKLPPLQOF
201  NVSFNQLNGS  IPASLRS

218  QPR  SAFLGTGLCG  GPLGPCPGEV
241  SPSAPAGQT  PSLTPVPSSG  GGNGSGSGSG  GTIGNGGSES
281  GHKNKLSGG  AIA

294  GIAIGSA  LGAGLLFLL  VCLC  TM
315  RRSGGT

321  RTRSEMPPP  EAPAAAAAG  GRKPEMTSG  AAVAPLTTIG
361  HPNAPIGQST  SGKLVFFGS  AAVAPFDLE  DLL

394  RASAEVL  GKGAFGTYK  AVLESGATVA
421  VKRLKDVTL  SBAFRERISE  IGELOHEFIV  PLRAYYSKD
461  EKLLVYDFMP  MGSLSAVLHG  NVSSGRTPLN  WDLRSSIALA
501  AARGVEYIHS  TTSTASHCNI  KSSNVLLGKS  YOARVSENGL  KD
541  TTLVGPSSSS  SRTTGYRAPE  VIDSRVSOX  ADVXSFGVLL
581  LELVTGKAPS  QAALNDEGVD  LPRWQSVNR  SEWGSLVFDM
621  ELMRHQTGEE  PMAQLVLLAM  DCTAQVPEAR  PSMARVVMRI
661  EEIKKSSVTP  NIEQVDDQSS  KAEEAAPT  PFAT

```

Figura 2.1 Seqüència completa de la proteïna MARK on es mostra el domini extracel.lular amb els LRR en gris, la regió transmembrana i el domini quinasa intracel.lular en blau.

Objectius

En el laboratori es van realitzar assajos de fosforilació *in vitro* del domini quinasa de MARK (MARK-KD). El resultat negatiu d'aquest assaig (veure figura 2.2A), va portar a analitzar en detall la seqüència aminoacídica de MARK-KD. Aquesta anàlisi va mostrar com alguns dels aminoàcids altament conservats en els dominis quinases i que es consideren essencials per a l'activitat quinasa, es trobaven substituïts. En la figura 2.2B es poden observar aquestes substitucions en els subdominis III, VIb i VII.

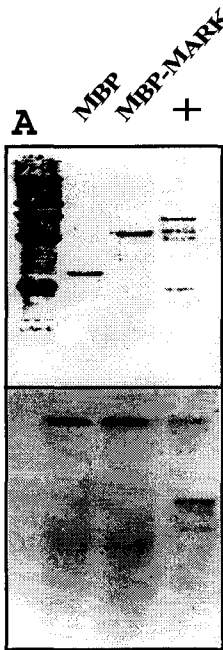


Figura 2.2. A: Assaig de fosforilació. En la part superior de la figura es presenta el gel SDS-PAGE tenyit amb Coomassie amb els marcadors de pesos moleculars en el primer carril, el control negatiu de la maltose-binding protein (MBP), la proteïna recombinant MBP-MARK i una proteïna quinasa control. **B:** Seqüències dels subdominis III, VIb i VII de diferents proteïnes RLKs.

B	III	VIb	VII	
CLV1	RSDHGFTA EI	LHRDVKSNNI	LLDSDFEAHV	ADFGLAKFL
SRK	QGIDEFMNEV	IHRDLKPGNI	LLDKYMIPKI	SDFGMARIF
RLK5	LNRDVFAAEV	VHRDVKSSNI	LLDSDYGAKV	ADFGIAKVG
CONS	E	D	DFG	
MARK	LSEAEFERRI	SHGNIKSSNV	LLGKSYQARV	SENGLTTLV

Aquesta característica de MARK també es troba en altres seqüències tant de plantes com d'animals. En plantes, en la base de dades existeixen varies seqüències EST tant d'arròs com d'*Arabidopsis* amb les mateixes característiques de MARK-KD, en la figura 2.3 se'n mostren algunes d'elles. Malgrat tot, només la proteïna d'*Arabidopsis* TMKL1 s'ha caracteritzat com un receptor que presenta un domini quinasa atípic (Valon *et al.*, 1993).

CONS	E	D		DFG
MARK	LSEAEFRERI	SHGNIKSSNV	LLGKSYQARV	SENGLTTLV
OJ991015	LTEPEFRDRI	SHGNIKSSNV	LLNKSYQARL	SDNGLSALV
OJ000107	LPEPEFRERI	SHGNIKSSNV	LLTKNYEARV	SDHGLPTLV
AC003105	ASKKEFETQM	VHGNIKASNI	LLHPNQDTCV	SDYGLNQLF
AB008270	VPEKEFERKL	SHGNIKSSNI	LLSESEFAKV	SDYCLAPMI
AB018111	ASKKEFEQQM	VHGDIKSSNI	LLTEDLEPCL	SDTSLVTLF
TMLK1	KDRSSCLPVI	IHGNIKSKNV	LVDDFFFARL	TEFGLDKIM
	III	Vib		VII

Figura 2.3 Seqüències dels dominis III, Vib i VII d'ESTs de plantes i de TMKL1 que presenten substitucions en els aminoàcids essencials per l'activitat quinasa.

En animals, com ja s'ha dit en la introducció d'aquest treball, també s'han descrit dominis quinasa amb característiques similars que són incapaçs de fosforilar *in vivo* tot i que, almenys en alguns casos, se sap que participen activament en la transducció del senyal. Per exemple, els receptors erbB3 o H-Ryk que s'ha proposat que poden participar en cascades de transducció del senyal a través de la interacció amb altres proteïnes.

És per això que, dins de l'estudi del mecanisme d'acció de MARK en aquest treball ens hem proposat una búsqueda de proteïnes que interaccionin amb MARK-KD. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball és la caracterització de proteïnes capaces d'interaccionar amb MARK-KD.

Objectius

Amb aquesta finalitat, ens vam proposar:

- la realització d'un crivellat de doble híbrid per tal d'obtenir cDNAs corresponents a possibles proteïnes d'interacció amb MARK-KD.
- l'anàlisi de la interacció entre MARK-KD i aquestes proteïnes per mitjà de diferents tècniques d'interacció proteïna-proteïna tant *in vitro* com *in vivo*.
- l'anàlisi de l'expressió dels gens corresponents a les proteïnes potencialment més interessants.

3. Resultats



1. Crivellat de doble-híbrid i anàlisi dels clons obtinguts.

Amb l'objectiu de buscar proteïnes capaces d'interaccionar amb el domini quinasa de MARK (MARK-KD) es va realitzar un crivellat d'una llibreria de doble híbrid de cDNA d'embrions de blat de moro de 7 dies després de la polinització (DAP), que va ser cedida pel Dr. Werr de la Universitat de Colònia. Aquesta tècnica permet l'anàlisi d'interaccions proteiques *in vivo* en cèl.lules de llevat (*Sacharomyces cerevisiae*). El crivellat es va dur a terme amb el domini quinasa de MARK (MARK-KD) i va permetre la identificació d'un conjunt de clons que codifiquen per proteïnes que podrien interaccionar amb ell.

1.1 Tècnica del doble-híbrid.

La tècnica del doble híbrid es basa en les característiques de molts factors de transcripció eucariotes que estan formats per dominis funcionalment independents i físicament separables. Un d'aquests dominis s'uneix a DNA (DNA-BD, *binding domain*) a una seqüència específica que en llevat s'anomena UAS (*upstream activation site*). Per altra banda, l'altre domini és un domini d'activació (AD, *activation domain*) que s'uneix al complex de la RNA polimerasa II per tal d'activar la transcripció del gen corresponent. Cap dels dos dominis per separat és capaç d'activar la transcripció gènica. L'activació de la transcripció només tindrà lloc en el cas que els dos dominis es trobin interaccionant en la regió promotora.

S'han desenvolupat vectors d'expressió per tal de generar proteïnes fusionades amb aquests dominis, d'aquesta manera, si es co-expressen aquests dos vectors en una mateixa cèl.lula de llevat es pot analitzar la interacció de les proteïnes clonades per l'activació del gen marcador. Tanmateix, es pot realitzar un crivellat d'una llibreria de proteïnes (fusionada a l'AD) per buscar proteïnes que interaccionin amb una proteïna en concret (fusionada al BD). En la figura 3.1 es presenta un esquema de la tècnica del doble-híbrid.

S'han desenvolupat diferents sistemes per dur a terme la tècnica del doble híbrid. En aquest treball s'ha utilitzat el sistema MATCHMAKER 2 de GAL4 de la casa comercial Clontech (#K1604-1) on el BD i AD provenen de la proteïna GAL4 de llevat. Aquest sistema MATCHMAKER 2 presenta una sèrie d'avantatges respecte al sistema MATCHMAKER:

- per a l'expressió de les proteïnes híbrides amb els dominis d'unió i d'activació s'utilitzen vectors d'alt nivell d'expressió.
- una vegada realitzat el crivellat de doble híbrid, les cèl.lules de llevat contenen el plàsmid que codifica per la proteïna esquer i el plàsmid que codifica per la proteïna procedent de la llibreria. Aquest sistema permet la selecció d'aquesta última mitjançant l'addició de cicloheximida en el medi.
- la soca de llevat utilitzada en el crivellat és capaç de creuar-se amb una soca complementària per tal d'obtenir cèl.lules diploides permetent l'anàlisi d'especificitat d'interacció del clon obtingut amb altres proteïnes control.
- aquest sistema també disposa d'anticossos per detectar les proteïnes híbrides per western blot, controlant així que la seva expressió en la soca de llevat sigui correcta.

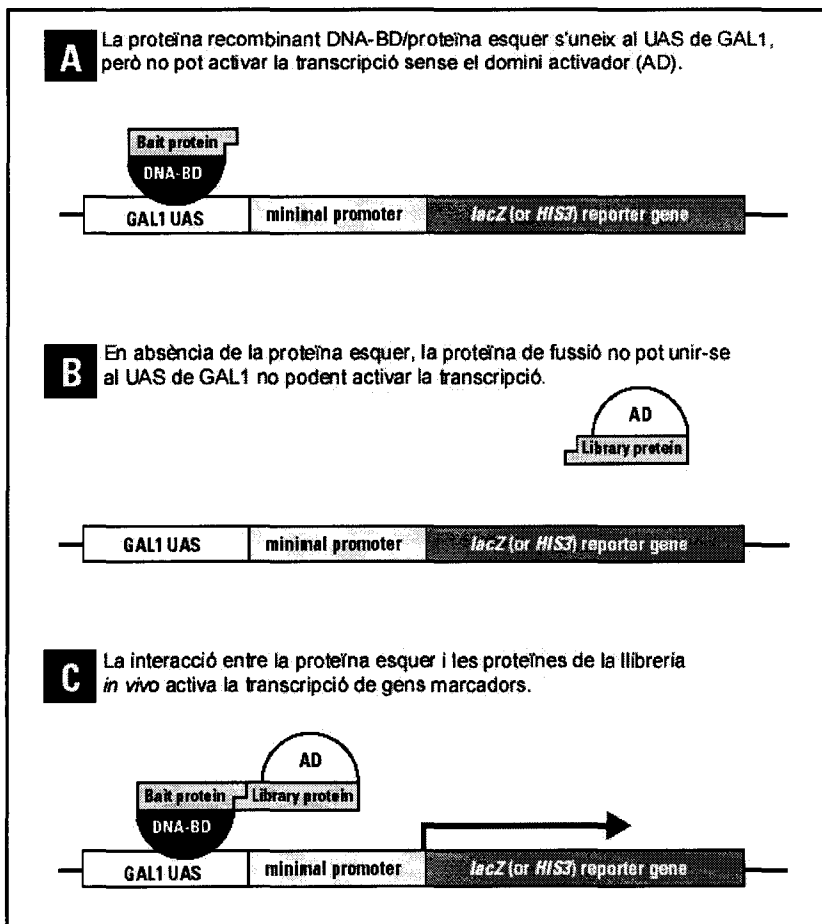


Figura 3.1.
Esquema del sistema MATCHMAKER GAL4 de doble híbrid. Modificat de MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual, Clontech, Inc.

1.2 Crivellat d'una llibreria de doble híbrid de cDNA d'embrió de 7 DAP amb la proteïna MARK-KD.

El domini intracel·lular de la proteïna MARK es va clonar en el vector d'expressió pAS2.1 de Clontech (*Genbank Accession*: U30497) que conté el domini d'unió a DNA de la proteïna GAL4. La proteïna MARK s'acumula molt a l'inici de l'embriogènesi, als 2 DAP, i es manté fins als 40 DAP (Río, 1999). Així doncs, per buscar proteïnes capaces d'interaccionar amb MARK-KD, es va utilitzar una llibreria de cDNA d'embrions de blat de moro de 7 DAP. Aquesta llibreria estava clonada en el vector pACT2 (*Genbank Accession*: U29899), que conté el domini d'activació de la transcripció.

La soca de llevat utilitzada pel crivellat fou la Y190 que té com a gens marcadors, el *lacZ* i l'*HIS3*. El gen *HIS3* en aquesta soca s'expressa de manera constitutiva, en absència d'inducció, per la qual cosa és imprescindible afegir en el medi el compost 3-AT com a inhibidor de la síntesi d'histidina. La concentració de 3-AT és crítica, doncs cal aconseguir la inhibició d'expressió endògena del gen però, alhora, aquesta inhibició no ha d'afectar l'expressió d'histidina depenent de la interacció. Per tant, cal arribar a un compromís entre l'obtenció del creixement de colònies independent de la inducció i el creixement de colònies que delaten una interacció feble.

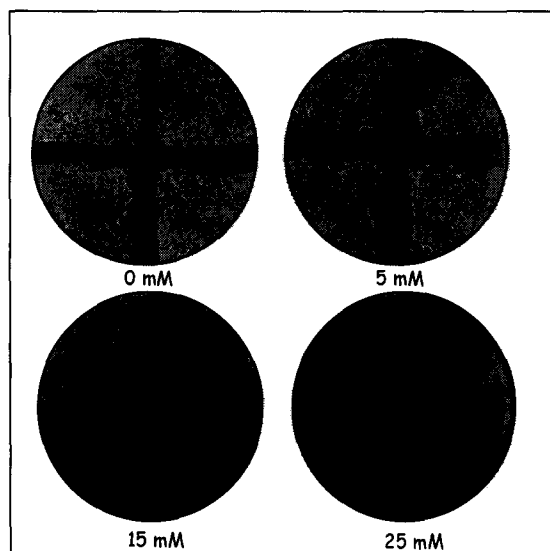


Figura 3.2. Cultius de la soca de llevat Y190 transformada amb la construcció MARK-pAS2.1 plaquejats en plaques de medi SD-T suplementades amb diferents molaritats de 3-AT.

Així doncs, es va plaquejar la soca Y190 transformada amb la construcció MARK-KD_pAS2.1 en plaques amb absència de triptòfan (per a la selecció del plàsmid) i d'histidina amb diferents molaritats de 3-AT.

En la figura 3.2 es pot observar creixement cel.lular en el medi suplementat amb 0 i 5 mM de 3-AT, mentre que a una concentració de 15 mM, el 3-AT inhibeix el creixement. Per tant, donat que la concentració mínima on no es va obtenir creixement de llevats fou a 15 mM, es va decidir realitzar el crivellat amb aquesta concentració de 3-AT.

Abans de realitzar la transformació de la llibreria, es van posar a punt les condicions de transformació òptimes, aconseguint una eficiència de $1,6 \cdot 10^4$ colònies/ μg de DNA. Es van crivellar 200.000 clons que van ser plaquejats en plaques de medi SD-Leu-Trp-His suplementat amb 15 mM de 3-AT. Es van obtenir 200 clons positius His⁺ els quals van ser repicats. Posteriorment van ser analitzats pel gen marcador *lacZ* en un assaig de β -galactosidasa en filtre. El gen *lacZ* codifica per l'enzim β -galactosidasa que pot ser detectat per diferents assajos. En aquest treball s'han realitzat assajos en filtre on X-gal es va utilitzar com a substrat de la β -galactosidasa, la reacció dona un color blau. 94 dels 200 clons positius His⁺, van resultar positius per la selecció β -gal.

Per tal de comprovar que no s'hagués transformat més d'un plàsmid de llibreria en una mateixa cèl.lula, es van realitzar PCRs dels 94 clons. Aquestes PCRs es realitzaven a partir de les colònies de llevat (apartat 1.1.5 del material i mètodes). En cap dels clons es va detectar més d'una banda de PCR suggerint que en cap cas s'havia introduït més d'un plàsmid.

Per altra banda, per determinar si algun clon presentava el mateix insert, els DNAs obtinguts de l'amplificació per PCR, que presentaven una mida d'entre 800 a 2000 pb, es van digerir amb l'enzim de restricció *HaeIII* (que té una freqüència de tall elevada). D'aquesta manera es van poder detectar 10 clons que contenien el mateix insert, reduint a 84 el número de clons independents.

1.3 Anàlisi de seqüència dels clons de doble híbrid obtinguts.

Els 84 clons independents obtinguts van ser seqüenciats a partir de la PCR purificada. Les seqüències obtingudes es van analitzar comparant amb les seqüències descrites en les bases de dades mitjançant el programa BLAST. En la taula 3.1 es poden observar les similituds

de seqüència que presenten els diferents clons. Cal esmentar que 38 clons no estan representats en la taula ja que no presentaven una homologia significativa amb cap proteïna de la base de dades.

Taula 3.1. Taula dels clons positius obtinguts en el crivellat de doble híbrid. Els número dels clons que apareixen entre parèntesi representen els clons que contenen el mateix insert.

clon	homologia	organisme
2 (85, 82), 9, 11 (20, 53), 25, 16, 30, 32 (35, 67), 45, 47, 49 (72), 55, 68, 69, 70, 93, 94	SAM descarboxilasa (ACCO24575)	<i>Zea mays</i>
3, 77	SIR2-like protein	<i>Oryza sativa</i>
4	proteïna desconeguda	<i>Arabidopsis</i>
5, 58	MAP4Kinasa (AJ009609)	<i>Brassica napus</i>
6, 29, 37, 59, 76	Eukaryotic translation initiation (AJ132240)	<i>Zea mays</i>
7 (33)	proteïna desconeguda / NT3	<i>Arabidopsis</i>
8, 34	Proteïna hipotètica (O67576)	<i>Arabidopsis</i>
13 (15)	proteïna desconeguda	<i>Arabidopsis</i>
14	proteïna desconeguda	<i>Arabidopsis</i>
31, 38, 52, 71, 73	proteïna desconeguda (O64588)	<i>Arabidopsis</i>
42, 64, 65	putativa Gamma-adaptin (AAK98709)	<i>Oryza sativa</i>
44	proteïna desconeguda	<i>Arabidopsis</i>
51	Putativa malonyl CoA descarboxilasa	<i>Arabidopsis</i>
56	ABA, deshidrogenasa	<i>Medicago sativa</i>
57 (83)	Acetyl CoA Carboxylasa	<i>Zea mays</i>
66	DNA polymerasaIII	<i>Arabidopsis</i>
81	NADPH oxidasa	<i>Oryza sativa</i>
84	Voltage-depenent anion channel protein	<i>Zea mays</i>

Com s'observa en la taula, alguns dels clons codifiquen per la mateixa proteïna. El fet que en el crivellat s'obtinguin clons independents corresponents a la mateixa seqüència, suggereix que la interacció, almenys en llevat, és forta.

Per tant, els clons que presenten una similitud amb les proteïnes SAMDC, MAP4K, eIF5, una proteïna hipotètica (O67576), una proteïna de funció desconeguda (O64588) i una gamma-adaptina, van ser els escollits per analitzar en més detall i estudiar la seva interacció amb MARK-KD utilitzant altres metodologies.

Resultats

Els llevats que contenien aquests clons van ser plaquejats en medi suplementat amb cicloheximida per eliminar el plàsmid MARK-KD_pAS2.1, seleccionant d'aquesta manera el plàsmid d'interès. Aquests plàsmids es van obtenir per extracció de DNA plasmídic i van ser transformats a la soca DH5 α d'*Escherichia coli*.

A continuació es descriuen els clons positius obtinguts que codifiquen per les proteïnes SAMDC, eIF5, γ -ADAPTINA, una proteïna hipotètica, una proteïna de funció desconeguda. El clon que codifica per una proteïna similar a BnMAP4K, s'analitza en l'apartat 2 dels resultats.

· Un elevat número de clons obtinguts en el crivellat codificaven per la proteïna SAMDC (*S-adenosylmethionine decarboxylase*) de blat de moro. En concret es van obtenir 16 clons independents (figura 3.3) que corresponien a una possible seqüència proteica 100% idèntica a la proteïna SAMDC. Aquests clons es van anomenar DH-SAMDC (per doble híbrid SAMDC).

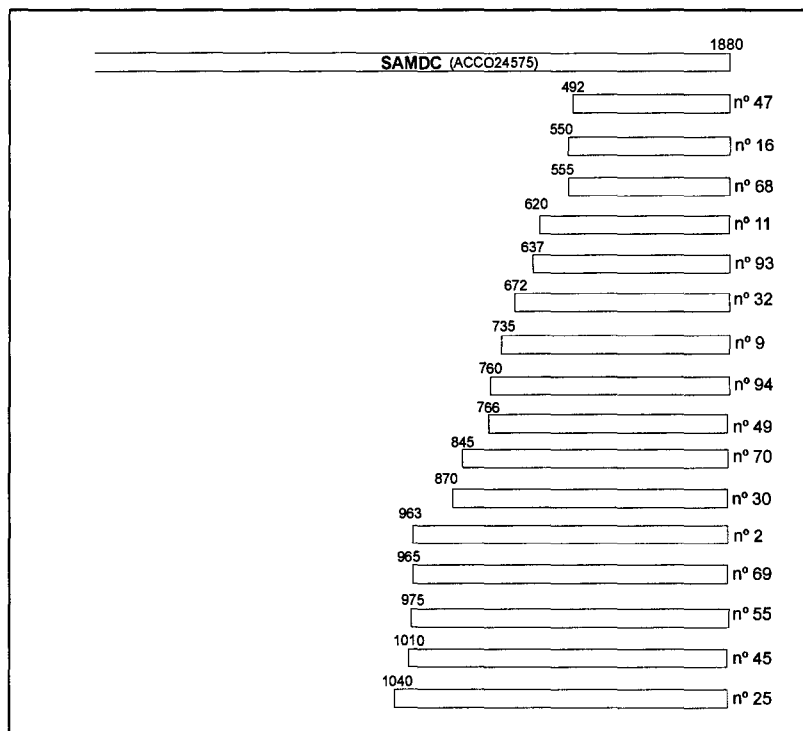


Figura 3.3. Esquema dels diferents clons obtinguts en el doble híbrid que codifiquen per la proteïna SAMDC de blat de moro.

L'enzim SAMDC forma part de la via de síntesi de les poliamines. Aquests compostos, estan implicats en processos de desenvolupament i creixement vegetal. La proteïna SAMDC de patata, per exemple, presenta uns nivells molt elevats d'expressió en teixits que es divideixen i diferencien activament tant en teixits vegetatius com en òrgans reproductors (Mad Arif *et al.*, 1994). El patró d'expressió de SAMDC és, doncs, coincident en alguns teixits amb el de la proteïna MARK que s'ha demostrat que en l'embrió i en teixits meristemàtics està associada a cèl.lules en proliferació i diferenciació (Río, 1999).

· La proteïna eIF5 (*Eukaryotic translation initiation factor 5*) de blat de moro del sistema de traducció cel.lular, fou obtinguda en el crivellat en cinc clons independents (figura 3.4). Aquests clons s'anomenaren DH-eIF5.

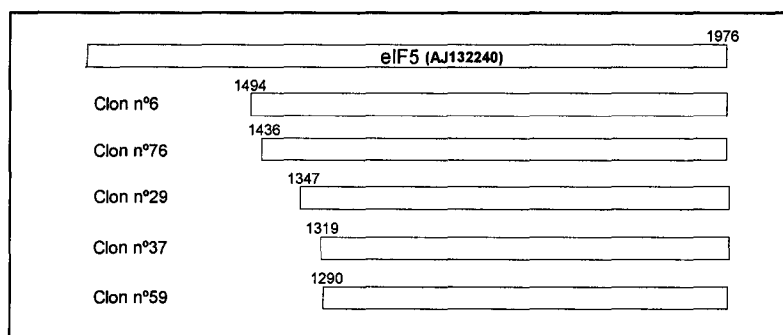


Figura 3.4. Esquema del 5 clons que codifiquen per diferents fragments d'eIF5 aïllats del crivellat del doble híbrid.

La proteïna eIF5 juga un paper essencial en la iniciació de la síntesi proteica juntament amb altres factors d'iniciació i GTP (Raychaudhuri *et al.*, 1987). Es tracta d'una proteïna, doncs, fortament expressada en cèl.lules que estan proliferant activament. Per tant, com en el cas de la proteïna SAMDC, el seu patró d'expressió pot ser, almenys en part, coincident amb MARK.

· Les seqüències de cinc dels clons aïllats del doble híbrid codificaven per proteïnes que presentaven similitud amb una proteïna de funció desconeguda d'*Arabidopsis* (O64588). El clon amb el que es va seguir treballant va ser el n° 71, que es va anomenar DH 71.

Resultats

En l'alineament de la figura 3.5 es poden observar dues regions del clon DH 71 que contenen X, ja que aquestes zones no estan acabades de seqüenciar. Quan es realitza una búsqueda en la base de dades, només dues proteïnes mostren una elevada similitud amb aquest clon, i les dues són de funció desconeguda. La proteïna AIR9 (*Auxin-Induced in Root cultures*) es va aïllar d'un crivellat diferencial d'una llibreria de cDNA d'arrel d'*Arabidopsis* tractada amb auxina (Neuteboom L.W. *et al.*, 1999). AIR9 és un clon parcial que, per similitud de seqüència, correspon a la regió C-terminal de la seqüència deduïda NP_181015. L'auxina és una hormona vegetal implicada en molts processos diferents en les plantes com ara la proliferació i la diferenciació.

```

DH-71      : ..... EKIDN... LEPDLVANSSEVVGETLKYKPSLNDVSSYLLYVPIRRDGVDDFLMATSDFVMAAFESVSDVHLEKKS
NP_181015  : EYIWRTEVKLEHGSALTEISYAGEVNVCCRTLKYTFSLSDVGAFLVLYWIFTRVDGRSGKPVVVTNSFVAPADFEVSNVRVKKLFS
AIR9       : .....

DH-71      : DVCYGLGIYYGGYKOLSLRWYRXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
NP_181015  : DAVSGEGEYFGQHRGSPLSWYRENDGTIDLIDGANSKTYEVTESDYNCRILFGYTPVRSDSVVGELKMSEPTTEILPG.FSLQHNPH
AIR9       : .....

DH-71      : SLNHLMXFLPELLKLETLNFKGNQVERETLTAARQIPYSEIQQRIWKNYKEMKYQWFISNESGGDQSFEPATQCERSYKVRFDIG
NP_181015  : TFDENT... EYFKVDMLAFTGKAVGQDVLTAQVIFKTEIQQLVNSKYKGDIQYQWFRSPESQDKISYEALSSSEISCSYKVFEDIG
AIR9       : .....

DH-71      : RCLKCKCYTDEVFGSSSLVSNVTAFLPGCPKIEKLEIEGRGFHTDLYAVGTVSGGKEGKSKIQWLRSMVGSDDLIPFGETGRVY
NP_181015  : RCLKCKCVVHDVFGSSSLAYAEIDFISPGCPRIEKLIEGGGFHTNLYAVRGNVYGGKEGKSKIQWLRSMVGSDDLIPGETGRVY
AIR9       : .....SPGCPRIEKLIEGGGFHTNLYAVRGNVYGGKEGKSKIQWLRSMVGSDDLIPGETGRVY

DH-71      : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
NP_181015  : EAVVDDVGYRLVVVYTFIREDGVQGHFVASTFVAVEFDLKEVRQKLETGLVIFLELYPLFSFLNVCSSINWNQV.LCDKDFYPKK
AIR9       : EAVVDDVGYRLVVVYTFIREDGVQGHFVASTFVAVEFDLKEVRQKLETGLVIFLELYPLFSFLNVCSSINWNQV.LCDKDFYPKK

DH-71      : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
NP_181015  : IVGEGNLEFRMLEMNRKRIKVVKPGSKTSFATTEVRSYCPFFHVEFRNDQRRPRIIVVDSIEVDIVVQSRHLRDLVIVLVIRGGAQR
AIR9       : IVGEGNLEFRMLEMNRKRIKVVKPGSKTSFATTEVRSYCPFFHVEFRNDQRRPRIIVVDSIEVDIVVQSRHLRDLVIVLVIRGGAQR

DH-71      : FNSTSLNLTLLRIE....
NP_181015  : FNSTSLNSLLKIDT...
AIR9       : FNSTSLNSLLKIRYMKP
    
```

Figura 3.5. Alineament de seqüències realitzat amb el programa Clustal entre la zona C-terminal de la proteïna NP_181015 (estan representats a partir de l' aminoàcid n° 1145), la proteïna AIR9 (AF055849) i el clon DH 71.

· Dos dels clons que es van analitzar (el DH 8 i DH 34) presentaven similitud amb proteïnes d'*Arabidopsis* de funció desconeguda o similars a proteïnes bacterianes.

Com es pot veure en l'alineament de la figura 3.6, el clon DH 8 presenta una elevada homologia de seqüència amb proteïnes d'*Arabidopsis* de les quals no se'n sap la funció, excepte el factor de transcripció APFI implicat en la regulació de gens del citocrom. En la comparació de seqüències (programa BLAST) en el banc de dades s'obtenen un conjunt de proteïnes bacterianes, suggerint que aquestes proteïnes similars d'*Arabidopsis* podrien localitzar-se en plastidis.

```
DH-8      : .....GKAMAVGFWIRETGQALDRLGCLQCKYFSEHCLSRHRTIMNIFDKA.....BHV
BAB39954 : .....MAGLGKAFYAVGFWIRETGQALDRLGCLQCKNYFSEHCLSRHRTLMNIFDKA.....BHV
AAF98404 : .....MCTIGRAFYSVGFWIRETGQALDRLGCLQCKNYFSEHCLSRHRTLMNVFDKA.....BIV
AAK76458 : .....MCTIGKAFYSVGFWIRETGQALDRLGCLQCKNHSEHCLSRHRTLMNVFDKA.....BNV
APFI     : .....MCTLGRAINIVGNWIRGTQALDRVCSLQCSHRTEBELSRHRTLMNVFDKS.....BLV
Transferas : MKCFTLSSQRRIIGIPIFCTSTFLIFFSVCCFFTLFAAFAHKTVLFCLKDLHKANNAPKVISKSFIAEVMSMSDVLRPYRDLFQII
```

```
DH-8      : HRDAFVAPSASLIGDVOVGSASIWYGCVLRGDANNIQTGSGTNIQDNLSLHVAKSN.LSGKVFPTTIGDNVTVGHSAVLGGCTVED
BAB39954 : HRDAFVAPSASLIGDIQVGGASIWYGCVLRGDANNVQLCSGTNIQDNLSLVHVAKSN.LSGKVFPTTIGDNVTVGHSAVLGGCTVED
AAF98404 : DKDAFVAPSASVIGDVEHIGRGSISWYGCVLRGDANNVSVGSGTNIQDNLSLVHVAKSN.LSGKVFPTTIGDNVTIGHSAVLGGCTVED
AAK76458 : DKDAFVAPNASLSDVHVGGRGSISWYGCVLRGDANSHVCGAGTNIQDNLSLVHVAKSN.LSGKVFPTTIGDNVTIGHSAVLGGCTVED
APFI     : DKDVFVAPSASVIGDVQIGKGSISWYGCVLRGDANNHISVGSCTNIQDNLSLVHVAKTT.TSGKVFPTTIGDNVTVGHSAVLGGCTVED
Transferas : GQRVMIDSSVVIQDVRADDDVCIWPLVVIQDVRVHYVQIGARTNIQDGSMLHVTHKSSYNPDGNEELTIGEDVTVGKVMVLLGGCTVGN
```

```
DH-8      : EAFVVGIGATLLDGVVVEKHCQVAAGALVRCQNRIPSGEYVWGGNPAKFLRRLTDEEISFLAKSAANYSNLSKVHAAENKPLEKIEFE
BAB39954 : EAFVVGIGATLLDGVVVEKHCQVAAGALVRYWIQ.....VWGGNPAKFLRRLTDEEITFLKESANYSSTLAKAHAENKPLVKTIFE
AAF98404 : ETFICMGATLLDGVVVEKHCQVAAGALVRCQNRIPSGEYVWGGNPAKFLRRLTDEEIAFISOSATNYSNLAQAHAENKPLNVIIFE
AAK76458 : EAYIGTSATVLDCAHVEKHAMVAAGSLVRCQNRIPSGEYVWGGNPAKFLRRLTDEEIRVFFSSSAVEYSNLAQAHAENKPLNDEAEK
APFI     : DAFVVGIGATLLDGVVVEKHAMVAAGSLVRCQNRIPSGEYVWGGNPAKFMRELTDEEIVYISOSAKNYINLAQAHAENKPLNDEAEK
Transferas : RVLVGMGSITLDCALVEDDVMIQAGSLVRCNKRLEEGYLYLGSFVKQIRPLSDEEKAGHRYSAANNVYKWK.....
```

```
DH-8      : KVLCKRFHOD.EYDSSHGVTGAPPELTSFNPAAQ.....
BAB39954 : KLFRRKSAHODEEYDSSHGIVRETPPELNLNPNILPKETKRPSNVN...
AAF98404 : KVLRRKHALKDEEYDSSHGIVRETPPELNLNPNILPKETKRPSNVN...
AAK76458 : KLLNKNAR.DTEYDSSL.....DDLTPENVPKAA.....
APFI     : KALRRKARKDEEYDSSHGIVRETPPELNLNPNILPKETKRPSNVN...
Transferas : .....
```

Figura 3.6. Alineament del clon DH8. BAB39954: *Oryza sativa* similar a proteïna desconeguda d'*Arabidopsis*. AAF98404: proteïna desconeguda (*Arabidopsis*). APFI: factor de transcripció (*Arabidopsis*). AAK76458: putativa ferripyochelin-binding protein (*Arabidopsis*). BAA93562: Transferasa (*E. coli*). Realitzat amb el programa Clustal.

· Tres clons aïllats del crivellat presentaven una elevada similitud amb proteïnes gamma-adaptines del tipus 1 com es pot veure en l'alineament de la figura 3.7. Aquests clons es van anomenar DH- γ ADAPTINA#42, #64 i #65.

Les γ -adaptines tipus I formen part dels complexos AP1 (*adaptor protein*). Aquests complexos, juntament amb el complex AP2 són components de les vesícules de clatrina associades al TGN (TransGolgi Network) i a la membrana plasmàtica respectivament. La funció d'aquests complexos és unir les clatrina a la membrana, seleccionar les proteïnes que cal transportar i reclutar proteïnes que regulen la formació de la vesícula. Són complexos heterotetràmers amb 2 unitats grans (γ i β 1 pel complex AP1 i α i β 2 per AP2), una subunitat mitjana (μ) i una de petita (δ). Els dos complexos tenen una estructura molt similar, on les diferents subunitats duen a terme diferents funcions. En aquest sentit, al domini C-terminal de la subunitat α -adaptina del complex AP2 s'hi uneixen directa o indirectament proteïnes de membrana que regulen la formació de la vesícula. En la bibliografia s'han descrit nombroses proteïnes que interaccionen amb el domini C-terminal de la α -adaptina (David *et al.*, 1996; Deheuveil *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997).

Presumiblement, la subunitat γ té aquesta mateixa funció, tot i que no ha sigut tant estudiada. En la bibliografia s'han descrit algunes proteïnes que interaccionen amb la γ -adaptina, com per exemple la proteïna γ -Synergina (Page *et al.*, 1999) o receptors específics de la membrana basolateral de cèl·lules epitelials (Fölsch *et al.*, 2001).

Figura 3.7 (pàgina següent). Alineament del clon DH- γ ADAPTINA#65 amb el programa Clustal. AAK98709: putativa gamma-adaptina1 (Oryza sativa); BAA78745: Similar gamma-adaptina 1 d'A. thaliana (Oryza sativa); NP_176215: putativa gamma-adaptina1 (A. thaliana); CAA72902: gamma-adaptin (Homo sapiens); CAB39730: gamma-adaptina2 (A. thaliana); O75843: gamma-adaptina2 (Homo sapiens). Es mostra el domini C-terminal de les proteïnes gamma-adaptines.

DH-Yadap :VAQNKNTVLELQQRSTEEF
 AAK98709 : EYGEMLVNVGMLGGSEPTMIHAIFPSAIYLAVLGSWFCTYFGHLVEDNWRKQFVSNQKKNVLELQQRSTEEF
 BAA78745 : EYGEMLVNVGMLGGSEPTMVTES...DAVDVAVSLKRYSDVTRAMCLV
 NP_176215 : EYADLLVNHACMLDLDPTVYTESDAVDVVENAKHHLSDVTKAMALIALKISSRFPSCSERVKSTIGQNGSSVLELQQRSTEEF
 AtY-adap1 : EYGDLLVNVGMLGGSEPTVYTESDAVDVIEDATRHNSDSTTKAMALVALLKLSRFPSSISVRKGTIVKQKGSLLLEMOQRHVEYN
 HY-adap1 : EYGDLLVS...GOCRESEPTVYTESDAVDVIEDATRHNSDSTTKAMALVALLKLSRFPSSISVRKGTIVKQKGSLLLEMOQRHVEYN
 AtY-adap2 : EYGDLLVNVGMLGGSEPTVYTESDAVDVIEDATRHNSDSTTKAMALVALLKLSRFPSSISVRKGTIVKQKGSLLLEMOQRHVEYN
 HY-adap2 : EYGDLLLA...GNCEETEPLVDREEVLALEKVLQSHMSLPATRGYALTALMKLSTRLCGDNNRERQVVSIVYGSCLDVELQQRHVEYD

DH-Yadap : SIIOE...HQSIKSSLLERMPALDEANVYVKRAAAASTQMAVSSVNSAPAVTSGGPKLPNGVAKPPAPLADLLDLSDDAP.VTT
 AAK98709 : SIIOE...HQSIKSSLLERMPALDEASYLLRRASAT...QAMLAADKPTPAVTPGG...LKLPNGVAKPATSPVLDLSDSDVPAIT
 BAA78745 : SULKLSRFPPTSESSLLERMPVIDEASVYKRAAST...QAMISSDKLAAAATPGSSKLPNGVAKPPAPLADLLDLSDDAP.ATT
 NP_176215 : SIIOE...HQNIRSESLVERMPVLEDEATFSCRRAGSLP...ASVS...TSGKSPKLPNGVAKA...AAPLVLDLSDSD...T
 AtY-adap1 : SIVDR...HKNIRSESLVDRMPVLEDEATFNVRAGSFP...ASVS...TMAKPSVSPONGVEKLPVAPLVLDLSDSDI...M
 HY-adap1 : ALFKK...YDHMRSAALLERMPVMEKV...TNGPTEHVQNGETEPAPLETKPPSPGQ...
 AtY-adap2 : SIVDR...HKNIRSESLVDRMPVLEDEATFNVRAGSFP...ASVS...TMAKPSVSPONGVEKLPVAPLVLDLSDSDI...M
 HY-adap2 : TLFRR...YDHMRSAALLERMPVMEKV...DGPQADEAKESKEAQLSEAPVWPEP...

DH-Yadap : SAPTSPDFLDQLLGLGCLDSSPIG.....GAPSTSDILMDLLSISGS.SPVONGPPTSN.
 AAK98709 : ASTTTAPKDFLDQLLGLGCISSSPAA.....APSSASDILMDLLSISGS.SPVONGPPTAADS
 BAA78745 : SAPTTPKDFLDQLLGLGCLDSSPIG.....GAPSTSDILMDLLSISGS.SPVONGPPTVSN
 NP_176215 : SAPTSSNDFLDQLLGLGCLDSSPIG.....AMQPSQAGDILMDLLSISGTPAPVONGSANGD.
 AtY-adap1 : VAPSPGADFLDQLLGLGCLDSSPIG.....ATQAPKAGTDLLDLISGTPSPACNSTSSIG.
 HY-adap1 : ...PTSQANDLFDLGLGCLDSSPIG.....TSKPSAGGELLDLGLDINLTPAPAAAPAPA.
 AtY-adap2 : VAPSPGADFLDQLLGLGCLDSSPIG.....ATQAPKAGTDLLDLISGTPSPACNSTSSIR.
 HY-adap2 : ...QASQLDLDLGLGCLDSSPIG.....HLDPS.PGGALVHLL...DLPCVTPPPA.

DH-Yadap :FSLPGIEIKPP.....PVTPQ.VVDLIDGSSSSTSLP.DEN
 AAK98709 : TPAQAITELFRINVPDKPVSTISQVGAIVPEATDVLSSLSSTSVSAFARMSDTSIAGTKSAPAVPQ.DMDLIDGSPSNTSVS.G.P
 BAA78745 :FSLPG.....Q.....DEN
 NP_176215 :LLSIQDNN.....APIAPSLTSPAPSSMMDLIDGSPPTPKSDEKS
 AtY-adap1 :LLSIADVNNNSIALYTL.....SSPAPPHVATTSSTGMPDLIDGSPSPSKEATNG
 HY-adap1 :SVQPIQ.....PPF...LIDGSSSQPLFN.DIA
 AtY-adap2 :LLSIADVNNNSIALDTL.....SSPAPPHVATTSSTGMPDLIDGSPSPSKEATNG
 HY-adap2 :PIPDLK.....

DH-Yadap : AAYPTITAFQSAALRIITFSEKKGKPKQETINASPTNLATTALIDFVQAAVPKFIQLRLDPASSNTLPASGNVSVTOSLSVTNNQH
 AAK98709 : VNHSSITAFQSAALKITENFKKQKPKQETIVHATPTNLTSSTSTDFVQAAVPKFIQLRLDPASGNVSVTOSLSVTNNQH
 BAA78745 : TAYPPTITAFQSAALKITENFKKQKPKQETIHRASPTNLSTTDFIFQAAVPKFIQLRLDPASSNTLPASGNVSVTOSLSVTNNQH
 NP_176215 : AAYPSIVAFSSSLKIEFNPTKQSENPOTDIVANSTNLTPTNVYTEPLFQAAVPKFIQLRLDPASSNLSLPANGN...IKOTMRTVNSOK
 AtY-adap1 : PAYAPIVAYESSSLKIEFNPTKQSENPOTDIVANSTNLTPTNVYTEPLFQAAVPKFIQLRLDPASSNLSLPANGN...IKOTMRTVNSOK
 HY-adap1 : AGIPSTIYASKNGLKIEFNPTKQSENPOTDIVANSTNLTPTNVYTEPLFQAAVPKFIQLRLDPASSNLSLPANGN...IKOTMRTVNSOK
 AtY-adap2 : PAYAPIVAYESSSLKIEFNPTKQSENPOTDIVANSTNLTPTNVYTEPLFQAAVPKFIQLRLDPASSNLSLPANGN...IKOTMRTVNSOK
 HY-adap2 :V...FEREGVQNLSEIRPPENPALLITITANPSEGDVTEPLFQAAVPKFIQLRLDPASSNLSLPANGN...IKOTMRTVNSOK

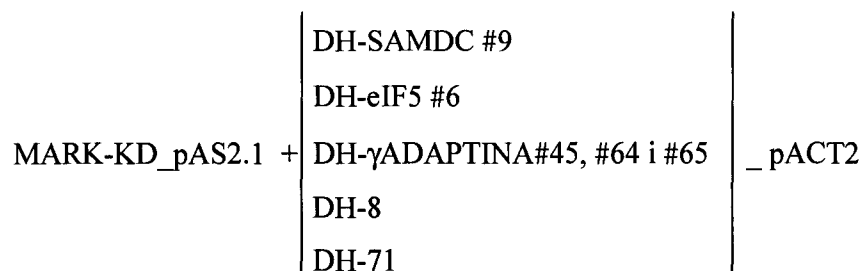
DH-Yadap : GOKPLAMRIRMSYKNGEDRLECCQ.....LSNPFSG.....LCHTCLWGWCSSVSVLQARRLYSCSTFSLLLACVYVTG.....
 AAK98709 : GOKPLAMRIRMSYKNGEDRLECCQENFLDAVLMTHAAVRDEILRLVFSVETALRLYCRGRKRHTHTLRASVAMVDDGEQRACA
 BAA78745 : GOKPLAMRIRMSYKNGEDRLECCQ.....RRCSTK.....YDLPVKHSSLLAIEAINPPLYRSEALVHEYLACVYR.....
 NP_176215 : GOKPLVMRMRVYKNGEDRLECCQ.....LNNPFRG.....
 AtY-adap1 : GOKPLVMRMRVYKNGEDRLECCQ.....VSNPFRG.....
 HY-adap1 : KQCPMRIRMSYKNGEDRLECCQ.....VSNPFRG.....SWQ.....
 AtY-adap2 : GOKPLVMRMRVYKNGEDRLECCQ.....VSNPFRG.....
 HY-adap2 : KAPURLKLRMSYKNGEDRLECCQ.....VSNPFRG.....SWQ.....

1.4 Anàlisi dels clons obtinguts pel sistema MATCHMAKER 3.

Amb la tècnica del doble híbrid es van obtenir una sèrie de clons que, en aquest sistema, són capaços d'interaccionar amb MARK-KD. Tot i que la tècnica de doble híbrid és molt potent alhora de buscar proteïnes d'interacció també s'obtenen bastants falsos positius. Per analitzar interaccions proteïna-proteïna existeixen altres tècniques complementàries com per exemple les tècniques d'interacció *in vitro* (*pull-down*) o les co-immunoprecipitacions. També en llevat s'han elaborat sistemes més selectius pel que respecte als falsos positius, com el sistema MATCHMAKER 3.

El sistema MATCHMAKER 3 de Clontech utilitza la soca de llevat AH109 per eliminar falsos positius, ja que presenta tres gens reporters: *ADE2*, *HIS3* i *lacZ* (o *MEL1*) sota el control de les seqüències GAL4 i TATA. El gen marcador *ADE2*, aporta més astringència a la interacció donat que es tracta d'una forta selecció nutricional. (MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual, PT3247-1).

Així doncs, es van transformar els clons obtinguts en el crivellat de doble híbrid en la soca de llevat AH109 juntament amb la proteïna MARK-KD:



Les cèl.lules de llevat transformades van ser plaquejades en medi mínim de selecció pel creixement sense histidina i adenina (SD-LTHA, la manca de leucina i triptòfan selecciona els dos plàsmids) i també es van realitzar assajos de β -galactosidasa.

· Els clons DH-SAMDC#9 i DH-eIF5#6 co-transformats amb MARK-KD no van créixer en la soca AH109 en absència d'histidina i adenina. Aquest resultat sembla indicar que les interaccions amb DH-SAMDC i DH-eIF5 podrien ser interaccions febles.

D'altra banda, MARK-KD co-transformada amb els clons DH 8 i DH 71 en aquesta soca, si que mostrava creixement en un medi selectiu per l'histidina i l'adenina, com mostra la figura 3.8.

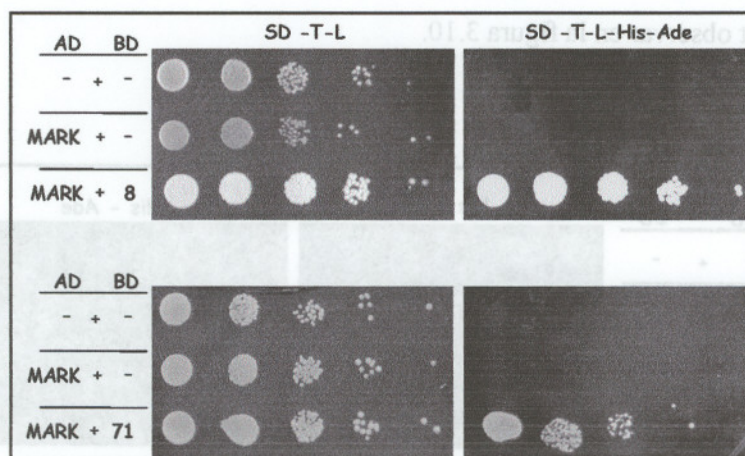


Figura 3.8. Selecció de creixement pels gens marcadors histidina i adenina. Els dos controls fan referència a la transformació dels dos plàsmids sense insert (en la part superior de les figures) i a la transformació de MARK-KD_pAS2.1 amb pACT2 sense insert. Tant el clon DH 8 com el DH 71 són capaços de créixer amb presència del domini quinasa de MARK.

En els assajos de β -galactosidasa (figura 3.9), es va observar un intens color blau en les cèl·lules que contenen les proteïnes MARK-KD i DH 71 passades les tres hores d'incubació. Així doncs, amb aquesta aproximació, la interacció de MARK-KD amb el clon DH 71 també és positiva. Per altra banda, amb el clon DH 8 no es detecta color blau en l'assaig, indicant que aquesta interacció sigui probablement més feble.

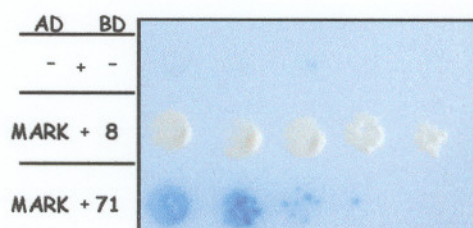


Figura 3.9. Assaig en filtre de β -galactosidasa de llevats que contenen MARK-KD + DH-8 i MARK-KD + DH-71.

Els tres clons que codificaven per proteïnes amb elevada similitud amb γ -adaptines (DH- γ ADAPTINA), van créixer amb la selecció d'histidina-adenina i en l'assaig de β -galactosidasa es va detectar color blau passades les tres hores d'incubació a 28°C pels tres clons com es pot observar en la figura 3.10.

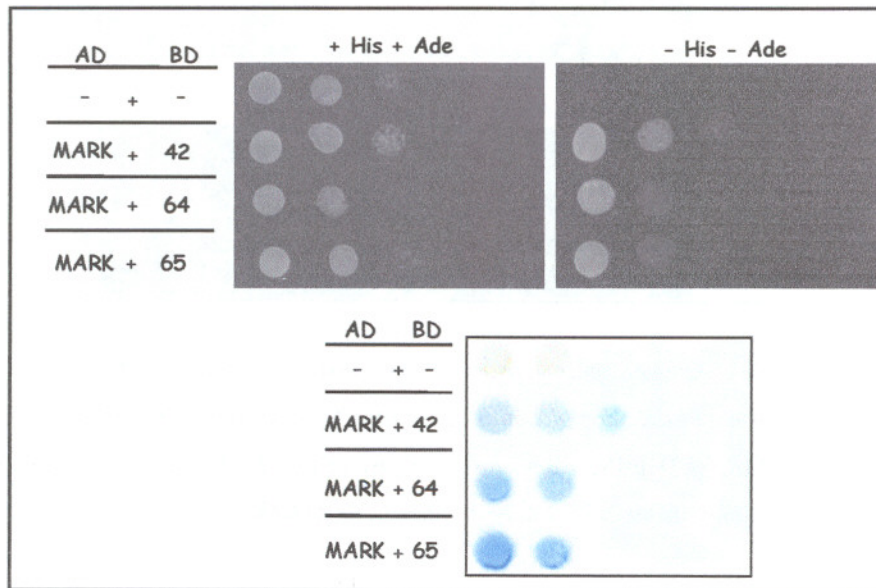


Figura 3.10. Selecció de creixement en absència d'histidina i adenina pels co-transformants MARK-KD_DH- γ ADAPTINA#45, #64 i #65 i assaig β -galactosidasa. Els llevats van ser plaquejats en dilucions decreixents 1/10.

Aquests resultats indiquen que la interacció entre els clons DH- γ ADAPTINA#42, #64 i #65 amb MARK-KD és una interacció forta en les cèl.lules de llevat.

1.5 Estudi *in vitro* per *pull-down* de les interaccions entre MARK-KD i els clons obtinguts del crivellat.

Una segona metodologia utilitzada per a l'estudi de les interaccions fou la tècnica dels *pull-downs*. Per als experiments de *pull-down* es clona una de les dues proteïnes a analitzar en el vector pGEX. Després d'expressar en cèl.lules d'*E. coli* (BL21) i purificar, s'obté una proteïna fusionada a la proteïna GST (*Glutathione S-transferasa*) que pot ser retinguda en una columna de Glutatió-Sepharosa-4B. Aquesta proteïna recombinant es pot incubar amb una segona proteïna o un extracte cel.lular (en el nostre cas proteïna MARK-KD recombinant) per tal d'analitzar-ne la interacció, que pot ser detectada per western blot amb anticossos contra la segona proteïna. Així doncs, els clons obtinguts del crivellat (DH-SAMDC#9, DH-eIF5#6, DH8, DH71 i DH- γ ADAPTINA#65) analitzats en l'apartat anterior van ser expressats i purificats com a proteïnes de fusió amb GST (figura 3.11).

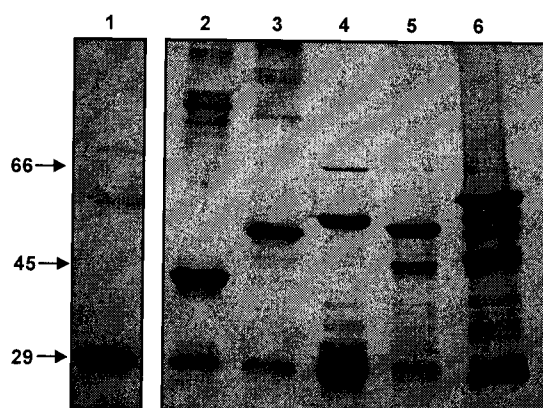


Figura 3.11. Gel SDS-PAGE al 10% tenyit amb blau de Coomassie de les proteïnes recombinants GST purificades. 1: GST. 2: GST_DH-eIF5#6. 3: GST_DH-SAMDC#9. 4: GST_DH- γ ADAPTINA#65. 5: GST_DH 8. 6: GST_DH 71.

L'assaig de *pull-down* realitzat amb les proteïnes recombinants DH-SAMDC#9 i DH-eIF5#6 amb MARK-KD i utilitzant la proteïna GST com a control negatiu, mostra una mínima quantitat de proteïna MARK-KD retinguda, com s'observa en la figura 3.12. Per tant, la possible interacció d'aquests clons amb MARK-KD és, probablement, una interacció feble.

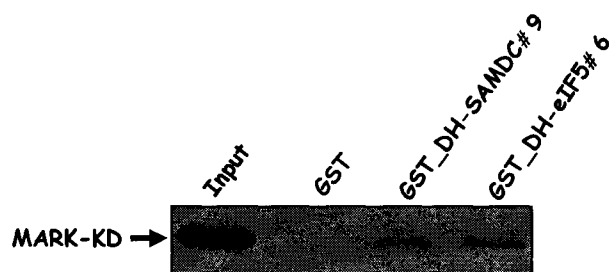


Figura 3.12. Immunodetecció de l'assaig de pull-down de les proteïnes recombinants *GST_DH-SAMDC#9* i *GST_DH-eIF5#6* incubades amb *MARK-KD* i revelat amb l'anticòs anti- *MARK-KD* (dil 1:1000).

Els estudis de *pull-down* per les proteïnes DH- γ ADAPTINA#65, DH 8 i DH 71 demostren que, en aquestes condicions, són capaces d'interaccionar amb *MARK-KD* (figura 3.13). Cal dir, però, que en alguns *pull-downs* realitzats amb el clon DH 8 no s'observava presència de *MARK-KD*. Per tant, la possible interacció de DH 8 amb *MARK-KD* seria més feble. D'altra banda, els clons DH- γ ADAPTINA i DH 71 han donat resultats positius amb les diferents aproximacions que s'han dut a terme per confirmar aquestes interaccions, el MATCHMACKER 3 i els *pull-downs*.

En l'apartat de discussió s'analitzarà en més detall aquestes possibles interaccions.

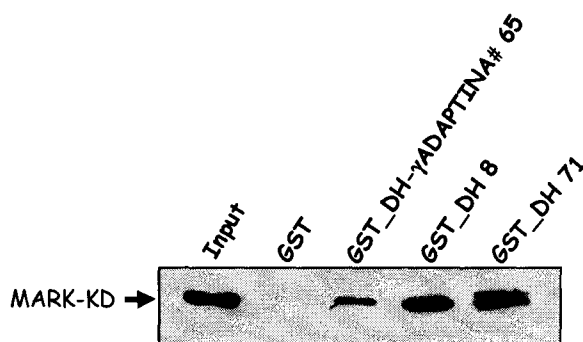


Figura 3.13. Assaig de pull-down de les proteïnes recombinants *GST_DH-gADAPTINA#65*, *GST_DH 8* i *GST_DH 71* amb *MARK-KD* revelat amb l'anticòs anti-*MARK-KD* (dilució 1:1000).

2. Caracterització de la proteïna MIK.

2.1 Anàlisi de seqüència dels clons DH5 i DH58.

L'anàlisi de les seqüències dels clons DH 5 i 58 va mostrar que es tractava de dos clons independents (diferents en tres aminoàcids) i que codificaven per la mateixa proteïna. El clon DH 5, el més llarg, codifica per un polipèptid de 144 aminoàcids que presenta similitud amb el domini C-terminal de les proteïnes MAP4K α 1 i α 2 de *Brassica napus* (figura 3.14).

```

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : MDGVAGLQEAAGARFHVVELIGRGSFGDVYKAFDSSELNKEVAIKVFTIDLESEDEIEDIQKEISVLSQCRCPIYTEYGSYLHQTKLWIIME

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : YMAGGSVADLLQPFTGHPLDEISIACITRDLHVAVEYLHTEGKIHRDIKAANILLSSENGDVKVADFGVSAQLTRFTTISRRTFVGTFFWMAP

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : EVIQNSEGYNEKADIWSLGITMIEMAKGEPPLADLHPMVLFFTTIIPRESPPQLDEHFSRPLKEFVSFCLKKAPAERPSSAKELLKHRFIKSAR

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : KSPKLLERIRFTRPKYQVKEDEDSPTCDPKSPAESSGTVRVARDDRGHGTSGTSFQGRTIKNAGWDFSIGFTGSSAGTVRALKPPQSRERR

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : QEVTSQSFQKSSRASASQLSSTSGAAVPEISEGGFLKRFTDSYQNDQCQEDDSLSLGSQGTVVIRSPRSSQSSVFRDLSSGTSRYTSFDDA

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : STSGTVVFTVRGQNDSDGSPRTPKSRLGLQERSSSASEDSIANLAEAKVALEAGFRRGNARERLGNGKFTVNRREQAQDSSDHLRSDRDDS

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : KQKPLIRSQQVSDDESELASLSASLSL LLLPSLKFTEAVGGDTSGSVGHRVSRALVQMERKPGSSPAFIAKLI ECLGSSKEVSVKEVQD

DH5 : .....
DH58 : .....
BnMAP4K : MAIRFTVFGKTVNNDANRKRKQASKEFASNTNVSPLCRPLFSRWLGQTSRDLNPS

```

Figura 3.14. Alineament de seqüència realitzat amb el programa Clustal dels clons DH 5, DH 58 i BnMAP4K α 2 (BnMAP4K).

BnMAP4K α 1 i α 2 van ser aïllats d'una llibreria de cDNA d'embrions secundaris de *Brassica napus* per hibridació amb un EST d'*Arabidopsis thaliana* que presenta una forta similitud de seqüència amb la família de proteïnes GCK/SPS1 (LePrince *et al.*, 1999). La família de proteïnes GCK/SPS1 formen part d'un grup particular de MAPK relacionades amb la proteïna Ste20 (*sterile 20 protein*) de llevat. Ste20p activa la MAP3K de llevat Ste11 directament per fosforilació, transduint d'aquesta manera el senyal del receptor de feromones de creuament de les cèl.lules de llevat (Wu *et al.*, 1995) i es pot, doncs, considerar com una proteïna del tipus MAP4K (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*). En els darrers anys, s'han identificat un gran nombre de proteïnes similars a Ste20: fins a una trentena en mamífers, en *Drosophila*, en *Caenorhabditis elegans* i en altres organismes. Segons la seva estructura aminoacídica, la família Ste20 s'ha classificat en dues subfamílies: les proteïnes STE20/PAK (*p21-activated kinases*) i la subfamília GCK/SPS1 (*germinal center kinases*). Les dues subfamílies estan formades per proteïnes que contenen un domini quinasa i un domini regulador, però, mentre que les proteïnes PAK presenten el domini quinasa en la part C-terminal, les GCKs el presenten en la regió N-terminal. Les proteïnes GCK presenten una elevada diversitat estructural en el domini regulador permetent la seva classificació en 6 subfamílies. En l'apartat 2.3 es mostra una anàlisi comparativa de la seqüència completa del clon DH5 amb les diferents classes de GCKs.

2.2 Anàlisi de la interacció MARK-KD i DH5.

Per tal de confirmar la interacció entre MARK-KD i DH5 es van utilitzar diferents aproximacions com la tècnica de creuament en llevats que permet l'anàlisi de l'especificitat d'interacció, estudis de *pull-down in vitro* i l'estudi de co-immunoprecipitació *in vivo*.

2.2.1 Interacció de DH5 amb diferents proteïnes control en llevat.

La tècnica de creuament permet analitzar de manera ràpida el comportament del clon obtingut en el doble híbrid amb diferents proteïnes control. D'aquesta manera, per comprovar l'especificitat de la interacció entre DH 5 i MAPK-KD, es va analitzar el comportament de DH5 amb diferents proteïnes control unides al plàsmid pAs2.1:

DNA-BD (Y190)	AD (Y187)
MARK-KD-pAs2.1	pACT2
MARK-KD-pAs2.1	DH5-pACT2
Lamin-pAs2.1	DH5-pACT2
CDK2-pAs2.1	DH5-pACT2
SNF1-pAs2.1	DH5-pACT2

Com es pot observar en la figura 3.15, en la selecció de creixement per histidina només les cèl·lules diploides que contenen les construccions MARK-KD i DH 5 són capaces de créixer, demostrant l'especificitat de la interacció.

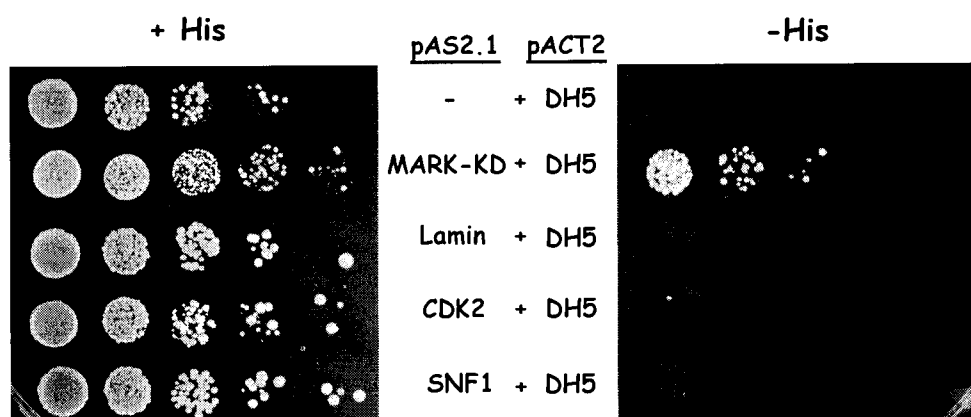


Figura 3.15. Selecció de creixement amb presència d'histidina de diferents diploids. Només el diploid que conté els plàsmids codificants per la proteïna MARK i el clon DH5 és capaç de créixer en absència d'histidina.

2.2.2 Estudis d'interacció entre MARK-KD i DH5 *in vitro*.

La interacció entre MARK-KD i DH5 també es va analitzar per estudis d'interacció *in vitro* amb el mètode de *pull-down*.

Com amb la resta de clons obtinguts del crivellat analitzats en el primer apartat dels resultats, el clon DH 5 es va clonar en el vector pGEX per obtenir la proteïna recombinant

Resultats

GST-DH5 per a ser incubada amb la proteïna recombinant MARK-KD. El resultat fou analitzat mitjançant un assaig western blot revelat amb l'anticòs policlonal contra MARK-KD.

Els resultats de la figura 3.16 mostren que en aquestes condicions la proteïna MARK-KD recombinant és capaç d'interaccionar amb el clon DH 5.

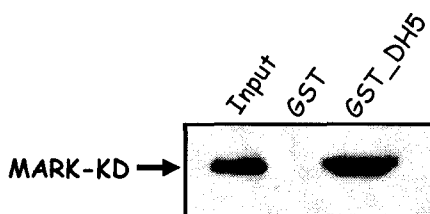


Figura 3.16. Assaig de pull-down entre MARK-KD i DH 5. Input: 50 ng de proteïna MARK-KD recombinant. GST: control negatiu. Western blot revelat amb una dilució 1:1000 de l'anticòs anti-MARK-KD.

Amb la tècnica del *pull-down* també és possible acotar el domini d'interacció entre proteïnes. Per tal, doncs, de poder concretar els aminoàcids implicats en la interacció de DH5 amb MARK-KD, el clon DH5 es va fraccionar en tres subclons que es van fusionar a GST. En la figura 3.17 es mostra l'esquema dels tres clons de DH5 que es van realitzar a partir del clon GST-DH5.

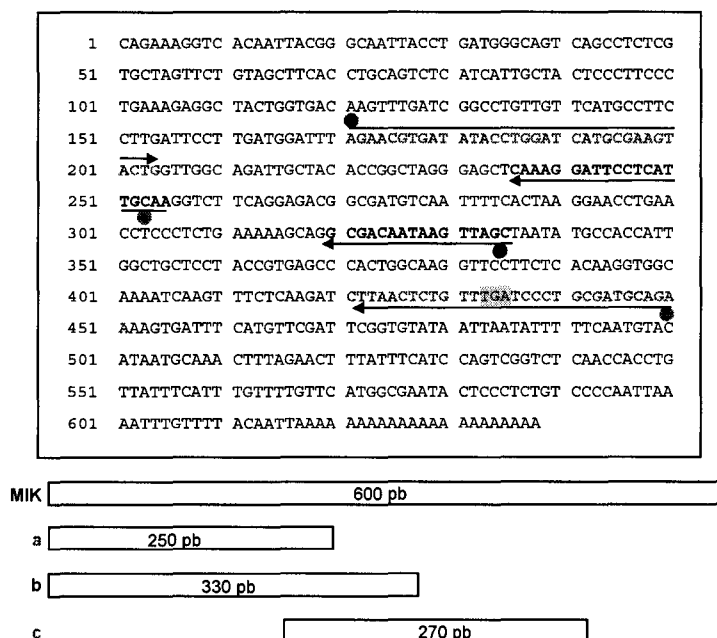


Figura 3.17 (pàgina anterior). Esquema de les construccions realitzades a partir del clon DH 5 que van ser clonades al vector pGEX. Les construccions a i b es van realitzar amb els oligonecleòtids assenyalats en el figura i un oligonucleòtid a 5' del polilinker del vector pGEX.

Aquestes tres construccions foren clonades a pGEX, expressades i purificades per a portar a terme el pull-down.

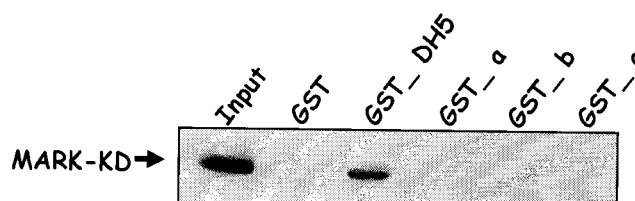


Figura 3.18. Assaig de pull-down de MARK-KD amb els diferents fragments del clon DH5. Revelat amb una dilució 1:1000 de l'anticòs anti-MARK-KD.

El resultat dels *pull-downs* amb els tres subclons (figura 3.18) va ser negatiu, observant-se només retenció de MARK-KD amb la proteïna DH 5 sencera. Aquest resultat sembla indicar que sigui necessari tot el clon DH 5 perquè tingui lloc la interacció.

Una altra de les anàlisis de *pull-down* realitzades per caracteritzar la interacció MARK-KD_DH5, fou l'estudi d'un possible efecte en la interacció per canvis aminoacídics en el domini quinasa de MARK. Com ja s'ha descrit anteriorment, MARK-KD és atípic ja que alguns dels aminoàcids considerats clau en l'activitat quinasa es troben substituïts i és incapaç de fosforilar *in vitro*. Ens vam plantejar si aquests canvis podien influir en la interacció amb el clon DH5. Al laboratori es disposava d'una sèrie de clons de MARK-KD on s'havia modificat la seqüència per mutagènesi dirigida per tal de recuperar la seqüència consens dels subdominis VIb i VII.

	VIb	VII
MARK	ASHGNLKSSN VLLGKSYQAR	VSENGLTTL
	D	DFG
A	ASHGDLKSSN VLLGKSYQAR	VSENGLTTL
B	ASHGNLKSSN VLLGKSYQAR	VSDFGLTTL
C	ASHGDLKSSN VLLGKSYQAR	VSDFGLTTL

Aquestes construccions de MARK-KD foren clonades en el vector pGEX per tal d'analitzar la seva capacitat de retenir la proteïna recombinant DH5 expressada en el sistema pET28. La proteïna recombinant DH 5 també es va utilitzar per produir anticossos en conill (apartat 2.6.1).

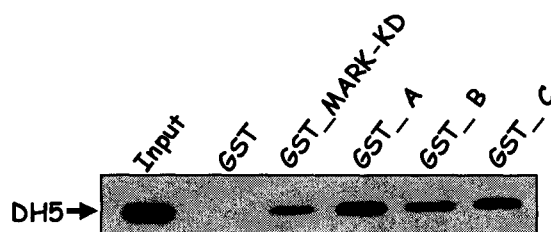


Figura 3.19. Pull-downs entre el clon DH5 i MARK-KD i amb les construccions A, B i C on s'han substituït residus aminoacídics del domini quinasa. S'ha revelat amb una dilució 1:1000 de l'anticòs anti-DH5.

Els resultats (figura 3.19) confirmen la interacció DH5-MARK-KD que ja havíem detectat en l'experiment complementari (figura 3.16). Per altra banda, aquests resultats semblen indicar que els canvis aminoacídics no afecten la interacció de les dues proteïnes. Tot i que la construcció A (on s'ha substituït l'asparagina del subdomini VIb) sembla retenir una mica millor la proteïna recombinant DH5, cosa que podria indicar una interacció lleugerament més forta.

2.2.3 Anàlisi de la interacció MARK-KD i DH 5 per co-immunoprecipitació.

La proteïna sencera corresponent al clon DH 5 (que es mostra en l'apartat 2.3) es va anomenar MIK (*MARK Interacting Kinase*).

Per tal de demostrar la interacció *in vivo* de les proteïnes MARK i MIK, es va realitzar una co-immunoprecipitació a partir d'extractes cel.lulars d'embrions de 15 DAP. Els lisats cel.lulars sota condicions no desnaturalitzants conserven els complexos proteics, de manera que un anticòs que immunoprecipita una proteïna que forma part d'un complex proteic, pot co-immunoprecipitar la resta de proteïnes del complex.

Per a dur a terme la co-immunoprecipitació, es va utilitzar l'anticòs policlonal per a la proteïna MIK (apartat 2.6.1) juntament amb l'anticòs policlonal que es disposava en el laboratori contra la proteïna MARK-KD.

En primer lloc es va haver de comprovar que MARK s'extreia en condicions no desnaturalitzants, ja que es tracta d'un receptor de membrana. Per tant, es va realitzar un western blot amb el lisat de 6 embrions de blat de moro de 15 DAP i després d'una centrifugació la fracció soluble i la insoluble s'immunodetectaven amb l'anticòs anti-MARK-KD. Els resultats (figura 3.20A) van mostrar que tant en la fracció soluble com en la insoluble s'immunodetectava proteïna MARK (97 KDa). Aquests extractes també es van revelar amb l'anticòs contra la MIK, mostrant una localització majoritària en la fracció soluble (figura 3.20B).

Com es pot observar, l'anticòs de MARK detecta, a apart de la banda d'uns 97 KDa, unes bandes d'aproximadament 37 KDa. Un experiment de fraccionament de membranes realitzat per Río (1999), va determinar que tant el polipèptid de 97 KDa com el més gran dels polipèptids de 37 KDa estan associats a la membrana, mentre que els polipèptids de pes molecular lleugerament inferior es localitzen a la fracció citoplasmàtica. Aquestes bandes de 37 KDa podrien correspondre a una forma processada de MARK. De fet, la mida deduïda del domini quinasa de MARK és compatible amb la mobilitat d'aquests.

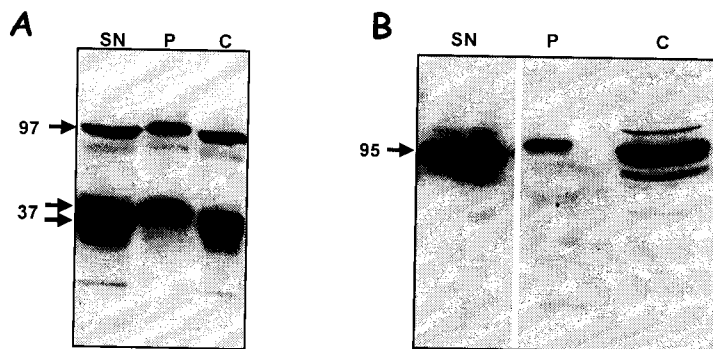


Figura 3.20. Immunodetecció de les proteïnes MARK i MIK de les extraccions que es van utilitzar per l'anàlisi de co-immunoprecipitació. Aquestes mostres foren separades en un gel SDS-PAGE al 10%, transferides a una membrana i revelades amb els corresponents anticossos diluïts 1:1000. **A:** MARK. **B:** MIK. SN: fracció del sobrenedant. P: pellet, fracció insoluble. C: control, extracte proteic total.

En l'experiment d'immunoprecipitació (figura 3.21) es pot veure com tant l'anticòs anti-MARK-KD com l'anticòs anti-DH5 immunoprecipiten les proteïnes corresponents (carril n° 1, figura 3.21A i B). En el carril n° 1 de la figura 4.22A es mostra també la immunoprecipitació d'una banda de 37 KDa. No obstant, amb cap dels dos anticossos s'observa co-immunoprecipitació de la possible proteïna d'interacció (carril n° 2, figura 3.21A i B).

Un dels desavantatges del mètode de co-immunoprecipitació és que no detecta interaccions proteiques transitòries, de fet, el que detecta són complexos proteics fisiològics que romanen com a tals després de la solubilització de la cèl.lula. Si la interacció que s'estudia és feble o transitòria no serà possible la seva detecció mitjançant aquest mètode.

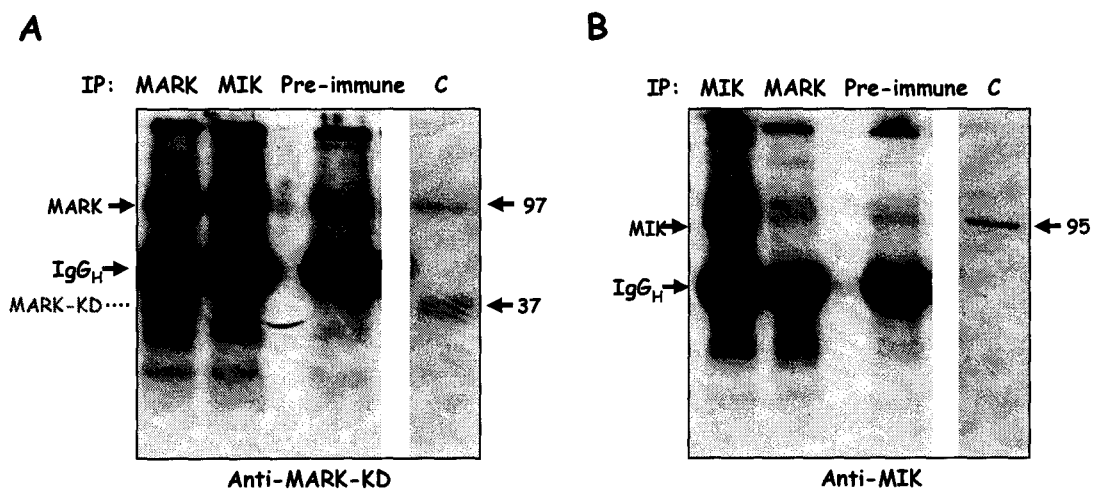


Figura 3.21. Experiment de co-immunoprecipitació per les proteïnes MIK i MARK. En la figura A es pot observar la immunoprecipitació de MARK (primer carril) així com la co-immunoprecipitació de la proteïna MIK (segon carril). En el western de la figura B en el primer carril es detecta la immunoprecipitació de MIK, mentre que en el segon carril no s'observa co-immunoprecipitació de MARK. Es van realitzar controls amb el sèrum preimmune alhora que es va afegir una mostra d'extracte proteic total (últim carril).

2.2.4 Co-localització de MARK i MIK en un gradient de sacarosa.

Davant el resultat negatiu de la co-immunoprecipitació, es va realitzar un gradient de sacarosa per comprovar la co-localització de les proteïnes MARK i MIK. Els resultats

mostren la localització de MARK (97 KDa) juntament amb la banda superior de 37 KDa en la fracció de membrana (figura 3.22A carril n°2). El gradient mostra un patró per la proteïna MARK típic de les proteïnes de membrana plasmàtica on l'acumulació s'incrementa en les fraccions més denses, mentre que el polipèptid de 37 KDa es localitza en les dues primeres fraccions (carrils 4 i 5) del gradient indicant una localització en altres tipus de membranes intracel·lulars. D'altra banda, en la fracció soluble es detecten dos polipèptids de pes molecular lleugerament inferior a l'anterior de 37 KDa.

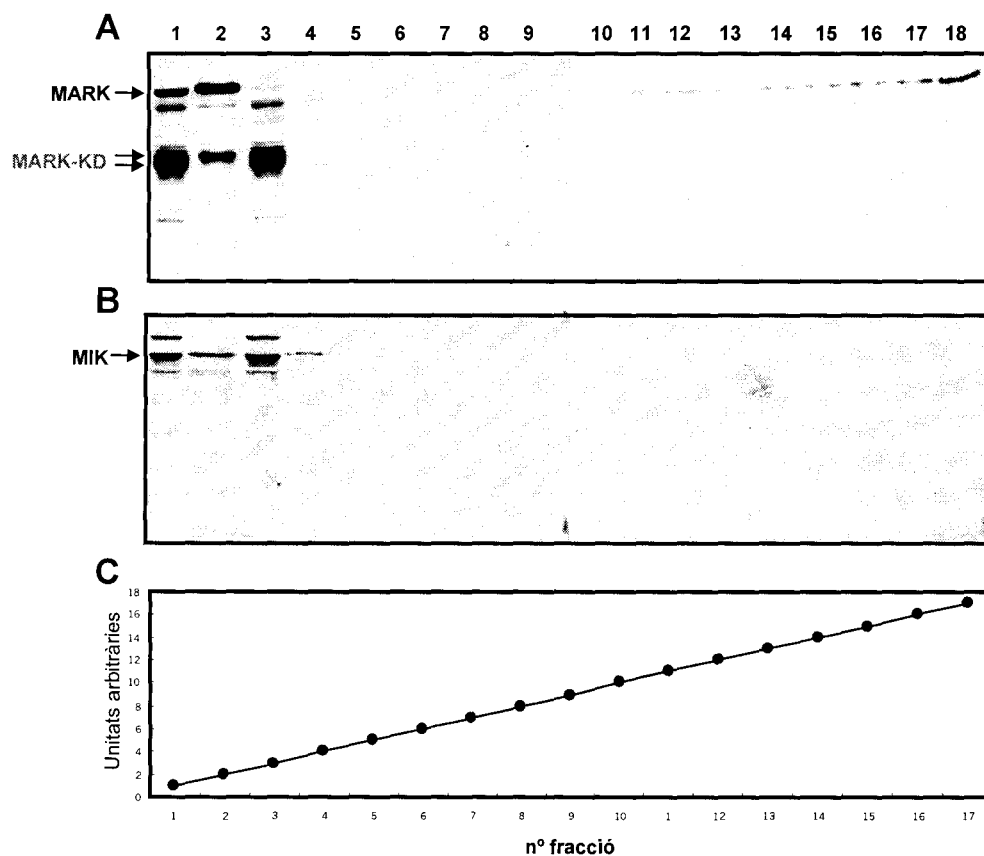


Figura 3.22. Detecció per western blot de les fraccions obtingudes en un gradient de sacarosa. Carril 1: extracte total. 2: sobrenedant. 3: pellet. 4-18: fraccions de sacarosa de menys a més denses. **A:** immunodetecció per MARK-KD. **B:** immunodetecció per MIK. **C:** gràfica de la mesura de les densitats de les diferents fraccions obtingudes en el gradient.

Respecte a la proteïna MIK, els resultats mostren una localització majoritària en la fracció soluble (carril nº3 de la figura 3.22B). La petita proporció de MIK que s'observa en la fracció insoluble apareix en les primeres fraccions menys denses del gradient indicant una localització a membranes intracel·lulars. Així doncs, la proteïna MIK co-localitza en la fracció soluble amb els polipèptids de 37 KDa que podrien correspondre a possibles formes processades de MARK, suggerint que la interacció amb MIK potser té lloc en el citoplasma.

En la gràfica de la figura 3.22C es representa la densitat del gradient de les diferents fraccions obtingudes.

En aquests moments, en el laboratori s'estan realitzant co-immunoprecipitacions amb la fracció del sobrenedant. Resultats preliminars indiquen que l'anticòs anti-MIK co-immunoprecipita un polipèptid d'un pes molecular lleugerament inferior de 37 KDa, que podria correspondre a la banda de menor pes molecular de 37 KDa, és a dir, a una de les bandes solubles.

2.3 Anàlisi de la seqüència del gen *MIK*.

Amb l'objectiu d'obtenir la seqüència completa de la proteïna MIK, es va optar per a la realització d'un crivellat d'una llibreria de DNA genòmic de blat de moro que es disposava en el departament. Tot i que es va aconseguir un clon de 5000 parells de bases, degut a la presència de nombrosos introns, alguns de pocs nucleòtids i d'altres de gran mida per la inserció d'elements mòbils, aquest clon només codificava per 431 aminoàcids (figura 3.23A). Aquesta nova seqüència de cDNA es va utilitzar com a sonda per a realitzar un nou crivellat del qual es va obtenir un clon de 3000 pb que tampoc no contenia la seqüència completa del gen *MIK* (figura 3.23A). Així doncs, es va decidir clonar el cDNA sencer per la tècnica de 5'-RACE. En la figura 3.23B es mostren els oligonucleòtids que es van dissenyar per a realitzar el RACE (material i mètodes, apartat 2.9). L'oligonucleòtid MIK RACE1 es va dissenyar per a la síntesi de la cadena de cDNA a partir d'RNA total DNAsa free d'embrions de 15 DAP (material i mètodes apartat 2.9). D'altra banda, l'oligonucleòtid MIK RACE2 es va utilitzar per l'amplificació per PCR juntament amb l'oligonucleòtid del

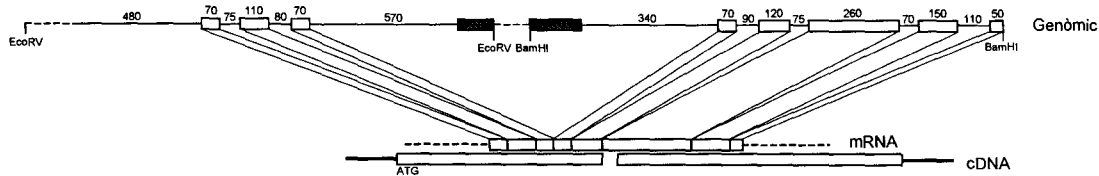
kit GeneRacer 5' Primer complementari a un oligonucleòtid de RNA incorporat a l'extrem 5' dels RNAs.

De l'amplificació per PCR es va aconseguir un clon de 1000 pb que cobreix tota la regió N-terminal de la proteïna i dels quals 200 pb corresponen a la regió 5' no traduïda (veure figura 3.23B). El gen conté uns 2000 pb que codifiquen per una proteïna de 690 aminoàcids. La proteïna MIK està formada per dos dominis: un domini quinasa N-terminal i un domini no-catalític C-terminal (figura 3.24). El subdomini VIII del domini quinasa conté la seqüència VGTPWMAPEV, en vermell en la figura 3.23B, que és la seqüència característica de les proteïnes Ste20.

Figura 3.23. A: Representació parcial del gen MIK; en rectangles es mostren els exons, en línees els exons, en gris dos retrotransposons i en ratllat els clons que provenen de cDNA. B: Seqüència completa del cDNA del gen MIK (d'uns 2300 pb) i la seva traducció a proteïna (690 aa). En sombrejat es mostra el domini quinasa, en vermell s'assenyala la seqüència específica de les proteïnes Ste20 i en blau els oligonucleòtids dissenyats pel RACE. En cursiva es mostra la seqüència de l'oligonucleòtid del kit comercial GenerRacer 5'.

Resultats

A



B

CGACTGGAGCACGAGGACACTGAAA → GeneRacer 5'

AAAACGCAAACTCTCGGACCTCTCGAAATGAGCGGTACCGGAAGCAGTGTGTAGCGGAGAGCAACCGCTCTAATCCAAACCCCTAGA
 GGCGGAGGAGACGGCGAGCGAACGACGACCAACGATTCTCGACCTTAATATCTAGCACGGCGGCGCGCGGATCTAGGGGTAA
 CGAAGGATGTCGGACTCGGCATCGATGGCGCGGCCATCGAGGCGCGTTCAGCAGCCGCACTCATCGGCTCGCGTTCCTCGGGC 90
 MS D S A S M A A A I E A R P S S R D L I G C G S P G D 28
 GTCTATAAGGGTTTGAACAGGAACTGAATAAAGAGGTTGCTATAAAGTCATGATTTGGAAGAGCTGAGGATGACATTGAGACATC 180
 V Y K G F D K E L N K E V A I K V I D L E E A E D D I E D I 58
 CAAAAGGAGATATCTGTTTGTCACAATGCGCGTCCCATATATTACGATTATTACGGCTTTATCTTACCAGACTAAATTTGGATA 270
 Q K E I S V L S Q C R C P Y I T D Y Y G S Y L H Q T K L W I 88
 GTAATGGAATACATGGCTGGTCTGTTGCTGATCTTCTCAAGCTGGTCTCTCTGGATGAAATGTCTATTGTCATGCAATTCGAG 360
 V M E Y M A G G S V A D L L Q A G P P L D E M S I A C I L R 118
 GACTTGTTCACGCAATTGAGTATCTACATTCGGAAGAAAATTCACCGTATATTAAGCGCAATATCTCTCACTGAAAGTGG 450
 D L L H A I E Y L H S E G K I H R D I K A A N I L L T E S G 148
 GATGTGAAGGTTCGGACTTTGCTGTTCTGACAGCTGACTAAAACAATGTCTAGGAGAAAGACATTTGTTGAACTCCCTTTGGATG 540
 D V K V A D F G V S A Q L T K T M S R R K T F V G T P F W M 178
 GCACCTGAGGTATTCAAATCTGAAGGTACAATGAGAAGGCAGATATCTGGTCTTTAGGTATCACTGCCATTGAAATGGCTAAGGT 630
 A P E V I Q N S E G Y N E K A D I W S L G I T A I E M A K G 208
 GAACCCCTCGGAGATATTCATCCATGAGAGTCTTTTCATCATACTCGTGAATCTTCCGAGCTTGTAGGATTTCTCGAAA 720
 E P P L A D I H P M R V L F I I P R E N P P Q L D E H F S K 238
 CCAATGAAGAGTTTGTCTCACTATGTTTAAAGAAGATCCAGCAGAGGCGCTAGTCCAGGAGCTTCTCAAGCATGTTTCATAAAA 810
 P M K E F V S L C L K K N P A E R P S A K E L L K H R P I K 268
 AATGCCGAAGA CTCCAAGCTTTTGGACCGAATAAGAGAGCGGCCAAAATTTGCGCAAAGGCATGGATGCCACAAAATGGGCAA 900
 N A R K T P K L L E R I R E R P K F A A K G M D A T Q N G Q 298
 ACATGDEAGAGAGGATTTTGTACAGGCACTATCAAGTCAATAGGACAAAAGATA CAGCTCCAGCTTTGAGTCAAGGAACAGTT 990
 T H D E E D F G T G T I K V N R T K D T A P A L S Q G T V 328
 AGGAACTGCACTCAGAGATTTTCTGATAGATCAGAGGGCACAGGAACGTCCGAGTTGTTTCAAGGCTCCTCAAAATCGCCTCCAG 1080
 R K S A V R D F S D R S E G T G T V R V V S R P P Q I A S T 358
 AAGDGTGATCTGATGCTAAAAGTCCAAAGCACCAATACGCCAGCTGATCGAGAATCAGTGGAGTCAACAGGATCGGA 1170
 K D G R S D M P K S P K A P I R T A D R E N Q W R S S G T G 388
 CTCGAAAGATCTCTCTCTCAGAGATCTCAGAGCGGACAGGAGAGTAGAAAGTTCTACTGATGACAAATGATCACTCTGTAAGTGG 1260
 S E S L S L R D T Q S G R G R V E S S T D D N D H S V S G 418
 TCAGGAAGTGTGTTACGCTCCAAAGGATCTCAGTTGTACTCAACAGCTAGCAACACAGTGCACAGCTCCAGGATCCAGGATTC 1350
 S G T V V L R S P R A S Q L Y S T A S N H S A K P P S R F S 448
 TCATATGAGATATGCTAATAGTGGACAGTTGTCAGACCCAAATGAAGACCCGAACTCCAGGATCTCAAGTCAAGGCTGGG 1440
 S Y E D M S N S G T V V Q T Q N E D P E T P R S S R S R L G 478
 ATCCAGAAAAGCATCAATGCTCCTCTGAGGATAGTGCATTAACCTTGCAGAGGCAAGGCTGCTTGCAGGCTGGGTAAGAAA 1530
 I Q E K A S N A P L E D S A I N L A E A K A A L Q A G L R K 508
 GGAATGCTCGAGAAAGCCTTTTATCAACAGGCGTGAAGGGATCACATGAGCATAGATCTTCTGGAGTAAATAGTCAAGAGGTTCAA 1620
 G N A R E R P P I N R R E K G S H E H R S S G V N S Q E V Q 538
 AGTGAGGATGTGGACCGGAAAGTCAAAAATTCAGCAATACCTGATGGCAGTCAAGCTCTCGTCTAGTTCTGTAGCTTCACT 1710
 S E D V D T Q K G H K L R Q L P D G Q S A S R A S S V A S P 568
 GCAGTCTCATGCTACTCCCTCCCTGAAAGAGGCTACTGGTACAAAGTTGATCGCTGCTGTTCAAGCTTCTGATTCCTG 1800
 A V S S L L L P S L K E A T G D K F D R P A V H A F L D S L 598
 ATGGATTTAGAACGTGATATACCTGGATCATGCGAAGTACTGGTGGCAGATTGCTACCCGGCTAGGGAGCTCAAAGGATTCCTCATT 1890
 M D L E R D I P G S C E V L V G R L L H R L G S S K D S S L 628
 CAAGGTCTCAGGAGACGGCGATGCAATTTTCACTAAGGAACCTGAACCTCCCTCTGAAAAGCAGGCGACATAAGTTAGCTAATATG 1980
 Q G L Q E T A M S I F T K E P E P P S E K A G D N K L A N M 658
 CCACCATGGTCTCTACCGTGAAGCCACTGGCAAGTTCCTTCTCAAGGTGGCAATCAAGTTTCTCAAGATCTTAAGCTGTT 2070
 P P L A A P T V S P L A R F L L T R W Q N Q V S Q D L N S V 68
 TGATCCCTGCGATGCAAGAAAGTATTCAATGTTGATTCCGGTGTATAATTAATTTTTTCAATGTACATAATGCAAACCTTTAGAACCTT
 *
 ATTTCACTCAGTCGGTCTCAACCACTGTTATTTTCATTGTTTGTTCATGGCAATCTCCCTCTGCCCAATTAATAATTTGTTTAC
 AATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Domini
 quinasa
 MIK RACE2
 MIK RACE1
 Domini
 regulador

2.4 Estudi de la proteïna MIK.

Les proteïnes Ste20 es classifiquen en dues subfamílies segons la posició del domini quinasa (figura 3.24): les proteïnes anomenades STE20/PAK (*p21-activated kinase*) i les GCK/SPS1 (*germinal center kinase*).

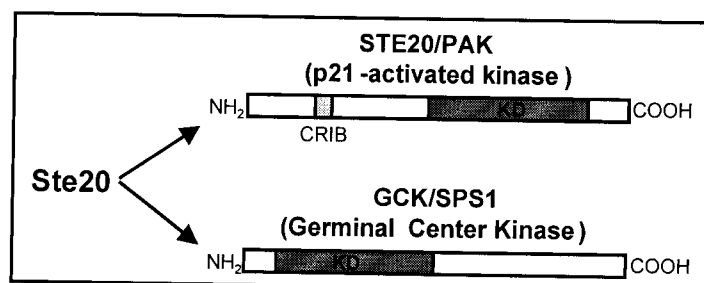


Figura 3.24. Esquema de la classificació de la família Ste20 amb les dues subfamílies de proteïnes PAK i GCK.

En la figura 3.25 es mostra un alineament de seqüències de la proteïna MIK amb proteïnes de la família GCK. Aquest alineament mostra l'elevada identitat de seqüència entre els dominis quinasa (on es marquen els 11 subdominis conservats i els residus aminoacídics invariables) i la gran diversitat de seqüència del domini no-catalític. En aquest domini regulador es pot observar una major similitud de MIK amb les quatre GCK de plantes.

Figura 3.25. Anàlisi comparativa de la seqüència de MIK amb la de proteïnes GCK. S'han marcat els 11 subdominis conservats del domini quinasa i els residus invariables amb un asterisc (*). **BnMAP4Ka1:** CAA08757. **BnMAP4Ka2:** CAA08758. **AtMAP4Ka1:** AC008007. **AtMAP4Ka2:** AP000413. **SEVERIN:** AAC24522. **MASK:** XP_029574. **MST3:** Q9Y6E0. **KRS-1:** NP_006272. **MST-1:** CAB89421. **MST4:** NP_057626. **SPS1p:** NP_010811. **GCK:** NP_004570. **GCKR:** NP_003609. **HPK1:** NP_009112. **SOK1:** O00506. **GLK:** NP_003609.

Resultats

```

MIK :.....SASAS.....MAAAIEARSSRDLLGCSYFGDVMKFDKELNKEVAIKVIDEBAARDDIEDIC....
BnMAP4Ka1:.....DDGVAG.....LQEAAGARSSHVLLGCRSFGDVMKFDSELNKEVAIKVIDEBSSEDEIEDIC....
AtMAP4Ka1:.....DDVAG.....LQEAAGTRSSQFLGCRSFGDVMKFDKELNKEVAIKVIDEBSSEDEIEDIKVSLLEL
BnMAP4Ka2:.....DDVAG.....LQEAAGARSSQVLLGCRSFGDVMKFDKELNKEVAIKVIDEBSSEDEIEDIC....
AtMAP4Ka2:.....DDVAG.....LQEAAGARSSQVLLGCRSFGDVMKFDKELNKEVAIKVIDEBSSEDEIEDIC....
SPS1p :.....SESKEIS.....IRSRTPSKLSIQSCEGSRNFGDVMKFAVRVSTQIIVAIKVVVNEBSDEDELLAQ....
MASK :.....SAHSVAVQVP.....GMQNNIADPEELFTKLEKRGSGSGGDFGIDNRGQVVAIKVIDEBAARDEYIEDIC....
MST4 :.....SAHSVAVQVP.....GMQNNIADPEELFTKLEKRGSGSGGDFGIDNRGQVVAIKVIDEBAARDEYIEDIC....
MST3 :.....MDSRAQLWGLALNKRRAFLPHPGGSTNLKADPEELFTKLEKRGSGSGGDFGIDNRGQVVAIKVIDEBAARDEYIEDIC....
SOK-1 :.....SAHLRFAN.....QHSRVDPPEELFTKLDKRGSGSGGDFGIDNRKKEVVAIKVIDEBAARDEYIEDIC....
SEVERIN :.....SASKK....DDEELYVRQEKKGSGSFGDVMKFGINKKTNETIATKIDLEBAARDEYIEDIC....
MST1 :.....METVQLRNPRLQKLLDE.....DSLTKQEEVFDVLEKLSGSYSFVSKAIEKKGQIVAVIQVP...VESDLQELIK....
KRS-1 :.....MEQPPAPKSKLKLSE.....DSLTKQEEVFDVLEKLSGSYSFVSKAIEKKGQIVAVIQVP...VESDLQELIK....
GCKR :.....SNPGF.....DLSRNPQDEBELIQRGSGSYCGDFVKNRNVTGLANIKVILEPGEDFAVYQ....
GLK :.....SNPGF.....DLSRNPQDEBELIQRGSGSYCGDFVKNRNVTGLANIKVILEPGEDFAVYQ....
GCK :.....SFLR.....DVSLDQDRDELLQRVAGTYGDFVKNRDTVSELANIKVIREPDDISSLQ....
HPK1 :.....DDVDP.....DIFNDRDRHYDLLQRIGSGTYGEVFAKRVSGDVAIKVIDEBAARDDVSTLK....
                +I                  II
                G G V K                  A K 1

MIK :.....ESVLSQCRCP.YITIVGSYLHQ.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
BnMAP4Ka1:.....ESVLSQCRCP.YITIVGSYLHQ.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
AtMAP4Ka1:TLVLE...ESVLSQCRCP.YITIVGSYLHQ.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
BnMAP4Ka2:.....ESVLSQCRCP.YITIVGSYLHQ.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
AtMAP4Ka2:.....ESVLSQCRCP.YITIVGSYLHQ.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
SPS1p :.....SIPFLAEKLSF.LIITIVIAITMDE.....VSMWIVMECGGSCSLKSRVYNGPPEKVSFIHEVTLGEKDLSEGGKIHHD
MASK :.....BITVLSQCSS.VYTRYVGSYKQG.....SKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
MST4 :.....BITVLSQCSS.VYTRYVGSYKQG.....SKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
MST3 :.....BITVLSQCSS.VYTRYVGSYKQG.....SKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
SOK-1 :.....BITVLSQCSS.VYTRYVGSYKQG.....SKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
SEVERIN :.....ENVLSQCSFP.VYTRYVGSYKQG.....SKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
MST1 :.....ESIMQCSS.VYTRYVGSYKFG.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
KRS-1 :.....ESIMQCSS.VYTRYVGSYKFG.....TKLWIWMECAGGSVALDLQAGP...PDDTSHACITDELHAIVEVLSEGGKIHHD
GCKR :.....EIMMKDKHP.NIVAVGSYLRR.....DKLWICMFPCCGGSLQEIYHATG...PDSBQLQAVYVRETTQGGYVLESGKGRHHD
GLK :.....EIMMKDKHP.NIVAVGSYLRR.....DKLWICMFPCCGGSLQEIYHATG...PDSBQLQAVYVRETTQGGYVLESGKGRHHD
GCK :.....BITILRECRHP.NIVAVGSYLRR.....DKLWICMFPCCGGSLQEIYHATG...PDSBQLQAVYVRETTQGGYVLESGKGRHHD
HPK1 :.....EPLIKTCRHA.NIVAVGSYLWL.....QKLWICMFPCCGSSQEIYQVGT...PDSBQLQAVYVRETTQGGYVLESGKGRHHD
                III      IV      V      VIa
                EI      Y      WI ME GS      E      LI K HRD

MIK :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
BnMAP4Ka1:.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
AtMAP4Ka1:.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
BnMAP4Ka2:.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
AtMAP4Ka2:.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
SPS1p :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVICCEVD...GNEKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
MASK :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...ANDSKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
MST4 :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...ANDSKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
MST3 :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...ANDSKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
SOK-1 :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNS...ANDPKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
SEVERIN :.....IKANMLLINSQGVKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQNT...ANDPKADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
MST1 :.....IKAGMLLINTGSHAKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQEIG...NCVADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
KRS-1 :.....IKAGMLLINTGSHAKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVIQEIG...NCVADINSLGITAHBLARGPNSLPPRVLEF
GCKR :.....IKAGMLLINTGSHAKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVAAVERK...GCNQLCGLAVGITAHELLOPPMPPHPRNALEF
GLK :.....IKAGMLLINTGSHAKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVAAVERK...GCNQLCGLAVGITAHELLOPPMPPHPRNALEF
GCK :.....IKAGMLLINTGSHAKADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVAAVERK...GCNQLCGLAVGITAHELLOPPMPPHPRNALEF
HPK1 :.....IKANMLLINDAGEVRLADFCVAGQLDQIKRNTSVGTFENMAPEVAAVALK...GCNQLCGLAVGITAHELLOPPMPPHPRNALEF
                VII      VIII      IX      X
                IK N L G DFG R GTP WMAPEV Y D W GIT E PP P

MIK :.....IXPRE..NPHQDEH..FSPKMEKNSVLCQKKNABRFSAKKELDERE
BnMAP4Ka1:.....IXPRE..SPPQDEH..FSRPLKEVNSFCUKAABRFSAKKELDERE
AtMAP4Ka1:.....IXPRE..SPPQDEH..FSRPLKEVNSFCUKAABRFSAKKELDERE
BnMAP4Ka2:.....IXPRE..NPHQDEH..FSRQVKRNSVLCQKKNABRFSAKKELDERE
AtMAP4Ka2:.....IXPRE..TPPQDEH..FSRQVKRNSVLCQKKNABRFSAKKELDERE
SPS1p :.....NLFRK..KPKRQGP..FSDAAKDFVAGCIVKTPADRSAYNLSPFQV
MASK :.....LIFKN..NPPTVGD..FTKSFKEIDACIKNDPSFRPAKELLCKKSE
MST4 :.....LIFKN..NPPTVGD..FTKSFKEIDACIKNDPSFRPAKELLCKKSE
MST3 :.....LIFKN..NPPTVEGN..YSKPLKEVREACIKNDPSFRPAKELLCKKSE
SOK-1 :.....LIFKN..SPPTEGQ..FSKPKKEVREACIKNDPSFRPAKELLCKKSE
SEVERIN :.....LIFKD..PPTVEGN..FSKPKKEVREACIKNDPSFRPAKELLCKKSE
MST1 :.....MIFTN..PPTFRKPELWDDDEIDFVKKIVVNEEQRAATOLLQPFE
KRS-1 :.....MIFTN..PPTFRKPELWDDDEIDFVKKIVVNEEQRAATOLLQPFE
GCKR :.....LMTKSNFPQPRKDKDKMKNSEHFKKMAIKRNPKRFPAKELLCKKSE
GLK :.....LMTKSNFPQPRKDKDKMKNSEHFKKMAIKRNPKRFPAKELLCKKSE
GCK :.....LMSKSNFPQPRKDKDKMKNSEHFKKMAIKRNPKRFPAKELLCKKSE
HPK1 :.....LMTKSGYQPRRCKKGGKWAAPHNKIKVTIKRSKRNRSATKMSHSLV
                XI
                PP F L K P R A
    
```

MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

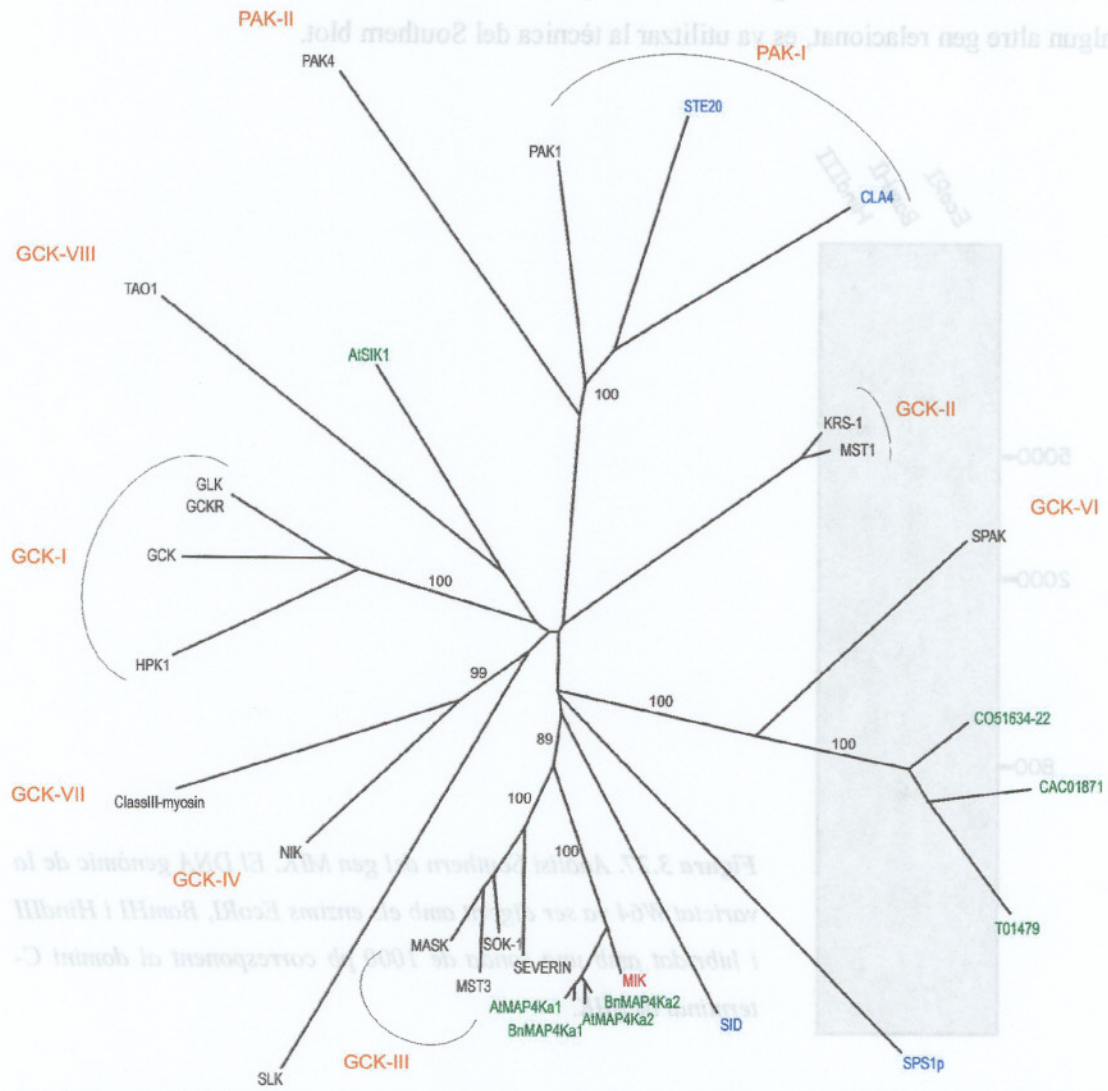
MIK : ...
BMAP4K2 : ...
ACMAP4K2 : ...
BMAP4K1 : ...
ACMAP4K1 : ...
SP51p : ...
MASK : ...
MST4 : ...
MST3 : ...
SOK-1 : ...
SEVERIN : ...
MST1 : ...
KRS-1 : ...
GCKR : ...
GLK : ...
GCK : ...
HPK1 : ...

La família de proteïnes GCK està molt poc caracteritzada. Un estudi molt recent de les GCK descrites de mamífer, *Drosophila* i *C. elegans* defineix sis subfamílies de GCK segons l'estructura del domini regulador (apartat 1.3 de la introducció). En plantes, fins al moment, només s'han descrit dues proteïnes de tipus GCK en *Brassica napus* (BnMAP4K α 1 i BnMAP4K α 2) (Leprince *et al.*, 1999). Per altra banda, dues seqüències aminoacídiques deduïdes d'*Arabidopsis* presenten una elevada similitud amb aquestes proteïnes de *Brassica*.

La figura 3.26 presenta un arbre filogenètic resultat de la comparació de seqüència del domini quinasa de MIK amb diferents proteïnes GCK representatives de les diferents subfamílies.

Com es pot observar en l'arbre filogenètic, la proteïna MIK s'agrupa amb les quatre proteïnes GCK de plantes. Aquest grup GCK de plantes, segons les anàlisis realitzades, presenta més similitud amb la subfamília GCK-III que està formada per les proteïnes MASK, MST3, SOK1 de mamífer i la proteïna SEVERIN de *Dictyostelium discoideum*.

Figura 3.26. Arbre filogenètic de tipus Neighbor-Joining resultat de la comparació dels dominis quinasa de diferents proteïnes de la família Ste20. Es mostren els valors de bootstrap d'un valor superior a 60 dels principals nodes. Es mostren les 8 diferents subfamílies de les proteïnes GCKs i les dues de la subfamília PAK. Les proteïnes de plantes estan escrites en verd i les bacterianes en blau. (SEVERIN: AAC24522. BnMAP4Ka1: CAA08757. BnMAP4Ka2: CAA08758. AtMAP4Ka1: AC008007. AtMAP4Ka2: AP000413. MASK: XP_029574. MST3: Q9Y6E0. KRS-1: NP_006272. MST-1: CAB89421. SPS1p: NP_010811. GCK: NP_004570. GCKR: NP_003609. HPK1: NP_009112. STE20: AAA35039. CLA4: NP_014101. SOK1: O00506. NIK: NP_056531. GLK: NP_003609. PAK1: AAC24716. PAK4: NP_005875. TAO1: NP_057235. SLK: NP_055535. SPAK: XP_002444. SID: gi2370557. AtSIK1: U96613.1. Putative Ste20 *Oriza sativa*: CO51634_22. Similar to BnMAP4K d'*Arabidopsis*: CAC01871. Putative Ste20 *Arabidopsis*: T01479).



El Southern es va hibridar amb una sonda corresponent a la regió C-terminal de MİK (de 1000 pb) que conté una diàna de restricció BlnH1. Tal i com es pot veure en la figura 3.27, la sonda detecta una banda amb les digestions EcoRI i HindIII (d'aproximadament 8000 pb i 6000 pb respectivament) i dues bandes en el DNA genòmic digerit per BlnH1 (d'uns 4500 i 600 pb). Aquest resultat és compatible amb l'existència d'una sola còpia del gen MİK en el genoma de blat de moro.

2.5 Anàlisi Southern de *MIK*.

Per tal de determinar si el gen *MIK* és un gen únic en el genoma de blat de moro o hi ha algun altre gen relacionat, es va utilitzar la tècnica del Southern blot.

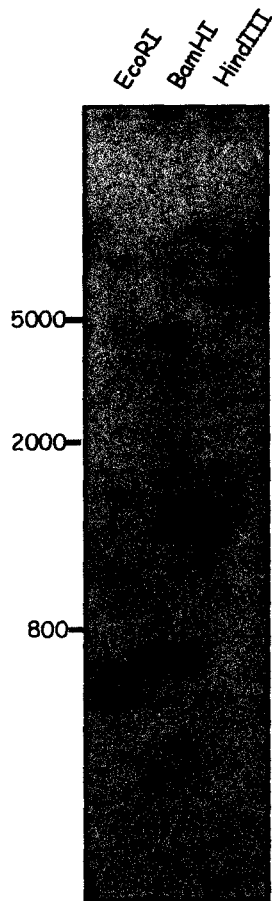


Figura 3.27. Anàlisi Southern del gen MIK. El DNA genòmic de la varietat W64 va ser digerit amb els enzims EcoRI, BamHI i HindIII i hibridat amb una sonda de 1000 pb corresponent al domini C-terminal de MIK.

El Southern es va hibridar amb una sonda corresponent a la regió C-terminal de *MIK* (de 1000 pb) que contenia una diana de restricció *BamHI*. Tal i com es pot veure en la figura 3.27, la sonda detecta una banda amb les digestions *EcoRI* i *HindIII* (d'aproximadament 8000 pb i 6000 pb respectivament) i dues bandes en el DNA genòmic digerit per *BamHI* (d'uns 4500 i 600 pb). Aquest resultat és compatible amb l'existència d'una sola còpia del gen *MIK* en el genoma de blat de moro.

2.6 Patró d'expressió de *MARK* i *MIK* durant l'embriogènesi.

L'expressió de *MARK* té lloc durant les primeres etapes de l'embriogènesi, amb una expressió màxima cap als 15 DAP i decreixent posteriorment fins a desaparèixer als 40 DAP, mentre que en teixits adults com la fulla no es detecta expressió de *MARK* (Roca, 1998).

Per tal d'estudiar el patró d'expressió de *MIK* i comparar-lo amb el de *MARK*, es van realitzar dos northern blots que van ser hibridats amb les dues sondes corresponents. Es van analitzar embrions a diferents estadis de l'embriogènesi, així com teixit adult de fulla jove.

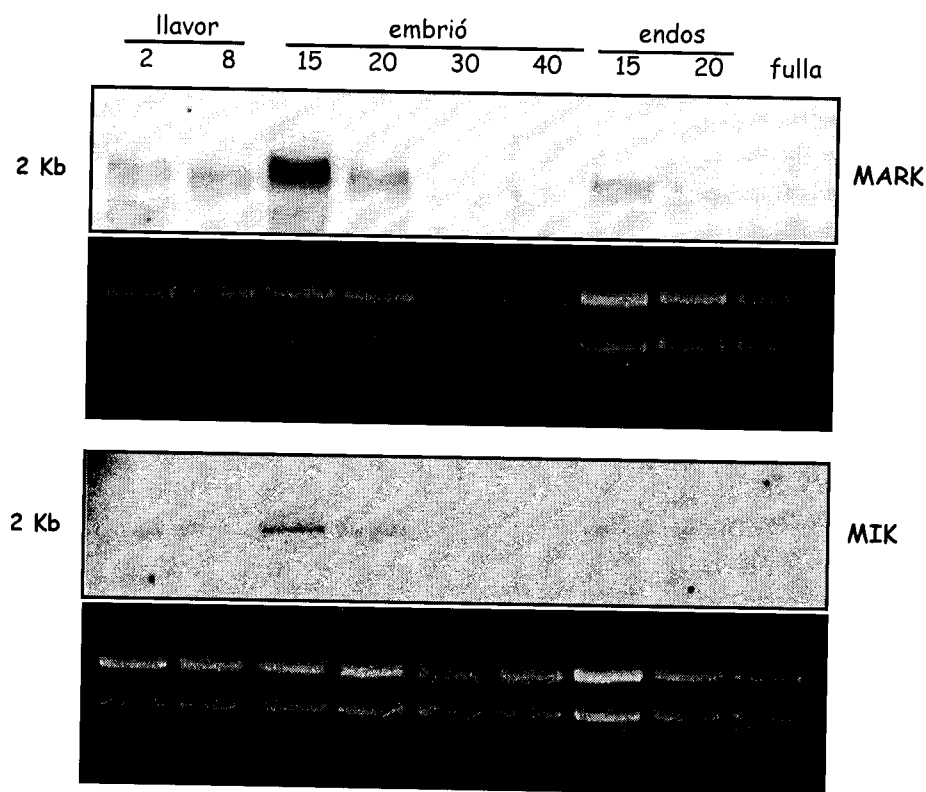


Figura 3.28. Estudi de l'expressió de les proteïnes *MARK* i *MIK* per northern blot d'embrions a diferents dies després de la polinització. En els estadis de 2 i 8 DAP es prenia la llavor sencera i a partir de 15 DAP es separava l'embrió de l'endosperm, on també es va estudiar l'expressió dels dos gens. Com a teixit de planta adulta es va analitzar fulla jove.

Com es pot observar en la figura 3.28, el patró d'expressió dels dos gens al llarg de l'embriogènesi és molt similar detectant-se als 2 DAP fins als 20 DAP en embrió i en endosperm presentant un pic d'expressió en l'embrió als 15 DAP. En teixit de fulla jove no es detecta presència de RNA de cap dels dos gens. Els patrons d'expressió coincidents suggereixen que ambdós gens es regulen de manera coordinada.

2.7 Patró d'acumulació de les proteïnes MARK i MIK durant l'embriogènesi.

Per a l'estudi del patró d'acumulació de la proteïna MIK, es van obtenir anticossos policlonals en conill amb els quals es van realitzar experiments de western blot i immunolocalitzacions en teixits.

2.7.1 Obtenció d'un anticòs policlonal contra la proteïna MIK.

Per a l'obtenció dels anticossos, el clon DH5 obtingut en el crivellat de doble híbrid que codifica per la regió més C-terminal del domini regulador de la proteïna MIK fou clonat en el sistema pET28 (Novagen). Aquests vectors permeten l'expressió d'una proteïna recombinant que presenta una cua d'histidines facilitant la seva purificació per unió a una columna de Ni⁺ (figura 3.29).

En la figura 3.30 es mostra el resultat de l'expressió de MIK-pET28 en *E. coli* (carril nº 2) i la seva posterior purificació en columnes de Ni⁺ (carrils 6 i 7).

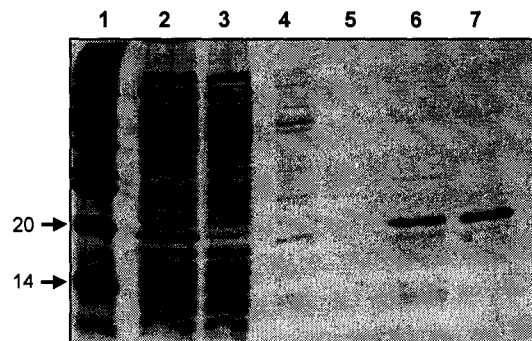


Figura 3.29. Gel d'acrilamida al 15% tenyit amb Coomassie Blue on es mostra la purificació de la proteïna de fusió MIK-pET28. La purificació en la columna d'histidines es va realitzar sota condicions desnaturalitzants (6M d'urea) degut al comportament insoluble de la proteïna recombinant. 1: pesos moleculars. 2: extracte total induït. 3, 4 i 5: rentats amb Binding Buffer. 6: Elució amb 100 mM Imidazol. 7: Elució amb 300 mM Imidazol.

La proteïna purificada es va utilitzar per inocular conills tal i com s'explica en l'apartat 3.6 de materials i mètodes. La qualitat d'anticòs obtingut es va analitzar per immunodetecció. Mitjançant experiments de dot blot amb diferents dilucions de proteïna recombinant incubada amb diferents dilucions del sèrum es va determinar que l'anticòs era capaç de reconèixer fins a 1 ng de proteïna recombinant amb una dilució 1:1000. Alhora, calia comprovar si l'anticòs era capaç de reconèixer la proteïna MIK extreta de teixit vegetal, per la qual cosa es va realitzar un western blot amb extracte total d'embrions de 20 DAP. En la figura 3.30 s'observa la immunodetecció en l'extracte proteic total d'embrions d'una única banda que en els gels d'acrilamida es localitza a uns 95 KDa.

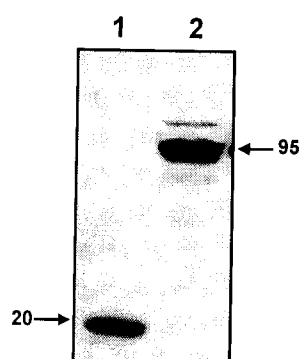


Figura 3.30. Immunodetecció d'extractes totals d'embrions de 20 DAP amb sèrum policlonal contra la proteïna MIK. Les mostres s'han separat en un gel d'acrilamida al 15% i la membrana transferida s'ha incubat amb una dilució 1:1000 del sèrum (Ab 2900). 1: proteïna recombinant. 2: 30 µg d'extracte proteic total d'embrions de 20 DAP.

2.7.2 L'acumulació de les proteïnes MARK i MIK coincideix en el temps durant l'embriogènesi.

Extractes proteics totals d'embrions de diferents dies després de la polinització es van analitzar per immunodetecció amb els anticossos policlonals de MARK i MIK paral·lelament.

Com s'ha descrit en treballs anteriors, l'acumulació de proteïna MARK en forma d'un polipèptid de 97 KDa i diversos polipèptids més petits d'aproximadament 37 KDa és màxima en embrions de 15 DAP mentre que va disminuint progressivament al llarg de l'embriogènesi, tot i que en la llavor de 60 DAP encara és detectable (Río, 1999). En la figura 3.31 s'observa aquest patró d'acumulació, on es detecta la proteïna MARK en extractes d'embrions de 2 DAP que es manté fins als 20 DAP i a partir dels 30 DAP comença a disminuir. MARK s'acumula també, tot i que en menor quantitat, en el teixit de

l'endosperm de 15 DAP. En teixit de planta adulta, hi ha una lleugera detecció de MARK en fulla jove. En la figura 3.31 es pot observar el patró d'acumulació de les bandes de 37 KDa al llarg de l'embriogènesi respecte a l'acumulació de la proteïna MARK. La presència de les dues bandes de 37 KDa té lloc sobretot en embrions de 15 i 20 DAP, mentre que no es detecten en l'endosperm de 15 DAP. D'altra banda, en la llavor de 8 DAP s'immunodetecta tant sols una banda de 37 KDa i en embrions de 30 i 40 DAP apareix un patró de bandes diferent, de dèbil intensitat, detectant-se una tercera banda de major pes molecular. Aquests resultats suggereixen que les modificacions (un processament, per exemple) que donen lloc als diferents polipèptids de MARK, podrien estar controlats durant l'embriogènesi. En conjunt, tenint en compte tant els polipèptids de 37 KDa com el de 97, la major acumulació de proteïna MARK té lloc en embrions de 15 DAP coincidint amb el patró d'expressió de mRNA de *MARK*.

L'acumulació de proteïna MIK es detecta en embrions a partir de 15 DAP i disminueix en embrions de 30 DAP. En el teixit d'endosperm de 15 DAP no es detecta acumulació de MIK, com tampoc en fulla jove. El patró d'acumulació de proteïna de MIK coincideix amb el del mRNA de *MIK*, indicant que no es dóna un control post-transcripcional important durant l'embriogènesi.

Així doncs, els resultats dels western blots mostren que existeix una coincidència en el temps de l'acumulació de les proteïnes MARK i MIK durant l'embriogènesi de blat de moro.

Figura 3.31 (pàgina següent). Anàlisi western blot. Extractes proteics totals (30 µg) d'embrions de diferents DAP, endosperm de 15 DAP i fulla jove. Els extractes foren separats en un gel d'acrilamida SDS-PAGE al 10%, transferits a una membrana d'Immobilon P i revelats a una dilució 1:1000 pels dos anticossos.



2.7.3 Immunolocalitzacions de les proteïnes MARK i MIK en embrions de blat de moro de 15 DAP.

Per tal d'estudiar en més detall en quins teixits té lloc l'acumulació de proteïna MIK així com per comparar els patrons d'acumulació de les proteïnes MARK i MIK, es van realitzar immunolocalitzacions en embrions de blat de moro de 15 DAP. Malauradament, l'anticòs que es disposava contra la proteïna MIK i que s'havia utilitzat en els western blots, no semblava reconèixer la proteïna nativa en teixit. Per tant, es va haver de produir un nou anticòs contra tot el domini regulador de MIK (DR-MIK). La síntesi d'aquest anticòs es va realitzar pel sistema d'expressió i purificació pET28, de la mateixa manera que el descrit en l'apartat 2.6.1, però es va utilitzar un clon que contenia una regió més gran de l'ORF de MIK (1000 pb) corresponent al domini regulador. De la mateixa manera, es va comprovar la immunodetecció de MIK en extractes proteics totals d'embrions (figura 3.32).

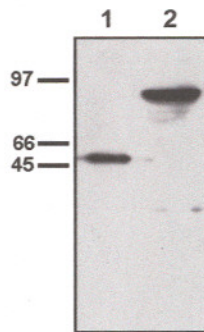


Figura 3.32. Western blot. Determinació de la presència d'anticòs contra el domini regulador de MIK. 1: proteïna recombinant pET28_DR-MIK. 2: extracte total proteic d'embrions de 15 DAP (30µg). L'anticòs anti-DR-MIK es va utilitzar a una dil.lució 1:1000 (Ab 165).

Les immunodeteccions es van dur a terme amb un anticòs secundari conjugat amb el fluorofor cianina 3 i sobre talls d'embrions inclosos en parafina que van ser analitzats al microscopi confocal.

Les immunolocalitzacions obtingudes en embrions tallats longitudinalment mostren una acumulació generalitzada de proteïna MIK en tot l'embrió de blat de moro (figura 3.33B). En les zones dels primordis foliars i del meristem radicular sembla que hi ha una major acumulació de proteïna, així com en els feixos vasculars del coleòptil. L'acumulació de la proteïna MARK presenta una localització similar, generalitzada en tot l'embrió i especialment abundant en els feixos vasculars del coleòptil i de la radícula.

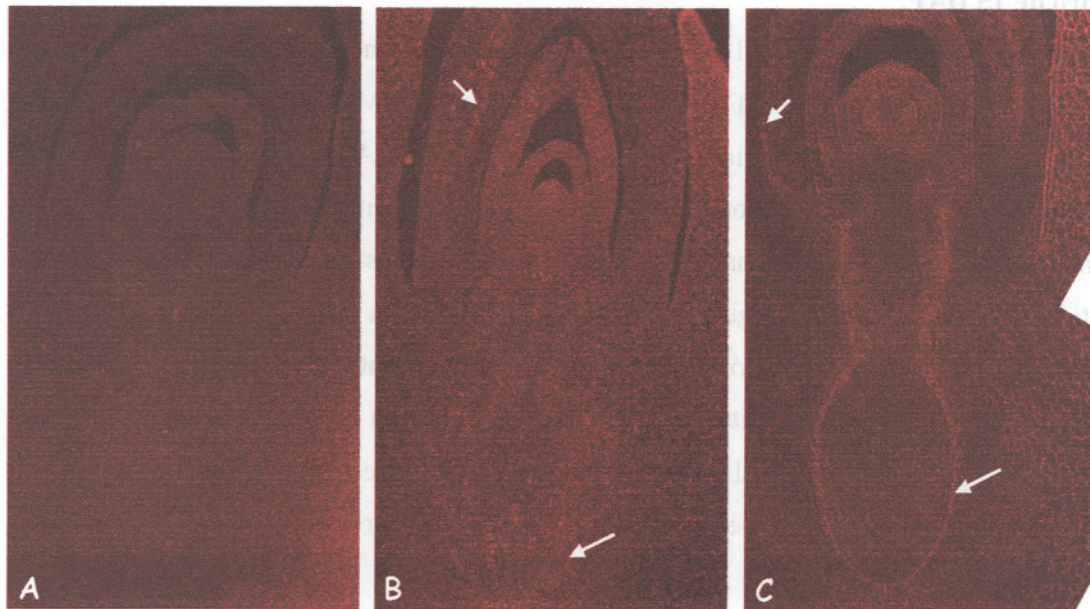


Figura 3.33 (pàgina anterior). Immunolocalitzacions de les proteïnes MIK i MARK (B i C) en embrions de 15 DAP tallats longitudinalment. Les proteïnes van ser immunolocalitzades amb dilucions 1:100, i com a control negatiu es va utilitzar el sèrum preimmune (1:100), figura A.

En la figura 3.34 s'observa en més detall la major acumulació tant de MIK com de MARK en les cèl.lules que formen part dels feixos vasculars del coleòptil. En aquestes imatges es detecta també una acumulació de MARK més important en les membranes laterals respecta a les membranes transversals que possiblement s'han format més recentment. A més, en les diferents immunodeteccions realitzades s'observa una certa polarització de MARK, acumulant-se majoritàriament en les membranes inferiors. Aquesta polarització en els feixos vasculars no sembla detectar-se amb la proteïna MIK.

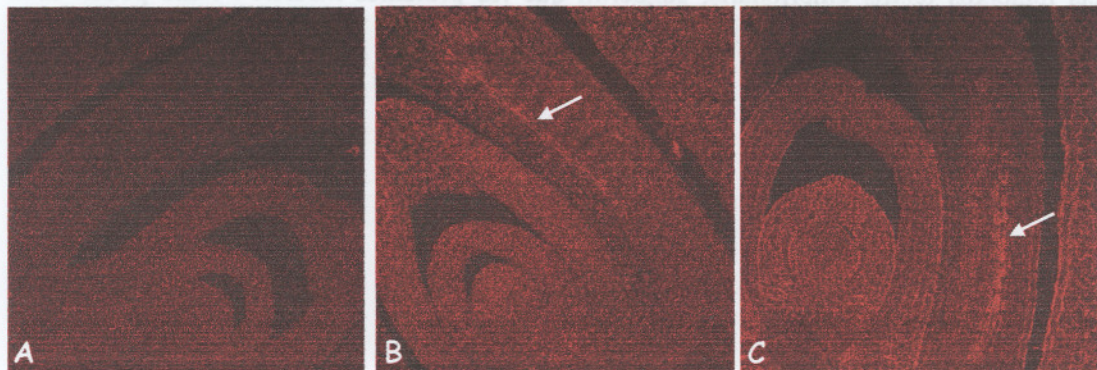


Figura 3.34. Acumulació de les proteïnes MIK i MARK en els feixos vasculars del coleòptil d'embrions de 15 DAP. A: control negatiu amb el sèrum preimmune. B: acumulació de la proteïna MIK. C: acumulació de la proteïna MARK.

L'acumulació de la proteïna MIK en tot el meristem apical es pot observar en el detall de la figura 3.35A. Comparant i sobreposant la imatge d'immunolocalització amb la imatge de transmissió on s'observen les estructures cel.lulars, la localització cel.lular de la proteïna MIK sembla mostrar un patró citoplasmàtic (figura 3.35C).

Per altra banda, l'acumulació de proteïna MARK sembla clarament associada a la membrana plasmàtica (figura 3.35D). En la figura 3.35E es pot comparar el patró de MARK amb l'autofluorescència de la paret cel.lular, en color verd, cosa que permet

Resultats

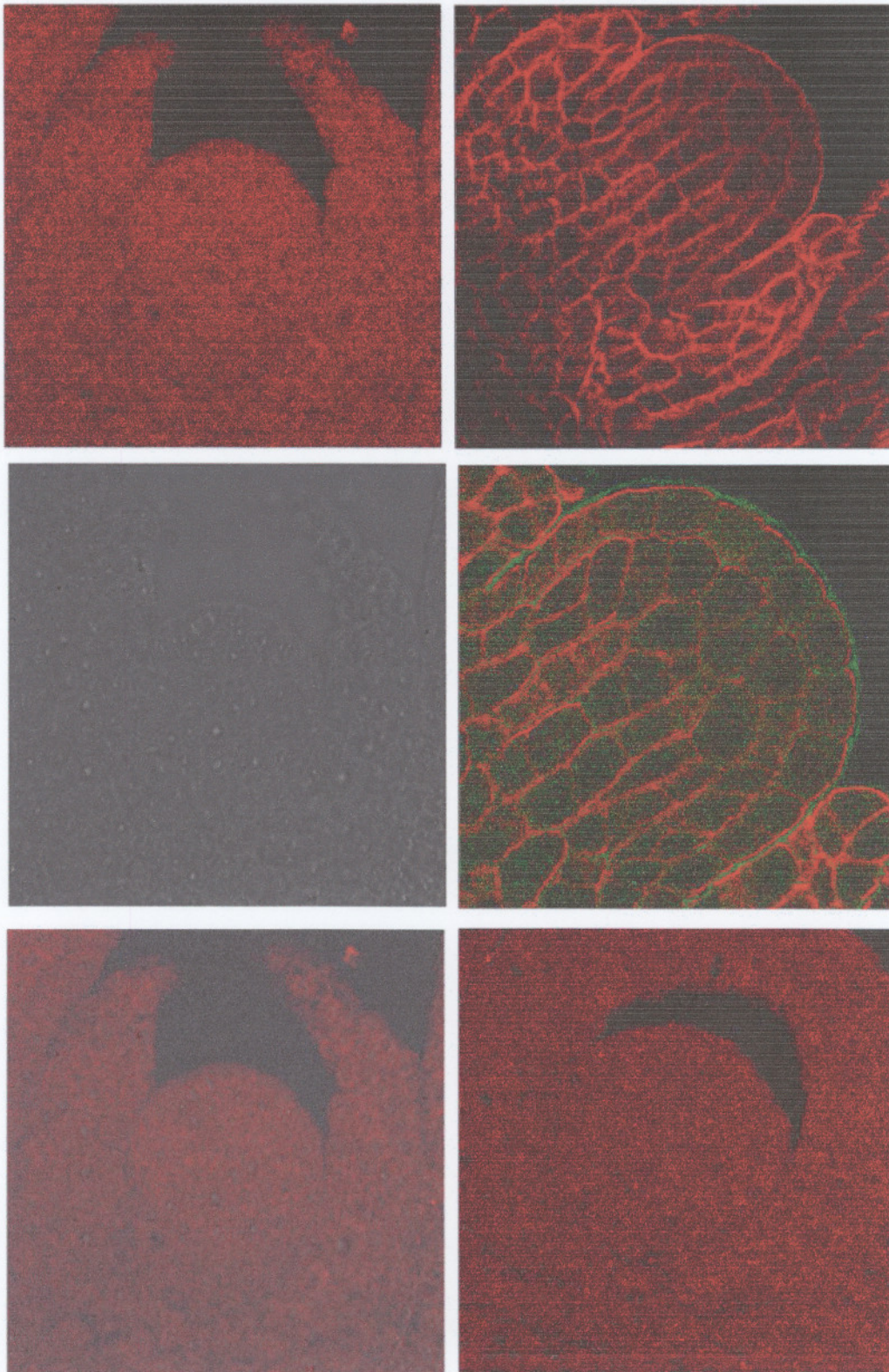
comprovar que la proteïna MARK està majoritàriament associada a la membrana plasmàtica.

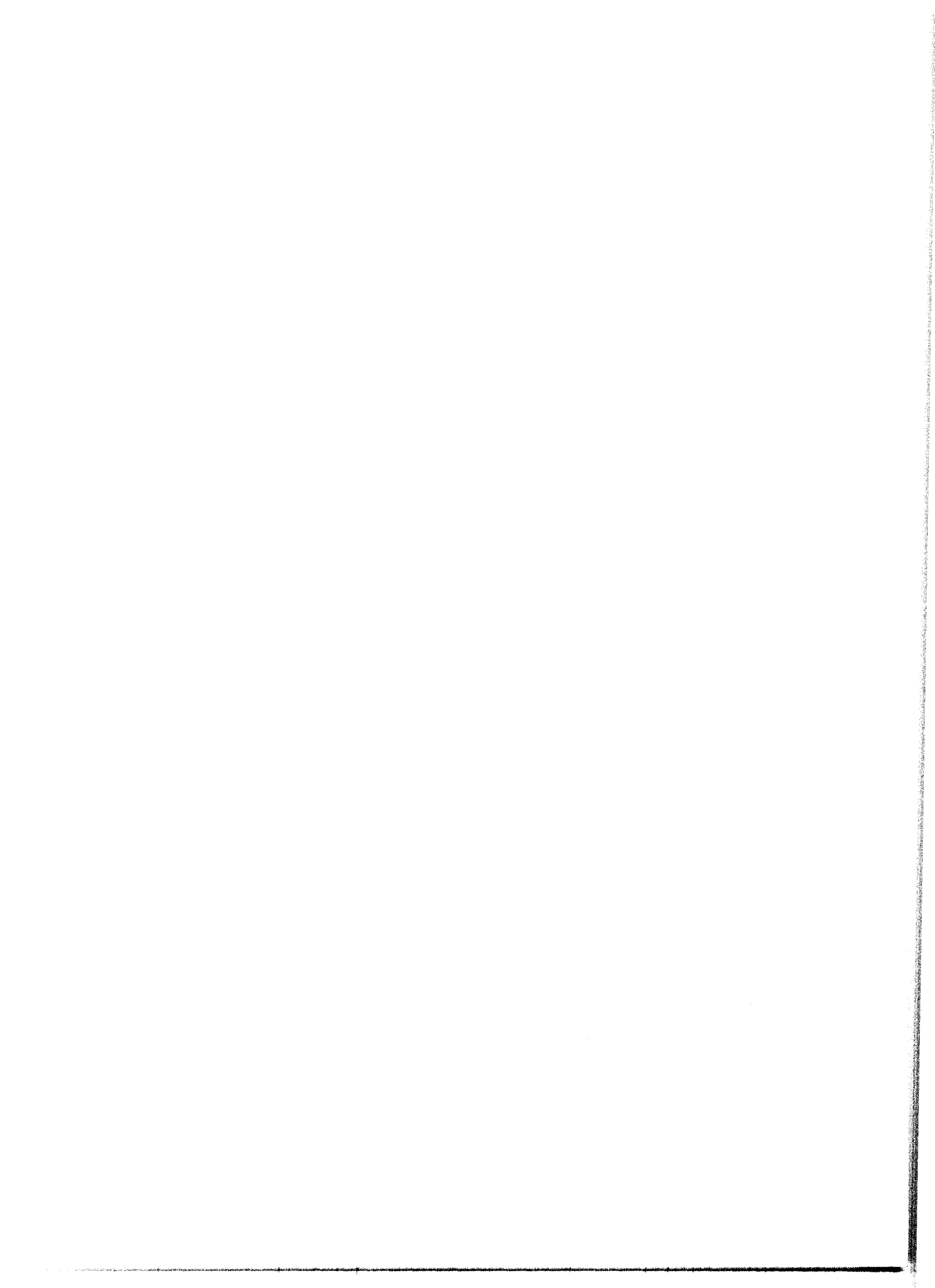
L'acumulació de MARK en el meristem apical té un patró molt característic ja descrit per Río en immunolocalitzacions de meristems apicals de plantes adultes amb el mètode de peroxidasa (Río, 1999). MARK no s'acumula en la zona central del meristem apical. Aquesta zona està formada per cèl.lules pluripotents, indiferenciades, amb una taxa de divisió molt baixa a partir de les quals es formen els nous òrgans de la planta adulta. D'altra banda, MARK s'acumula en les cèl.lules que formen part de la capa L1, formada per cèl.lules diferenciades epidèrmicament.

Aquest patró d'acumulació de MARK suggereix que aquest receptor quinasa podria està implicat en processos de proliferació i de diferenciació.

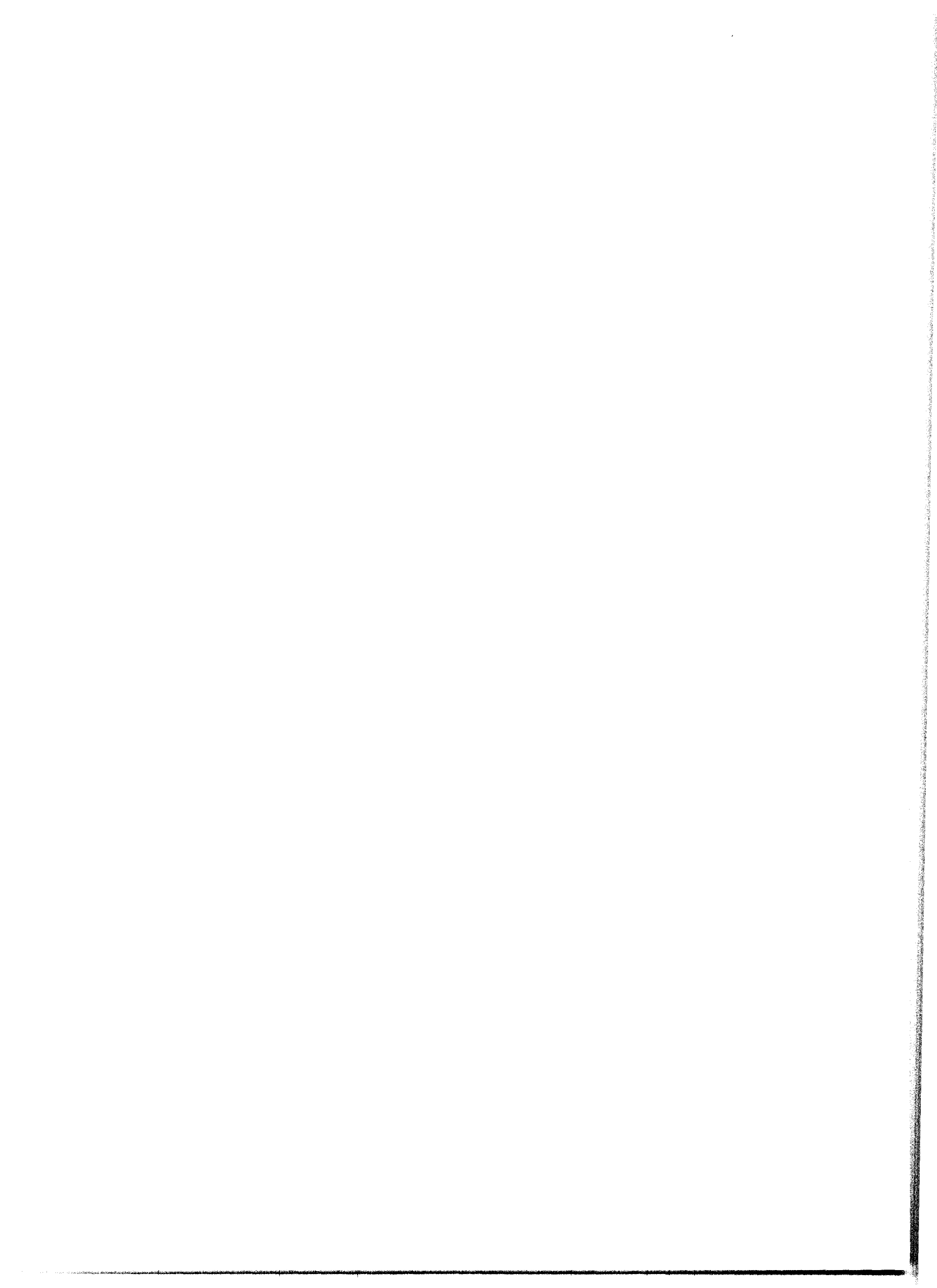
Així doncs, aquests resultats mostren una co-localització de les proteïnes MARK i MIK en els mateixos teixits embrionaris, suggerint que les proteïnes MARK i MIK poden estar associades a processos proliferatius i de diferenciació.

Figura 3.35. Immunolocalitzacions de les proteïnes MARK i MIK en meristems apicals d'embrions de 15 DAP. A: acumulació de la proteïna MIK. B: imatge de transmissió del meristem apical. C: sobreposició de les imatges A i B. D: acumulació de la proteïna MARK. E: doble marcatge de l'autofluorescència de la paret cel.lular que emet al rang del verd i el marcatge de la cianina 3 que emet al rang del vermell. F: control negatiu amb un anticòs preimmune.





4. Discussió



L'objectiu d'aquesta tesi era estudiar la proteïna MARK, un receptor de membrana que presenta un domini quinasa atípic i en particular el seu possible mecanisme d'acció. Tot i que el domini intracel·lular de MARK, analitzat prèviament per Rfo (1999), conté una estructura de serina/treonina quinasa, presenta substitucions en alguns dels aminoàcids essencials per l'activitat quinasa i no té activitat catalítica *in vitro*. La hipòtesi que malgrat MARK no és capaç de fosforilar, podria participar en la transducció del senyal per mitjà d'interaccions proteïna-proteïna ens va fer començar el treball per un crivellat d'una llibreria de doble-híbrid.

Tot i que el nostre treball s'ha centrat sobretot en la caracterització d'una quinasa de la família GCK/SPS1, en el crivellat es van obtenir altres clons candidats per interaccionar amb MARK.

Un conjunt de clons obtinguts en el crivellat de doble híbrid codificaven per les proteïnes SAMDC i eIF5 de blat de moro involucrades en la ruta de síntesi de les poliamines i en el complex de traducció proteic respectivament. Aquestes interaccions no han pogut ser confirmades plenament en cèl·lules de llevat ni per estudis *in vitro* de *pull-down*, cosa que suggereix que, d'interaccionar amb MARK, aquesta interacció podria ser feble o transitòria. La síntesi de poliamines augmenta en teixits en proliferació i diferenciació (Mad Arif *et al.*, 1994) i, per altra banda, la traducció proteica ha d'augmentar en teixits actius en proliferació (López i Puigdomènech 1999). Donat que el patró d'acumulació de MARK en embrions de blat de moro suggereix una implicació en el control de processos de proliferació i de diferenciació, la interacció de MARK amb aquestes proteïnes, si es donés, podria suggerir un mecanisme de control de la proliferació i diferenciació associat a l'activació de la síntesi de poliamines i l'increment de l'activació traduccional.

Altres clons obtinguts del doble-híbrid van poder ser confirmats tant en cèl·lules de llevat com en *pull-downs*. Aquests clons codifiquen per dues proteïnes amb funció desconeguda (DH8 i DH71) i una proteïna similar a les γ -adaptines.

El clon DH8 presenta una elevada similitud amb un conjunt de proteïnes d'*Arabidopsis* de funció desconeguda, cosa que no ens permet avançar, hores d'ara, en el significat d'aquesta possible interacció.

El clon DH71, del qual es van obtenir cinc clons independents en el crivellat, presenta una elevada similitud amb la regió C-terminal d'una proteïna d'*Arabidopsis* de funció desconeguda (O64588). Aquesta proteïna fou parcialment clonada a partir d'un crivellat d'una llibreria de cDNA de cultiu de rel d'*Arabidopsis* tractat amb auxina i fou anomenada AIR9 (*Auxin-Induced in Root cultures*) (Neuteboom *et al.*, 1999). La única dada funcional de AIR9 és la seva acumulació de mRNA davant l'addició exògena d'auxina en cultius d'arrel. L'auxina, juntament amb les citoquinines, es troba implicada en el control de molts aspectes del creixement i la diferenciació (Coenen and Lomax, 1997). L'anàlisi de la seqüència de O64588 mitjançant el programa Smart mostra la presència de motius LRR indicant un possible paper en interaccions proteïques. Malgrat tot, la manca de dades d'aquesta proteïna no ha permès estudiar el possible paper de la interacció amb MARK-KD. La interacció entre la proteïna codificada per DH71 i MARK-KD podria suggerir una relació entre MARK i la via de transducció d'auxina. Aquest aspecte no s'ha estudiat en el present treball però que, sens dubte, seria interessant d'analitzar.

En el següent apartat discutim la possible interacció de MARK amb les proteïnes γ -adaptines relacionades amb el transport de receptors de membrana.

1. Possible interacció de MARK amb una proteïna γ -adaptina.

Al crivellat de doble-híbrid de la llibreria de cDNA d'embrió es van obtenir tres clons independents que codifiquen per una proteïna similar a les γ -adaptines. Els experiments que es van realitzar per comprovar la interacció amb MARK-KD van confirmar *in vitro* aquesta possible interacció. Les adaptines són subunitats dels complexos AP (*adaptor proteins*) implicats en la formació de vesícules de transport intracel·lulars i en la selecció de les proteïnes a transportar incorporant-les a les vesícules. S'han descrit 4 complexos AP en mamífers: AP1, AP2, AP3 i AP4. Cadascun d'ells està format per dues proteïnes adaptines grans (la γ , α , δ ó la ϵ i una β 1-4 de 90 i 130 kDa respectivament), una adaptina mitjana (μ 1-4, d'uns 50 kDa) i una adaptina petita (σ 1-4 d'uns 20 kDa) (Robinson *et al.*, 2001) (figura 4.1).

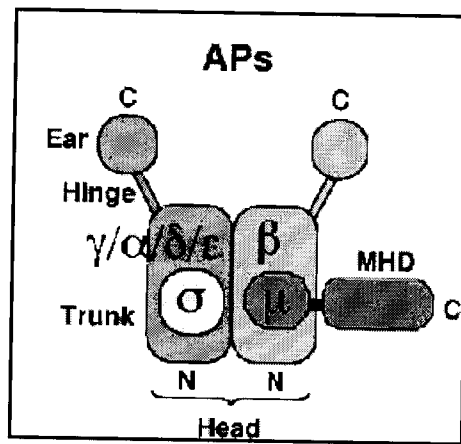
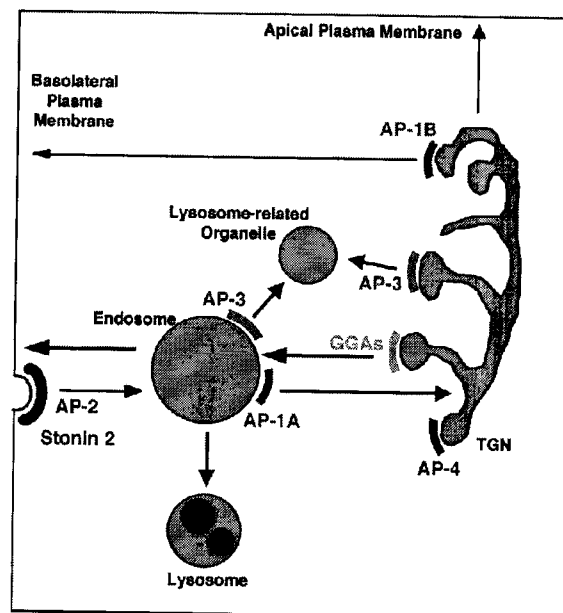


Figura 4.1. Representació esquemàtica d'un complex AP format per dues proteïnes grans: γ , α , ϵ o δ i β_{1-4} , una subunitat mitjana σ i una subunitat petita μ . De Boehm i Bonifacino (2001).

Cada complex AP té una distribució cel.lular específica, així AP2 es localitza a la membrana plasmàtica on interacciona amb receptors provocant la endocitosi ràpida cap als endosomes, mentre que AP1, AP3 i AP4 estan involucrats en els processos de distribució del *trans-Golgi network* (TGN) i/o endosomes (figura 4.2). La formació de vesícules a partir dels complexos AP1 i AP2 es realitza conjuntament amb les clatrines, que estan involucrades en la formació de la vesícula unint-se a la membrana durant la endocitosi i en el compartiment des del TGN.

Figura 4.2. Representació esquemàtica de les vies de transport on es troben involucrats els diferents complexos Aps en mamífers. El complex AP2 està implicat en la recircularització de receptors de membrana a l'endosoma. El complex AP1 està involucrat en el transport de l'endosoma al TGN i del TGN a les membranes basolaterals. De Boehm i Bonifacino (2001).



Els clons obtinguts en el crivellat de doble híbrid amb la proteïna MARK-KD presentaven una major similitud amb la regió C-terminal de les γ -adaptines1 que formen part del complex AP1. Les proteïnes adaptines γ , α , δ , ϵ i β 1-4, estan formades per tres dominis. El domini N-terminal (d'uns 600 residus) s'ha denominat *trunk* i presenta una estructura secundària rica en α -hèlix. Aquest domini està involucrat en les interaccions amb les subunitats mitjana i petita, així com en el destí d'AP1 i AP2 al TGN i a la membrana plasmàtica respectivament. Un segon domini de mida variable anomenat *hinge*, conté una regió rica en residus serina, dianes potencials de fosforilació (Newman *et al.*, 1995). El domini C-terminal anomenat *ear* de les adaptines està menys conservat que el domini N-terminal, sobretot entre les adaptines γ , α , δ , ϵ . Provablement aquest fet reflecteix la diversitat funcional dels diferents complexos APs. La regió C-terminal està implicada en el reconeixement de proteïnes addicionals que ajuden a la formació de les vesícules (α -adaptina de l'AP2) o en la interacció amb proteïnes de membrana per transportar-les des del TGN a la membrana plasmàtica (γ -adaptina de l'AP1). Per tant, el fet que en el doble híbrid s'hagi obtingut el domini C-terminal (domini *ear*) similar a la γ -adaptina com a possible proteïna d'interacció amb el receptor MARK, podria indicar que MARK pot ser transportat en un complex AP1.

Totes les subunitats de AP1 s'expressen de manera ubiqua en tots els teixits i cèl.lules de mamífer analitzades a excepció de μ 1B que s'expressa exclusivament en les cèl.lules epitelials polaritzades (Ohno *et al.*, 1999). Les cèl.lules epitelials mostren una distribució de proteïnes i lípids de membrana diferencial entre la membrana apical i les membranes basolaterals. Aquesta distribució es deu a la capacitat que tenen aquestes cèl.lules d'emmagatzemar les proteïnes a la sortida de TGN en vesícules de transport destinades a la membrana determinada, així com assegurar-se que la distribució polaritzada es manté durant l'endocitosi (Fölsch *et al.*, 2001). El complex AP1B específic de cèl.lules epitelials es diferencia únicament del AP1A expressat ubiquament pel canvi de la subunitat μ 1A per la μ 1B. S'ha demostrat que la substitució de les subunitats μ s és suficient per unir proteïnes de membrana a la paret basolateral, com el receptor LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) (Fölsch *et al.*, 2001). S'ha descrit un altre receptor basolateral, el receptor de membrana d'immunoglobulines polimèric (pIgR), que co-immunoprecipita amb la subunitat γ -adaptina en l'acumulació al TGN (Orzech *et al.*, 1999). Tot i que no s'ha

demonstrat si es tracta o no del complex AP1B, és un exemple d'interacció específica entre la γ -adaptina i un receptor de membrana.

Aquests resultats demostren, doncs, que la funció de la subunitat γ en mamífers, i en concret el seu domini C-terminal, és la d'interaccionar amb receptors de membrana pel seu transport a les membranes basolaterals. En plantes, tot i que els mecanismes d'endocitosi i de compartimentalització proteica estan molt poc estudiats, a *Arabidopsis* s'han identificat proteïnes similars a les diferents subunitats APs (Boehm i Bonifacino, 2001). Tot i la manca d'estudis en plantes, la similitud de seqüència fa suposar uns mecanismes similars als descrits en mamífers.

El resultat de les immunolocalitzacions realitzades amb l'anticòs contra MARK-KD en talls d'embrions de 15 DAP mostren una acumulació de MARK a membrana plasmàtica no homogènea. MARK s'acumula majoritàriament en les parets laterals alhora que es detecta una polarització en la membrana basal en les cèl.lules del sistema provascular. Aquesta distribució de MARK es podria explicar per un transport específic a través de vesícules on el domini intracel.lular de MARK podria interaccionar amb una proteïna γ -adaptina. La confirmació d'aquests resultats, així com l'anàlisi de les possibles implicacions d'aquesta acumulació de MARK en les parets laterals, queden pendents per a un treball posterior.

2. MARK interacciona amb MIK, una MAPKinasa relacionada amb la subfamília GCK-III.

Dos dels clons obtinguts del crivellat de la llibreria de doble híbrid de cDNA d'embrions de 7 DAP, presentaven similitud amb proteïnes quinasa de la família GCK. A partir d'aquests dos clons es va poder obtenir, posteriorment, mitjançant la tècnica 5'-RACE, la seqüència completa del gen que es va anomenar *MIK* (per *MARK Interacting Kinase*).

Els experiments d'interacció *in vitro* (*pull-down*) van confirmar la possible interacció de MIK amb MARK-KD.

Les proteïnes GCKs de mamífers estan involucrades en la transducció del senyal en processos cel.lulars molt diversos, des de l'estructuració del citoesquelet o la morfogènesis fins a l'apoptosi. La major part de GCKs regulen les vies de senyalització JNK o p38

MAPK que corresponen a famílies de MAPKs activades per diferents tipus d'estressos (Dan *et al.*, 2002). La subfamília GCK-III de mamífers, però, formada per les proteïnes SOK1, MST3 i MASK no activen les vies de JNK o p38 MAPK (Shinkmann i Blenis, 1997). Tot i que fins ara no s'havia pogut relacionar cap GCK-III amb cap de les cascades de MAPK conegudes, estudis molt recents semblen relacionar la proteïna MASK amb una activació específica de la via ERK a través de Ras/Raf1 (Lin *et al.*, 2001).

Si bé en un principi les GCKs s'havien subclassificat en dos grups; recentment, gràcies als projectes de seqüenciació del genoma humà, així com el de *Drosophila* i el de *C. elegans*, han estat reclassificades en 8 subfamílies (Dan *et al.*, 2001).

La seqüència de la proteïna MIK mostra similitud amb proteïnes que pertanyen a la subfamília GCK-III (veure l'arbre filogenètic de l'apartat 2.3 dels resultats). Aquesta subfamília està representada fins al moment per les proteïnes de mamífer SOK1 (*Sterile 20-like oxidant stress response kinase-1*), MST3 (*mammalian Ste20-like kinase*) i MASK (*Mst3 and SOK1-related kinase*), una proteïna de *Drosophila* (CG5169) i una de *C. elegans* (T19A5.2) predites de seqüències genòmiques. La proteïna anomenada SEVERIN de *Dictyostelium discoideum* presenta també una elevada similitud amb les proteïnes GCK-III. En plantes, dues proteïnes descrites recentment en *Brassica napus* (BnMAP4K α 1 i α 2) i dues proteïnes predites d'*Arabidopsis* també es classifiquen en aquesta subfamília de proteïnes GCK-III. D'altra banda, en *S. pombe* s'ha descrit la proteïna Sid1 que presenta similitud amb les proteïnes de la subfamília GCK-III.

El domini quinasa de la proteïna MIK està altament relacionat amb el de proteïnes de la subfamília GCK-III, presentant uns valors d'identitat aminoacídica entre el 64 i el 88% (taula 4.1). Pel que respecte al domini no-catalític, els % d'identitat varien entre el 40% amb les proteïnes de plantes i del 20-30% amb la resta de GCK-III.

La subfamília GCK-III de mamífers (MASK, SOK1 i MST3) es caracteritza per presentar una regió C-terminal curta. Aquesta característica no és general en les GCKIII de plantes, entre elles la MIK, que presenten un domini regulador casi tres vegades més extens. Les dues proteïnes de *Drosophila* i de *C. elegans* així com la proteïna Sid1 presenten una domini C-terminal de longitud més similar a les GCK de plantes.

Una altra característica de les GCKIII de mamífers és el caràcter altament acídic de la regió més cap a 5' del C-terminal (Dan *et al.*, 2002). Aquesta característica sí que es conserva en

la resta de proteïnes GCK-III, suggerint la implicació d'aquesta regió en un mecanisme d'acció comú.

Taula 4.1. Taula dels % d'identitat aminoacídica entre les diferents proteïnes de la subfamília GCK-III i la proteïna MIK. L'anàlisi s'ha realitzat pels dos dominis per separat, ja que la conservació entre el domini quinasa i el domini no-catalític és molt diferent. Dades obtingudes amb el programa fasta.

	Domini quinasa	Domini regulador
BnMAP4Ka1 (<i>Brassica napus</i>)	85,5%	37,8%
BnMAP4Ka2 (<i>Brassica napus</i>)	88,4%	38,7%
AtMAP4K1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	82,7%	37,8%
AtMAP4K2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	86,2%	40%
MASK (<i>Homo s. sapiens</i>)	65,6%	31,7%
SOK1 (<i>Homo s. sapiens</i>)	67,6%	25%
Mst3 (<i>Homo s. sapiens</i>)	65,2%	21,1%
CG5169 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	64,4%	21,5%
Sid1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	57,8%	21,1%
SEVERIN (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	64,8%	22,4%
T19A5.2 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	63,6%	21,9%

Les proteïnes GCK-III de mamífers MASK, MST3 i SOK1 mostren un patró d'expressió ubíquo en tots els teixits analitzats, a excepció de les isoformes Mst4b (MASK) i Mst3a que s'expressen específicament en cervell (Qian *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Aquesta ubiqüitat del mRNA també s'ha observat en BnMAP4K, presentant, però, una major expressió en òrgans amb elevada proliferació. En particular, durant l'embriogènesi d'*Arabidopsis*, *BnMAP4K α 1* i *α 2* s'expressen en l'estadi globular/cor, de torpedo i en embrions cotiledonars (Leprince *et al.*, 1999).

L'expressió de *MIK*, segons els estudis per northern blot sembla que és més variable al llarg de l'embriogènesi de blat de moro. *MIK* s'expressa en llavor a partir dels 2 DAP fins als 20 DAP i als 30 DAP ja no es detecta acumulació de mRNA de *MIK*. En teixit de planta adulta, fulla jove, no s'observa expressió de *MIK*. Tot i que potser hi ha una expressió basal que no s'ha detectat en els experiments de northern blot, sembla que *MIK* no s'expressa de manera ubíqua com la resta de proteïnes de la família. La seva expressió té lloc durant el primer estadi de l'embriogènesi del blat de moro, l'estadi morfogenètic (fins als 18-20 DAPs). En aquest estadi, s'estableix la polaritat apical-basal, el patró radial i l'elaboració de les diferents estructures i òrgans. El creixement i la proliferació són els principals processos que tenen lloc de manera simultànea en l'estadi morfogenètic (Jürgens *et al.*, 1994). L'expressió de *MIK* podria relacionar-se, doncs, amb processos de proliferació i diferenciació mostrant un patró coincident amb el de MARK que, en treballs anteriors, s'ha relacionat també amb processos de proliferació i diferenciació (Río, 1999).

3. La diversitat funcional de les proteïnes GCK-III i el possible paper de la proteïna MIK.

Les funcions de les diferents proteïnes GCK-III són molt diverses. La proteïna MASK, per exemple, s'ha relacionat amb el procés apoptòtic. Cultius cel·lulars que sobre-exprimeixen MASK mostren canvis morfològics típics de l'apoptosi com per exemple la condensació nuclear (Dan *et al.*, 2002). Per altra banda, estudis *in vitro* han demostrat que la caspasa 3 és capaç de processar MASK i que aquest processament és dependent de l'activitat quinasa (Wolf i Green, 1999). Aquest processament podria donar-se en un motiu DESDS present en la regió àcida del domini regulador de MASK que és un motiu de reconeixement per la caspasa 3. D'aquesta manera la caspasa 3 alliberaria el domini quinasa de MASK.

Per altra banda, la proteïna SEVERIN de *Dictyostelium discoideum* s'ha associat a mecanismes de la reorganització del citoesquelet relacionats amb la mobilitat cel·lular (Eichinger *et al.*, 1998). Davant d'un estímul extern, *Dictyostelium* és capaç de reajustar el seu citoesquelet d'actina en segons, i la fosforilació és el principal candidat per aquesta

ràpida modificació dels components del citoesquelet. La fosforilació específica en extractes citosòlics va permetre l'aïllament de la proteïna SEVERIN. La proteïna SEVERIN actuaria com una proteïna de fraccionament dels filaments d'actina provocant-ne un ràpid reajustament. Es suggereix que com una possible resposta a l'estrès cel.lular tingui lloc la fosforilació de la SEVERIN i es doni una interacció entre un senyal extracel.lular i la via del citoesquelet mitjançant una cascada de senyalització encara no coneguda (Eichinger *et al.*, 1998).

La proteïna SOK1 va ser identificada durant les primeres etapes d'anòxia química en cèl.lules humanes (Pombo *et al.*, 1997). En aquest període el dany de les cèl.lules és reversible i la majoria de les cèl.lules són viables. Sembla, doncs, que l'activació de SOK1 no és una conseqüència de la mort cel.lular. L'anòxia indueix dues respostes patològiques: la formació d'espècies reactives d'oxigen i l'increment de Ca^{2+} , que provoquen formes de necrosi cel.lular i apoptosi. Sembla ser que les dues respostes són necessàries per l'activació de SOK1. Malgrat tot, el paper fisiològic que juga SOK1 en l'anòxia cel.lular no està gens clar.

Respecte a la proteïna MST3, no s'ha identificat encara cap estímul fisiològic que l'activi. També s'ha descrit una isoforma, MST3b, que presenta una deleció en la regió 5' i s'expressa específicament en el cervell (Zhou *et al.*, 2000).

En plantes s'han descrit dues proteïnes en *Brassica napus* que presenten una elevada similitud de seqüència amb la proteïna MIK, BnMAP4K α 1 i α 2. Tot i que la funció d'aquestes proteïnes no ha sigut descrita, la seva expressió en cultius cel.lulars depenen del cicle cel.lular i la seva expressió durant l'embriogènesi suggereix una possible implicació d'aquestes proteïnes en mecanismes de proliferació (Leprince *et al.*, 1999).

En resum, les diferents proteïnes que formen part de la subfamília GCK-III i que presenten similitud amb MIK estan implicades en la regulació de processos molt diferents, cosa que fa pensar que la similitud de seqüència podria estar més relacionada en una conservació del mecanisme pel qual actuen que no pas amb una conservació funcional.

Una altra de les proteïnes relacionades amb MIK és la proteïna Sid1 de *Schizosaccharomyces pombe*. Tot i que Sid1 no forma part de la subfamília GCK-III, hi està filogenèticament relacionada. El gen *sid1* (*septation initiation deficient*) va ser clonat per complementació d'un mutant sensible a temperatura *sid1-239* (Guertin *et al.*, 2000). Sid1 està molt ben caracteritzada i forma part de la via de senyalització anomenada SIN (*septation initiation network*) que regula l'inici de la citoquinesi al final de l'anafase, després de la completa segregació cromosòmica i quan els promotors de la mitosis (les CDKs) es troben inactivats.

D'una manera similar a les cèl.lules animals, *S. pombe* es divideix mitjançant la contracció de l'anell d'actina-miosina. El control de la formació del septe està dirigit per la cascada de transducció SIN que consisteix en una GTPasa (*spg1*), quatre quinases (*cdc7*, *sid1*, *sid2* i *plp1*), un factor associat a *sid1* (*cdc14*) i dos components GAP (GTPase activating protein) (*cdc16-byr4*). La inactivació de la via SIN dóna lloc a cèl.lules plurinuclears incapaces de formar el septe de divisió mentre que la hiperactivació de SIN provoca la formació de cèl.lules que presenten varis septes (Bardin i Amon, 2001). La GTPase *spg1* (de la superfamília Ras) actua a l'inici de la via. Una sobre-expressió de *spg1* induïx la septació en qualsevol etapa del cicle cel.lular. La localització dels diferents components de la via SIN al llarg del cicle cel.lular es mostra en la figura 4.3. *Spg1* es localitza en el SPB (*Spindle pole body*) que és l'equivalent als centrosomes eucariòtics, una organització estructural de microtúbuls. Durant la interfase, *spg1* està inactivada pels components GAP *cdc16-byr4* que quan es dissocien dels SBP permeten l'activació de *spg1*-GTP i el reclutament de *cdc7* en els dos SPBs.

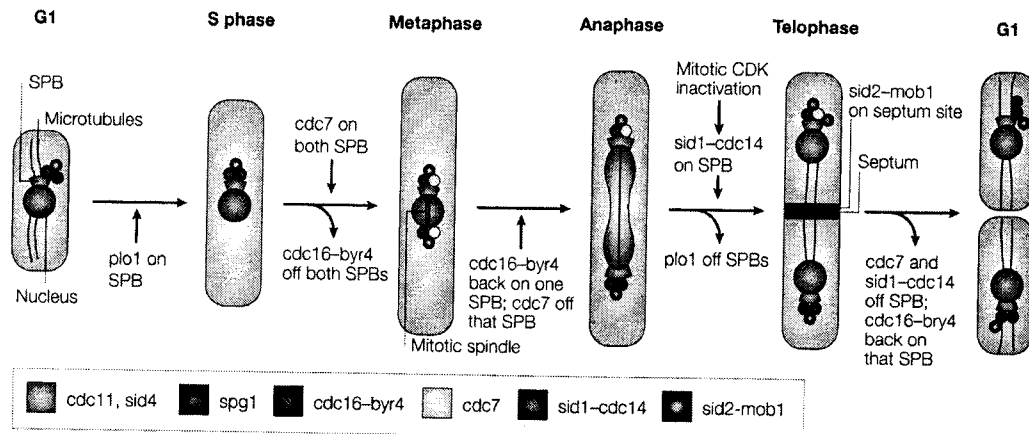


Figura 4.3. Localització dels components de la cascada SIN durant el cicle cel·lular. *sid4* i *cdc11* actuen com a proteïnes de sosteniment per als components SIN. *spg1* i *cdc16-byr4* es localitzen en un SPB. Quan *cdc16-byr4* es desassocia, s'uneix *cdc7*. En l'anafase *sid1-cdc14* s'associa al SPB i activa *sid2-mob1* que (una vegada activada) es localitza en el septe. Modificat de Bardin i Amon (2001).

S'ha demostrat que la localització de *spg1*, *cdc7* i *byr4* en els SPB depèn de dos components: *sid4* i *cdc11* la funció dels quals es creu que és ancorar aquestes proteïnes (Chang *et al.*, 2000). Durant la separació dels fusos mitòtics, a l'anafase, la proteïna quinasa *sid1*, formant un complex amb *cdc14*, és reclutada al SPB que conté *spg1* i *cdc7* activades. Tot i que els nivells proteics de *sid1* i *cdc14* no varien al llarg del cicle cel·lular, l'activitat quinasa de *sid1* sí que presenta un pic d'activitat durant l'anafase/telofase (Guerin *et al.*, 2000). El reclutament de *sid1-cdc14* al SPB promou la inactivació de la CDK mitòtica *cdc2* bloquejant la seva elevada activitat. Finalment, la proteïna *sid2* amb el seu factor *mob1*, que es localitza constitutivament en els SPBs durant el cicle cel·lular, només quan *sid2* és activada per *sid1* en el SPB pot ser localitzada en el pla de divisió. De fet, les proteïnes *sid2* i *mob1* són els únics components de la via que es localitzen en el septe de divisió, donant suport a la hipòtesi que aquestes proteïnes porten el missatge de la citoquinesi (Bardin i Amon, 2001). Basant-se en aquests estudis de localització (figura 4.3), sembla que la cascada SIN té el paper de transduir el senyal per promoure el septe des del SPB fins al lloc de divisió. En la figura 4.4 es presenta el model de la via SIN.

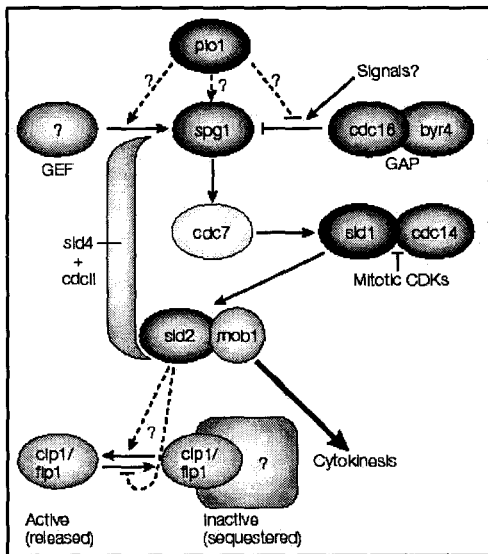


Figura 4.4. Model de la via SIN. *spg1* és inhibida per GAP (*cdc16-byr4*) i és regulada per *plo1*, segurament a través de *cdc16-byr4*. *spg1*-GTP activa *cdc7*, que activa *sid1-cdc14* que són inhibides per les proteïnes CDKs i activen *sid2-mob1*. *sid4-cdc11* tenen una funció de sosteniment dels components de la via. *sid2-mob1* activats es localitzen en el pla de divisió per promoure la formació del sept. La localització de *clp1-flp1* no es coneix.

De Bardin i Amon (2001)

La citoquinesi de les plantes té lloc per la formació *de novo* d'un compartiment membranar, la làmina cel·lular (*cell plate*), que s'inicia en el pla de divisió i resulta de la fusió de vesícules derivades de Golgi repartides per un citoesquelet molt dinàmic, el fragmoplast. Estudis mutagènics han permès identificar mutants com el *cyd* en pèsol o el *knolle* i el *keule* d'*Arabidopsis* que presenten una citoquinesi defectiva (Assad *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995; Lukowitz *et al.*, 1996). Les proteïnes KNOLLE i KEULE interaccionen específicament amb vesícules de fusió durant la citoquinesi (Waizenegger *et al.*, 2000). El fet que aquests mutants tinguin greus defectes de desenvolupament mostra fins a quin punt el control del desenvolupament en plantes està lligat al control de la proliferació cel·lular i la citoquinesi. Pel que fa a l'inici de la formació de la citoquinesi, se'n coneix molt poc. Dues proteïnes MAPK de tabac i alfals, NT6 i MKK3 respectivament, són activades en la mitosi tardana i es localitzen en el pla mig de la separació cromosòmica durant l'anafase tardana (Calderini *et al.*, 1998).

Recentment, en tabac s'ha descrit una MAP3K, la proteïna NPK1 (*Nicotiana Protein Kinase1*) que es troba involucrada en la citoquinesi, en la formació de la làmina cel·lular (Nishihama *et al.*, 2001). L'expressió de *NPK1* s'acumula en condicions de proliferació (Nakashima *et al.*, 1998).

Aquestes observacions suggereixen una possible implicació d'almenys una via MAPK en la regulació de la citoquinesi en les cèl·lules vegetals.

Malgrat que res no permet recolzar un paper per MIK similar al de Sid1, el cert és que a *Arabidopsis* i a *B. napus* s'han descrit dues proteïnes funcionalment homòlogues a la quinasa *cdc7* de *S. pombe*, les proteïnes AtMAP3K ϵ 1 i BnMAP3K ϵ 1 i s'ha demostrat que la proteïna BnMAP3K ϵ 1 complementa parcialment els mutants *cdc7-24* (Jouannic *et al.*, 2001). Aquesta dada i la similitud que presenten les proteïnes Bn MAP4K α 1 i α 2 amb la proteïna sid1, podria suggerir una possible via de transducció del senyal similar al descrit en *S. pombe*.

4. Activació de les proteïnes GCK-III. Model d'interacció MARK-MIK.

Les proteïnes GCK, i en particular les GCK-III, presenten una estructura en dos dominis diferenciats, un domini N-terminal serina/treonina quinasa i un domini C-terminal de seqüència variable. La funció del domini C-terminal de les proteïnes GCK-III s'ha analitzat en les proteïnes MASK i SOK1. Aquestes proteïnes mostren uns nivells d'autofosforilació majors quan es troba mutat el domini C-terminal suggerint, doncs, que el domini C-terminal té una funció inhibidora de l'activitat quinasa (Dan *et al.*, 2002; Pombo *et al.*, 1996). Possiblement el mecanisme pel qual té lloc aquesta inhibició estigui relacionat amb un canvi conformacional que es pot provocar per la mutació o la deleció del domini C-terminal, fent més accessible el domini actiu (Creasy *et al.*, 1996).

En el cas de la proteïna MASK s'ha postulat un possible mecanisme d'activació. Es suggereix un mecanisme on el tall per la caspasa 3 entre els dos dominis permet l'alliberació del domini quinasa incrementant la seva activitat durant l'apoptosi. A més, en la regió C-terminal de la proteïna MASK s'ha predit una zona (dels aminoàcids 359-391) amb estructura *colied-coil* que està implicada en l'auto-associació (Wolf i Green, 1999). Aquesta seqüència peptídica es troba conservada en les proteïnes SOK1 i MST3. La formació d'homodímers en aquesta regió s'ha pogut demostrar per anàlisis de doble-híbrid i experiments *in vivo*. Aquests resultats suggereixen que l'activitat catalítica de MASK està

regulada per l'auto-associació a través del domini regualdor C-terminal. De fet, l'expressió ubiqua de MASK en condicions fisiològiques apunta a una regulació negativa per evitar una inducció d'apoptosi en condicions normals. Així, podríem estar davant d'un mecanisme d'inhibició de MASK mitjançant l'associació intermolecular on el processament de MASK per la caspasa 3 alliberaria el domini C-terminal estimulando la interacció de MASK a una cascada de senyalització determinada.

Malgrat que no hagi estat demostrat, podria ser que el domini C-terminal funcionés com inhibidor en altres proteïnes GCK-III. L'activació podria venir pel processament del domini inhibidor, com en el cas de MASK, o simplement per la interacció d'aquest domini amb una altra proteïna que induís un canvi conformacional permetent l'accessibilitat del domini quinasa a altres proteïnes de la cascada de transducció.

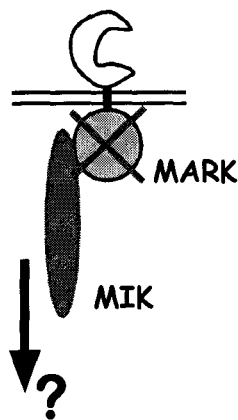


Figura 4.5 Model d'interacció on MIK interacciona directament amb MARK-KD.

La interacció de MARK amb el domini regulador de MIK podria, doncs, activar aquesta última activant una cascada de senyal intracel·lular en un model en el que una proteïna del tipus GCK-III faria de lligam directe entre un receptor de membrana i una cascada intracel·lular de senyalització (figura 4.5). Aquest tipus de lligam entre receptors de membrana i mòduls intracel·lulars de senyalització s'ha descrit per altres proteïnes GCK, si bé no directament sinó que a través de proteïnes adaptadores. En la figura 4.6 es resumeixen els dos models de regulació establerts fins ara per proteïnes GCKs. El mecanisme proposat per algunes GCKs (per exemple la proteïna HPK1, una GCK-I) es base en la presència de dominis SH3 en la seva regió no-catalítica. Mitjançant aquest domini interaccionen amb proteïnes adaptadores que contenen dominis SH2/SH3 que

s'uneixen a tirosines quinasa (per exemple Grb2 o Crk). Sembla ser que l'estímul mitogènic provoca l'autofosforilació del receptor tirosina quinasa que, alhora, provoca la translocació del complex adaptador-GCK a la membrana on GCK activa la cascada de MAPKs (Su *et al.*, 1997).

D'altra banda, alguns membres de la subfamília GCK-I (com GCK, GCKR i GLK) tenen un paper important en la via de senyalització del receptor TNFR. Es tracta d'un mecanisme diferent a l'anterior, ja que aquest receptor no presenta una activitat catalítica i transdueix el senyal formant un homotrímer. L'homotrímer recluta la proteïna TRADD que, alhora, recluta el factor TRAF2. Aquestes proteïnes GCK interaccionen amb TRAF en la regió C-terminal, permetent la transducció del senyal (Yuasa *et al.*, 1998).

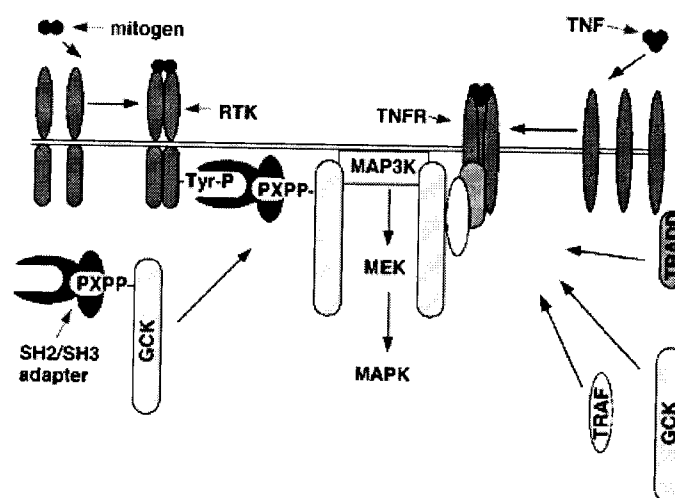


Figura 4.6. Model de regulació i funció de les proteïnes GCK-I. Les GCKs són reclutades a la membrana per receptors tirosina quinasa o per components activadors dels receptors TNF. Aquest reclutament és seguit de l'activació del domini quinasa de GCK. Els estímuls que recluten GCK a la membrana podrien també reclutar les proteïnes MAP3K. De Kyriakis (1999).

La interacció directa de MARK, un receptor quinasa atípic que no té activitat catalítica, amb MIK suggereix un mecanisme on receptors atípics podrien participar en la transducció del senyal activant la via de les MAPK. De fet, el receptor atípic humà H-Ryk és capaç d'activar, en resposta a un estímul extern, una via intracel·lular de MAPK (Katso *et al.*, 1999).

Per altra banda, els resultats del fraccionament subcel·lular d'embrions de 15 DAP mostren que MIK és una proteïna majoritàriament citoplasmàtica, mentre que la proteïna MARK, almenys la proteïna de 97KDa, és una proteïna transmembrana, i només els pèptids de 37KDa reconeguts per l'anticòs de MARK-KD i que podrien correspondre al domini

quinasa de MARK processat (Río, 1999) es troben en el citoplasma. Això, podria suggerir que la proteïna MIK interacciona amb MARK-KD només després de que aquest sigui processat.

En la bibliografia hi ha exemples de receptors que es processen al rebre el senyal com per exemple el receptor Nocth de *Drosophila*. Notch, implicat en el desenvolupament, és dependent del processament induït pel lligand. La unió del lligand provoca un processament en el domini transmembrana generant un fragment citoplasmàtic que és dirigit a nucli per modificar la transcripció del gens diana (DeStrooper *et al.*, 1999).

Una hipòtesi, compatible amb els nostres resultats, podria ser que la unió d'un lligand podria induir el processament de MARK que, un cop alliberat al medi citoplasmàtic interaccionaria amb MIK activant una cascada de senyalització (figura 4.7).

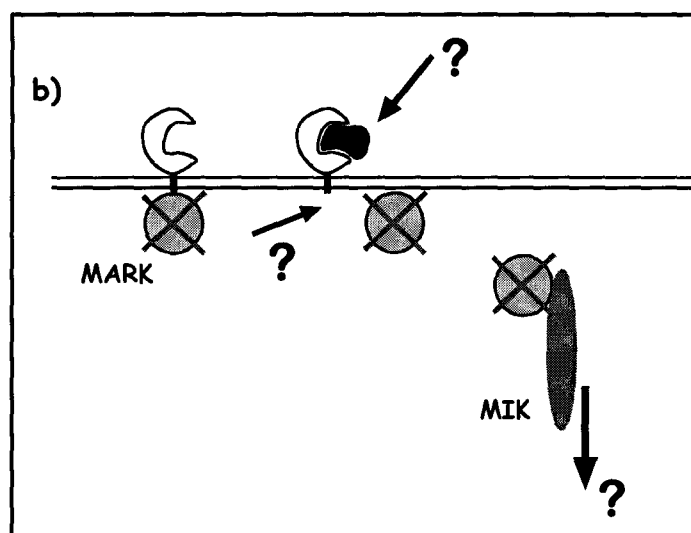


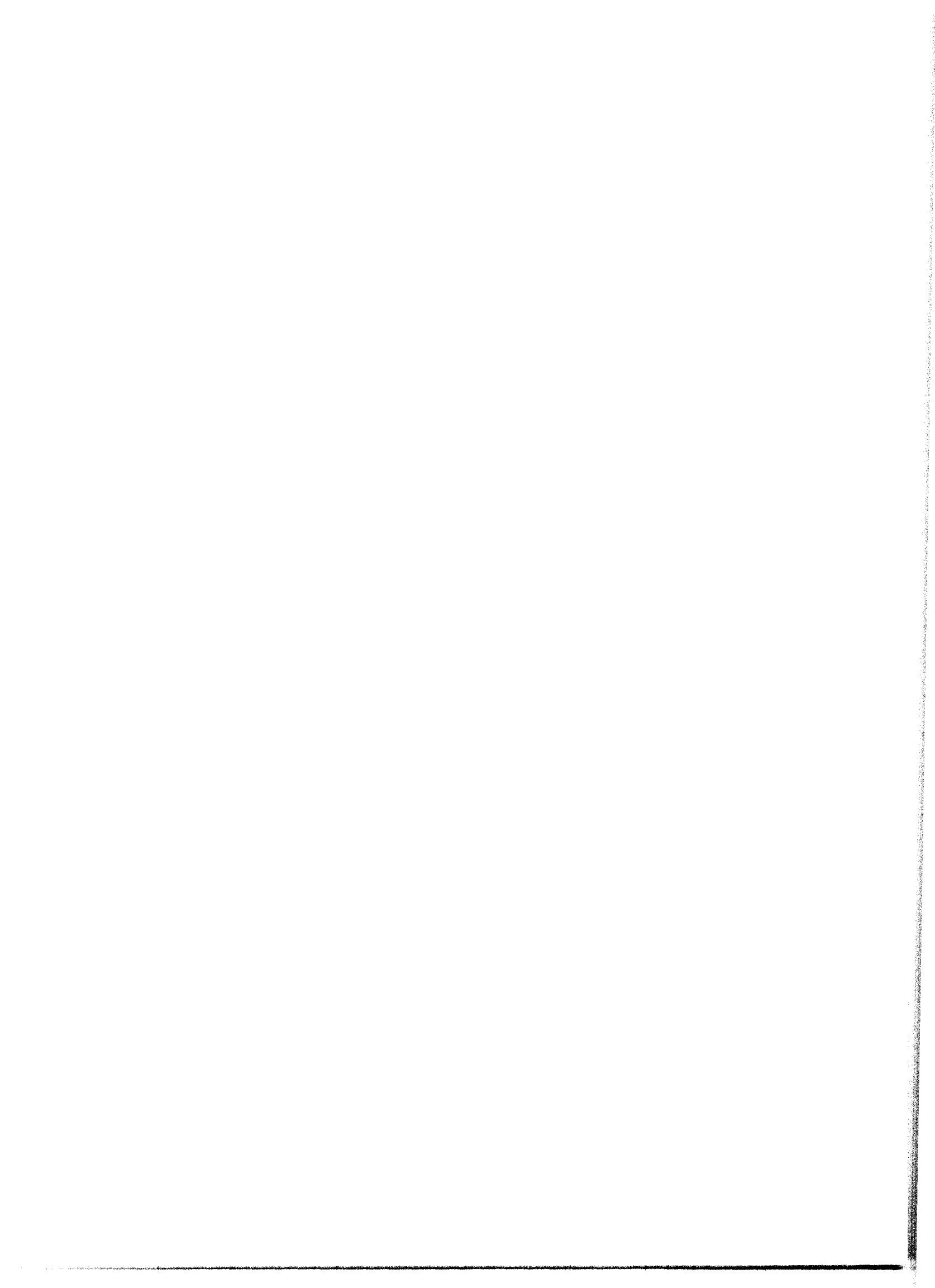
Figura 4.7. Model hipotètic per la interacció MARK-MIK. D'acord amb els resultats obtinguts, proposem un mecanisme d'acció on la unió del lligand provoqui el processament del MARK-KD que, una vegada alliberat al citoplasma interaccionaria amb MIK.

Actualment en el laboratori s'estan realitzant experiments de co-immunoprecipitació per tal de comprovar la interacció MARK-KD amb MIK *in vivo*. Al mateix temps es realitzarà un experiment de cromatografia d'afinitat amb extractes d'embrions no-desnaturalitzats per tal

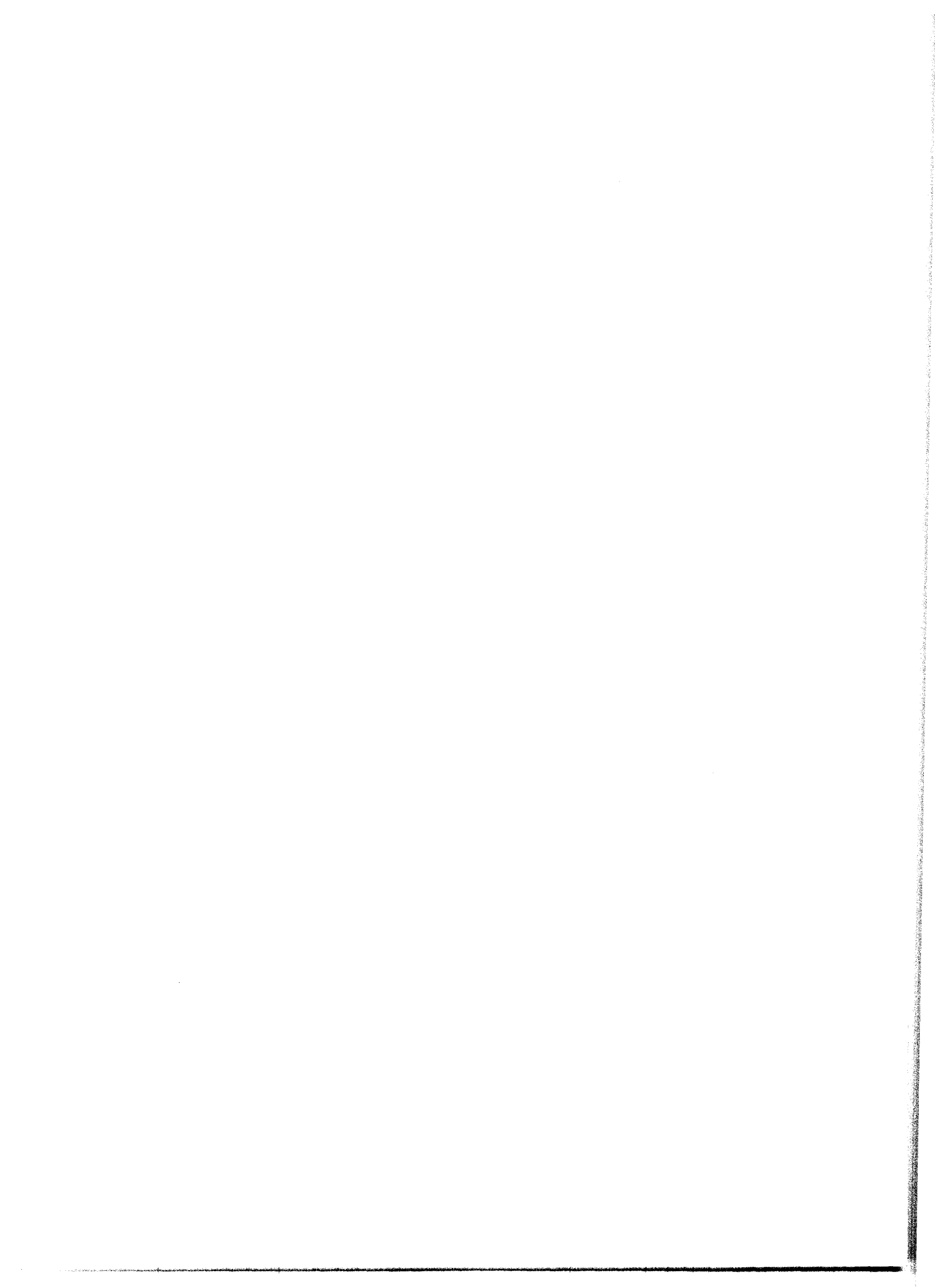
de poder determinar si MARK forma part d'un complex, així com detectar si MIK co-localitza en les mateixes fraccions.

En un futur proper pretenem expressar la proteïna MIK (sencera i deleccionada del seu domini regulador) en *S. pombe* per tal de veure si pot interferir en la via regulada per Sid1, cosa que ens donaria un excel.lent model per analitzar l'activitat de la proteïna MIK.

L'estudi de la funció de les proteïnes MARK i MIK passa, necessàriament, per l'anàlisi de la sobreexpressió o inactivació dels seus corresponents gens. L'obtenció de mutants i la transformació en baat de moro són, per ara, treballs relativament costosos, per això s'han començat a realitzar clonatges en vectors binaris per transformar arròs a fi d'obtenir plantes transgèniques que sobre-expressin *MARK* i *MIK* així com plantes antisentit pels dos gens. Els resultats d'aquests experiments ens indicaran si aquests dos gens estan implicats en una mateixa via de transducció.



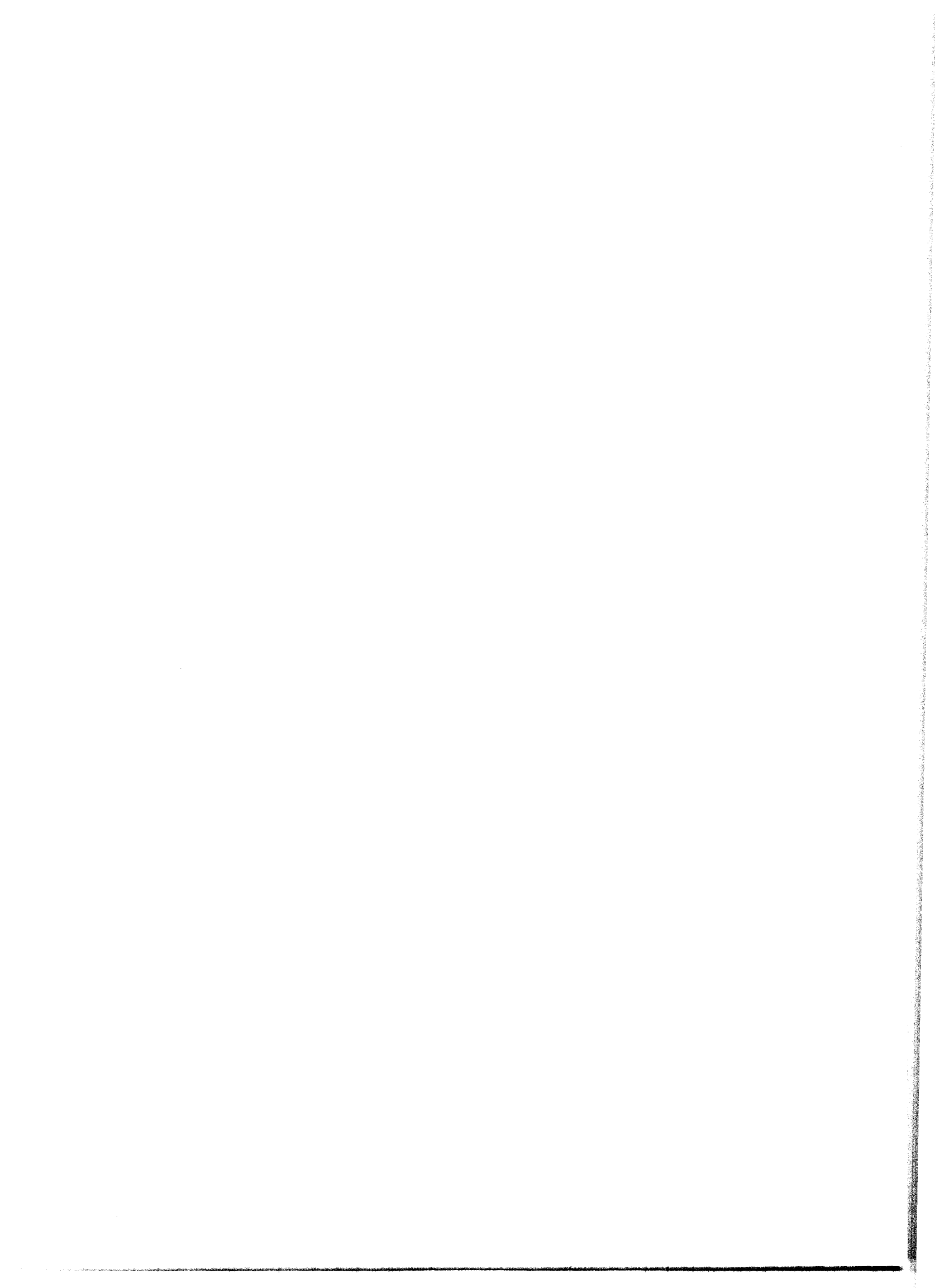
5. Conclusions



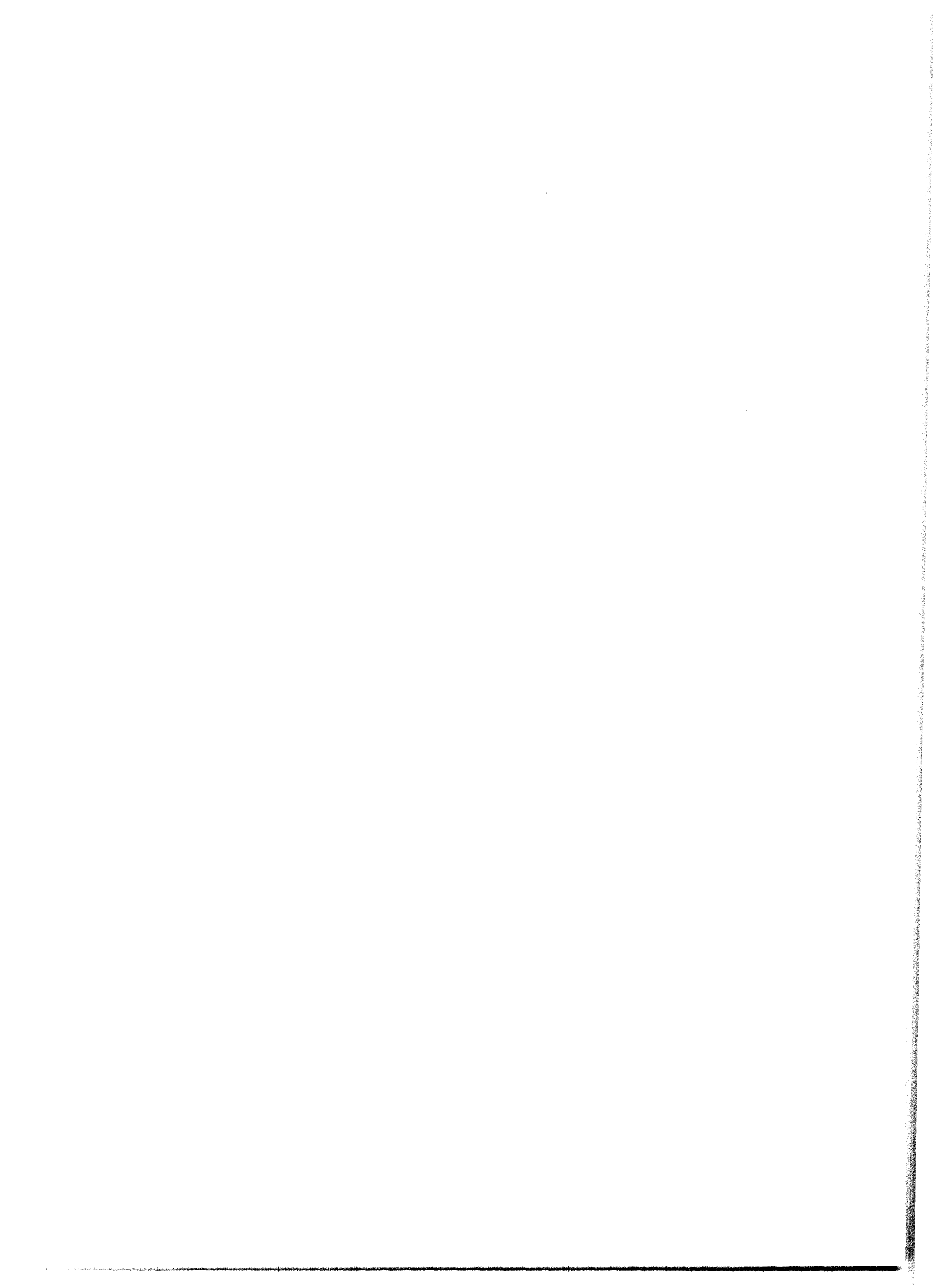
CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquesta memòria permeten extreure les següent conclusions:

- 1.- El domini quinasa de MARK interacciona, en el sistema de doble-híbrid i en assajos de pull-down, amb una proteïna que presenta una elevada similitud de seqüència amb proteïnes γ -adaptines i amb dues proteïnes similars a les proteïnes deduïdes de la base de dades de funció desconeguda (O67576 i O64588).
- 2.- El domini quinasa de MARK interacciona, en cèl.lules de llevat i en assajos *in vitro* de pull-down, amb la regió C-terminal d'una proteïna MAPKinasa que hem anomenat MIK (MARK Interacting Kinase). La proteïna MIK presenta una similitud de seqüència amb proteïnes de la subfamília GCK-III.
- 3.- La proteïna MIK és una proteïna soluble d'un pes molecular aproximat d'uns 95 KDa.
- 4.- *MIK* presenta un patró d'expressió coincident amb el de *MARK*. Tant l'mRNA com la proteïna es detecten en embrions de 2 DAP i l'expressió màxima té lloc en embrions de 15 DAP, mentre que en teixit de fulla jove no s'ha detectat mRNA de *MIK*.
- 5.- Estudis d'immunolocalitzacions al microscopi confocal en embrions de 15 DAP mostren una localització de MARK a la membrana plasmàtica, mentre que MIK s'acumula en el citoplasma de les cèl.lules de l'embrió.
- 6.- Els resultats obtinguts en aquest treball suggereixen una interacció de MARK amb MIK que podria estar associada amb el control de la diferenciació i/o proliferació en blat de moro.



6. Material i mètodes



1. Anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna.

1.1. La tècnica del doble-híbrid.

1.1.1. Transformació de llevats.

Per a la transformació dels llevats es va utilitzar el mètode de l'acetat de liti, un dels més simples i reproduïbles per a introduir DNA en llevats.

Protocol:

- 1- Inocular una colònia en 20 ml de medi ric (YPD) i incubar a 30°C o.n. amb agitació.
- 2- Inocular 400 ml del mateix medi amb el cultiu de nit i incubar fins a obtenir una DO_{600} de 0,1.
- 3- Centrifugar el cultiu a 1000 g 5 minuts a temperatura ambient.
- 4- Resuspendre les cèl.lules en 50 ml d'aigua. Tornar a centrifugar les cèl.lules com en el pas anterior.
- 5- Resuspendre les cèl.lules en 1 ml de solució LiAc/TE fresca i incubar 50 minuts a 30°C. En aquest pas s'aconsegueixen les cèl.lules de llevat competents.
- 6- Preparar solució PEG/LiAc/TE i desnaturalitzar esperma de salmó (10 µg/µg) 5 minuts a 95°C, després mantenir en gel.
- 7- Preparar la mescla de DNA: 0,5 µl del clon amb la proteïna esquer fusionada al vector pAS2.1 (1µg/µl) + 10 µl d'esperma de salmó desnaturalitzat, barrejar.
- 8- Afegir 100 µl de cèl.lules de llevat competents i barrejar.
- 9- Afegir 600 µl de solució PEG/LiAc/TE, barrejar i incubar 30 minuts a 30°C.
- 10- Incubar 15 minuts a 42°C i refredar ràpidament a temperatura ambient.
- 11- Centrifugar a 14000 rpm 5 segons a temperatura ambient.
- 12- Decantar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 400 µl de tampó TE 1X.
- 13- Plaquejar en medi selectiu (SD).

Medis de cultiu:

YPD	SD
Peptona.....20 g/L	Yeast nitrogen base sense aa. (amb sulfat d'amoni)....6,7g
Extracte de llevat...10 g/L	Agar.....20g/Lg
Agar.....20 g/L	H ₂ O.....850 ml
H ₂ O..... .950 ml	Dropout 10X*100 ml

Pels dos medis: Ajustar el pH a 5,8, autoclavar, refredar a 55°C i afegir glucosa al 2% (solució stock: 50 ml al 40%).

Material i mètodes

* mescla d'aminoàcids: les concentracions de cada aminoàcid s'especifiquen en els protocols de doble-híbrid de la casa comercial Clontech.

Solucions stock:

- 50% PEG 4000 (pes molecular 3350) esterilitzat per filtració.
- TE 10X Buffer: 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5 autoclavat.
- LiAc 10X: 1 M Lithium acetate, ajustat a pH 7,5 amb àcid acètic diluït i autoclavat.
- Solució LiAc/TE 1X: cal ser fresca a partir dels stocks de TE 10X i LiAc 10X.
- Solució PEG/LiAc/TE:
 - 50% PEG.....24 ml
 - LiAc 10X.....3 ml
 - TE 10X.....3 ml

1.1.2. Cotransformació seqüencial de llevats a gran escala.

Per realitzar el crivellat de doble-híbrid es va dur a terme la transformació seqüencial, ja que l'eficiència de transformació és més elevada que una transformació simultània, on s'introdueixen els dos plàsmids a la vegada.

Protocol:

- 1- Transformar la soca de llevat Y190 amb la construcció pAS-bait (apartat 1.1.1).
- 2- Plaques les cèl.lules transformants en medi SD sense Trp.
- 3- Picar una colònia transformada Trp⁺ i créixer tota la nit a 30°C en medi SD -Trp.
- 4- Inocular 100 ml del mateix medi amb el cultiu de nit i incubar a 30°C fins a obtenir una DO₆₀₀ de 0,5-1 (tota la nit).
- 5- Inocular 1 L d'YPD amb el cultiu de 100 ml (repartit en quatre erlenmeyers d'1 L) i créixer-ho a 30°C durant unes 4-5 hores amb agitació fins a obtenir una DO₆₀₀ de 0,4-0,5.
- 6- Centrifugar les cèl.lules a 3000 g durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 7- Decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules en 600 ml d'H₂O. Tornar a centrifugar les cèl.lules com en el pas anterior.
- 8- Decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules en 50 ml de solució LiAc/TE 1X. Centrifugar a 3000 g durant 5 minuts.
- 9- Decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules en 6 ml de solució LiAc/TE. Incubar dues alíquotes de 2 ml a 30°C 50 minuts.

- 10- Preparar la solució PEG/LiAc/TE i desnaturalitzar 320 µl d'esperma de salmó (10 µg/µl) 5 minuts a 95°C i mantenir en gel.
- 11- Preparar la barreja de DNA: dos tubs amb 50 µg del domini d'activació (AD)/llibreria de cDNA (1 µg/µl) i 150 µl d'esperma de salmó. Barrejar.
- 12- Afegir la mescla de DNA als 2 ml de cèl.lules competents i barrejar.
- 13- Afegir 12 ml de solució PEG/LiAc/TE a cada tub i incubar a 30°C 30 minuts i amb agitació.
- 14- Incubar 15 minuts a 42°C i refredar ràpidament a temperatura ambient.
- 15- Diluir en 1 L d'YPD i incubar 1 hora i mitja a 30°C amb agitació.
- 16- Centrifugar a 3000 g 5 minuts a temperatura ambient i resuspendre les cèl.lules en 50 ml de tampó TE 1X i centrifugar com en el pas anterior.
- 17- Decantar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 15 ml de tampó TE 1X.
- 18- Per controlar l'eficiència de transformació plaquejar 10 µl de mix (dels 15 totals) + 40 µl d'YPD en plaques SD -Trp -Leu (de 4 x 80 mm).
- 19- Plaquejar 305-310 µl de mix en plaques de 145 mm de medi SD -Trp -Leu per a seleccionar colònies que contenen els dos tipus de plàsmids.
- 20- Segellar amb parafilm i incubar les plaques 3 dies a 30°C.

1.1.3. Selecció per histidina i assaig β-galactosidasa.

Els gens marcadors de la soca Y190 que s'indueixen quan té lloc una interacció proteica, són el gen de la *HISTIDINA* i el *LACZ*.

Pel que respecte al gen *HIS*, per determinar la seva activació, els llevats es plaquegen en un medi sense histidina, seleccionant així els clons His⁺.

El gen *Lacz* codifica per l'enzim β-galactosidasa, la detecció del qual és colorimètrica. En aquest treball es va utilitzar l'assaig β-galactosidasa en filtre. En tots els assajos de β-galactosidasa hi ha un pas on cal trencar les cèl.lules de llevat per alliberar l'enzim per permetre la seva quantificació, per exemple, una immersió en nitrogen líquid.

Protocol:

- 1- Créixer les colònies a analitzar en una placa en medi SD -Leu -Trp (per a la selecció dels dos plàsmids). Millor que les colònies estiguin ben crescudes (1-3 mm de diàmetre).
- 2- Col·locar un filtre 0,5 µm de Millipore sobre les colònies i marcar-lo asimètricament.
- 3- Retirar el filtre i submergir-lo en nitrogen líquid un minut.

4- Deixar descongelar el fitre amb les colònies cap per amunt.

5- Posar el filtre en una placa de petri amb tampó Z + X-gal (el substrat de la β -galatosidasa). És important que el filtre quedi xop de solució procurant que no hi hagi un excés de solució que ens difondria el senyal.

6- Incubar el filtre a 28°C i observar l'aparició de color blau. L'obtenció de color blau per crivellats de llibreries es dona entre els 30 minuts i les 8 hores. Mentre que passades les 8 hores d'incubació, el resultat pot ser causat per un fals positiu.

1.1.4. Anàlisi de creuament.

La fusió de dues cèl.lules de llevat formant un diploide s'utilitza com a control d'interacció. La fusió es realitza entre cèl.lules compatibles de les soques Y190 i Y187, incubant-se durant tota la nit a 28°C amb agitació en medi ric YPD. El diploide es plaqueja en el medi selectiu adequat per la selecció dels plàsmids. Una vegada s'ha obtingut el diploide, s'estudia la interacció proteica per la selecció per histidina i l'assaig β -galatosidasa.

1.1.5. Reacció de PCR sobre colònies de llevat.

En la transformació de llevats a vegades és probable que s'introdueixi més d'un plàsmid per cèl.lula. Per tal de comprovar aquesta possibilitat es va realitzar una PCR amb els diferents clons obtinguts en el crivellat amb dos oligonucleòtids del vector pAS2.1 localitzats a banda i banda del poli-linker. Aquestes amplificacions es van comprovar en un gel d'agarosa a l'1%. Per altra banda és bastant probable obtenir el mateix plàsmid transformat varies vegades. Per comprovar-ho es van digerir les PCRs amb un enzim de restricció de tall freqüent, com ara el *Hae III*.

Protocol:

1- Diluir la colònia aïllada de llevat a analitzar en 100 μ l de tampó TE o aigua.

2- Afegir boletes de vidre (Glass Beads 425-600 microns de Sigma) fins al menisc.

3- Bullir 5 minuts.

4- Vortexejar com a mínim 1 minut.

5- Repetir els pasos 3 i 4 de tres a quatre vegades (per assegurar que la paret del llevat es trenca).

6- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm.

7- Utilitzar 1 μ l del sobrenedant per la PCR (no cal canviar de tub).

Condicions de la reacció:

Tampó de PCR 10X	10 µl
MgCl ₂ (50mM)	3 µl
Oligonucleòtids pAS	2 µl (x2)
dNTPs (10 mM)	2 µl
Taq polimerasa	1 µl (1unitat/µl)
H ₂ O	70 µl

Aquesta mescla s'utilitzava per 5 mostres: 18 µl de mix amb 2 µl de DNA.

Dels 20 µl de cada mostra, 10 es separaven en un gel d'agarosa i els altres 10 es digerien amb *HaeIII*.

1.2. Anàlisi d'interaccions.

1.2.1. Mètode de *pull-down*.

El mètode de *pull-down* permet analitzar interaccions *in vitro*, incubant les dues proteïnes a analitzar amb un tampó que afavoreix les interaccions proteiques.

En aquest treball es van utilitzar dues proteïnes recombinants per a realitzar els *pull-downs*. Mentre que els clons obtinguts del doble híbrid es van clonar al vectot pGEX per tal d'obtenir proteïnes de fusió amb GST i purificar-les en una reïna de glutathione-sepharosa, la proteïna MARK-KD clonada al vector pET28 s'havia purificat pel mètode His-Tag. La quantitat de proteïna MARK-KD que s'utilitza en el *pull-down* sol ser 10 vegades més que l'input que ve determinat per la detecció de l'anticòs. En el nostre cas, en western blot podíem detectar 5 ng de proteïna recombinant MARK-KD (input), per tant el *pull-down* s'incubava amb 50 ng. Finalment, es realitzava un western blot, revelant-lo amb l'anticòs contra MARK-KD per determinar si s'havia quedat retingut amb MIK o s'havia rentat.

1.2.1.1. Inducció i purificació de proteïnes GST.

Les proteïnes a analitzar per *pull-down* s'expressaven com a proteïnes de fusió amb GST, la qual queda retinguda en un reïna de glutathione-sepharosa permetent la seva purificació.

Protocol:

1- Preparar un cultiu de nit en 1 ml de LB amb 4 µl de carbenicilina (100 µg/ml).

Material i mètodes

- 2- Inocular 0,2 ml de cultiu de nit en 200 ml de LB i 0,8 ml de carbenicilina i incubar a 37°C amb agitació fins arribar a una DO₆₀₀ de 0,8-1.
- 3- Induir l'expressió de proteïna afegint IPTG 1mM durant tres hores. Recollir mostres de 500 µl a cada hora per controlar la sobreexpressió proteica. Les alíquotes es centrifugen 1 minut a 13000 rpm i les cèl.lules es resuspenen amb 45 µl de tampó de càrrega 2X.
- 4- Centrifugar el cultiu 10 minuts a 5000 rpm, eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl.lules amb 10 ml de tampó NENT PMSF.
- 5- Sonicar les cèl.lules assegurant que estiguin ben resuspeses.
- 6- Centrifugar en córex 30 a 10000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
- 7- Guardar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 5 ml NENT 2% Sarcosyl PMSF.
- 8- Sonicar breument.
- 9- Centrifugar a 10000 rpm durant 15 minuts a 4°C i ajuntar el sobrenedant amb el del pas 7. En aquest pas l'extracte proteic pot congelar-se a -80°C.
- 10- Per eliminar possibles restes cel.lulars, tornar a centrifugar l'extracte a 10000 rpm 10 minuts a 4°C.
- 11- Preparar la columna de Glutathione Sepharose 4B amb 500 µl de reïna.
- 12- Equilibrar la reïna amb 5 ml de tampó NENT PMSF.
- 13- Passar la mostra per la columna.
- 14- Rentar la columna amb 5 ml de tampó NENT PMSF, 5 ml de tampó NENT-0,7M NaCl PMSF i 5 ml de NENT PMSF.
- 15- Equilibrar la columna amb tampó D (tampó *pull-down*) amb 5 ml.
- 16- Afegir azida sòdica i guardar la resina a 4°C.

Tampó NENT PMSF

Tris pH8.....	20mM
NaCl.....	100mM
EDTA.....	1 mM
PMSF.....	1 mM
NP40.....	0,5%

1.2.1.2. Pull-down.

Un cop purificada una de les proteïnes a analitzar en la reïna de glutathione-Sepharosa, cal equilibrar les diferents quantitats de proteïnes en un gel SDS-PAGE. És important realitzar

el *pull-down* amb una quantitat de proteïna-GST no massa elevada per evitar que se saturi el sistema. Aproximadament els *pull-downs* es realitzaven amb uns 10 µg de proteïna de fusió.

Protocol:

- 1- Equilibrar les proteïnes recombinants en GST amb tampó D afegint 400 µl de tampó i barrejant.
- 2- Centrifugar a 3000 rpm durant 1 minut i descartar el sobrenedant.
- 3- Bloquejar les proteïnes amb 10 µl de BSA (100 mg/ml) durant 2 hores a 4°C en una roda.
- 4- Centrifugar a 3000 rpm 1 minut i retirar el tampó.
- 5- Rentar amb 400 µl de tampó D amb 50 µg/ml de BSA durant 5 minuts a la roda.
- 6- Incubar les possibles proteïnes d'interacció amb 450 µl de tampó durant 2 hores a 4°C a la roda. La quantitat de proteïna que s'afegeix és 10 vegades l'input.
- 7- Passades les 2 hores cal rentar l'excés de proteïna no unida. Realitzar 5 rentats de 15 minuts amb 450 µl de tampó D.
- 8- Afegir 20 µl de tampó de càrrega 2X, barrejar, incubar a 95°C 5 minuts i analitzar en un gel d'acrilamida.

Tampó D

Hepes pH7,9.....	20 mM
Glicerol.....	20%
EDTA.....	0,2 mM
NaCl.....	150 mM
NP40.....	0,5%
PMSF.....	0,1 mM
DTT.....	0,5 mM

1.2.2. Immunoprecipitació.

Els experiments de co-immunoprecipitació permeten demostrar interaccions *in vivo*. Els extractes cel.lulars es tracten en condicions no desnaturalitzants de manera que els complexos proteics es mantinguin. D'aquesta manera si un anticòs immunoprecipita una proteïna que forma part d'un complex, també co-immunoprecipita la resta de proteïnes del complex.

Material i mètodes

Protocol:

- 1- Extracció de proteïnes totals d'embrions de 15 DAP en morter amb nitrogen líquid.
- 2- Afegir 500 µl de tampó d'immunoprecipitació.
- 3- Incubar 30 minuts en gel.
- 4- Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
- 5- Recuperar el sobrenedant (en aquest punt, cal comprovar que s'ha extret la proteïna a immunoprecipitar, en cas que tingui una naturalesa insoluble). Per la immunoprecipitació normalment s'utilitza deu vegades més de sobrenedant respecte a una quantitat coneguda que detecta la proteïna en western.
- 6- Afegir 5-10 µl d'anticòs (dilució 1:1000). És necessari fer controls amb el sèrum pre-immune.
- 7- Incubar 2 hores a 4°C a la roda.
- 8- Afegir proteïna A Sepharosa resuspesa en tampó d'immunoprecipitació de 50-70 mg/500 µl de tampó (20 µl proteïna A/immunoprecipitació). També s'afegeix azida sòdica al 20%.
- 9- Incubar a la roda durant 1 hora o durant tota la nit a 4°C.
- 10- Rentar amb tampó d'immunoprecipitació afegint 500 µl de tampó i centrifugar 1 minut a 3000 rpm i retirar el tampó. Les baixes rpm impedeixen la precipitació de sals.
- 11- Repetir el pas anterior 4-5 vegades.
- 12- Resuspendre en tampó de càrrega 2X.
- 13- Les mostres poden ser congelades o carregades en un gel d'acrilamida per tal de ser immunodetectades per western blot.

Tampó d'immunoprecipitació

Tris pH8.....	50mM
NaCl.....	150mM
EDTA.....	5mM
NP40.....	0,5%
PMSF.....	0,1mM
Aprotinina.....	2µg/ml
Leupeptina.....	1µg/ml

- Per realitzar una co-immunoprecipitació, en primer lloc cal comprovar que els dos anticossos (Ab1 i Ab2) són capaços d'immunoprecipitar. Per la co-immunoprecipitació cal revelar el western blot amb l'anticòs de la proteïna que pensem que forma part del complex. Així, en precipitar amb l'anticòs Ab1, si la proteïna 2 forma part del complex podrà ser detectada en un western blot revelat amb l'Ab2.

1.3 Gradient de sacarosa.

Per tal de determinar en quines fraccions (solubles o insolubles) es localitzaven les proteïnes MARK i MIK, es va realitzar un gradient de sacarosa.

Protocol:

- 1- Triturar embrions de 20 DAP en morter amb nitrogen líquid.
- 2- Afegir 2 ml de tampó d'extracció X2.
- 3- Centrifugar 10 minuts a 3000 rpm a 4°C.
- 4- Repetir el pas anterior.
- 5- Guardar una mostra (control 1). Passar la resta del sobrenedant a un tub nou. Ultracentrifugar a 34000 rpm durant 1 hora (rotor SW60).
- 6- Guardar el sobrenedant (control 2).
- 7- Homogeneïtzar el pellet amb 0,4 ml de tampó d'extracció 1X. Guardar una alíquota (control 3; 50 µl).
- 8- Realitzar el gradient amb 12 ml: 6 ml STED20 + 6 ml STED45 i afegir el pellet homogeneïtzat (0,350 ml).
- 9- Ultracentrifugar durant 5 hores a 28000 rpm (100000g).
- 10- Recollir les diferents fraccions de sacarosa (de 0,8 ml cadascuna).
- 11- Mesurar el gradient de densitat a l'espectrofotòmetre.

Tampons de gradient de sacarosa

	<u>STED 20</u>	<u>STED45</u>
Sacarosa.....	20%.....	45%
Tris pH8.....	50 mM.....	50 mM
EDTA.....	1 mM.....	1 mM
DTT.....	1 mM.....	1 mM

Tampó d'immunoprecipitació

Sacarosa.....	12%
Tris pH8.....	100 mM
EDTA.....	10 mM
DTT.....	2 mM
Leupeptina.....	0,5 µg/ml
Pepstatina.....	1 µg/ml
E64.....	1 µg/ml
PMSF.....	0,1 mM

2. Anàlisi d'àcids nucleics.

2.1 Obtenció de DNA plasmídic.

El mètode utilitzat va ser el de la lisi alcalina basat en el descrit per Birnboim i Doly (1979) i modificat posteriorment per Sambrook *et al.* (1989).

2.2 Preparacions de DNA a gran escala (midipreparacions de DNA).

El kit d'extracció utilitzat fou el de la casa comercial Qiagen, que combina la lisi alcalina i columnes amb reïna de bescanvi aniònic. El DNA que s'obté, de gran puresa i lliure d'activitats DNases, pot ser utilitzat per a qualsevol tipus de reacció enzimàtica.

2.3 Extracció de DNA genòmic.

S'ha utilitzat una modificació del mètode de Dellaporta que permet realitzar extraccions ràpides i múltiples de fins a 2 g de material sense haver de passar per una purificació de CsCl (Dellaporta *et al.* 1983). Aquest mètode és fàcilment adaptable a una escala inferior permetent l'extracció en tubs de microcentrífuga.

És molt important no vortexejar ni agitar vigorosament el DNA genòmic ja que es degrada amb facilitat.

Protocol:

- 1- Triturar el teixit vegetal amb nitrogen líquid en un morter evitant que es descongeli. És important aconseguir un polsim fi, ja que el rendiment de l'obtenció de DNA està en funció del grau de disgregació al que s'ha sotmès el teixit.
- 2- Passar el material a un tub de microcentrífuga que conté 400 µl de tampó d'extracció. Homogeneïtzar suaument invertint el tub repetidament.
- 3- Afegir 500 µl de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1) i homogeneïtzar suaument invertint repetidament el tub.
- 4- Centrifugar a 13000 rpm durant 10 minuts.
- 5- Recollir la fase aquosa i afegir un volum de fenol/cloroform/alcohol isoamílic, barrejar suaument.
- 6- Centrifugar a 13000 rpm 10 minuts.

- 7- Repetir els punts 6 i 7 (si no s'aconsegueix netejar bé pot ser degut a un excés de DNA i es pot diluir la mostra amb tampó d'extracció).
- 8- Precipitar el DNA afegint 150 µl de NH₄Ac i 900 µl d'IprOH i invertir el tub. S'ha de veure el DNA com precipita en forma de filaments.
- 9- Centrifugar 15 minuts a 13000 rpm.
- 10- Descartar el sobrenedant i rentar el DNA amb 200 µl d'EtOH 70%.
- 11- Centrifugar a 13000 rpm 5 minuts, retirar el sobrenedant i deixar assecar durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 12- Resuspendre el DNA en el volum adequat de TE. Per ajudar a resuspendre es pot escalfar a 65°C durant 10-15 minuts.
- 13- Afegir 3-4 µl de RNAsa 10 mg/ml per cada 100 µl i incubar 10 minuts a 37°C.
- 14- Guardar a 4°C. Aquest DNA es manté durant mesos.

Tampó d'extracció

Urea.....	7 M
NaCl.....	312,5 mM
Tris-HCl pH8.....	50 mM
EDTA pH8.....	20 mM
Sarkosyl.....	1% (w/v)

Quantificació dels àcids nucleics per espectrometria.

La concentració del àcids nucleics es determina per absorció a diferents longituds d'ona. Els àcids nucleics tenen un màxim d'absorció a 260 nm, mentre que les proteïnes el tenen a 280 nm. Per tant, el quocient de les absorcions 260/280 es pot utilitzar per a determinar la puresa de la mostra (Gallagher, 1994).

Per altra banda, la quantitat d'àcids nucleics en la mostra es calcularà tenint en compte que 1 unitat de densitat òptica (DO) és igual a:

- per DNA de doble cadena 1 DO= 50 µg/ml
- per RNA 1 DO= 40 µg/ml

2.3.1 Southern genòmic.

La tècnica Southern (1975) permet analitzar, per exemple, quantes còpies d'un gen en concret hi ha en el genoma mitjançant la transferència de DNA digerit per enzims de restricció i hibridat amb la sonda del gen a analitzar.

• Digestió genòmica:

Protocol:

- 1- Digerir uns 15 µg de DNA genòmic (apartat 2.3) amb 3 unitats d'enzim per µg de DNA durant 2 hores a 37°C (és millor fer la digestió en un volum final gran, de 200 µl, per exemple). Cal fer la digestió amb dos o més enzims diferents.
- 2- Afegir la mateixa quantitat d'enzim i incubar 2 hores més.
- 3- Verificar en un gel d'agarosa la digestió del DNA, corrent 1/10 part de la digestió. S'han d'observar un escalat de bandes en tot el carril.
- 4- Afegir un volum de fenol/cloroform/alcohol isoamflic, vortexejar i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
- 5- Precipitar el sobrenedant afegint 0,1 volums de NaAc 3M pH5,5 i 2,5 volums d'EtOH 100%.
- 6- Centrifugar 15 minuts a 13000 rpm.
- 7- Rentar el pellet amb 200 µl d'EtOH 70% i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
- 8- Resuspendre en el volum adequat d'aigua per deixar a una concentració de 1 µg/µl.
- 9- Analitzar les mostres segons la tècnica Southern, següent apartat.

• Transferència:

La transferència s'aconsegueix per capil·laritat a través d'una pila de paper absorbent compactada per pressió. Posteriorment, el DNA s'immobilitza en la membrana de tal manera que aquesta representa una còpia exacta del patró present en el gel (Brown, 1999).

Protocol:

- 1- Preparar les mostres afegint una concentració 1X final de tampó de càrrega per DNA i carregar-les en un gel d'agarosa (al 0,8% si es tracta de DNA genòmic).
- 2- Córrer el gel a 70 mV si es tracta de DNA genòmic o a 100 mV en la resta dels casos.
- 3- Acabada l'electroforesi, fer una foto del gel amb llum UV col·locant un regla al costat de manera que es pugui mesurar la distància recorreguda per les mostres des del pouet.
- 4- Incubar el gel 5-10 minuts en solució desnaturalitzant.

- 5- Preparar una transferència capil·lar (veure apartat 2.5) amb solució desnaturalitzant i transferir durant tota la nit.
- 6- Desmuntar la transferència i rentar la membrana 5-10 minuts en SSC 2X per tal d'eliminar restes d'agarosa.
- 7- Eixugar la membrana amb paper de filtre i empaquetar-la.
- 8- Fixar el DNA a la membrana incubant-la 2 hores a 80°C.
- 9- La membrana es pot mantenir en un lloc sec i net.

Solució desnaturalitzant

NaOH.....0,5 M

NaCl.....1,5 M

SSC2X

Citrat de sodi pH 7,5.....30 mM

NaCl.....0,3 M

Ajustar el pH a 7 amb NaOH

2.4 Extracció de RNA.

L'extracció de RNA és especialment delicada ja que s'ha d'evitar qualsevol activitat RNAsa tant endògena com contaminant. Per aquest motiu tant els reactius com el material a utilitzar han d'estar lliures de RNAses i el teixit ha de mantenir-se congelat fins a l'addició del tampó d'extracció. L'ús de guants és fonamental durant tot el procés. El mètode utilitzat és una modificació del descrit per Logeman i col.laboradors (1987).

Protocol:

- 1- Triturar el teixit vegetal amb nitrogen líquid en un morter evitant que el material es descongeli. Igual que en el cas del DNA és important obtenir un polsim fi.
- 2- Passar el material triturat a un tub de microcentrifuga que conté 400 µl de tampó d'extracció Z6. Vortexejar exhaustivament i congelar en nitrogen líquid.
- 3- Deixar descongelar la mostra a temperatura ambient (mentres tant es poden anar polvoritzant les altres mostres).
- 4- Afegir 400 µl de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1, V/V/V) i vortexejar exhaustivament.
- 5- Centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient i recollir la fase aquosa.
- 6- Repetir els punts 4 i 5 dues vegades.
- 7- Afegir 0,1 V d'àcid acètic 1 M i vortexejar.
- 8- Afegir 0,7 V d'etanol, vortexejar i deixar 30 minuts a -20°C.

Material i mètodes

- 9- Centrifugar a 13000 rpm durant 15 minuts a temperatura ambient.
- 10- Retirar el sobrenedant i rentar l'RNA amb 500 µl d'EtOH 70%.
- 11- Centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts.
- 12- Retirar el sobrenedant i rentar el pellet amb 1 ml de NaAc 3 M pH5,5, per tal de dissoldre els polisacàrids. Vortexejar.
- 13- Centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts
- 14- Retirar el sobrenedant i rentar el pellet amb 400 µl d'EtOH 70%.
- 15- Vortexejar i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
- 16- Repetir els passos 14 i 15.
- 17- Retirar el sobrenedant i deixar assecar a temperatura ambient (5 minuts).
- 18- Resuspènere en el volum adequat d'H₂O estèril pipetejant i escalfant a 65°C durant 10 minuts. Una vegada ben resuspès, centrifugar 5 minuts a 13000 rpm i traspasar el sobrenedant en un eppendorf nou per eliminar les restes no solubles que poden haver quedat a la mostra.
- 19- Congelar a -80°C. El RNA es pot mantenir durant anys.

Tampó d'extracció Z6

Hidroclorur de guanidini.....8 M

MES pH7.....20 mM

EDTA pH8.....20 mM

Just abans d'utilitzar-lo cal afegir 1% de 2β-mercaptoetanol.

2.4.1 Northern blot.

• Preparació de les mostres.

Una vegada realitzada l'extracció de RNA i calculada la concentració, s'agafa la quantitat a analitzar i es liofilitza. Es poden analitzar fins a 30 µg de RNA per carril, tot i que 10-20 µg poden ser suficients per detectar els RNAs més abundants. Les mostres liofilitzades es resuspenen en 15 µl de tampó de càrrega de RNA i es carreguen en el gel electroforètic. Alternativament, si no es vol liofilitzar la mostra, s'ha d'afegir el volum necessari de tampó de càrrega (2X) al volum de la mostra a analitzar.

<u>Tampó de càrrega de RNA</u>	<u>MEN 10X</u>
Formamida desionitzada.....60%	MOPS àcid pH7.....0,2 M
MEN10X.....1X	NaAc.....50 mM
Formaldehid.....6,29%	EDTA pH8.....10 mM
BrEt.....0,1 µg/ml	Ajustar a pH7 amb NaOH.
Blau de bromofenol.....0,025%	Guardar a 4°C.

• **Electroforesi i transferència de RNA.**

Cal treballar sota campana de flux, ja que el formaldehid és molt tòxic. Tot el material a utilitzar en l'electroforesi cal que estigui lliure de RNases i per això cal netejar-ho bé amb NaOH.

Protocol:

- 1- Fondre la quantitat necessària d'agarosa (a l'1%) amb aigua destil.lada i deixar atemperar.
- 2- Afegir el volum necessari de MEN 10X i un 6,5% de formaldehid 37%. Barrejar bé i decantar-ho sobre el suport del gel.
- 3- Deixar solidificar el gel.
- 4- Escalfar les mostres a 65°C durant 5 minuts per desnaturalitzar-les. Fer un cop de centrifuga.
- 5- Carregar i córrer el gel a 80 mV.
- 6- Preparar la transferència capil.lar (apartat 2.5) amb SSC 20X i transferir 24 hores.
- 7- Desmontar la transferència, marcar els pouets amb llapis i netejar la membrana amb SSC 2X.
- 8- Eixugar la membrana amb paper de filtre i empaquetar-la.
- 9- Fixar el RNA a la membrana incubant-la 2 hores a 80°C. Fer una foto de la membrana amb llum UV col.locant un regle al costat, de manera que es pugui mesurar la distància recorreguda per les mostres des del pouet.
- 10- La membrana es pot guardar en un lloc sec i net abans d'hibridar-la amb la sonda.

2.5 Preparació d'una transferència capil.lar en líquid i en sec.

Aquest protocol s'utilitza per transferir els àcids nucleics (DNA o RNA) des d'un gel d'agarosa a una membrana de niló.

• **Transferència en líquid.**

Protocol:

- 1- Col·locar sobre una safata un suport de mida superior a la del gel que s'ha de transferir.
- 2- Posar dos trossos de paper Whatman 3MM d'amplada superior a la del gel que s'ha de transferir.
- 3- Omplir la safata amb la solució de transferència que pertoqui i mullar els papers Whatman 3 MM amb aquesta mateixa solució. Vigilar que no es formin bombolles ni arrugues.
- 4- Col·locar el gel sobre els papers Whatman eliminant les bombolles.
- 5- Mullar la membrana, de la mida del gel, primer amb aigua destil·lada i després amb la solució de transferència. Posar-la sobre el gel eliminant, també, les bombolles.
- 6- Posar tres papers Whatman 3MM de la mida del gel mullats amb la solució de transferència sobre el gel.
- 7- Col·locar Parafilm al voltant del gel per assegurar que la capil·laritat passa només a través del gel.
- 8- Posar papers absorbents sobre dels papers Whatman i posar un pes a sobre.

• **Transferència en sec.**

La transferència en sec s'utilitza quan s'ha de transferir DNA de minipreparacions o de PCR. Dues hores són suficients per transferir tot el DNA i es pot fer per duplicat, és a dir, transferir per les dues cares del gel.

Protocol:

- 1- Sobre un suport de vidre ben net posar-hi el gel a transferir prèviament equilibrat en solució desnaturalitzant. Si es vol fer una transferència doble, sobre el suport de vidre es col·loquen papers absorbents, els Whatman mullats amb solució desnaturalitzant i seguidament la membrana també equilibrada. Sobre la membrana s'hi posa el gel equilibrat amb solució desnaturalitzant.
- 2- Mullar la membrana primer amb aigua destil·lada i després amb solució desnaturalitzant. Col·locar-la sobre el gel eliminant les bombolles.
- 3- Posar tres papers Whatman 3MM de la mida del gel mullats amb solució de transferència sobre la membrana.
- 4- Col·locar tires de parafilm al voltant de gel.
- 5- Posar papers absorbents a sobre i col·locar-hi un pes.
- 6- Deixar transferir durant 2 hores.

2.6 Hibridació d'àcids nucleics.

El principi bioquímic en què es basa la tècnica d'hibridació d'àcids nucleics és la capacitat que té una molècula de cadena senzilla, ja sigui DNA o RNA, d'unir-se a una altra molècula que té una seqüència complementària a la primera. La sensibilitat és tan elevada que permet la detecció de gens de còpia única dins de genomes complexes (Brown, 1999). Així doncs, el DNA o RNA una vegada immobilitzat en una membrana pot ser hibridat amb una sonda marcada radioactivament, de tal manera que es detectaran els fragments de seqüència similar a la sonda.

2.6.1 Marcatge d'àcids nucleics.

El marcatge radioactiu dels àcids nucleics es va realitzar amb el mètode de Random Priming desenvolupat per Feinberg i Vogelstein (1983) que permet l'obtenció de fragments de DNA marcats uniformement i amb una elevada activitat específica (fins 3×10^9 cpm/ μ g). El DNA es desnatura i s'incuba amb una barreja d'hexanucleòtids. Aquests hexanucleòtids fan d'encebadors per a l'enzim *klenow* polimerasa que sintetitza la cadena complementària en presència d'un dels desoxinucleòtids marcats radioactivament. El protocol descrit a continuació és l'utilitzat pel kit "Random Primer DNA Labeling Kit" (Roche), amb algunes variacions.

Protocol:

- 1- A 20-50 ng de DNA afegir el volum necessari d'aigua fins assolir un volum final d'11 μ l.
- 2- Desnaturalitzar durant 5 minuts a 100°C i mantenir en gel.
- 3- Afegir;

1 μ l dATP 0,5 mM
1 μ l dGTP 0,5 mM
1 μ l dTTP 0,5 mM
2 μ l d'hexanucleòtids 10X
- 4- Afegir 1,5 μ l de *klenow* (2 u/ μ l) a la paret de l'ependorf i mantenir en gel. S'ha d'evitar que la *klenow* comenci a sintetitzar noves cadenes abans que s'hagi incorporat el desoxinucleòtid marcat.
- 5- Afegir 3 μ l de 32 P-dCTP 10 μ Ci/ μ l (Amersham Pharmacia). Donar un cop de centrifuga i incubar 1 hora a 37°C.

Material i mètodes

6- Donar un cop de centrifuga i afegir;

3 µl d'EDTA 0,5 M, pH 8 (per parar la reacció)

3 µl de NaAc 3 M, pH5,5

3 µl d'esperma de salmó* a la paret del tub

75 µl d'EtOH 100%, fer baixar el DNA de salmó

7- Vortexejar i centrifugar 15 minuts a 13000 rpm.

8- Traspasar el sobrenedant a un altre tub i comprovar amb un comptador Geiger l'eficiència del marcatge comparant les desintegracions/minut del DNA marcat i del sobrenedant. Com a mínim la incorporació ha de ser de més del 50%.

9- Resuspendre la sonda en 150 µl d'aigua i guardar a 4°C.

* 10 mg/ml de DNA d'esperma de salmó en aigua destil.lada. Cal sonicar la solució i desnaturalitzar-la 10 minuts a 100°C. Pot ser emmagatzemada a -20°C. Abans d'utilitzar, però, es torna a desnaturalitzar 5 minuts a 100°C i es manté en gel.

2.6.2 Hibridació i rentats.

Totes les hibridacions fetes en aquest treball s'han dut a terme a 65°C i utilitzant el mètode de l'hidrogenfosfat de sodi, descrit originalment per Church i Gilbert (1984).

Protocol:

1- Escalfar la solució d'hibridació a 65°C.

2- Col.locar la membrana on hi ha el DNA fixat en un cilindre o en una caixa.

3- Afegir-hi el volum de solució d'hibridació necessari perquè la membrana quedi coberta, i afegir 10 µg/ml d'esperma de salmó.

4- Incubar 1 hora a 65° C i amb agitació.

5- Decantar la solució i afegir nova solució d'hibridació a 65° C.

6- Desnaturalitzar la sonda a 100° C durant 5 minuts i afegir-la a la membrana.

7- Incubar un mínim de 5 hores amb agitació a 65° C (en general les hibridacions es feien durant tota la nit).

8- Treure la solució d'hibridació amb la sonda i substituir-la amb solució de rentat prèviament escalfada a 65° C.

9- Fer 4-5 rentats de 15 minuts a 65° C amb agitació, fins que la solució que canviem no canti.

10- Exposar la membrana a un film d'autoradiografia dins d'un casset amb pantalla intensificadora del senyal a -80° C durant el temps que calgui.

Solució d'hibridació.

Tampó fosfat pH 7,2.....0,25 M

SDS.....7 %

EDTA pH 8.....1 mM

Solució de rentat.

Tampó fosfat pH 7,2.....20 mM

SDS.....1 %

EDTA pH 8.....1 mM

2.6.3. Deshibridació de les membranes.

Les membranes que han estat hibridades es poden deshibridar i ser reutilitzades amb una altra sonda.

Per a membranes amb DNA:

- Fer dos rentats de 10 minuts de solució NaOH 0,1 M
- Fer dos rentats de 10 minuts de solució neutralitzant.

Per a membranes amb RNA:

- Fer dos rentats de 10 minuts de solució 0,1 % SDS bullint.

Solució neutralitzant.

NaCl.....1,5 M

Tris-HCl pH 7.5.....0,5 M

2.7 Clonatge.

2.7.1 Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa.

Per a la majoria dels clonatges realitzats en aquest treball el DNA a clonar s'ha obtingut utilitzant el Kit comercial GFXTM-PCR DNA and Gel Purification Kit d'Amersham Pharmacia Biotech.

2.7.2 Lligació.

La T4 lligasa uneix covalentment fragments de DNA d'extrems roms o cohesius que tinguin l'extrem 5' fosforilat. Per evitar que la lligasa enlloc d'insertar el fragment de DNA en el plàsmid provoqui la seva recircularització, cal defosforilar prèviament el plàsmid.

L'eficàcia de la lligació depen de la probabilitat que es trobin el plàsmid i el fragment de DNA. En general, per a un millor rendiment de la reacció de lligació, la relació de concentració entre el nº de molècules de l'insert i del plàsmid és de 3:1. Si bé en construccions més complicades (extrems roms o plàsmids de mida gran) és millor que la relació sigui de 5:1.

La quantitat d'insert i de plàsmid que s'ha d'utilitzar es pot calcular a partir de la relació molecular següent:

$$\text{ng insert/longitud insert} = 3 \text{ (ó 5) (ng plàsmid/longitud plàsmid)}$$

En la reacció de lligació cal afegir el tampó de lligació (10X) i lligasa (no més de 1 unitat per cada 10 µl de reacció final). En general, les lligacions s'incubaven durant tota la nit a 16°C.

2.7.3 Transformació en cèl.lules d'*E. coli* per xoc tèrmic.

Mitjançant la transformació de vectors podem mantenir i amplificar DNA forà en bacteris. Per tal que un vector pugui ser introduït en un bacteri cal manipular la seva paret cel.lular fent-la competent. Les cèl.lules competents s'obtenien pel mètode d'incubació amb clorur de calci descrit per Seidman (1997).

Transformació per xoc tèrmic:

- 1- Afegir a l'alíquota de cèl.lules competents (200 µl) la lligació i barrejar suaument.
- 2- Mantenir 10-15 minuts en gel. En aquest pas el DNA s'adhereix a les cèl.lules.
- 3- Incubar 2 minuts a 42°C (o 5 minuts a 37°C), aquest xoc tèrmic provoca l'entrada del DNA a les cèl.lules.
- 4- Incubar 1 minut els tubs en gel.
- 5- Afegir 800 µl de medi SOB i incubar 45 minuts a 37°C amb agitació perquè es recuperin les cèl.lules.
- 6- Plaquejar la transformació en plaques de medi LB complementades amb l'antibiòtic introduït pel vector.

7- Incubar les plaques a 37°C durant tota la nit en posició invertida.

8- Les colònies obtingudes poden ser amplificades i mitjançant una minipreparació, extreure i analitzar el DNA d'interès.

Medi SOB

Bactotripton.....20 g/l

Bacto yeast extract.....5 g/l

KCl.....2,5 mM

NaCl.....10 mM

MgSO₄.....10 mM

MgCl₂.....10 mM

2.7.4 Reacció de PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet la síntesi de seqüències específiques de DNA. S'utilitzen dos oligonucleòtids complementaris respectivament a les dues cadenes i que flanquegen la regió a amplificar. La reacció es du a terme en varis cicles de desnaturalització, anellament dels oligonucleòtids i extensió mitjançant la Taq polimerasa.

Les condicions habituals de reacció utilitzades són les següents:

DNA entre 10 i 100 ng

Tampó de PCR 1X

dNTPs 10 mM

MgCl₂ entre 1 mM i 5 mM (alguns tampons contenen ja el MgCl₂).

oligonucleòtid A 20 pmol

oligonucleòtid B 20 pmol

Taq polimerasa 2,5 U

H₂O fins V_{final} de 50-100 µl.

Material i mètodes

Els programes poden ser molt variables, però cal tenir en compte una sèrie de paràmetres:

1 cicle:	1-2 minuts	94°C (per desnaturalitzar l'àcid nucleic)
30 cicles:	45 s	94°C
	30 s	temperatura d'anellament (sol ser d'uns 3-5 graus per sota de la T _m dels oligonucleòtids)
	x s	72°C (cal tenir en compte que la Taq incorpora 1kb/minut)
1 cicle:	10 minuts	72°C.

Tampó de PCR

KCl.....500 mM

Tris-HCl pH 8,6.....200 mM

Tritó X-100.....1%

2.8 Crivellat d'una llibreria de DNA genòmic.

En aquest treball es va realitzar un crivellat d'una llibreria genòmica de blat de moro per tal d'obtenir la seqüència completa d'un dels gens estudiats.

Es va utilitzar una llibreria comercial de Clontech que estava clonada en el vector EMBL3 i la soca d'*E. coli* utilitzada per a la propagació va ser la K803.

Pel crivellat es va utilitzar el protocol de la casa comercial Clontech.

2.9 RACE.

La tècnica RACE (*rapid amplification cDNA ends*) es va utilitzar per aconseguir un clon complet del gen *MIK*. Es va utilitzar el kit de la casa comercial Invitrogen, GeneRacer Kit. Aquest kit es base en la incorporació, mitjançant una lligasa, d'un oligonucleòtid de RNA a l'extrem 5' dels mRNAs que s'utilitza de motlle per amplificar per PCR juntament amb un oligonucleòtid intern del gen problema. En aquesta metodologia hi ha un pas previ on es descarten tots aquells RNAs no complets mitjançant una fosfatasa que elimina els fosfats 5'. D'aquesta manera, els mRNAs que presenten l'estructura del CAP, els complets, no són defosforilats. Seguidament, l'estructura del CAP és eliminada amb una pirofosfatasa que incorpora un fosfat 5' lliure necessari per la lligació de l'oligonucleòtids de RNA. Amb les

cadena de RNA lligades a l'oligonucleòtids se sintetitza la primera cadena amb l'enzim Reverse Transcriptasa utilitzant, en el nostre cas, un oligonucleòtid intern. Seguidament es realitza la PCR amb l'oligonucleòtid GeneRacer 5' Primer i un oligonucleòtid més a 5' que l'utilitzat per la primera cadena. La PCR obtinguda es va clonar en el vector pGEM-T Easy Vector System I (Promega).

Vam partir de RNA total (5 µg) d'embrions de 15 DAP DNAsa free.

Protocol de DNAsa free:

1- Afegir a 5 µg d'RNA:

- 5 µl tampó DNAsa
- 1 µl DNAsa-RNAsa free
- 1 µl RNAsina ó RNAguard
- H₂O fins a 50 µl

2- Incubar 20 minuts a 37°C.

3- Afegir un volum de fenol/cloroform/alcohol isoamílic, vortexejar i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.

4- Precipitar el sobrenedant afegint 0,1 volums de NaAc 3M pH5,5 i 2,5 volums d'EtOH 100%.

5- Centrifugar 15 minuts a 13000 rpm.

6- Rentar el pellet amb 200 µl d'EtOH 70% i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.

7- Resuspendre en H₂O RNAsa free segons la concentració final que es vulgui.

Tampó DNase 10X: Tris-HCl 0,4 M pH 7,5, MgCl₂ 60 mM.

RNAguardTM RNase Inhibitor Porcine (Amersham Pharmacia Biotech).

DNaseI-RNase free (10U/µl) (Boehringer Mannheim)

3. Anàlisi de proteïnes.

3.1 Extracció de proteïnes totals.

Per tal d'extreure les proteïnes totals a partir de material vegetal, es va utilitzar el següent protocol.

Protocol:

- 1- Homogeneïtzar les mostres en nitrogen líquid.
- 2- Afegir 500 µl de tampó d'extracció i vortexejar.
- 3- Centrifugar 10 minuts a 4000 rpm i transferir el sobrenedant a un altre eppendorf.
- 4- Repetir el punt 3.
- 5- Congelar les mostres a -20°C.

Tampó d'extracció

Tris-HCl pH8.....50 mM

NaCl.....10 mM

SDS.....1%

βmercaptoetanol.....5%

Guardar a 4°C.

En el moment d'utilitzar el tampó cal afegir inhibidors de proteases:

Aprotinina.....2U/ml

Leupeptina.....21µM

Pepstatina.....1,46 µM

E-64.....2,8 µM

PMSF.....100 µM

Una vegada feta l'extracció de proteïnes, per determinar la concentració proteica de les mostres s'utilitzava el mètode Bradford (Bradford, 1976). El rang de detecció d'aquest mètode es troba entre 1-20 µg/ml i es basa en l'extrapolació de les nostres mostres a una recta patró de concentracions proteiques conegudes.

Cal tenir en compte que alguns compostos químics presenten incompatibilitats a l'hora de llegir l'absorció si superen uns valors màxims:

2,5 mM EDTA, 2,475% Glicerol, 25 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 25 mM β-Mercaptoetanol, 125 mM NaCl, 25 mM fosfatos, 0,0025% SDS i 0,0025 Triton X-100.

Donat que el tampó d'extracció contenia un 1% SDS i un 5% de β-mercaptoetanol el que es feia era afegir a totes les mostres de la recta patró el compost (o compostos) que podien interferir en la mesura. Així, si mesuràvem 1 µl d'extracte total, afegíem també 1 µl de tampó d'extracció a la recta patró.

3.2 Electroforesi de proteïnes.

Mitjançant l'electroforesi es separen proteïnes segons el seu pes molecular en una matriu de poliacrilamida. A les mostres proteiques s'hi afegeix SDS i β-mercaptoetanol (un detergent aniònic i un agent reductor) i s'escalfen per tal de desnaturalitzar les proteïnes. El SDS s'uneix a les proteïnes rodejant-les i conferint-les-hi una càrrega negativa neta proporcional a les seves dimensions. D'aquesta manera les proteïnes se separen segons el seu pes molecular en una matriu de poliacrilamida sotmesa a un camp elèctric.

En aquest treball es va utilitzar un sistema d'electroforesi discontinu que consta de dos gels, un primer gel empaquetador on les proteïnes es concentren a la interfase des d'on entraran al gel resolutiu on es separaran. El % de poliacrilamida del gel resolutiu depèn de la mida de les proteïnes que volem separar. Així, un percentatge baix afavoreix la separació de proteïnes d'alt pes molecular, mentre que un percentatge alt millorarà la separació de les proteïnes de menor pes molecular.

En aquest treball el protocol que s'ha seguit és el del sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad).

Gel apilador

Acrilamida-bisacrilamida (40%).....	3%
Tampó 10X.....	2 ml
H ₂ O.....	5,4 ml
Temed (0,1%).....	.8 µl
APS 15%.....	80 µl
	20 ml

Gel separador

Acrilamida-bisacrilamida (40%).....	10%
Tampó 10X.....	5 ml
H ₂ O.....	10 ml
Temed (0,1%).....	10 µl
APS 15%.....	80 µl
	50 ml

Material i mètodes

Aquestes quantitats són per dos gels d'acrilamida. Per proteïnes de baix pes molecular es va utilitzar un % elevat (del 15%) que polimeritza una matriu amb un porus petit. Per separar proteïnes d'alt pes molecular, es va utilitzar un percentatge del 10%. El Temed i l'APS sempre s'afegeixen en l'últim pas, ja que són els responsables de la polimerització.

Tampó 10X (gel apilador)

Tris.....0,5M

SDS.....0,4%

Aquests tampons no cal autoclavar-los.

Tampó 10X (gel separador)

Tris.....1,5 M

SDS.....0,4%

Tampó electroforesi 10X

Glicina.....1,92 M

Tris.....0,25 M

SDS.....1%

no ajustar el pH, que no ha de ser superior a 8,7.

3.3 Western blot.

• Transferència de proteïnes.

La transferència de proteïnes des del gel de poliacrilamida a membranes s'ha utilitzat per a la detecció de proteïnes específiques mitjançant anticossos. El sistema utilitzat per transferir fou el sistema Mini-Blot Transfer Cell (Bio-Rad). El voltatge i la durada de les transferències depenen de la mida de les proteïnes, en el nostre cas es feien durant tota la nit a un voltatge de 30 volts a 4°C (o en 3 hores a 80 volts).

Les membranes de nitrocel·lulosa van ser les ImmobilonTM-P Transfer Membrane (Millipore). Aquestes membranes són molt hidrofòbiques i per mullar-les cal primer passar-les per metanol. Cal procurar, doncs, que no s'assequin; si això passa serà necessari tornar-les a passar per metanol.

Transfer Buffer

Tris.....25 mM

Glicina.....40 mM

Metanol.....20%

SDS.....0,05%

• **Immunodetecció.**

Aquesta tècnica permet la detecció d'antígens específics immobilitzats a la membrana de nitrocel·lulosa. Els antígens són reconeguts per anticossos específics, normalment IgGs, que serveixen de diana per un segon anticòs anti-IgG. Aquest segon anticòs porta unit un enzim capaç d'excitar un compost químic que emet luminiscència que pot ser detectada mitjançant un film d'autoradiografia. S'ha utilitzat el sistema de detecció ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Protocol:

- 1- Incubar la membrana amb PBS-Tween 0,1% * (PBS-T) amb un 10% de llet en pols a temperatura ambient durant dues hores en agitació per tal de bloquejar la membrana.
- 2- Rentar amb PBS-T 5 minuts en agitació.
- 3- Incubar la membrana amb l'anticòs primari durant dues hores amb PBS-T amb un 2% de llet en pols. En aquest treball els dos anticossos (α -MARK-KD i α -MIK) s'han utilitzat a una dilució 1:1000.
- 4- Rentar l'excés d'anticòs no unit a la membrana durant 5 minuts en agitació amb PBS-T.
- 5- Incubar l'anticòs secundari anti-IgG conjugat amb la peroxidasa de rave (Amersham Pharmacia) durant 45 minuts en agitació a una dilució de 1:10000.
- 6- Rentar 10 minuts en agitació amb PBS-T tres vegades.
- 7- Revelar la membrana mitjançant el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

* En aquest treball, el PBS-Tween 20 al 0,1% es va suplementar amb NaCl 0,5 M per tal de fer més restrictiu el reconeixement, doncs els anticossos utilitzats no estaven purificats.

- Una membrana pot ser reutilitzada per ser incubada amb un anticòs diferent (Stripping). Per tal de rentar la membrana cal incubar-la dues vegades amb una solució de Glicina 100 mM pH 2,5 a 42°C durant 5 minuts. A continuació es segueix el protocol descrit anteriorment.

3.4 Expressió proteica. Sistema pET28.

L'expressió de proteïnes recombinants mitjançant el sistema pET28 és un dels més utilitzats, doncs permet la seva inducció i purificació de manera ràpida i còmode. En aquest

treball aquest mètode es va utilitzar per tal d'obtenir una quantitat de proteïna recombinant important per injectar en conills i obtenir anticossos contra la proteïna injectada. La proteïna de fusió MIK-pET28 també es va utilitzar per a la realització de *pull-downs*.

3.4.1 Expressió i inducció de proteïnes recombinants en el sistema pET28. Assaig de solubilitat.

Protocol:

- 1- Inocular 15 µl d'un cultiu de nit en 10 ml de medi LB suplementat amb 40 µl de kanamicina (25 µg/ml).
- 2- Mantenir en agitació a 37° C fins assolir una DO₆₀₀ d'entre 0,6-0,8.
- 3- Induir l'expressió de la proteïna recombinant afegint IPTG 1 mM.
- 4- Recollir una mostra de 500 µl de cultiu a les 0, 1, 2 i 3 hores d'inducció.
- 5- Centrifugar les mostres 2 minuts a 13000 rpm i resuspendre el pellet amb 45 µl de tampó de mostres 2X. Aquestes mostres es poden guardar a -20° C o carregar directament en un gel d'acrilamida després d'afegir 5 µl de β-mercaptoetanol (1/10) i escalfar 5 minuts a 100° C.
- 6- Després de recollir l'última alíquota, centrifugar 1,5 ml de cultiu induït 1 minut a 13000 rpm per realitzar l'assaig de solubilitat.
- 7- Resuspendre el pellet amb 0,1 vol. de 50 mM Tris pH8,0 i 2 mM EDTA.
- 8- Afegir 100 µg/ml de lisozim, 0,1 vol. 1% Triton X-100 i incubar 15 minuts a 30° C.
- 9- Afegir 10 mM MgCl₂, 20 µg/ml DNAsa i incubar 20 minuts a 37° C.
- 10- Centrifugar 15 minuts a 13000 rpm a 4° C i recuperar el sobrenedant en un tub nou on s'hi troben les proteïnes solubles.
- 11- Resuspendre el pellet directament en 45 µl de tampó de càrrega 2X corresponent a la fracció de proteïnes insolubles.
- 12- Analitzar les mostres de sobrenedant i del pellet en un gel de poliacrilamida per detectar en quina fracció es troba la proteïna recombinant.

3.4.2 Obtenció de proteïna recombinant a gran escala.

Per tal d'extreure gran quantitat de proteïna de fusió, es va repetir l'experiment anterior a gran escala.

Protocol:

- 1- Inocular 1 L de medi LB amb cultiu de nit (1,6 ml) suplementat amb kanamicina (25 µg/ml).
- 2- Incubar a 37° C amb agitació fins arribar a 0.6-0,8 u.d.o. i afegir 10 ml d'IPTG (1mM).
- 3- Passades les tres hores d'inducció, centrifugar les cèl.lules 10 minuts a 5000 rpm.
- 4- Al sediment de la centrifugació afegir hidrocloreur de guanidini sòlid 6M en un volum final de 30 ml.
- 5- Afegir 15 ml de Tris-HCl 40 mM NaCl 1M a pH 7,9, agitar amb el vòrtex fins que es dissolgui i enrasar amb aigua a 30 ml.
- 6- Afegir a la mescla lisozima 100 µg/ml i nonidet P-40 al 0,1%.
- 7- Sonicar l'extracte en gel fins que s'apreciï una clara disminució de la viscositat.
- 8- Finalment, ultracentrifugar l'extracte durant 30 minuts a 25000 rpm a 4° C amb el rotor SW-40 (Beckman).

3.4.3 Purificació mitjançant columna d'afinitat His-tag.

La cromatografia en la columna d'afinitat His-tag es va realitzar seguint el protocol del Sistema pET de la casa comercial Novagen.

El resultat de l'assaig de solubilitat va mostrar que la proteïna s'acumulava majoritàriament en la fracció insoluble, de manera que als tampons de la columna se'ls hi va afegir urea a 6M (seguint el protocol de Novagen). Donat que part de la proteïna purificada es volia utilitzar per anàlisi de *pull-down*, es va decidir eliminar la urea. Així doncs, una vegada passada la mostra per la columna, la urea es va anar eliminant passant el tampó BB (Binding Buffer) amb diferents molaritats decreixent d'urea. Així doncs, la proteïna es va eluir majoritàriament en el tampó de 300 mM d'imidazol (sense urea).

3.5 Obtenció d'anticossos.

La producció d'anticossos policlonals en conill es va dur a terme per la inoculació de proteïna recombinant purificada per columna d'afiniat His.Tag. Es van realitzar 3-4 inoculacions d'entre 150-200 µg de proteïna purificada diluïda en PBS.

3.6 Immunolocalització.

Aquesta tècnica té com a objectiu localitzar una proteïna de manera específica en talls fins de teixit vegetal. Per l'obtenció d'aquests talls, cal fixar i incloure el teixit fresc. Aquestes

seccions, s'incuben amb un anticòs específic contra la proteïna d'interès, amb un anticòs anti-conill (dirigit contra l'anterior) conjugat amb un enzim i finalment s'afegeix un substrat que precipita per acció de l'enzim i permet localitzar la proteïna.

3.6.1 Fixació del teixit vegetal.

La fixació del teixit vegetal evita que el teixit es degradi ja que atura l'activitat enzimàtica ràpidament. A més, evita l'aparició d'artefactes per inclusió de pèptids i proteïnes dins i fora de les cèl.lules al mateix temps que enforteix el teixit contra els efectes que patirà en els posteriors tractaments. El material biològic cal que sigui el més fresc possible i, per facilitar la fixació, les dimensions de la mostra no han de ser molt grans (Langdale, 1994).

Les fixacions es realitzen en flascons de vidre de 10 ml.

Protocol:

- 1- Submergir el teixit en solució fixadora durant 1 hora a temperatura ambient. Si el teixit flota, cal fer el buit per facilitar la penetració de la solució.
- 2- Canviar la solució per solució fixadora fresca i mantenir a 4°C durant una setmana.
- 3- Decantar la solució fixadora i submergir en EtOH 70% durant una hora.
- 4- Canviar per EtOH 70% fresc. Es pot guardar a 4°C indefinidament.

Solució fixadora

EtOH/formaldehid/HAc glacial (80:3.5:5)

3.6.2 Inclusió en parafina.

La inclusió consisteix en la substitució de tota l'aigua que conté el teixit per una matriu inert, el medi d'inclusió (Langdale, 1994). En aquest treball el medi d'inclusió utilitzat fou la parafina.

Protocol:

- 1- Canviar l'EtOH 70% de les mostres per solució nova i mantenir-ho una hora a temperatura ambient.

- 2- Deshidratar les mostres de 30 minuts a una hora a temperatura ambient a través de la sèrie: EtOH 80%, 0,5% Fast Green en EtOH 90%, 2 x EtOH 100%, 25% TBA en EtOH, 50% TBA en EtOH, 2 x TBA 100%. El Fast Green s'utilitza per tenyir les mostres i fer-les així visibles en la parafina. Aquesta tinció es pot dur a terme en qualsevol dels passos amb EtOH tot i que és recomanable fer-ho en els primers passos per si no queda ben tenyit el primer cop.
- 3- Canviar el TBA per 5 ml de TBA fresc i afegir el mateix volum de parafina fosa. La parafina solidifica immediatament, per tant, cal incubar-ho a 60°C fins que la parafina estigui fosa i agitar vigorosament fins aconseguir una barreja homogènia.
- 4- Incubar a 60°C 12 hores.
- 5- Canviar la parafina per parafina fresca i incubar a 60°C durant 12 hores.
- 6- Repetir el pas nº 5.
- 7- Agitar el flascó per facilitar que les mostres es desenganxin del fons i decantar immediatament sobre un suport (plaques de Petri) prèviament escalfat a 60°C. Separar i orientar les mostres amb l'ajut d'unes pinces o agulla.
- 8- Deixar solidificar la parafina.
- 9- Guardar a 4°C.

3.6.3 Preparació dels blocs de parafina.

En aquest pas, les mostres s'adhereixen a un suport de parafina de dimensions adients per ser col.locat al micròtom i poder-les tallar.

Protocol:

- 1- Tallar amb l'ajuda d'un bisturí calent un bloc de parafina on hi hagi la mostra que volem seccionar. Donar al bloc forma trapezoïdal, la cara petita de la qual serà per on es començarà a seccionar.
- 2- Col.locar aquest bloc amb l'orientació adequada sobre un cub de parafina. Per fer-ho, fondre una mica de parafina, posar-la sobre el cub i col.locar immediatament el bloc a sobre.
- 3- Assegurar-se que la cara que serà tallada quedi ben llisa.
- 4- Deixar refredar i guardar a 4°C fins el moment de tallar.

3.6.4 Preparació dels portaobjectes.

Per tal de mantenir les seccions dels teixits unides als portaobjectes durant les diferents etapes del procés és necessari realitzar un pretactament dels portaobjectes amb poli-D-lisina (Langdale, 1994).

Protocol:

- 1- Submergir els portaobjectes en poli-D-lisina 50 µg/ml dissolta en 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 durant 30 minuts.
- 2- Deixar assecar.

3.6.5 Preparació de les seccions.

Els blocs de parafina es tallaven al microtom a 8 µm, ja que, talls més fins es trenquen amb facilitat. Les tires de parafina tallada es col·locaven en un lloc net i sec (com per exemple una placa de Petri estèril) mantenint la orientació que tenien al sortir del microtom. Una vegada obtingudes totes les seccions, es montaven en els portaobjectes tractats.

Protocol:

- 1- Col·locar els portaobjectes sobre una placa termostàtica a 42°C.
- 2- Cobrir cadascun dels portaobjectes amb aigua.
- 3- Col·locar les tires de parafina a sobre de l'aigua amb unes pinces mantenint la orientació que tenien al sortir del microtom.
- 4- Retirar l'excés d'aigua.
- 5- Deixar assecar durant tota la nit.
- 6- Les seccions es poden guardar algunes setmanes en caixes amb sílica gel, però amb el temps les seccions podrien separar-se dels portaobjectes durant les manipulacions posteriors.

3.6.6 Immunolocalització en talls de parafina per fluoròfors.

Les immunolocalitzacions realitzades en aquesta tesi van ser analitzades al microscopi confocal. L'anticòs secundari utilitzat va ser el conjugat amb el fluoròfor cianina 3 que s'excita amb el làser He/Ne de 543nm.

Protocol:

- 1- Desparafinar les seccions incubant 10 minuts amb xilol dues vegades.
- 2- Rehidratar les mostres per incubació de 2 minuts a través de la sèrie: 100% EtOH, 100% EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH, aigua destil.lada (5 minuts), aigua destil.lada (5 minuts).
- 3- Permeabilitzar amb 0,5% de Triton X-100 en tampó durant 20 minuts.
- 4- Rentar les mostres amb tampó 2 vegades durant 10 minuts.
- 5- Bloquejar les mostres amb sèrum de cabra (1/12) dissolt en tampó durant 1 hora.
- 6- Rentar amb tampó 2 vegades durant 10 minuts.
- 7- Incubar les mostres amb l'anticòs primari (diluit 1:50 ó 1:100) en tampó amb 0,25% Triton X-100 durant 1 hora.
- 8- Rentar les mostres 2 vegades durant 10 minuts.
- 9- Incubació amb l'anticòs secundari anti-conill conjugat amb el fluoròfor cianina 3 (1:300) en tampó amb 0,25% Triton X-100 durant 1 hora.
- 10- Rentar 2 vegades durant 10 minuts.
- 11- Rentar 10 minuts amb tampó PBS 1 amb 0,1% Tween.
- 12- Rentar 10 minuts amb tampó PBS 1X.
- 13- Montar les mostres amb Mowiol i guardar a 4°C
- 14- Les mostres s'analitzen al microscopi en la longitud d'ona emesa de 560-615 nm.

· Les incubacions del sèrum de cabra i dels dos anticossos es realitzen amb 150 µl/portaobjecta cubert amb un cobreobjectes procurant que no quedin bombolles.

Tampó

- PBS 1X amb 0,1% Tween
- 20 mM glicina
- 1% BSA

3.7 Material biològic.

En aquest treball s'ha utilitzat la línia americana W64A+/+ de *Zea mays*.

3.7.1 Esterilització de les llavors de blat de moro.

Per créixer llavors en cambra de germinació és necessari esterilitzar-les per evitar la infecció amb fongs.

Protocol:

- 1- Rentar les llavors amb 500 ml de solució d'hipoclorit de calci a l'1% durant 10 minuts i amb agitació. La solució d'hipoclorit de calci s'ha de preparar amb aigua Milli-Q autoclavada.
- 2- Fer quatre rentats de 10 minuts amb 500 ml d'aigua Milli-Q autoclavada i amb agitació.

3.7.2 Germinació.

Les llavors esterilitzades es posen a la part superior (a uns 5 cm) d'un paper de filtre mullat amb aigua Milli-Q autoclavada i plegat per la meitat. Col·locar de 8 a 10 llavors a cada paper, separades entre sí uns 3 cm. Enrotllar el paper de manera que a cada plec hi hagi tant sols una llavor i col·locar-ho en un vas de precipitats que conté una tercera part d'aigua. Aquest vas de precipitats s'ha embolicat amb paper de plata per tal de no deixar passar la llum imitant les condicions de germinació en camp. També cal cobrir amb paper de plata la part superior del vas on sobresurten els papers. Posar a germinar a la cambra de germinació, les condicions de la qual són 16 hores de llum a 26°C i 8 hores de fosc a 24°C. Quan apareixen les primeres fulles, treure el paper de plata de la part superior.

4. Apèndix

- Soques de llevat utilitzades:

- **Y190:** MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^r2, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, MEL1 URA::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ.
- **Y187:** MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-109, leu2-3, 112, gal4 Δ , met^r, gal80 Δ , URA::GAL_{UAS}-GAL_{TATA}-lacZ, MEL1.
- **AH190:** MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ.

- Soques bacterianes utilitzades:

- **BL21 (DE3):** lambda DE3 (lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5), F⁺, dcm, ompT, hsdS(r⁻ B, m⁻ B), gal.
- **DH5 α :** supE44, delta lacU169 (phi 80 lacZ delta M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.
- **K803:** soca de la genoteca de blat de moro (Clontech).

- Vectors utilitzats:

- **pBluescript II SK:** derivat de pUC19. lacZ, ColE1 origin, Amp^r (X52328).
- **pGEX-KG:** lac represor, Glutathione-S-transferase, tac promotor, Amp^r. Pharmacia (U13850).
- **pGEM-T:** Promega (A6130), per clonatges de PCRs.
- **pET28:** Novagen (69258-1). Promotor T7lac, N-terminal His-Tag, Thrombin, T7-Tag.
- **pAS2.1:** GAL4₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, Amp^r, CYH^s2. Clontech: U30497.
- **pACT2:** GAL4₍₇₆₈₋₈₈₁₎, LEU2, Amp^r, HA epitope tag. Clontech: U29899.
- **bacteròfag EMBL3:** Clontech Laboratories Inc., vector de la genoteca comercial.

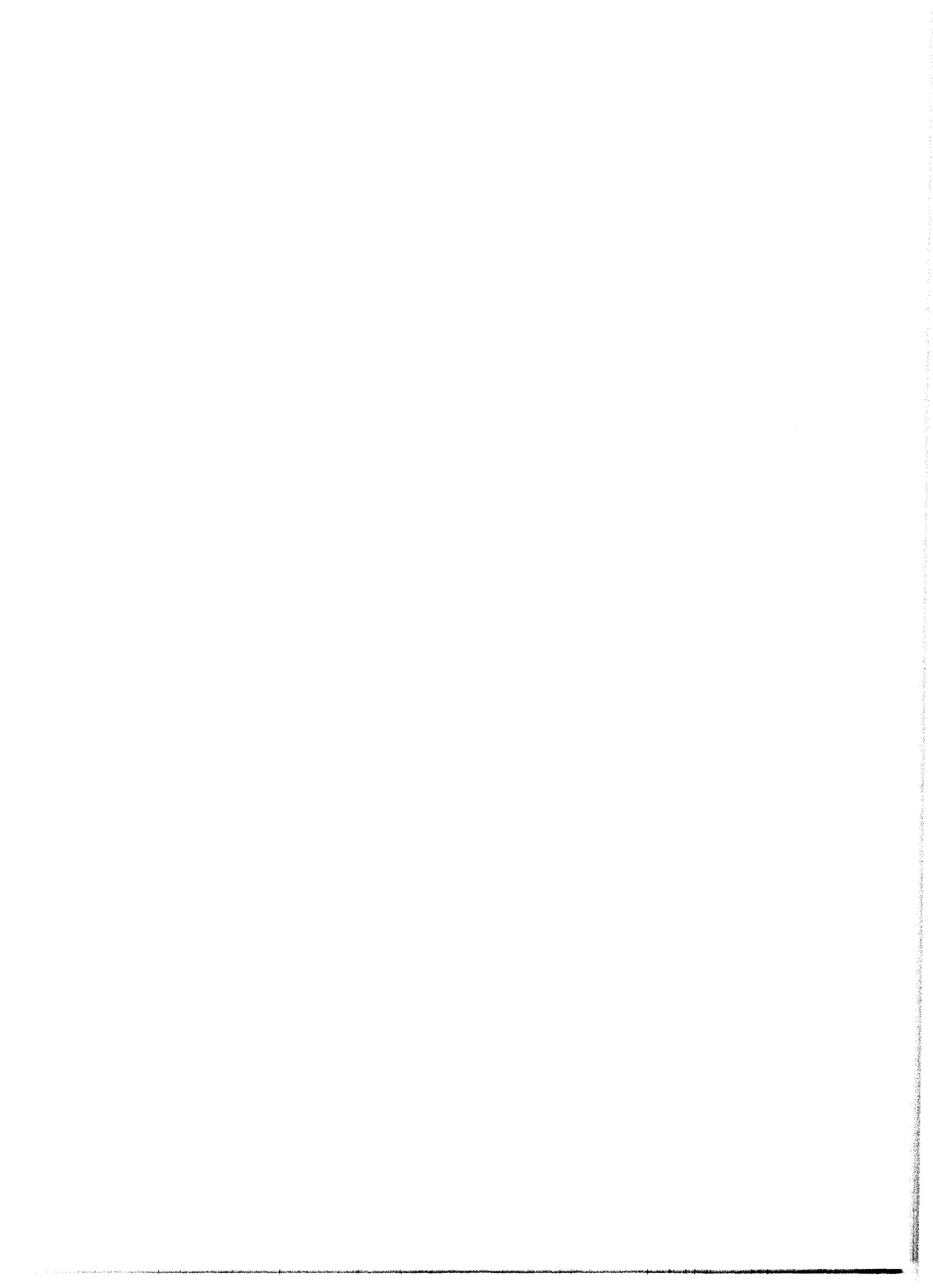
- Bases de dades utilitzades :

- PubMed : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- BLAST : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- EMBL : <http://www.embl-heidelberg.de>
- SMART : <http://smart.embl-heidelberg.de>

- Programes informàtics utilitzats per anàlisis filogenètiques.

Les seqüències van ser alineades amb el programa CLUSTAL W multiple-alignment (version 1.5; Thompson *et al.*, 1994). Dels programes Felsestein's PHYLIP (Felsenstein 1989), es va utilitzar el programa DNADIST per a generar la matriu de distància basada en l'algoritme Jukes-Cantor. Aquesta matriu es va utilitzar per generar un arbre del tipus neighbor-joining. Les anàlisis *Bootstrap* es van realitzar amb els programes Seqboot and Consense de Felsestein's PHYLIP (Felsenstein 1989).

7. Bibliografia



-
- **Abbé E.C. and Stein O.L. (1954)** The growth of the shoot apex in maize: embryogeny. *Am. J. Bot.* **41**, 285-293.
 - **Ahmad M. and Cashmore A.R. (1993)** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
 - **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1994)** *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc.
 - **Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. and Ecker J.R. (1999)** EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 2148-2152.
 - **Altmann T. (1998)** Recent advances in brassinosteroids molecular genetics. *Curr. Opinion in Plant Biology* **1**, 378-383.
 - **Anderson P.A., Lawrence G.J., Morrish B.C., Ayliffe M.A., Finnegan E.J. and Ellis J.G. (1997)** Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeat unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* **9**, 641-651.
 - **Annen F. and Stockhaus J. (1999)** SbRLK1, a receptor-like protein kinase of *Sorghum bicolor* (L.) Moench that is expressed in mesophyll cells. *Planta* **208**, 420-425.
 - **Arch R.H., Gedrich R.W. and Thompson C.B. (1998)** Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. *Biochem Biophys Res Commun* **16**; **272(3)**, 936-45.
 - **Assad F., Mayer U., Wanner G. and Jürgens G. (1996)** The *KEULE* gene is involve in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* **253**, 267-277.
 - **Banno H., Hirano K., Nakamura T., Irie K., Nomoto S., Matsumoto K. and Machida Y. (1996)** NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Moll Cell Biol* **13**, 4745-4752.
 - **Bardin A.J. and Amon A. (2001)** MEN and SIN: what's the difference? *Nature Reviews* **2**, 815-826.
 - **Basset C.L., Nickerson M.L., Cohen R.A. and Rajeevan M.S. (2000)** Alternative transcript initiation and novel post-transcriptional processing of a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase gene that responds to short-day photoperiodic floral induction on morning glory (*Ipomoea nil*). *Plant Mol Biol* **43 (1)**, 43-58.
 - **Baudino S., Hansen S., Brettschneider R., Hecht V.F., Dresselhaus T., Lorz H., Dumas C. and Rogowsky P.M. (2001)** Molecular characterisation of two maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* **213 (1)**, 1-10.

Bibliografia

- **Beato M., Herrlich P. and Schutz G (1995)** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.
- **Becraft P.W., Stinard P.S. and McCarty D.R. (1996)** CRINKLY4: a TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* **273**, 1406-1409.
- **Birboim H. C. and Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- **Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C.S. and Palme K. (1999)** GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci.* **55**, 233-256.
- **Blumwald E., Aharon G.S. and Lam B.C-H. (1998)** Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science* **3** (9), 342-346.
- **Boehm M. and Bonifacino J. (2001)** Adaptins. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2907-2920.
- **Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollashek C., Baker P. and Huckisson N.S. (1999)** A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of the cell division. *Plant Cell* **11**, 101-113.
- **Bommert P. and Werr W. (2000)** Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* **271**, 131-142.
- **Bower M.S., Matias D.D., Fernandes-Carvalho E., Mazzuco M., Gu T., Rothstein S.J. and Goring D.R. (1996)** Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of Brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**, 1641-1650.
- **Bowman J.L. and Eshed Y. (2000)** Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science* **5** (3), 110-115.
- **Bradford M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- **Brand U., Fletcher J., Hobe M., Meyerowitz E. and Simon R. (2000)** Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* **289**, 617-619.
- **Braun D.M., Stone J.M. and Walker J.C. (1997)** Interaction of the maize and Arabidopsis kinase interaction domains with a subset of receptor-like protein kinases: implications for transmembrane signaling in plants. *The Plant Journal* **12** (1), 83-95.
- **Brown T. (1999)** Analysis of DNA sequences by blotting and hybridation. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Volum 1 (US: Wiley Interscience) pp. 2.9.1-2.9.15.

-
- **Cabrillac D., Cock J.M., Dumas C. and Gaude T. (2001)** The S-locus receptor kinase is inhibited by thiredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410** (8), 220-223.
 - **Calderini O., Bögre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E. and Wilson C. (1998)** A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* **111**, 3091-3100.
 - **Calderini O., Glad N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001)** A novel tobacco MAP kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 18139-18145.
 - **Carraway K.L., III, Sltoff S.P., Diamonti A.J. and Cantley L.C. (1994)** The *erbB-3* gene product is a receptor of heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14303-14306.
 - **Casanova J. and Struhl G. (1993)** The torso receptor localizes as well as transduces the spatial signal specifying terminal body pattern in *Drosophila*. *Nature* **362**, 152-155.
 - **Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B. and Meyerowitz E.M. (1993)** Arabidopsis ethylene-responses gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
 - **Chang C., Schaller G.E., Patterson S.E., Kwok SF, Meyerowitz E.M. and Bleecker A.B. (1992)** The TMKL1 gene from Arabidopsis codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* **4** (10), 1263-1271.
 - **Chang L. and Gould K.L. (2000)** Sid4p is required to localize components of the septation initiation network proteins pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5249-5254.
 - **Chang L. and Karin M. (2001)** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
 - **Cho H.S. and Pai H.S. (2000)** Cloning and characterization of ntTMK1 gene encoding a TMK1-homologous receptor-like kinase in tobacco. *Mol Cells* **30**; **10** (3), 317-324.
 - **Chuck G., Lincoln C. and Hake S. (1996)** *Knat1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 1277-1289.
 - **Church G. and Gilbert W. (1984)** Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
 - **Clark S.E., Runing M.P. and Meyerowitz E.M. (1993)** *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.
 - **Clark S.E., Runing M.P., Meyerowitz E.M. (1995)** *CLAVATA3* is a sepcific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.

Bibliografia

- **Clark J.K. and Sheridan W.F. (1991)** Isolation and characterization of 51 embryo-specific mutations of maize. *Plant Cell* **3**, 935-951.
- **Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin J and Meyerowitz E.M. (1996)** The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-1575.
- **Clark S.E., Williams R.W. and Meyerowitz E.M. (1997)** The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that control shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- **Coenen C. and Lomax T.L. (1997)** Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant Science* **2** (9), 315-356.
- **Creasy C.L., Ambrose D.M. and Chernoff J. (1996)** The Ste20-like protein kinase. Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **271** (35) 21049-21053.
- **Czech M.P. (2000)** PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* **100**, 603-606.
- **Czernic P., Visser B., Sun W., SAvoure A., Deslandes L., Marco Y., Van Montagu M. and Verbruggen N. (1999)** Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *Plant J.* **18**, 321-327.
- **Dan I., Ong S-E., Watanabe N.M., Blagoy B., Nielsen M.M., Kajikawa E., Kristiansen T.Z., Mann M. and Pandey A. (2002)** Cloning of MASK, a novel member of mammalian Germinal Center Kinase-III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *JBC* **277** (8), 5929-39.
- **Dan I., Watanabe N.M. and Kusumi A. (2001)** The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascade. *Trends in Cell Biology* **11**(5), 220- 230.
- **Dan I., Watanabe N.M., Kobayashi T., Yamashita-Suzuki K., Fukagaya Y., Kajikawa E., Kimura W.K., Nakashima T.M., Matsumoto K., Ninomiya-Tsuji J., Kusumi A. (2000)** Molecular cloning of MINK, a novel member of mammalian GCK family kinases, which is up-regulated during post-natal mouse cerebral development. *FEBS Lett.* **469**, 19-23.
- **David C., McPherson P.S., Mundigl O. and DeCamilli P. (1996)** A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dymanin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 331-335.
- **De Nettancourt D. (1977)** Incompatibility in Angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics 3. Berlin: Springer-Verlag.
- **De Wit P.J.G.M. (1998)** Pathogen avirulence and plant resistance; a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* **12**, 452-458.

-
- **Deak J.C. and Templeton D.J. (1997)** Regulation of the activity of MEK kinase1 (MEKK1) by autophosphorylation within the kinase activation domain. *Biochem. J.* **322**, 185-192.
 - **DeHeuvel E., Bell A.W., Ramjaun A.R., Wong K., Sossin W.S. and Mc Pherson P.S. (1997)** Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *J. Biol. Chem.* **271**: 8710-8716.
 - **Deken R. and Kaldenhoff R. (1997)** Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **202**, 479-486.
 - **Dellaporta S. L., Wood J. and Hicks J. B. (1983)** A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 142-148.
 - **Delmer D.P., Pear J.R., Andrawis A. and Stalker D.M. (1995)** Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers. *Mol Gen Genet* **248**, 43-51.
 - **Diener K., Wang X.S., Chen C., Meyer C.F., Keesler G., Zukowski M., Tan T.H. and Yao Z. (1997)** Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathways by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9687-9692.
 - **Dixit R., Nasrallah M.E and Nasrallah J.B. (in press)** Post-transcriptional maturation of the S-receptor kinase of Brassica correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in Brassica stigmas and transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.*
 - **Dolfini S.f. and Sparvoli F (1988)** Cytological characterization og the embryo-lethal mutant dek-1 of maize. *Protoplasma* **144**, 142-148.
 - **Drogen F., O'Rourke S.M., Stucke V.M., Jaquenoud M., Neiman A.M., Peter M. (2000)** Phosphorilation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signalling *in vivo*. *Curr Biol.* **10**, 630-639.
 - **Eichinger L., Bähler M., Diertz M., Eckerskorn C. and Schleicher M. (1998)** Characterization and cloning of s Dictyostelium Ste20-like protein kinase that phosphorilates the actin-binding protein severin. *J. Biol. Chem.* **273 (21)**, 12952-12959.
 - **Elliot R.C., Betzner A.S., Huttner E., Oakes M.P., Tucker W.Q., Gerentes D., Perez P. and Smyth D.R. (1996)** *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovulve developemtn and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.
 - **Endrizzi K., Moussain B., Haecker A., Levin J.Z. and Laux T. (1996)** The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of indifferenciatde cells in *Arabidopsis*

Bibliografia

shoot and floral meristems and actac at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHELL* and *ZWILLE*. *Plant J* **10**, 967-979.

• **Falls D.L., Rosen K.M., Corfas G., Lane W.S. and Fischback G.D. (1993)** ARIA, a protein that stimulates acethylcoline receptor sysnthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**, 801-815.

• **Fankhauser C., Yeh K.C., Lagarias C., Zhang H., Elich T.D. and Chory J. (1999)** PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539-1541.

• **Feinberg A. P. and Vogeltein B. (1983)** A technique for radiolabelling DNA restiction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.

• **Felix G., Duran J.D., Volko S. and Boller T. (1999)** Plants recognise bacteria through the most conserved domain of flagellin. *Plant J.* **18**, 265-276.

• **Feuillet C., Reuzeau C., Kjellbom P. and Keller B. (1998)** Molecular characterization of a new type of receptor-like kinase (*wlrk*) gene family in wheat. *Plant Mol Biol.* **37**, 943-953.

• **Feuillet C., Schachermayr G. and Keller B (1997)** Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus in wheat. *Plant J.* **11**, 45-52.

• **Fletcher J., Brand U., Runing M., Simon R. and Meyerowitz E. (1999)** Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.

• **Flor H.H. (1971)** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.

• **Fölsch H., Pypaert M., Schu P. and Mellman I. (2001)** Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **152**, 595-606.

• **Friedrichsen D.M., Joazeiro C.A., Li J., Hunter T. and Chory J. (2000)** Brassinosteroid-insensitive 1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor Serine/Threonine kinase. *Plant Physiol.* **123**, 1247-1256.

• **Fruman D.A., Rameh L.E. and Cantley L.C. (1999)** Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell* **25 (97)**, 817-820.

• **Fu C.A. et al., (1999)** TNIK, a novel member of germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J. Biol.Chem.* **274**, 30729-30737.

• **Gallagher S. R. (1994)** Quantification of DNA and RNA with absortion and fluorescens spectroscopy. In *Currents Protocols in Molecular Biology*. Volum **3** (U.S.: Wiley Interscience), pp A.3D.1-A.3D.8.

-
- **Gisel A., Barella S., Hempel F.D. and Zambryski P.C. (1999)** Temporal and spacial regulation of symplastic traffickinf during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development* **11**, 309-322.
 - **Goldderg R.B., De Paiva G. and Yadegari R. (1994)**. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* **266**, 605-614.
 - **Gómez-Gómez L. and Boller T. (2000)** *FLS2*: an LRR receptor-like kinase involved in the preception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
 - **Gómez-Gómez L., Bauer Z. and Boller T. (2001)** Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of *FLS2* are required for flagellin binding and signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
 - **Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T. (1999)** A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 277-284.
 - **Gomperts S.A. (1996)** Clustering membrane proteins: it's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* **84**, 659-662.
 - **Gomperts S.N. (1996)** Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* **84**(5), 659-62.
 - **Goring D.R., Glavin T.L., Schafer U. and Rothstein S.J. (1992)** The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**, 1273-1281.
 - **Graciano E., Bastida M., López E., Stiefel V. and Puigdomènech P. (in press)** *Long cell*, a mutant from maize producing a distorted embryo and generalized cell death.
 - **Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M. and Hynes N.E. (1997)** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655.
 - **Gu T., Mazzuco M., Sulaman W., Matias D.D. and Goring (1998)** Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3759-3764.
 - **Guertin D.A., Chang L., Irshad F., Gould K.L. and McCollum D. (2000)** The role of Sid1p kinase and Cdc14p in regulation the onset of cytokinesis in fission yeast. *The EMBO J.* **19** (8) 1803-1815.
 - **Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M. and Davenport K. (1998)** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1264-1300.

Bibliografia

- **Guy P., Platko J.V., Cantley L., Cerione R.A. and Carraway K.I., III (1994)** Insect cell-expressed p180^{erbB3} possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 8132-9136.
- **Haecker A. and Laux T. (2001)** Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 441-446.
- **Hajouj T., Michelis R. and Gepstein S. (2000)** Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiol.* **124**, 1305-1314.
- **Hanks S.K. and Hunter T., (1995)** Protein kinases 6, The eucariotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
- **Hanks S.K., Quinn A.M. and Hunter T. (1988)** *Science* **241**, 42-52.
- **He Z., Wang Z.Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P. and Chory J. (2000)** Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**, 2360-2363.
- **He Z.H., Fujiki M. and Kohorn B.D. (1996)** A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 19789-19793.
- **Hecht V., Vielle-Calzada J-P., Hartog V., Schmidt D.L., Boutilier K., Grossniklaus U. and de Vries S. (2001)** The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**, 803-816.
- **Heldin C-H. (1995)** Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-223.
- **Herskowitz I. (1995)** MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**, 187-197.
- **Hervé C., Dabos P., Galaud J.P., Rouge P. and Lescure B. (1996)** Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J. Mol. Biol.* **258**, 778-788.
- **Herve C., Serres J., Dados P., Canut H., Barre A., Rouge P. and Lescure B. (1999)** Characterization of the Arabidopsis *lecRK-a* genes: members of a superfamily encoding putative receptor with an extracellular domain homologous to legume lectins. *Plant Mol Biol* **39** (4), 671-682.
- **Higashiyama S., Abraham J.A., Miller J., Fiddes J.C. and Klagsbrun M. (1991)** A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**, 936-939.

-
- **Hirt H. (2000)** Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 14; 97(6):2405-7.
 - **Holmes W.E., Sliwkowski M.X., Akita R.W., Henzel W.J., Lee J. Park J.W., Yansura D., Abadi N., Raab H., Lewis GD. et al. (1992)** Identification of heregulin, a specific activator of p185^{erbB2}. *Science* 256, 1205-1210.
 - **Hong S.W., Jon J.H., Kwak J.M. and Nam H.G. (1997)** Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 113, 1203-1212.
 - **Hu M.C., Qiu W.R., Wang X., Meyer C.F. and Tan T.H. (1996)** Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev.* 10, 2251-2264.
 - **Hubbard S.R., Wei L., Ellis L. and Hendrickson W.A. (1994)** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746-754.
 - **Hunter T. (1998)** The Croonian lecture, 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 583-605.
 - **Irish V.F. and Jenik P.D. (2001)** Cell lineage, cell signaling and control of plant morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 424-430.
 - **Jackson D., Veit B. and Hake S. (1994)** Expression of maize *KNOTTED1*-related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* 120, 405-413.
 - **Jeong S., Trotouchaud A.E. and Clark S.E. (1999)** The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11, 1925-1933.
 - **Jinn T-L., Stone J. and Walker J. (2000)** HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development* 14, 108-117.
 - **Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J. and Jones J.D. (1994)** Isolation of the Tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266, 789-793.
 - **Jouannic S., Champion A., Segui-Simarro J-M., Salimova E., Picaud A., Tregear J., Testillano P., Risueño M-C., Simanis V., Kreis M. and Henry Y. (2001)** The protein kinases AtMAP3Kε1 and BnMAP4Kε1 are functional homologues of *S. pombe cdc7p* and may be involved in cell division. *The Plant Journal.* 26 (6), 637-649.

Bibliografia

- **Jürgens G., Torres Ruiz R.A., Laux T., Mayer U. and Berleth (1994)** Early events in apical-basal patterns formation in *Arabidopsis*. In *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*; 95-103.
- **Katso R.M., Russell R.B. and Ganesan T.S. (1999)** Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family. *Molecular and Cellular Biology* **19** (9), 6427-6440.
- **Kauschmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M., Willmitzer L. and Altmann T. (1996)** Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J.* **9**, 701-713.
- **Kayes J.M. and Clark S.E. (1998)** *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-3851.
- **Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldman K.A. and Ecker J.R. (1993)** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- **Kiefer F. (1996)** HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathways. *EMBO J.* **15**, 7013-7025.
- **Kishimoto K., Tibbles L.A., Anafi M., Janssen A., Zanke B.W., Lassam N., Pawson T., Woodgett J.R. and Iscove N.N. (2000)** TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 7359-7364.
- **Klinge B. and Werr W. (1995)** Transcription of the *Zea mays* homeobox (*ZmHOX*) genes is activated rarely in embryogenesis and restricted to meristems of the maize plant. *Dev. Genet.* **16**, 349-453.
- **Kohorn B. (2001)** WAKs; cell wall associated kinases. *Curr. Opinion in Cell Biology* **13**, 529-533.
- **Kossiakoff A.A. and De Vos A.M. (1998)** Structural basis for cytokine hormone-receptor recognition and receptor activation. *Adv. Protein Chem.* **52**, 67-108.
- **Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G. and Sheen J. (2000)** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2940-2945.
- **Kovtun Y., Chiu W.L., Zeng W. and Sheen J. (1998)** Suppression of auxin signal transduction by a MAP kinase cascade in higher plants. *Nature* **395**, 716-720.
- **Kuriyan J. and Cowburn D. (1997)** Modular peptide recognition domains in eukaryotic signalling. *Annu. rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 259-288.

-
- **Kusaba M., Nishio T., Satta Y., Hinata K. and Ockendon D. (1997)** Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I SLG alleles of *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: implications for the evolution and recognition mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7673-7678.
 - **Kyriakis J.M. (1999)** Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem* **274**(9), 5259-62.
 - **Kyriakis J.M. and Avruch J. (1996)** Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* **271**, 24313-24316.
 - **Kyriakis J.M. and Avruch J. (2001)** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* **81** (2), 807-869.
 - **Langdale J. A. (1994)** In situ hybridization. In *The Maize Handbook* (New York: Springer-Verlag), pp. 165-180.
 - **Laufs P., Jonak C. and Traas J. (1998)** Cells and domains: Two views of the shoot meristem in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 33-45.
 - **Leprince A.S., Jouannic S., Hamal A., Kreis M. and Henry Y. (1999)** Molecular characterization of plant cDNAs, BnMAP4K α 1 and α 2, belonging to the GCK/SPS1 subfamily of MAP kinase kinase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**, 1-13.
 - **Leung I.W. and Lassam N. (1998)** Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J. Biol. Chem.* **273**, 32408-32415.
 - **Li H., Wu G., Ware D., Davis K.R. and Zang Z (1998)** *Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pole and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol* **118**, 407-417.
 - **Li J. and Chory J. (1997)** A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
 - **Li J. and Chory J. (1999)** Brassinosteroids action in plants. *J. Exp. Bot.* **50**, 275-282.
 - **Li J., Lease K.A., Tax F.E. and Walker J.C. (2001)** BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5916-5921.
 - **Li Z. and Wurtzel E. (1998)** The *Itk* gene family encodes novel receptor-like kinases with temporal expression in developing maize endosperm. *Plan Mol Biol* **37**, 749-761.
 - **Ligterink W. and Hirt G.R. (2001)** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signalling tools. *Int Rev Cytol* **201**, 209-275.

Bibliografia

- **Lin J.L., Chen H.C., Fang H.I., Robinson D., Kung H.J. and Shiu H.M. (2001)** MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. *Oncogene* 4; **20 (45)** 6559-69.
- **Liu B., Johson S. and Wang T.L. (1995)** *cyd*, a mutant of pea that alters embryo morphology, is defective in cytokinesis. *Dev. Genet.* **16**, 21-31.
- **Liu Y., Zhang S. and Klessig D.F. (2000)** Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**, 118-124.
- **Logeman J., Schell J. and Willmitzer L. (1987)** Improved method for the isolation of RNA from plants tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.
- **Long J.A. and Barton M.K. (1998)** The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-3035.
- **López R.I. and Puigdomènech P. (1999)** Structure, organization and expression of the eukaryotic translation initiation factor 5, eIF-5, gene in *Zea mays*. *Gene* 29; **240 (2)**: 355-9.
- **Lu P., Porat R., Nadeu J.A. and O'Neill S.D. (1996)**. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell.* **8**, 2155-2168.
- **Lucas W.J., Bouché-Pillon S., Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B. and Hake S. (1995)** Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Nature* **270**, 1980-1983.
- **Lucas W.J., Bouche-Pillon S., Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B. and Hake S. (1995)** Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980-1983.
- **Lukowitz W., Mayer U. and Jürgens G. (1996)** Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLE* gene product. *Cell* **84**, 61-71.
- **Lyndon R.F. (1998)** The shoot apical meristem: its growth and development. Crambrigde: Cambridge University Press.
- **Mad Arif S.A., Taylor M.A., George L.A., Butler A.R., Burch L.R., Davies H.V. and Kumar A. (1994)** Characterization of the S-adenosylmethionine decarboxilase (SAMDC) gene of potato. *Plant Mol Biol* **26**: 147-158.
- **Marchionni M.A., Goodearl A.D., Chen M.S., Bermingham-McDonogh O., Kirk C., Hendricks M., Danehy F., Misumi D., Sudhalter J. Kobayashi K., et al. (1993)** Glial growth factors are alternative spliced erbB-2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**, 312-319.

-
- **Margolis B. (1999)** The TPB domain: the name doesn't say it all. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 262-267.
 - **Marinissen M.J., Chiariello M. and Gutkind J.S. (2001)** Regulation of gene expression by the small GTPases Rho through the ERK6 (p38 γ) MAP kinase pathway. *Genes Dev* **15**, 535-553.
 - **Marquart H.M., Hunkapiller W., Hood L.E. and Todaro G.J. (1984)** Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* **223**, 1079-1082.
 - **Marski M.D. and Ornitz D.M. (1998)** FGF signalling in skeletal development. *Front. Biosci.* **3**, D781-D794.
 - **Martin G.B., Frary A., Wu T., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Earle E.D. and Tanksley S.D. (1994)** Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**, 1432-1436.
 - **MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3. Catàleg n° PT3247-1.**
 - **MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual, Clontech, Inc. Catàleg n° PT3061-1.**
 - **Mayer K.F., Schoof H, Haecker A., Lenhard M, Jürgens G. and Laux T. (1998)** Role of *WUSCHELL* in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
 - **McCarty D.R. and Chory J. (2000)** Conservation and innovation in plant signalling pathways. *Cell* **103**, 201-209.
 - **Meyers B.C., Chin D.B., Shen K.A., Sivaramakrishnan S., Lavelle D.O., Zhang Z. and Michelmore (1998)** The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* **10**, 1817-1832.
 - **Merlot S. et al., (2001)** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* **25**, 295-303.
 - **Micheva K.D., Kay B.K. and McPherson P.S. (1997)** Synanptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J. Biol. Chem.* **272**: 27239-27245.
 - **Mu J-H., Lee H-S. and Kao T-H. (1994)** Characterization of a pollen-express receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *The Plant Cell* **6**, 709-721.

- **Muschietti J., Eyal Y. and McCormick S. (1998)** Pollen tube localization implies a role in polle-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *The Plant Cell* **10**, 319-330.

- **Nakashima M., Hirano K., Nakashima S., Banno H., Nishihama R. and Machida Y. (1998)** The expression pattern of the gene for NPK1 protein kinase related to mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) in a tobacco plant: Correlation with cell proliferation. *Plant Cell Physiol.* **39**, 690-700.

- **Nasrallah J., Nasrallah M. (1993)** Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**, 1325-1335.

- **Nasrallah J.B. (2000)** Cell-cell signalling in the self-incompatibility response. *Curr Opinion in Plant Biol.* **3**, 368-373.

- **Nasrallah J.B., Kao T.H., Chen C.H., Goldberg M.L. and Nasrallah M.E. (1987)** Amino acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S-locus of *Brassica oleracea*. *Nature* **326**, 617-619.

- **Nasrallah J.B., Rundle S.J. and Nasrallah M.E. (1994)** Genetic evidence for the requirement of the S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *Plant J.* **5**, 373-384.

- **Nasrallah M.E., Kandasay M.K., Chang M-C., Stadler Z., Lim S and Nasrallah J.B. (2000)** Identifying genes of pollen-stigma recognition in crucifers. *Annal Botany* **85**, 125-132.

- **Neuteboom L. W., Ng J. M., Kuyper M., Clijdesdale O., Hooykaas P. and van der Zaal B. J. (1999)** Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* **39**: 273-287.

- **Newman L.S., McKeever M.O., Okano H.J. and Darnell R.B. (1995)** β -NAP, a cerebellar degeneration antigen, is a neuro-specific vesicle coat protein. *Cell* **82**, 773-783.

- **Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T. and Machida Y. (2001)** the NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev.* **15**, 352-363.

- **Ohno H., Tomemori J.E., Nakatsu F., Okazaki Y., Aguilar R.C., Fölsch H., Mellman I., Saito T., Shirasawa T. and Bonifacino J.S. (1999)** μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* **449**, 215-220.

-
- **Ohtake Y., Takahashi T. and Komeda Y. (2000)** Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **41** (9), 1038-1044.
 - **Okadome T., Yamashita H., Franzén P., Morén A., Heldin C.-H. and Miyazono K. (1994)** Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor β type I and type II receptors in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 30753-30756.
 - **Opsahl-Ferstad H.G., Le Deunff E., Dumas C., Rogowsky P.M. (1997)** ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J.* **12**(1); 235-46.
 - **Orzech E., Schlessinger K., Weiss A., Okamoto C.T. and Aroeti B. (1999)** Interaction of the AP-1 Golgi Adaptor with the Polymeric Immunoglobulin Receptor and their possible role in mediating Brefeldin A-sensitive Basolateral Targeting from the trans-Golgi Network. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (4): 2201-2215.
 - **Otsuga D., DeGuzman B., Prigge M.J., Drews G.N. and Clark S.E. (2001)** *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* **25**, 223-236.
 - **Page L.J, Sowerby P.J., Winnie W.Y.L. and Robinson M.S. (1999)** γ -Synergisin: an EH domain-containing protein that interacts with γ -Adaptin. *The Journal of Cell Biology*, **146** (5): 993-1004.
 - **Pawson T. and Schlessinger J. (1993)** SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.* **3**, 434-442.
 - **Piedras P., Rivas S., Dröge S., Hillmer S. and Jones D.G. (2000)** Functional, c-myc-tagged Cf-9 resistance gene product are plasma-membrane localized and glycosylated. *Plant Journal* **21** (6), 529-536.
 - **Pinkas-Kramarski R., Soussan L., Waterman H., Levkowitz G., Alroy L., Klapper L., Lavi S., Seger R., Ratzkin B.J., Sela B.N. and Yarden Y. (1996)** Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signalling by combinatorial receptor interaction. *EMBO J.* **15**, 2452-2467.
 - **Plakidou-Dymock S., Dymock D. and Hooley R. (1998)** A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr. Biol.* **8**, 315-324.
 - **Plasterk R.H. (1992)** Genetic switches: mechanism and function. *Trends Genet* **8**(12), 403-6.
 - **Plowman G.D., Culouscou J.M., Whitney G.S., Green J.M., Carlton G.W., Foy L., Neubauer M.G. and Shoyab M. (1993a)** Ligand specific activation of HER/*p180erbB4*, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1746-1750.

Bibliografia

- **Plowman G.D., Green J.M., Culouscou J.M., Carlton G.W., Rothwell V.M. and Buckley S. (1993b)** Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER^{p180erbB4}. *Nature* **366**, 473-475.
- **Pombo C.M., Bonventre J.V., Molnar A., Kyriakis J. and Force T. (1996)** Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *The EMBO J.* **16** (17), 4537-4546.
- **Pombo C.M., Kehrl J.H., Sanchez I., Katz P., Avruch J., Zon L.I., Woodgett J.R., Force T., Kyriakis J.M. (1995)** Activation of the SAPK pathways by the human STE20 homologue germinal center kinase. *Nature* **377**, 750-754.
- **Pombo C.M., Tsujita T., Kyriakis J.M., Bonventre J.V. and Force T. (1997)** Activation of the Ste20-like oxidant stress response kinase-1 during the initial stages of chemical anoxia-induced necrotic cell death. *J. Biol. Chem.* **272** (46), 29372-29379.
- **Qian Z., Lin C., Espinosa R., LeBeau M. and Rosner M.R. (2001)** Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase. *J. Biol. Chem.* **276** (25), 22439-2245.
- **Randolph L.F. (1936)**. Development morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric. Res.* **51**, 881-916.
- **Raitt D.C., Posas F. and Saito H. (2000)** Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO J.* **19** (17), 4623-4631.
- **Rathjen J.P., Chang J.H., Staskawicz B.J. and Michelmore R.W. (1999)** Constitutively active *Pto* induces a Prf-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*. *EMBO J.* **18** (12), 3232-3240.
- **Raychaudhuri P., Chevesich A., Ghosh S. and Maitra U. (1987)** Characterization of eukaryotic initiation factor 5 from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **264**: 5134-5140.
- **Renault L., Nassar N., Vetter I., Becker J., Klebe B.M., Schaller G.E. and Blecker A.B. (1998)** The 1.7Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* **392**, 97-101.
- **Riethmacher D., Sonnenberg R.E., Brinkmann V., Yamaai T., Lewin G.R. and Birchmeier C. (1997)** Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* **389**, 725-730.
- **Rinne P. and van der Schoot C. (1998)** Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristems coordinated morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-1485.
- **Río A. (1999)** Caracterización de un receptor quinasa atípico expresado durante la embriogénesis del maíz (*Zea mays*). Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.

-
- **Robinson M.S. and Bonifacio J.S. (2001)** Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. in Cell Biology* **13**: 444-453.
 - **Roca R. (1998)** Caracterització de patrons d'expressió de gens d'expressió preferent a l'embriogènesi precoç del blat de moro. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
 - **Rodríguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Blinder B.M., Schaller G.E. and Bleecker A.B. (1999)** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, 996-998.
 - **Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D.F. and Hirt H. (1999)** Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP Kinase in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant cell* **11**, 273-287.
 - **Ruth J., Klekowski E.J. and Stein O.L. (1985)** Impermanent initials of the root apex and diplontic selection in a juniper chimera. *Am J Bot* **72**, 1127-1135.
 - **Sakurai A. and Fujioka S. (1997)** Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 757-762.
 - **Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989)** Extraction and purification of plasmid DNA. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 - **Savage C.R., Inagami T. and Cohen S. (1972)** The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **247**, 7612-7621.
 - **Scheel D. (1998)** Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 305-310.
 - **Schlessinger J. (1997)** Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell* **91**, 869-872.
 - **Schlessinger J. (2000)** Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
 - **Schmidt B.M.W., Gerdes D., Feuring M., Falkenstein E., Christ M. and Wehling M. (2000)** Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? *Front Neuroendocrinol.* **21**, 57-64.
 - **Schmidt D.L., Guzzo F., Toonen M.A. and de Vries S.C. (1997)** A leucine-rich repeat containing receptor-like marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**, 2049-2062.
 - **Schopfer C.R., Nasrallah M.E. and Nasrallah J.B. (1999)** The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700.

Bibliografia

- **Schulze-Muth P., Irmeler S., Schröder G. and Schöder J. (1997)** Novel type of receptor-like kinase from a higher plant (*Catharanthus roseus*). *The Journal of Biological Chemistry* **271** (43), 26674-26689.
- **Schumaker K. and Chory (2000)** Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 79-84.
- **Scofield S.R., Tobias C.M., Rathjen J.P., Chang J.H., Lavallo D.T., Michelmore R.W. and Staskawicz (1996)** Molecular basis of gen-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**, 2063-2065.
- **Seger R., Ahn N.G., Posada J., Munar E.S., Jensen A.M., Cooper J.A., Cobb M.H. and Krebs E.G. (1992)** Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 14373-14381.
- **Seidman C. E. (1997)** Introduction of plasmid DNA into cells. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Volum I (U.S.: Wiley Interscience), pp 1.8.1-1.8.10.
- **Sessions A., Weigel D. and Yanofsky M.F. (1999)** The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J.* **20**, 259-263.
- **Sharma A, Matsuoka M, Tanaka H, Komatsu S. (2001)** Antisense inhibition of a BRI1 receptor reveals additional protein kinase signaling components downstream to the perception of brassinosteroids in rice. *FEBS Lett* **2; 507(3)**, 346-50.
- **Sheridan W.F. and Clark J.K. (1987)** Maize embryogeny: a promising experimental system. *Trends Genet.* **3**, 3-6.
- **Shi C.S., Leonardi A., Kyriakis J., Siebenlist U. and Kehrl J.H. (1997)** TNF-mediated activation of the stress-activated protein kinase pathway: TNF receptor-associated factor 2 recruits and activates germinal center kinase related. *J Immunol* **163(6)**, 3279-85.
- **Shing Y., Christofori G., Hanahan D., Ono Y., Sasada R., Igarashi K. and Folkman J. (1993)** Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumor. *Science* **259**, 1604-1607.
- **Shinkmann K. and Blenis J. (1997)** Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual co-factor requirement. *J. Biol. Chem.* **272**, 28695-28703.
- **Shiu S-H. and Bleecker A. (2001)** Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *PNAS* **11 (98)**, 10763-10768.
- **Shoyab M.G., Plowman G., McDonald V.L., Bradley J.G. and Todaro G.J. (1989)** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER/neu oncogen. *Science* **243**, 1074-1076.

-
- **Sierke S.L., Cheng K., Kin H.H. and Koland J.G. (1997)** *Biochem J.* **322**, 757-763.
 - **Sinha N.R., Williams R.E. and Hake S. (1993)** Overpression of the maize homeo box gene, *KNOTTED1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* **7**, 787-795.
 - **Sliwkowski M.X., Schaefer G., Akita R.W., Lofgren J.A., Fitzpatrick D.N., Nuijens A., Fendly B.M., Cerione R.A., Vandlen R.L. and Carraway K.L., III (1994)** Co-expression of *erbB2* and *erbB3* proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14661-14665.
 - **Skirpan A.L., McCubbin A.C., Ishimizu T., Wang X., Dowd P.E., Ma H. and Kao T-H. (2001)** Isolation and characterization of kinase interacting protein 1, a pollen protein that interacts with the kinase domain *PRPK1*, a receptor-like kinase of *Petunia*. *Plant Physiol.* **126**, 1480-1492.
 - **Smith L., Greene B., Veit B. and Hake S. (1992)** A dominant mutation in the maize homeo box gene, *Knotted1*, cause it ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* **116**, 21-30.
 - **Song W-Y., Pi L-Y., Wang G-L., Gardner J., Holsten T. and Ronald P.C. (1997)** Evolution of the rice *Xa21D* disease resistance gene family. *Plant cell* **9**, 1279-1287.
 - **Song W-Y., Wang G-L., Chen L-L., Kim H-S., Pi L-Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W-X., Zhu L-H., Fauquet C. and Ronald P. (1995)** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.
 - **Sossountzov L., Luis-Avila L., Vignols F., Jolliot A., Arondel V., Tchang F., Grosbois M., Guerbette F., Miginiac E., Delseny M., Puigdomenech P. and Kader J.C. (1991)** Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**, 923-933.
 - **Southern E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
 - **Steeves T.A. and Sussex I.M. (1989)** *Patterns in Plant Development*, Second edition (Cambridge: Cambridge University Press).
 - **Stein J.C., Howlett B.H., Boyes C.D., Nasrallah M.E. and Nasrallah J.B. (1991)** Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8816-8820.
 - **Stein R.A. and Staroe J.V. (2000)** Evolutionary analysis of the *ErbB* receptor and ligand families. *J. Mol Evol* **50**, 397-412.

Bibliografía

- **Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C.L., Paris S., Gälweiler L., Palme K. and Jürgens G. (1999)** Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**, 316-318.
- **Stewart R.N. and Dermen H (1970)** Determination of number and mitotic activity of shoot apical initials cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am J Bot* **57**, 816-826.
- **Stiefel V., López E., Roca R., Bastida M., Jahrman T., Graziano E. and Puigdomènech P. (1999)** TM20, a gene coding for a new class of transmembrane proteins expressed in the meristematic tissues of maize. *The J. Biol. Chem.* **274 (39)**, 27734-27739.
- **Stone J.M., Collinger M.A., Smith R.D., Horn M.A. and Walker J.C. (1994)** Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science* **266**, 793-795.
- **Stone J.M., Trotochaud A.E., Walker J.C. and Clark S.E. (1998)** Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol.* **117**, 1217-1235.
- **Stone S.L., Arnoldo M.A. and Goring D.R. (1999)** A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**, 1729-1731.
- **Su Y.C., Han J., Xu S., Cobb M. and Skolnik E.Y. (1997)** NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* **16**, 1279-1290.
- **Sunn et al., (2000)** Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr. Biol.* **10**, 281-284.
- **Takahashi T., Mu J-H., Gasch A. and Chua N-H. (1998)** Identification by PCR of receptor-like protein kinases from *Arabidopsis* flowers. *Plant Mol Biol* **37**, 587-596.
- **Takasaki T., Hatakeyama K., Suzuki A. and Isogai A. (2000)** The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* **403**, 913-916.
- **Takayama S., Shiba H., Iwano M., Shimosato H., Che F-S., Kai N., Watanabe M., Suzuki G., Hinata K. and Isogai A. (2000)** The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **15**, 1920-1925.
- **Tang X., Frederick R.D., Zhou J., Halterman D.A., Jia Y. and Martin G.M. (1996)** Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**, 2060-2063.
- **Tena G., Asai T., Chiu W.-L. and Sheen J. (2001)** Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. in Plant Biology* **4**, 392-400.

-
- **Teo W.L., Kumar P., Goh C.J. and Swarup S. (2001)** The expression of *Brostm*, a KNOTTED1-like gene, marks the cell type and timing of in vitro shoot induction in *Brassica oleracea*. *Plant Mol Biol* **46** (5), 567-80.
 - **The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408** (14), 796- 815.
 - **Tobias C.M., Howlett B. and Nasrallah J.B. (1992)** An *Arabidopsis thaliana* gene with sequence similarity to the S-locus receptor-like of *Brassica oleracea*. *Plant Physiol.* **99**, 284-290.
 - **Torii K. (2000)** Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Curr. Opin. in Plant Biology* **3**, 361-367.
 - **Torii K.U., Mitsukawa N., Oosumi T., Matsuura Y., Yokoyama R., Whittier R.F. and Koneda Y. (1996)** The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**, 735-746.
 - **Toyoda H., Komuasaki T., Uchida D., Takayama Y., Isobe T., Okuyama T. and Hanada K. (1995)** Epiregulin, a novel epidermal growth factor with mitogenic activity receptors for rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 7495-7500.
 - **Trotouchaud A.E., Hao T., Guang W., Yang Z. and Clark S.E. (1999)** The CLAVATA1 receptor like-kinase required CLAVATA3 for its assembly into a signal complex that includes KAPP and Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-405.
 - **Trotouchaud A.E., Hao T., Wu G., Yang Z and Clark S.E. (1999)** The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signalling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-406.
 - **Trotouchaud A.E., Jeong S. and Clark S.E. (2000)** CLAVATA3, a multimeric ligand for a CLAVATA1 receptor kinase. *Science* **289**, 613-617.
 - **Ullrich A. and Schlessinger J. (1990)** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212.
 - **Valon C., Smalle J., Goodman H. and Giraudat J. (1993)** Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. *Plant Molecular Biology* **23**, 415-421.
 - **van der Geer P., Wiley S., Gish G.D., Lai V.K., Stephens R., White M.F., Kaplan D. and Pawson T. (1996)** Identification of residus that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 963-968.
 - **van der Knaap E., Song W-Y., Ruan D-L., Sauter M., Ronald P.C. and Kende H. (1999)** Expression of a gibberellin-induced leucine-rich repeat receptor-like protein kinase

Bibliografia

in deepwater rice and its interaction with kinase-associated protein phosphatase. *Plant Physiol.* **120**, 559-569.

• **van der Schoot C. and Rinne P. (1999)** Networks for shoot design. *Trends Plant Sci* **4**, 31-37.

• **Vollbrecht E., Reiser L. and Hake S. (2000)** Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the homeobox gene, *knotted1*. *Development* **127**, 3161-3172.

• **Wagner T.A. and Kohorn B. (2001)** Wall associated kinases, WAKs, are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**, 303-318.

• **Waizeneger I., Lukowitz W., Assad F., Scharz H., Jürgens G. and Mayer U. (2000)** The Arabidopsis *KNOLLE* and *KEULE* genes interact to promote involves multiple regulatory elements. *Plant J.* **17**, 263-273.

• **Walker J.C. (1993)** Receptor-like protein kinase gene of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal* **3** (3), 451-456.

• **Walker J.C. (1994)** Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1599-1609.

• **Walker J.C. and Zhang R. (1990)** Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature* **345**, 743-746.

• **Wang G-L., Raun D-L., Song W-Y., Sideris S., Chen L., Pi L-Y., Zhang S., Zhang Z., Fauquet C. and Gaut B.S. (1998)** Xa21D encodes a receptor like molecule with a leucine-rich repeat domain that determinates reca-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-779.

• **Wang X., Zafian P., Choudhary M. and Lawton M. (1996)** The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2598-2602.

• **Wang Z-Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S. and Chory J. (2001)** BRI1 is a critical component of a plasma-membrana receptor for plant steroids. *Nature* **410** (15), 380-383.

• **Waterman H., Alroy I., Strano S., Seger R. and Yarden Y. (1999)** The C-terminal of the kinase-defective neregulin receptor ErbB-3 confers superiority and dictates endocytic routing. *EMBO J.* **18** (12), 3348-3358.

• **Wehling M. (1997)** Specific, nongenomic actions of steroid actions: a new age? *Front Neuroendocrinol.* **21**, 57-94.

• **Wen D., Peles E., Cupples R., Suggs S.V., Bacus S.S., Luo Y., Trail G., Hu S., Silbiger S.M., Levy R.B., et al. (1992)** Neu differentiation factor: a transmembrane

glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**, 559-572.

• **West M.A.L. and Harada J.J. (1993)** Embryogenesis on higher plants: an overview. *Plant Cell* **5**, 1361-1369.

• **Whitmarsh A.J., Shore P., Sharrocks A.D. and Davis R.J. (1995)** Identification of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**, 403-407.

• **Williams R.W., Wilson J.M. and Meyerowitz E. (1997)** A possible role of kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signalling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 10467-10472.

• **Winge P., Brembu T., Kristensen R and Bones A.M. (2000)** Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **156**, 1959-1971.

• **Wolf B.B. and Green D.R. (1999)** Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 20049-20052.

• **Wrana J.L., Attisano L., Cárcomo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X.-F. and Massague J. (1992)** TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003-1014.

• **Wu C, Whiteway M, Thomas DY and Leberer E. (1995)** Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 15984-15992.

• **Xing T., Higgins V.J. and Blumwald E. (1996)** Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* **8**, 555-564.

• **Yamamoto E. and Knap H.T. (2001)** Soybean receptor-like protein kinase genes: paralogous divergence of a gene family. *Mol Biol Evol.* **18** (8), 1522-1531.

• **Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2000)** Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive 1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**, 1591-1605.

• **Yang K.Y., Liu Y. and Zhang S. (2001)** Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 741-746.

Bibliografia

- **Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Ledder P. and Ornitz D.M. (1991)** Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848.
- **Yeng E.C. and Meinke D.W. (1993)** Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* **5**, 1371-1381.
- **Yokoyama R., Takahashi T., Kato A., Torii K.U. and Komeda Y. (1998)** The Arabidopsis ERECTA gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *The Plant Journal* **15** (3), 301-310.
- **Yu L.P., Simon E.J., Trotochaud A.E. and Clark S.E. (2000)** POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the CLAVATA loci. *Development* **127**, 1661-1670.
- **Yuasa T., Ohno S., Kehrl J.H. and Kyriakis J.M. (1998)** Tumor necrosis factor signalling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38. *The Journal of Biological Chemistry* **273** (35), 22681-22692.
- **Zang R. and Walker J.C. (1993)** Structure and expression of the S locus-related genes of maize. *Plant Mol Biol* **21** (6), 1171-1174.
- **Zhang S. and Klessig D.F. (2001)** MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6** (11), 520-527.
- **Zou T.H., Ling K., Gno J., Zhou H., Wu Y.L., Jing Q., Ma L. and Pei G. (2000)** identification of a human brain-specific isoform of mammalian Ste20-like kinase3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 2513-2519.
- **Zwergner K. and Heibert H. (2001)** Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biol. Chem.* **382**, 1123-1131.