



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterització de la proteïna LICC1 amb els dominis LisH-CTLH-CRA de blat de moro

Mercè Miquel Jaureguibeitia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA i BIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA LICC1

AMB ELS DOMINIS

LisH-CTLH-CRA DE BLAT DE MORO

MERCÈ MIQUEL JAUREGUIBEITIA

Barcelona, Setembre 2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA i BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA LICC1

AMB ELS DOMINIS

LisH-CTLH-CRA DE BLAT DE MORO

Memòria presentada per Mercè Miquel Jaureguibeitia per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat en el Consorci CSIC-IRTA, i en el Centre de Recerca en
Agrigenòmica (Crag) (CSIC, IRTA, UAB, UB)

Director de la Tesi

Tutora

Autora

Dr. Carlos M. Vicient Sánchez

Dra. Montserrat Arró Plans

Mercè Miquel Jaureguibeitia

Barcelona, Setembre 2015

Al Pere, al Guillem i a la Cristina
A l'Amatxu i a la memòria de l'Aitite

The Adventure Begins

The Hobbit: an Unexpected Journey

Howard Shore

Piano

5

8

Pno.

5

Pno.

9

Pno.

15

Pno.

24

Aquesta Tesi ha durat molts anys així que hi ha molta gent a qui he d'agrair els seu recolzament, ajuda i suport. Perdoneu si me n'oblido d'algú, però podeu estar segurs que a tots us tinc ben presents.

En primer lloc vull donar les gràcies a en Pere Puigdomènech per dues raons. La primera perquè ell va ser la "guspira" que va endegar aquesta Tesi, fent-me pensar que podria gaudir plenament de la recerca i aprendre coses noves, tot i que hauria de fer un esforç a nivell conceptual per passar de la química pura a l'apassionant món de la biologia molecular. La segona perquè, com a director del CID, em vas deixar començar-la sabent que treballava en un servei.

En segon lloc està el meu director de tesi. Carlos te agradezco de todo corazón todo lo que sé de biología molecular. Has sido y eres mi profesor de biología. Además, has tenido una inmensa paciencia conmigo. En todos estos años, hemos compartido momentos buenos y malos, resultados positivos, negativos y otros que no nos llevaban a buen puerto. Espero que los buenos tengan más peso. Quiero que sepas que aunque haya acabado esta Tesis seguirás siendo mi tutor en biología.

A la gent del laboratori. A Ignacio, no sabes bien lo que me has ayudado con esos protocolos que me dejaste, difíciles de encontrar en tu carpeta pero que siempre están allí. Recuerdo una breve frase que me dijiste al principio de la Tesis, cuando empecé a trabajar por primera vez con bacterias, intentando hacer crecer unas colonias. Ante mi incredulidad, esperando que no creciese, me animaste con un "Ten fe". Tenías razón, al día siguiente obtuve cientos de colonias. A Nuria, Cristian y Hedia, por los momentos que hemos pasado juntos. I com no, l'últim becari del grup, el David, amb qui vaig fer experiments junts, tots amb resultats fabulosos. Tens fusta d'investigador, molta sort.

A tota la gent dels diferents laboratoris, tant investigadors seniors, juniors, post-docs, pre-docs, tècnics, gràcies a tots.

A en Sami, pels seus consells en proteòmica.

A la Sara M., la madrileña. Ha sido un visto y no visto. Hemos compartido y seguimos compartiendo momentos en los que nos apetecía hacer un break. Qué bien nos iban.

A la Montse, per les fotos tan maques del confocal. Ets la veu de la consciència en microscòpia. Quants cops m'has dit que – No colocalitza, no ho veig clar..., de manera que quan em donaves el vist i plau guardava aquelles fotos quasi bé per triplicat.

A tot el grup d'hivernacles: Pilar, Alejandro, Eva, Mina, Leire, Albert, César, per cuidar-me les plantes, els calls i preparar-me medis. I pels moments de dintre i fora del centre, les alegries i tristors, les xerrades, "cotilleos" i que no acabin mai.

Al grup d'OMGs: Teresa, Marta B., Manel, Marta H., Nora. !Qué momentos más divertidos y agradables pasamos en el CID!. A Carlos R. por esos los piques y enfados que nos llevábamos del fútbol y política. A Maria C., a tope que ja queda poc per acabar. Mi Sarita, hemos vivido todo tipo de momentos y siempre has salido adelante; tienes mucho coraje, suerte. Jose... creo


que eres una de las personas que más ha compartido mis momentos en la poyata, gracias por toda la ayuda que me has dado en el laboratorio; me has enseñado muchísimas cosas.

A la meva companya i amiga Mireia. Les hem passades de tots colors en el servei. Gràcies per tots els moments en què m'has recolzat i m'has ajudat, tant en el laboratori , en l'ordinador (les hores que hem estat juntes), en les tertúlies a l'hora de dinar a la feina, en els experiments de la tesi... són tantes coses que no tinc paraules. La pena és que per circumstàncies alienes a nosaltres ja no podem estar més juntes en el laboratori però per sort, hi ha vida fora de la feina i ens veiem.

A la Basi, lo bien que has cuidado a tus nietos cuando eran pequeños y necesitaban de tu ayuda, mientras yo trabajaba o estaba en el laboratorio. No sabes lo que te agradezco el cariño que les has dado y les continuas dando.

A mi Amatxu, zaindu zure bilobak horiek behar bezala esker. A l'Aitite, vas ser una peça molt important en tot moment, la de vegades que anaves a buscar als nets a l'escola i després els portaves al parc, als entrenaments de futbol o veure els trens.

A en Guillem i la Cristina, els meus fills. M'haureu de perdonar per les estones que no he estat amb vosaltres i ara que ja sou més grans i enteneu les coses us vull dir, us estimo i gràcies de tot cor.

Al Pere, sens dubte has estat el punt clau en tot moment. Ja saps que ets el meu  *Pepito Grillo*. Per sort saps el que és fer recerca i has sabut entendre els èxits i els moments difícils. Això m'ha ajudat a tirar endavant perquè sense el teu recolzament continu, suport, comprensió i estimació hagués estat més difícil fer aquesta Tesi. Gràcies per ajudar-me.

ÍNDEX

ACRÒNIMS	1
INTRODUCCIÓ	
1-EMBRIOGÈNESI DEL BLAT DE MORO	5
1.1-Etapes de l'embriogènesi	6
1.1.1-Etapa morfogènica	6
1.1.1.1-Patró apical-basal	7
1.1.1.2-Patró radial.	7
1.1.2- Etapa de maduració	8
1.1.3- Etapa de dessecació i dormició.	8
1.2-Aproximació genètica a l'estudi de l'embriogènesi	8
1.3-Aproximació transcriptòmica a l'estudi de l'embriogènesi	9
2-MICROTÚBULS	10
2.1-Estructura	10
2.2-Proteïnes motores	12
2.3-Fàrmacs que afecten als microtúbuls	12
2.4-Proteïnes associades a microtúbuls (MAPs)	13
3-DOMINIS PROTEICS	13
3.1-Dominis LisH (<i>Lisencephaly type-1-like homology motif</i>)	13
3.2-Domini CTLH (motiu C-terminal de LisH)	15
3.3-Domini CRA (motiu CT11-RanBPM)	15
4-COMPLEXES DE PROTEÏNES <i>SCAFFOLD</i>	16
4.1-Complexos proteics	16
4.2-Complexos <i>scaffold</i>	16
5-COMPLEX PROTEIC GID/MRCTLH....	18
5.1-Complex GID en llevat	18
5.1.1-GID1	19
5.1.2-GID2	20
5.1.3-GID4	20
5.1.4-GID5	21
5.1.5-GID7	21
5.1.6-GID8	21
5.1.7-GID9	21
5.2-Complex MRCTLH en humans	21
5.2.1-RanBPM	23
5.2.2-TWA1	25
5.2.3-RMND5A	25
5.2.4-MUSKELIN	26
5.2.5-ARMc8	26
5.2.6-MAEA	26
5.2.7-WDR26	27
5.3-Complex MRCTLH a plantes	27
OBJECTIUS	
OBJECTIUS..	33
RESULTATS	
1-IDENTIFICACIÓ DE GENS D'EXPRESSION EN EMBRIÓ JOVE DE BLAT DE MORO	37
1.1-Una genoteca de cDNA d'embrió de 10 DAP de blat de moro	37

1.2-MCYL un nou pèptid antimicrobià	41
1.2.1-Patró d'expressió de <i>mcy1</i>	41
1.2.2-Anàlisi filogenètica i possible funció de MCYL	44
1.3-Un membre de la família MAP65 de proteïnes associades a microtúbuls	47
1.3.1-Anàlisi funcional del clon MMH3	47
1.3.2-Patró d'expressió	48
2-CARATERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA LICC1	51
2.1-Presència dels dominis LisH-CTLH-CRA a les proteïnes de plantes	51
2.1.1-Gens que contenen dominis LisH-CTLH-CRA en blat de moro	51
2.1.2-Gens que contenen alguns dels dominis Lish-CTLH-CRA en arròs	53
2.1.3-Gens que contenen alguns dels dominis Lish-CTLH-CRA en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	55
2.1.4-Anàlisi filogenètica de les proteïnes LIS (LisH-CTLH-CRA)	56
2.2-Patró d'expressió del gen <i>licc1</i>	59
2.3-Patró d'acumulació de la proteïna LICC1	60
2.4-Interacció de la proteïna LICC1 amb d'altres proteïnes	62
2.4.1-Inclusió de LICC1 en complexos proteics.	62
2.4.2-Interacció de la proteïna LICC1 amb microtúbuls	63
2.4.3-Identificació d'altres proteïnes que interactuen amb LICC1	65
2.5-Tranformació transitòria de cèl·lules de fulla de tabac mitjançant agroinfiltració	68
2.5.1-Localització subcel·lular de LICC1 i LC	69
2.5.2-Colocalització amb microtúbuls	70
2.6-Transformació estable de cèl·lules de <i>Nicotiana benthamiana</i>	74
2.6.1-Colocalització subcel·lular	74
2.6.2-Identificació dels corpuscles on es localitzen LICC1-YFP i CRA-YFP	75
2.6.2.1-Colocalització amb FM4-64	75
2.6.2.2-Colocalització amb cossos lipídics	76
2.6.3-Identificació dels orgànuls on es localitza LC-YFP	78
2.6.3.1-Interacció amb els microtúbuls	78
2.6.3.2-Colocalització de LC-YFP en nucli	80
2.6.4-Localització durant la divisió cel·lular.	81
2.6.5-Interacció amb PPO en cèl·lules transformades de BY2	84
2.6.6-Fenotip	85
2.7-Plantes transgèniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	86
2.7.1-Distribució subcel·lular de LICC1-YFP i els seus fragments a plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
2.7.1.1-Fulles	86
2.7.1.2-Hipocòtil	87
2.7.1.3-Arrel.	87
2.7.1.4-Punta d'arrel	88
2.7.2-Colocalització amb orgànuls	88
2.7.2.1-Cloroplast	88
2.7.2.2-Paret cel·lular: tractament amb sorbitol	89
2.7.2.3-Microtúbuls	90
2.7.2.4-Cossos lipídics	94
2.7.3-Fenotip	95
2.7.3.1-Efectes sobre el creixement de les plantes	95
2.7.3.2-Tolerància a l'estrès hídric	97

2.7.4-Canvis en l'acumulació i distribució de la fluorescència en resposta a l'estrès hídric	98
2.7.4.1-Canvis en l'acumulació de LICC1-YFP a les cèl·lules de guarda dels estomes de plantes sotmeses a estrès hídric	98
2.7.4.2-Canvis en la localització subcel·lular de LC-YFP a plantes sotmeses a estrès hídric	100
DISCUSSIÓ	
1-IDENTIFICACIÓ DE GENS D'EXPRESSIONI EN EMBRIÓ JOVE D BLAT DE MORO	105
2-DESENVOLUPAMENT DE LA LLAVOR DE BALT DE MORO I GENS DE DEFENSA I MCYL	106
3-MICROTÚBULS, CITOESQUELET I DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI	108
4-CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LICC1	109
4.1-Gens <i>licc1</i> en plantes	109
4.2-Dominis LisH, CTLH i CRA, interaccions amb proteïnes	110
4.2.1-Formació de complexos	111
4.2.2-Interacció amb microtúbuls	111
4.2.3-Cossos lipídics	112
4.2.4-Polifenol oxidasa i resposta a estrès	113
4.3-Complexos MRCTLH de plantes	114
CONCLUSIONS	
CONCLUSIONS.	125
MATERIALS I MÈTODES	
1-MATERIALS	129
1.1-Material vegetal	129
1.2-Cultiu del material vegetal	129
1.2.1-Creixement en terra d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
1.2.2-Creixement in vitro d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	130
1.2.3-Creixement en terra de blat de moro i tabac (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	130
1.2.4-Control de creixement de les cèl·lules transformades BY2 de <i>Nicotiana benthamiana</i>	131
1.3-Material bacterià	131
1.4-Plasmidis	131
1.5-Medis de cultiu i solucions generals	132
1.5.1-Medis bacterians	132
1.5.2-Medis per a plantes	132
1.5.3-Solucions generals	132
1.6-Antibiòtics, reactius i inhibidors de proteases	133
1.7-Anticossos	133
1.8-Oligonucleòtids i sondes	133
2-MÈTODES GENERALS PER A ÀCIDS NUCLEICS	135
2.1-Extracció d'àcids nucleics	135
2.1.1-Extracció de DNA genòmic de teixits vegetals	135
2.1.2-Extracció ràpida de DNA genòmic de teixits vegetals	135
2.1.3-Extracció de DNA plasmídic.	135
2.1.4-Extracció de RNA total	136
2.1.4.1 amb Trizol®	136
2.1.4.2 amb fenol	136
2.1.5-Precipitació del DNA i RNA	137
2.2-Modificacions del DNA	137
2.2.1-Digestions amb endonucleases de restricció	137

2.2.2-Lligació de fragments de DNA amplificats per PCR.	137
2.2.3-Addició d'adenines protuberants a extrems 3' de productes de PCR	138
2.2.4-Recombinació <i>in vitro</i>	138
2.3-Reaccions de PCR,RT-PCR quantitativa	138
2.3.1-Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	138
2.3.2-Purificació i clonació dels productes de PCR	139
2.3.3-RT-PCR a temps real quantitativa	139
2.4-Electroforesi d'àcids nucleics en gel d'agarosa	140
2.4.1-Quantificació de la concentració i puresa	140
2.5-Transformació bacteriana	141
2.5.1-Transformació d' <i>E.coli</i> per xoc tèrmic	141
2.5.2-Transformació d' <i>A.tumefaciens</i>	141
2.5.2.1-Preparació de cèl·lules competents per <i>A.tumefaciens</i>	141
2.5.2.2-Transformació d' <i>A.tumefaciens</i> per electroporació	141
2.6-Seqüenciació de DNA	142
3-MÈTODES PER A L'ANÀLISI DE PROTEÏNES	143
3.1-Extracció de proteïna total	143
3.2-Quantificació d'extractes proteics	143
3.3-Precipitació de proteïnes per TCA	143
3.4-Separació de proteïnes en gels de poliacrilamida desnaturalitzant SDS-PAGE	144
3.5-Tinció de proteïnes en gels SDS-PAGE amb blau de Coomassie	144
3.6-Tinció de proteïnes amb nitrat de plata	145
3.7-Tranferència de proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF	145
3.8-Tinció de proteïnes en membranes amb vermell Ponceau-S	145
3.9-Immunodetecció de proteïnes fixades a la membrana de nitrocel·lulosa amb anticossos específics	146
3.10-Seqüenciació de proteïnes	146
3.11-Producció en <i>E.coli</i> de proteïnes recombinants marcades amb l'epítot d'histidines	147
3.12-Dialització de proteïnes	148
3.13-Extracció de proteïnes de cossos lipídics	148
4-MÈTODES DE TRANSFORMACIÓ VEGETAL	149
4.1-Transformació estable	149
4.1.1-Transformació de plantes per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	149
4.1.1.1-Preparació del material vegetal	149
4.1.1.2-Electroporació en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	150
4.1.1.3-Transformació de plantes	150
4.1.2-Transformació de calls BY2 per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	151
4.1.2.1-Suspensió cel·lular a partir de calls abans de la transformació	151
4.1.2.2-Transformació de calls	151
4.1.2.3-Suspensió cel·lular a partir de calls un cop transformats	152
4.2-Transformació transitòria	152
5-CONSTRUCCIÓ D'UNA GENOTECA DE cDNA	153
5.1-Síntesi de la primera cadena de cDNA	154
5.2-Síntesi de la segona cadena de cDNA	154
5.3-Digestió amb proteïnasa K	155
5.4-Lligació en TOPO-TA	155
5.5-Amplificació dels inserts a partir del bacteris	156

6-TRANSFERÈNCIA NORTHERN	156
6.1-Preparació de la sonda	156
6.1.1-Marcatge de la sonda per Random Priming	156
6.1.2-Purificació de la sonda marcada	157
6.2-Preparació de la mostra RNA	158
6.3-Electroforesi i transferència del RNA	158
6.4-Prehibridacions i hibridacions	159
6.5-Deshibridacions de membranes	159
7-HIBRIDACIONS <i>IN SITU</i>	160
7.1-Preparació del teixit	160
7.1.1-Fixació del teixit	160
7.1.2-Inclusió	160
7.1.3-Preparació dels blocs de parafina.	161
7.1.4-Preparació de les seccions	161
7.2-Síntesi de la sonda	161
7.2.1-Marcatge de la sonda	161
7.2.2-Anàlisi de la sonda marcada. Dot-blot	162
7.3-Tractaments de la mostra	163
7.3.1-Prehibridacions	163
7.3.2-Hibridacions i rentats	164
7.3.3-Detecció amb digoxigenina (DIG)	164
8-PROTOPLASTS..	165
8.1-Formació de protoplasts a partir de suspensions cel·lulars BY2	165
8.2-Aïllament de nuclis de protoplasts	166
9-SINCRONITZACIÓ DE LA DIVISIÓ CEL·LULAR	166
10-COSEDIMENTACIÓ AMB MICROTÚBULS	167
10.1-Preparació dels microtúbuls (MT)	168
10.2-Assaig d'unió	168
10.3-Precipitació amb TCA	169
11-IMMUNOPRECIPITACIÓ	169
11.1-Preparació de les boles magnètiques (DB) amb l'anticòs	170
11.2-Crosslinking de les DB amb l'anticòs	170
11.3-Immunoprecipitació.	171
12-MICROSCÒPIA	171
12.1-Microscopi SZX16. Microscopi estereoscòpic	171
12.2-Axiophot Zeiss. Microscòpia làser fluorescència	172
12.3-Microscòpia làser confocal	172
13-BIOINFORMÀTICA	173
BIBLIOGRAFIA	
BIBLIOGRAFIA	177

2,4 D: Àcid diclorofenoxiacètic
ACN: Acetonitril
APS: Persulfat amònic
BCIP: 5-brom-4-cloro-3-indolil fosfat
BSA: Albúmina sèrica bovina
CB: Solució de PIPES, MgCl, EGTA, Glicerol
cDNA: DNA còpia
DAP: dies després de la polinització
dATP: Desoxiadenosina trifosfat
DB: boles magnètiques Dynalbeads
dCTP: Desoxicitosina trifosfat
DIG: digoxigenina
DMP: dimetil pimelimidat dihidroclorur
DMSO: Dimetilsulfòxid
DNA: Àcid desoxirribonucleic
DNAsa: desoxirribonucleasa
dNTP: Desoxirribonucleòtids
DO: densitat òptica
DTT: ditiotreitòl
dTTP: desoxitimidina trifosfat
dUTP: desoxiuracil trifosfat
EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA: Àcid etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracètic
EST: Expressed sequence tag
FMI: Medi igual GMI, sacarosa
FMII: Medi igual FMI, sacarosa
GFP: Proteïna fluorescent verda
GMI: Medi EDTA, KCl, MgCl₂, DTT, Sacarosa, tricina-KOH
GMII: Medi igual a GMI, NaCl
GTB: Solució de PIPES, MgCl, EGTA
HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-àcid piperazineetanolsilfònic
His: Histidines
IP: Immunoprecipitació
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranòside
LB: Medi cultiu Luria-Bertani
LC: domini LisH-CTLH
LICC1: Proteïna 1 amb els dominis LisH-CTLH-CRA
MAP: proteïna associada a microtúbul
MEN: Tampó de càrrega MOPS, AcONa, EDTA
mRNA: Àcid ribonucleic missatger
MS: Murashige @ Skoog

MT: Microtúbul

NBT: *nitro blue tetrazolium*

NP-40: Nonidet P-40 (octil fenoxipolietoxietanol)

NTE: Solució tampó de NaCl, Tris, HCl, EDTA

PBS: solució tampó fosfat salí

PBST: solució tampó fosfat salí-Tween 0.1 %

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PMSF: Fluorur de fenilmetil sulfonil

PPO: polifenol oxidasa

pps: Protoplasts

RFP: Proteïna fluorescent vermella

RNA: Àcid ribonucleic

RNAsa: Ribonucleasa

RT-PCR: PCR a temps real

SDS: Dodecilsulfat sòdic

SDS-PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

SSC: Solució citrat sòdic

SSC: Tampó citrat sòdic

TAE: Tampó Tris, EDTA, AcOH

TBS: Solució tampó de NaCl, Tris, HCl

TCA: Àcid triclor acètic

TE: Tampó Tris-HCl, EDTA

TEA: Trietanolamina

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina

TM: Tampó càrrega, Tris-HCl, Glicerol, blau bromofenol, β -mercaptoetanol

TRIS: tris(hidoximetil)aminometano

tRNA: RNA de transferència

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranòside

YEB: medi *yeast extract broth*

YFP: Proteïna fluorescent groga

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1- EMBRIOGÈNESI DEL BLAT DE MORO

El blat de moro és una planta espermatòfita, angiosperma, monocotiledònia de la família *Poaceae*. Les plantes angiospermes es caracteritzen per tenir una doble fecundació: una de les cèl·lules espermàtiques s'uneix a la cèl·lula ou per formar el zigot, a partir del qual es formarà l'embrió i posteriorment donarà lloc a la planta adulta, mentre que l'altra cèl·lula espermàtica s'uneix a la cèl·lula central, diploide, per generar l'endosperma, triploide, que actua com a òrgan de reserva (Súarez i Bozkov, 2008; Capron *et al.*, 2009).

L'estudi de l'embriogènesi s'ha dut a terme principalment a l'*Arabidopsis thaliana*, planta dicotiledònia amb un genoma petit totalment seqüenciat i amb un temps de generació curt (Jürgens *et al.*, 1991; Mayer *et al.* 1991). D'altra banda el blat de moro ha estat un model per a l'embriogènesi de les plantes monocotiledònies que presenten característiques diferents a les dicotiledònies.

Per estudiar el procés de l'embriogènesi se segueixen diferents estratègies. A nivell histològic, s'analitzen els canvis estructurals i cel·lulars que tenen lloc. A nivell genètic, l'ús de mutants que bloquegen l'embriogènesi és una eina molt vàlida per entendre el procés. A nivell molecular, s'identifiquen els gens implicats en el procés, i la qual cosa permet tenir un conjunt de marcadors que faciliten la interpretació dels mutants i dels processos que tenen lloc (Meinke, 1995).

1.1- Etapes de l'embriogènesi

L'embriogènesi de les plantes es pot dividir en tres fases: morfogenètica, maduració i dessecació (**Figura I1**) (Gooldberg *et al.* 1994; Jürgens *et al.*, 1994).

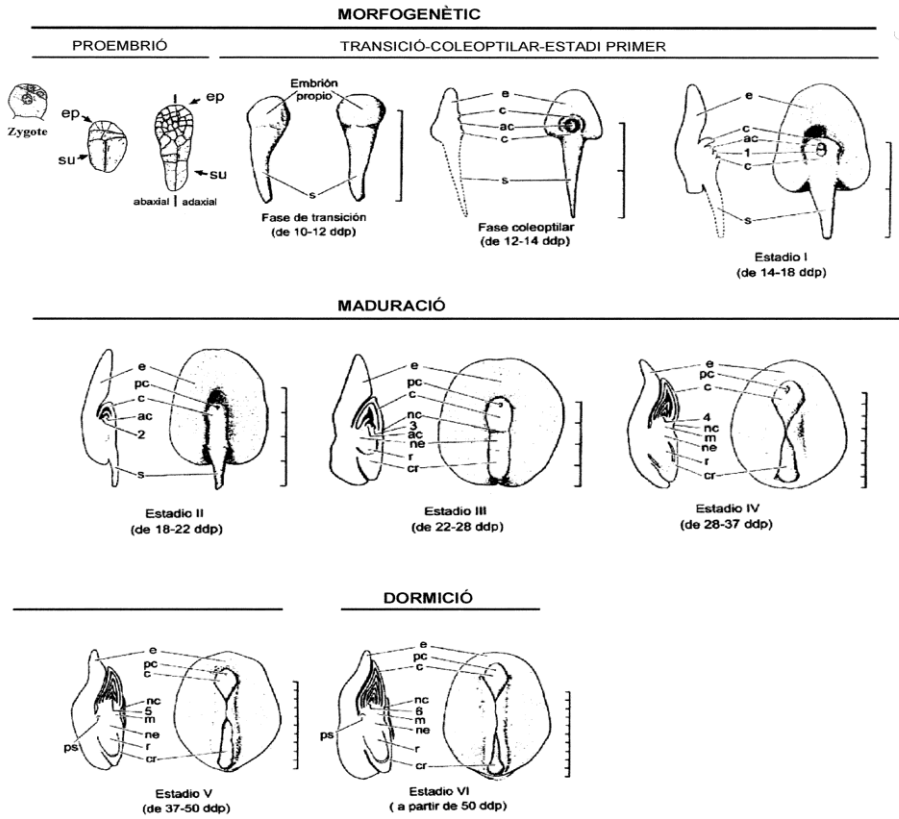


Figura I1. Diferents etapes de l'embriogènesi del blat de moro. Representació esquemàtica dels diferents estadis del desenvolupament de l'embrió. En cada estadi es mostra un tall lateral i una imatge frontal del mateix embrió. **ddp**, dies després de la pol·linització; **ep**, embrió propi; **s**, suspensor; **e**, escutel; **c**, coleòptil; **ac**, meristem apical; **pc**, porus coleoptilar; **nc**, node escutelar; **r**, arrel; **cr**, coleorriza; **m**, mesocòtil. Cada divisió són 0.5 mm (Río, 1999; amb modificacions).

1.1.1- Etapa morfogenètica

És l'etapa inicial on es determina l'organització bàsica de l'embrió. Els principals processos que tenen lloc de manera simultània durant el període morfogenètic són l'establiment de la polaritat apical-basal i del patró radial, l'elaboració de les diferents estructures i òrgans, el creixement i la diferenciació dels diferents tipus cel·lulars, teixits i òrgans (Jürgens *et al.*, 1994). Tot això s'ha de donar en un context coherent a nivell estructural i funcional. Atès que la paret cel·lular de la cèl·lula vegetal no permet migracions, l'elaboració de les diferents estructures, el creixement i la diferenciació es deuen fonamentalment a mecanismes de divisió i expansió cel·lular dirigides (Sreenivasulu i Wobus, 2013).

L'organització del cos de l'embrió es pot considerar que resulta de la superposició de dos patrons, l'apical-basal i el radial (Gooldberg *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994).

1.1.1.1- *Patró apical-basal*

El desenvolupament de l'embrió s'inicia amb la fertilització de la cèl·lula ou i la subsegüent formació del zigot. Abans de la primera divisió del zigot ja es pot observar una distribució polaritzada, amb una regió de citoplasma més densa. La primera divisió del zigot és asimètrica i dóna lloc a dues cèl·lules diferents, la situada a la posició apical, més petita i amb un citoplasma més dens i que donarà lloc a l'embrió propi (Van Lammeren, 1996; Jürgens, 1995), i la situada a la regió basal, gran i vacuolaritzada, on es formarà el suspensor que, en els primers estadis de l'embriogènesi, té el paper d'orientar l'embrió dins l'endosperma i proveir-lo amb nutrients. Al principi de l'embriogènesi del blat de moro aproximadament set dies després de la pol·linització (DAP), a l'embrió hi ha una constant divisió cel·lular que al blat de moro es caracteritza per divisions irregulars tant en la seva orientació com en la seva seqüència és el conegut estadi de proembrió (**Figura I1**).

La polaritat apical-basal formada inicialment per l'embrió propi/suspensor caracteritza tot el desenvolupament posterior de la planta. Posteriors divisions donen lloc als diferents òrgans. A la part superior, un grup de cèl·lules més petites, més densament empaquetades i en intensa divisió formen el meristem apical, el qual es forma com una protuberància la regió apical i lateral de l'embrió propi. Seguidament s'estableix el meristem radicular, en una posició centrada a la part inferior de l'embrió propi. D'aquesta manera queda establert l'eix apical-basal, constituït pels dos meristems. L'establiment dels meristems fa que la simetria de l'embrió passi de ser radial a bilateral (Van Lammeren 1986).

En aquest patró apical-basal també s'inclou la formació dels diferents òrgans o estructures al llarg del l'eix longitudinal. Durant l'estadi de transició es forma l'escutel (òrgan homòleg al cotiledó), situat en la regió apical de l'embrió propi, al costat oposat d'on es troba el meristem. En l'estadi coleoptilar (cap als dotze DAP). Com el seu nom indica es forma el coleòptil, que l'embolcalla el meristem apical i les fulles que es van generant, de tal manera que protegeix la plúmula durant els primers estadis de la germinació.

1.1.1.2- *Patró radial*

El patró radial està constituït per capes concèntriques de cèl·lules diferenciades que s'estableixen seqüencialment començant per la capa més externa. La formació d'aquesta capa, el protoderma, és el primer indicatiu de diferenciació tissular de l'embrió i marca l'inici de l'estadi de transició (Elster *et al.* 2000). El protoderma s'expandeix i acaba formant l'epidermis. D'altra banda, a la regió de l'hipocòtil, l'arrel i el meristem radicular, la massa cel·lular interna es diferencia en el teixit principal, i dóna pas al còrtex i l'endodermis, mentre que les cèl·lules precursors del teixit vascular, formen el pericicle, el xilema i el floema (Jürgens, 1995; Laux i Jürgens 1997).

1.1.2- Etapa de maduració

El període morfogenètic finalitza quan s'assoleix l'organització bàsica de l'embrió amb l'eix longitudinal, el patró radial i els diferents òrgans (**Figura I1**). Continua amb un període de maduració caracteritzat pel creixement de la mida de l'embrió, la síntesi i l'acumulació de productes de reserva (Gooldberg *et al.*, 1994; Meinke, 1995). Aquests nutrients que l'embrió utilitzarà durant la germinació per a la seva subsistència són emmagatzemats principalment a l'endosperma i l'escutel (Lopes i Larkins, 1993; West i Harada, 1993; Berger, 1999).

L'endosperma del blat de moro conté tres tipus de cèl·lules: les cèl·lules basals de transferència a la regió que envolta l'embrió, les cèl·lules centrals que acumulen midó i l'aleurona, monocapa cel·lular de la perifèria i on bàsicament s'acumulen lípids (Lopes i Larkins, 1993; Young *et al.*, 1997; Berger, 1999). Una de les etapes del desenvolupament de l'endosperma és l'endoreplicació, un conjunt de successius cicles cel·lulars sense mitosi, que augmenten el volum nuclear i el contingut en DNA. El motiu d'aquesta endoreduplicació no està clar, podria servir per tenir còpies dels gens responsables de la síntesi i acumulació de productes de reserva, funció principal de l'endosperma, o simplement ser una manera d'augmentar les dimensions de l'òrgan (Young i Gallie, 2000). A continuació s'inicia la síntesi i l'acumulació de proteïnes de reserva, inicialment a la regió central de l'endosperma i finalment, a la regió perifèrica. S'inclouen gens que codifiquen per l' α -Zeïna o la β -Zeïna, les proteïnes de reserva més abundants de l'endosperma.

Durant la maduració l'escutel augmenta les seves dimensions fins a adquirir la forma de triangle o escut. En els estadis finals de l'embriogènesi, l'escutel embolcalla pràcticament tot l'eix embrionari, òrgan en què s'acumulen preferentment lípids, fitina i fòsfor que s'acumulen dins els cossos proteïcs (Loewus i Murthy, 2000).

1.1.3- Etapa de dessecació i dormició

Al final de l'embriogènesi, l'embrió entra en una fase de deshidratació i dormició en la qual el desenvolupament s'atura (Gooldberg *et al.*, 1994; Meinke, 1995). L'embrió de blat de moro en aquesta etapa és com una planta en miniatura que consta de cinc o sis primordis foliars enrotllats al voltant del meristem apical, embolcallats i protegits pel coleòptil. Un sistema provascular s'estén a través del node escutelar fins a l'escutel, i un altre es troba a l'eix i als primordis foliars. L'arrel primària està ben desenvolupada, rodejada i protegida per la coleorriza. També es poden trobar primordis d'una o dues arrels secundàries.

1.2- Aproximació genètica a l'estudi de l'embriogènesi

El desenvolupament de l'embrió es produeix sota un estricte control genètic, regulat per una gran quantitat de gens que han de funcionar de manera coordinada i organitzada tant temporalment com espacialment (Park i Harada, 2008). S'han identificat mutants, principalment a *Arabidopsis* però també al blat de moro, que afecten algun dels processos, de

manera que s'utilitzen per identificar gens amb un paper essencial durant el desenvolupament de l'embrió (Goolberg *et al.*, 1994). Els mutants també permeten determinar quins processos funcionen de manera independent, quins estan relacionats entre sí, i entendre els diferents esdeveniments (Meinke, 1995). Alguns dels mutants es poden classificar en mutants *emb* (*embryo specific*), en què està únicament afectat el desenvolupament de l'embrió, i mutants *dek* (*defective kernel*), en què la mutació afecta el desenvolupament tant de l'endosperma com de l'embrió (Clark i Sheridan, 1991, 1993; Heckel *et al.* 1999).

L'anàlisi molecular aplicada a l'estudi de l'embriogènesi està dirigida especialment a la caracterització de gens amb un paper clau durant aquest període i que es puguin utilitzar com marcadors que permetin revelar l'identitat d'un determinat òrgan, l'estat de diferenciació d'un teixit o l'ordre d'un procés (Becker *et al.*, 2014). Moltes vegades alguns gens es comencen a expressar en un determinat tipus cel·lular o regió abans que les cèl·lules es diferenciïn o es puguin detectar amb l'observació histològica, per la qual cosa els marcadors representen el primer indici de diferenciació o especificació. Alguns exemples impliquen gens relacionats amb el cicle cel·lular, metabolisme, síntesi de productes de reserva o gens relacionats amb la dessecació (Sreenivasalu i Mobus, 2013). A més, aquests marcadors són molt útils a l'hora de caracteritzar una mutació. Hi ha vegades que el fenotip d'un mutant és tan aberrant que gràcies a l'existència dels marcadors ha estat possible saber l'esdeveniment afectat per la mutació, la identitat i l'estat de diferenciació dels teixits (Topping i Lindsey, 1997).

1.3- Aproximació transcriptòmica a l'estudi de l'embriogènesi

La transcriptòmica és l'estudi dels diferents RNAs presents a una cèl·lula, teixit o òrgan en un determinat moment. Permet identificar els gens involucrats en un determinat procés, i els processos que tenen lloc en un teixit mitjançant el reconeixement de les funcions dels gens que s'expressen (Lee *et al.*, 2002; Vernoud *et al.*, 2005; Alexirov *et al.*, 2009; Teoh *et al.*, 2013). Aquestes tècniques es poden aplicar a l'estudi de la formació dels embrions de les plantes. Per exemple, Vernoud *et al.*, (2005) descriu els diferents gens que s'expressen a diverses etapes de la formació de l'embrió i els relaciona amb mutants caracteritzats. Aquests tipus d'estudis han permès identificar grups de gens amb patrons d'expressió similars típics de les diferents etapes de l'embriogènesi. Les tècniques transcriptòmiques han variat molt en els darrers anys, passant de la seqüenciació individual de cDNAs a la seqüenciació de ESTs, les micromatrius i, en la actualitat, la seqüenciació massiva de mRNAs mitjançant seqüenciadors de darrera generació. La transcriptòmica ha esdevingut una gran eina amb un enorme potencial per estudiar l'embriogènesi. Per exemple, la transcriptòmica ha permès determinar que en embrions de 15 DAP (fase coleoptilar, **Figura I1**) s'expressen gens relacionats amb microtúbuls, activitat motora de microtúbuls, moviments i processos basats en microtúbuls, citoesquelet, etc. En embrions de 21 DAP (estadi II de maduració, **Figura I1**) es troben gens que codifiquen components cel·lulars, processos i funcions moleculars biològics associats

amb proteïnes com oligomerització de proteïnes, complexos de DNA-proteïna com respostes a estrès. En embrions de 21 DAP (estadi III de maduració, **Figura I1**) es troben gens que codifiquen proteïnes de reserva (Teoh *et al.*, 2013).

2- MICROTÚBULS

El citoesquelet és un entramat tridimensional de proteïnes que dóna suport intern a les cèl·lules, organitza les estructures internes i intervé en fenòmens de transport i divisions cel·lulars. Un dels seus components són els microtúbuls.

Els microtúbuls juguen un paper organitzador intern crucial en les cèl·lules eucariotes. Tenen nombroses funcions, com establir la disposició espacial de determinats orgànuls, formar un sistema de rails mitjançant el qual es poden transportar vesícules o macromolècules entre compartiments cel·lulars i són imprescindibles per a la divisió cel·lular ja que formen el fus mitòtic (Horio i Murata, 2014; Oda, 2015; Nakamura, 2015).

2.1- Estructura

Els microtúbuls són estructures tubulars de 25 nm de diàmetre exterior i uns 12 nm de diàmetre interior, amb longituds que varien des d'uns pocs nanòmetres a micròmetres, que s'originen en els centres organitzadors de microtúbuls i que s'estenen al llarg de tot el citoplasma. Estan formats per unes subunitats proteïques globulars anomenades tubulines que s'associen en dímers: α -tubulina i β -tubulina. Aquestes parelles s'ordenen mitjançant enllaços no covalents en files longitudinals que s'anomenen protofilaments. Cada protofilament té una polaritat estructural: la α -tubulina sempre formarà un extrem del protofilament i la β -tubulina l'altre (Hamada, 2014). Aquesta polaritat és la mateixa per a tots els protofilaments d'un microtúbul, i per la qual cosa el microtúbul esdevé una estructura polaritzada. S'anomena extrem (-) l'extrem on hi ha una α -tubulina i extrem (+) on hi ha β -tubulina (**Figura I2**). Els nous dímers de tubulina s'afegeixen amb una menor eficàcia a la α -tubulina que a la β -tubulina, de manera que l'extrem (+) és el lloc preferent de creixement del microtúbul i predomina la polimerització respecte la despolimerització. A l'extrem (-) predomina la despolimerització respecte la polimerització.

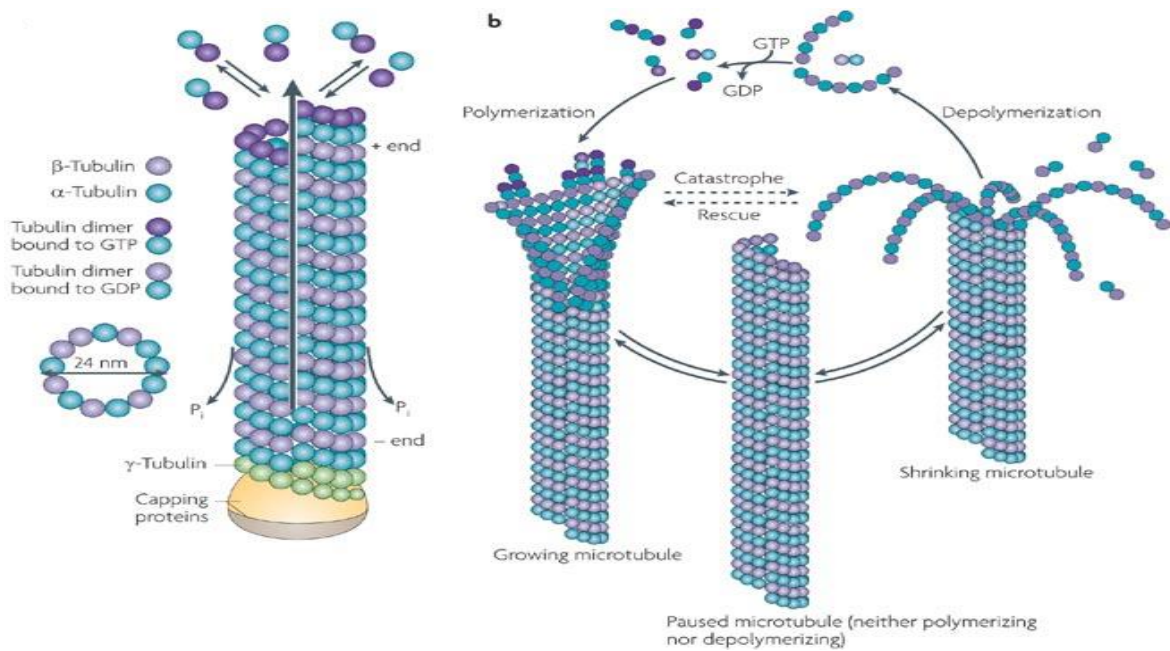


Figura 12. Estructura del microtúbul. **A**, representació de les subunitats α i β tubulina juntament amb les molècules de GTP i GDP. **B**, inestabilitat dinàmica dels microtúbuls. (Nature Reviews. Neuroscience).

Els microtúbuls estan contínuament polimeritzant-se i despolimeritzant-se i hi ha un anar i venir de dímers de tubulina entre el citosol i els microtúbuls. Això és important per a la reordenació del sistema cel·lular de microtúbuls quan és necessari. Un cop s'ha iniciat la formació d'un microtúbul, la incorporació de nous dímers de tubulina fa que el microtúbul creixi en longitud. Aquest creixement de vegades s'atura i el microtúbul comença a despolimeritzar-se de manera que en una mateixa cèl·lula alguns microtúbuls estan despolimeritzant-se (catàstrofe) i altres allargant-se (rescat) (**Figura 12**). Aquestes alternances entre polimerització i despolimerització reben el nom d'instabilitat dinàmica.

Els microtúbuls són normalment nucleats i organitzats per orgànuls anomenats centres organitzadors de microtúbuls, *microtubule-organizing centres (MTOCs)* (Yubuki i Leier, 2013). Als MTOC hi ha un altre tipus de tubulina, la γ -tubulina. La γ -tubulina es combina amb altres proteïnes per formar una estructura coneguda com el "complex d'anell γ -tubulina" (γ -Turc). Aquests és el lloc on comença la polimerització d'un nou microtúbul i on solen estar ancorats els seus extrems (-) (**Figura 13**). El principal MTOC en les cèl·lules animals és el centrosoma, el qual controla el nombre, localització i orientació dels microtúbuls en el citoplasma. En les cèl·lules vegetals, en no tenir centríols, no formen centrosomes típics com en les cèl·lules animals, però sí anells de γ -tubulina dispersos pel citoplasma o associats a l'embolcall nuclear.

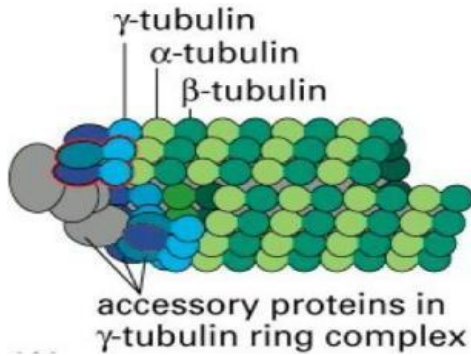


Figura I3. Representació de les subunitats α , β , γ i el complex γ -tubulina necessaris per la nucleació dels microtúbuls. (www.studyblue.com)

2.2- Proteïnes motores

Existeixen proteïnes que aprofiten la hidròlisi d'ATP per generar energia mecànica i desplaçar substàncies sobre els microtúbuls. La dineïna i la kinesina en són dos exemples (Briizzi i Wasteneys, 2013; Hamada, 2014a). L'estructura de la dineïna consta de dues cadenes pesades idèntiques que conformen dos caps globulars i un nombre variable de cadenes intermèdies i de cadenes lleugeres. La dineïna transporta vesícules i orgànuls des de (+) cap a l'extrem (-) del microtúbul, per la qual cosa necessita d'un complex proteic en el que destaca la dinactina. Per la seva banda la kinesina té una estructura similar a la de la dineïna i participa en moviments des de l'extrem (-) cap al (+) dels microtúbuls, sobre els quals es desplacen.

2.3- Fàrmacs que afecten als microtúbuls

Algunes drogues s'uneixen a les tubulines i modulen el seu estat d'activació, interferint amb la dinàmica dels microtúbuls. Atès que una de les funcions principals dels microtúbuls és la mitosi, aquestes drogues s'anomenen drogues antimitòtiques que es poden classificar en dos grups:

- Inhibidors de la polimerització. Inhibeixen la formació dels microtúbuls. És el cas de la vinblastina, colchicina, i d'alguns herbicides i antifungicides.
- Estabilitzadors de microtúbuls. S'uneixen a la tubulina ja formada i minimitzen la dissociació de la tubulina-GDP dels extrems dels microtúbuls. És el cas del paclitaxel (taxol) i la discodermolida.

Els microtúbuls són necessaris per a la mitosi, concretament per a la separació dels cromosomes abans de l'escissió en dues cèl·lules filles. En conseqüència, totes aquelles substàncies que inhibeixen la formació o trencament dels microtúbuls també inhibeixen la mitosi. Així en inhibir la polimerització del fus mitòtic inhibeixen la proliferació cel·lular. D'aquesta manera les cèl·lules detenen el cicle cel·lular i poden conduir a la mort cel·lular programada o apoptosi (Jordan *et al.*, 2004). Això té importants aplicacions en la lluita contra

el càncer, per la qual cosa s'han aïllat uns quants d'aquest inhibidors. La majoria s'uneixen a la tubulina soluble i/o directament al microtúbul (Dostál i Libusová, 2014).

2.4- Proteïnes associades a microtúbuls (MAPs)

Las proteïnes associades a microtúbuls, *microtubule-associated proteins* (MAPs) tenen una gran varietat de funcions, com ara la construcció o manteniment dels microtúbuls, o el transport de càrregues i molècules implicades en processos cel·lulars (Hamada, 2014b). Tradicionalment es considerava una proteïna com una MAP si es podia copurificar *in vitro* amb el microtúbul com a resultat d'una unió directa (Struk i Dhonukshe, 2014). L'etiquetatge de MAP pot ser confós si es descriu una proteïna que està lleugerament associada amb microtúbuls; per exemple, proteïnes que tenen un interacció indirecta o de transició amb microtúbuls, proteïnes que tenen colocalització *in vivo* amb microtúbuls, o proteïnes que tenen homologia a MAPs conegudes (Sedbrook, 2004).

Gardiner (2013) descriu al menys dotze famílies de MAPs a plantes, algunes amb més de deu gens. Aquesta classificació es basa principalment en comparacions de la seva seqüència, però les interaccions no han estat experimentalment demostrades en tots els casos, i, molt menys, les seves funcions.

Una de les característiques de les MAPs és la presència de gran quantitat de variants de *splicing* (Kozielski *et al.*, 2011) que poden tenir diferents funcions (Wang *et al.*, 2011). La presència d'aquestes variants també ha estat observada a les plantes, concretament a l'*Arabidopsis* (Marquez *et al.*, 2012).

3- DOMINIS PROTEÏCS

Un domini proteic és una unitat evolutiva independent que pot formar una proteïna amb un sol domini o ser part d'una proteïna amb múltiples dominis. El domini pot tenir una organització estructural, la qual cosa fa que sigui un component estable de l'estructura, o bé contribuir a la funció d'una proteïna, sol o en cooperació amb altres dominis, de manera que es diu que és funcional quan dóna lloc a una funció bioquímica determinada. Per entendre la funció dels dominis de les proteïnes és útil saber com han evolucionat i en quins tipus de proteïnes estan presents.

3.1- Domini LisH (*Lisencephaly type-1-like homology motif*)

El domini LisH va ser identificat per primera vegada a la proteïna LIS1 humana degut a que una mutació en el seu residu 33 produeix la malaltia de la lisencefàlia de Miller-Dieker, tipus I oral-facial-digital de Treacher Collins, de la qual prové el seu nom. El domini LisH consta de trenta-quatre aminoàcids. LisH es troba només en cèl·lules eucariotes, plantes incloses, i a humans es calcula en unes cent les proteïnes que contenen aquest domini (Emes i Ponting,

2001). Inicialment es va trobar a proteïnes involucrades en el moviment o dinàmica dels microtúbuls, per la qual cosa es va pensar que aquesta era la seva única funció. Més endavant s'ha vist que no és cert. Ara sabem que no és només aquesta la seva funció sinó que, en general, té una funció d'unió a proteïnes i dimerització (Emes i Ponting, 2001). La interacció amb els microtúbuls pot ser mitjançant la dimerització de la proteïna amb el domini LisH, mitjançant la unió amb la dineïna o bé per la unió amb els microtúbuls directament. Aquesta interacció pot tenir a veure amb la migració cel·lular, la nucleocinesi o la segregació dels cromosomes. Es requereix LIS1 per a diversos processos dineïna - microtúbuls com ara el manteniment de la integritat de Golgi, el transport perifèric de fragments de microtúbuls i l'acoblament del nucli i centrosoma. La inhibició de LIS1 afecta severament el transport de grans vesícules i orgànuls. En el fong *Aspergillus nidulans*, la interacció de l'homòleg de LIS1 amb la dineïna és necessària per a l'adequada distribució d'endosomes, peroxisomes i nuclis. LIS1 també es necessita per a l'activació de RhoGTPases i per la polimerització de l'actina.

El domini LisH té una estructura secundària amb dues hèlixs α (Emes i Ponting, 2001). Les hèlixs estan connectades en el vèrtex per un bucle G23Y24 molt conservat. La regió N-terminal és la responsable de la dimerització de manera antiparal·lela, en què alguns residus fortament conservats formen una interfície d'hèlix i d'aquesta manera un nucli hidròfob (Kim *et al.*, 2004; Mateja *et al.*, 2006; Gerlitz *et al.*, 2005; Delto *et al.*, 2015).

LisH es pot trobar associat a d'altres dominis com WD-40 SPRY, Kelch, AAA ATPasa, Ras GEF, o HEAT. Molts dels dominis associats també tenen funcions d'unió proteïna-proteïna, per la qual cosa es creu que moltes serveixen com a plataforma d'interacció amb diverses proteïnes (Reiner i Sapir, 2013). Per exemple, RanBPM humana conté dominis LisH, CTLH i SPRY i se sap que és una proteïna *scaffold* multimodular que interactua amb una gran varietat de proteïnes nuclears, citoplasmàtiques i proteïnes de membrana (Puverel i Tessarollo, 2013; Suresh *et al.*, 2012; Nishimoto, 1999). Nopp1400 humana conté un motiu LisH i es creu que funciona com una xaperona molecular, portant els complexos nucleolars ribonucleoproteics (snoRNPs) al nuclèol, on el RNA pre-ribosomal és sintetitzat, tallat, modificat químicament i acoblat en les subunitats dels ribosomes (He i DiMario, 2011). Treacle també és una proteïna nucleolar que conté el domini LisH en la part N-terminal actua com una xaperona (He i DiMario, 2011). Les proteïnes katanin i muskelin, contenen LisH i s'uneixen als microtúbuls i al citoesquelet respectivament (Delto *et al.*, 2015). La proteïna SIF2 de llevat forma part d'un complex (SET3) responsable de la repressió mitòtica dels gens. A SIF2 el domini LisH és necessari per formar dímers i tetràmers (Cerna i Wilson, 2005). La proteïna humana MAEA (*Macrophage erythroblast attacher*) conté els dominis LisH, CTLH i CRA, i juga un paper en la nucleació d'eritroblasts i en el desenvolupament dels macròfags madurs (Hanspal *et al.*, 1998).

El domini LisH també està present en proteïnes de plantes, tot i que no se sap massa de les seves funcions:

- La mutació de *fra2*, afecta l'homòleg de katanin en *Arabidopsis thaliana* i condueix a una disposició aberrant de les microfibril·les de cel·lulosa al llarg de la paret cel·lular en desenvolupament. Aquesta mutació produeix una reducció de l'elongació de les cèl·lules.
- TONNEAU, també en *Arabidopsis thaliana*, està involucrada en el control de l'organització dinàmica del citoesquelet (Azimzadeh *et al.*, 2008), i juga un paper important en l'organització dels microtúbuls corticals. Es localitza en el citoplasma i estructures del citoesquelet cortical, incloent la bia de la pre-profase i en els filaments que formen els microtúbuls a la interfase.
- LEUNIG, també de *Arabidopsis thaliana*, participa en la regulació del gen homeòtic floral AGAMOUS (Conner i Liu, 2000). La mutació de LEUNIG provoca expressions ectòpiques del mRNA de AGAMOUS en els dos verticils exteriors de la flor, provocant transformacions en els òrgans florals. LEUNIG es localitza en el nucli.
- Les proteïnes de la família de proteïnes de plantes TOPLESS (TPL) contenen els dominis LisH i CTLH. Estan involucrades en múltiples vies de regulació (Hao *et al.*, 2014), incloent senyalització d'hormones, manteniment dels meristems, inducció floral, estrès biòtic o regulació del rellotge circadià. Les proteïnes TPL no tenen activitat d'unió al DNA però interactuen amb factors de transcripció per reprimir l'expressió de gens en diversos processos mediat per el reclutament de les histones desacetilases en complexos de transcripció i canviant l'estat de la cromatina d'actiu a inactiu. La interacció amb els factors de transcripció depèn dels dominis LisH i CTLH.
- OsLIS-L1 d'arròs conté els dominis LisH, CTLH i nou repeticions WD40 (Gao *et al.*, 2012). Juga un paper important en la formació del gametòfit i en l'elongació del primer internodi en arròs. Mutants de OsLIS-L1 i OsLIS-L2 mostren nanisme, curta longitud de la panícula i una reducció de la fertilitat.

3.2- Domini CTLH (motiu C-terminal de LisH)

El motiu CTLH, de funció desconeguda, forma tres o quatre hèlixs α moltes vegades adjacents al motiu LisH però no sempre, com per exemple a LIS1 (Umeda *et al.*, 2003). En general, és present en proteïnes involucrades en el moviment de microtúbuls, migració cel·lular, nucleocinesi i segregació dels cromosomes. També es pot trobar associat a altres dominis com WD-40, SPRY, Kelch, AAA ATPase, RasGEF o HEAT. Algunes proteïnes que contenen el domini CTLH són RanBPM, Muskelin, TOPLESS, MAEA, OsLis-L1, ja descrites abans.

3.3- Domini CRA (motiu CT11-RanBPM)

El domini CRA o CT11-RanBPM és un domini d'interacció proteïna-proteïna present en proteïnes de cèl·lules eucariotes. Aquest domini sempre es troba en la posició C-terminal de les proteïnes i està format per uns cent aminoàcids. El domini CRA conté un senyal de localització nuclear (Lakshmana *et al.*, 2010). No se sap gaire de les seves funcions, però és

important per a la interacció de RanBPM amb la proteïna de retard mental X fràgil (FMRP) (Menon *et al.*, 2004).

4- COMPLEXES DE PROTEÏNES SCAFFOLD

4.1- Complexos proteics

Un complex de proteïnes és un grup de dues o més cadenes polipeptídiques unides per interaccions no covalents que juntes realitzen una àmplia gamma de funcions biològiques (Price i Stevens, 1999; Hartwell *et al.* 1999), una de les quals és la d'actuar com *scaffold* (Good *et al.*, 2011). Els complexos proteics juguen, doncs, papers molt importants en les cèl·lules (Wang *et al.*, 2009). Un alt nombre de gens essencials codifiquen proteïnes que pertanyen a complexos proteics (Hart *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 2007) i les plantes no són una excepció (Dedecker *et al.*, 2015).

4.2- Complexos scaffold

Una definició estricta d'un complex *scaffold* o d'una proteïna *scaffold* és complicada. En general, s'accepta que un complex *scaffold* és un conjunt de proteïnes que interactuen amb moltes d'altres proteïnes de funcions variades i que tenen una funció reguladora essencial. Dit en altres paraules, són grups de proteïnes que serveixen perquè d'altres proteïnes es situïn de tal manera que puguin complir la seva tasca. D'això ve el nom de *scaffold*, que en català vol dir bastida.

L'organització espacial i temporal de les molècules és crítica per a la coordinació de les diferents activitats que es duen a terme dins d'una cèl·lula. En un nombre creixent de processos de senyalització biològica s'han trobat proteïnes *scaffold* que juguen un paper destacat en l'agrupament dels components moleculars rellevants (Good *et al.*, 2011). De les proteïnes *scaffold* se sap que regulen processos cel·lulars importants mitjançant la interacció amb altres proteïnes per modular respostes moleculars. Encara que la majoria de proteïnes *scaffold* utilitzen un mecanisme d'immobilització senzill per augmentar l'eficiència de la interacció entre les diverses unitats associades, també poden exercir un control al·lostèric complex sobre les seves parelles i poden ser en si mateixes l'objectiu de la regulació. Les proteïnes *scaffold* ofereixen una estratègia simple i flexible per a la regulació de la selectivitat de les rutes metabòliques, controlant els productes de sortida i l'assoliment de noves respostes per part dels components de senyalització preexistent.

Les proteïnes que componen els complexos *scaffold* són extremadament diverses però tenen en comú la presència de múltiples dominis d'interacció proteïna-proteïna. La composició de

dominis i el seu ordre poden variar àmpliament depenent de les rutes en que s'organitzen. Així, les proteïnes *scaffold* són plataformes flexibles d'unió de proteïnes.

Les proteïnes *scaffold* poden coordinar cascades de senyalització com, per exemple, les quinases de mamífers activades per mitògens (MAPK) o GTPases (Choi *et al.*, 1994), que regulen la comunicació intracel·lular cèl·lula-cèl·lula com ha estat demostrat amb les sinapsis neuronals (Funke *et al.*, 2005).

En un nombre creixent de casos, les proteïnes *scaffold* són una diana de regulació, amb què es poden activar i desactivar les rutes metabòliques mitjançant la seva modificació (McKay *et al.*, 2009). Un dels avantatges d'utilitzar proteïnes *scaffold* per organitzar els complexos de senyalització és la connexió de proteïnes. Així, una funció pot ser fàcilment regulada per senyals externs que modifiquen associacions d'altres proteïnes amb la proteïna *scaffold*. Processos de fosforilació, ubiquitinació, sumolització,... poden bloquejar o activar les interaccions proteïna-proteïna o interaccions proteïna-lípid i així regular una ruta (Strickfaden *et al.*, 2007).

En alguns casos les proteïnes *scaffold* exerceixen els seus efectes a través de la simple immobilització o bé al reduir la disponibilitat d'una proteïna necessària en un orgànul cel·lular concret o de molècules associades la qual augmenta la concentració efectiva d'enzims i els seus substrats en un lloc molt concret de la cèl·lula. D'altres proteïnes *scaffold* dirigeixen l'ubiquitinació d'altres proteïnes i, per tant, la seva degradació.

Potser la característica més sorprenent de les proteïnes *scaffold* és el seu potencial per facilitar l'aparició o evolució de noves rutes. El *scaffold* és una entitat codificada genèticament per controlar la interacció dels components de senyalització i la creació de proteïnes noves o recombinats *scaffold* que podrien proporcionar un mecanisme senzill per vincular components preexistents a rutes noves (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Així les propietats de les proteïnes *scaffold* poden ser utilitzades per modificar o crear noves rutes metabòliques artificialment. Per exemple, es va crear una proteïna *scaffold* artificial associada a tres enzims en una ruta metabòlica sintètica en *Escherichia coli* i augmentava la producció del mevalonat en un factor de cent (Dueber *et al.*, 2009).

Les plantes també contenen proteïnes *scaffold* associades a diverses funcions, com ara la regulació de la cadena respiratòria (Gehl i Sweetlove, 2014; Van Aken *et al.*, 2010), la regulació de diferents aspectes del metabolisme (Couturier *et al.*, 2013), la defensa contra patògens (Carvalho Ade i Gomes, 2011; Jarsch i Ott, 2011),...

5- COMPLEX PROTEIC GID/MRCTLH

El complex de proteïnes GID/MRCTLH (Muskelin/RanBPM/CTLH) està present en tots els organismes eucariotes, incloent-hi les plantes, però no en els Procariotes (Francis *et al.*, 2013). Va ser descobert per primera vegada en el llevat associat a la inactivació de la gluconeogènesi (Menssen *et al.*, 2012), però s'ha estudiat més àmpliament en els éssers humans observant-se que participa en molts processos (Suresh *et al.*, 2012). Una de les qualitats més característiques d'aquest complex és la presència de múltiples proteïnes amb dominis LisH i CTLH.

5.1- Complex GID en llevat

El complex GID de llevat és un complex format per set proteïnes que va ser inicialment descobert per la seva implicació en la regulació de la gluconeogènesi (Santt *et al.*, 2008). Més concretament, activa la ubiquitin ligasa i intervé en la degradació via proteosoma de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) i la malat deshidrogenasa c (c-MDH). Tot i que la seva participació en la regulació de la gluconeogènesi és la funció ha estat més estudiada, se sap que juga un paper anti-apoptosi en front de l'exposició a la toxina K1 killer (Page *et al.*, 2003).

Quan la glucosa no està disponible en el medi, el llevat la sintetitza per la via de la gluconeogènesi. L'enzim clau d'aquesta via és la FBPasa que catalitza l'etapa de desfosforilació de fructosa-1,6-bisfosfat a la fructosa-6-fosfat (Carlson, 1999). Quan aquestes cèl·lules tornen a trobar un medi ric en glucosa la FBPasa s'inactiva ràpidament mitjançant dos mecanismes: la degradació vacuolar que depèn de l'absorció de FPBase en vesícules controlada per proteïnes VID (Huang i Chiang, 1997) i la degradació pel proteosoma que necessita de proteïnes GID (Hämmerle *et al.*, 1998). L'elecció d'una o altra ruta depèn de les condicions de cultiu (Alibhoy *et al.*, 2012). A la ruta GID, la poliubiquitinació de la FPBase es realitza mitjançant un complex de proteïnes d'uns 600 kDa, el complex GID (Regelmann *et al.* 2003). En condicions gluconeogèniques el complex GID està compost per sis membres (GID1, GID2, GID3, GID5, GID7, GID8 i GID9), però després de l'addició de glucosa, GID4 s'uneix el complex i desencadena l'ubiquitinació de la FPBase (Santt *et al.* 2008). La supressió de qualsevol d'aquests set gens GID condueix a una pertorbació de la degradació de la FBPasa pel proteosoma (Regelmann *et al.*, 2003; Hämmerle *et al.*, 1998). L'acumulació de les proteïnes GID2 i GID3 està regulada per la glucosa del medi a nivell de transcripció, però els nivells de GID1, GID5, GID7, GID8 i GID9 no estan regulats per la glucosa (Derisi *et al.*, 1997; Pfirrmann, 2006).

Les proteïnes del complex GID contenen múltiples dominis responsables d'interaccions proteïna-proteïna (Santt *et al.*, 2008):

- LisH (GID1, GID7 i GID8).
- CTLH (GID1, GID2, GID8 i GID9).
- CRA (GID1 i GID8).
- SPRY (GID1).
- WD40 (GID7).
- Repeticions d'Armadillo (GID5).

A més, GID2 i GID9 contenen el domini RING responsable de l'activitat ubiquitina ligasa E3 (Umeda *et al.*, 2003, Kobayashi *et al.*, 2007). Les interaccions entre tots aquests components es van determinar mitjançant assaigs de coimmunoprecipitació (Menssen *et al.*, 2012) (**Figura I4**):

- GID1 i GID8 són els components centrals del complex. Les dues proteïnes poden interactuar fortament en absència de totes les altres proteïnes GID. La seva interacció depèn dels seus dominis LisH.
- GID7 s'uneix a GID1. Aquesta interacció depèn del domini CTLH de GID1.
- GID9 s'uneix el complex mitjançant els dominis CTLH i CRA de GID8.
- GID5 necessita GID9 per unir-se al complex.
- GID4 s'uneix a GID5.
- GID2 s'uneix a GID9.
- La interacció entre GID1 i GID8 és necessària per permetre la interacció de GID8 amb GID9/GID2.
- La interacció entre GID1 i GID8 és necessària per permetre la interacció de GID9 amb GID5.

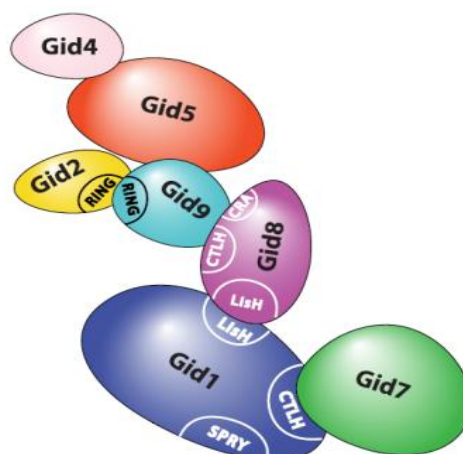


Figura I4. Model de la topologia del complex ubiquitina ligasa GID (Menssen, *et al.*, 2012).

En conseqüència:

- GID1 i GID8 actuen com *scaffold* per a les altres subunitats.
- GID1 és extremadament important ja que l'alteració d'aquesta proteïna modifica tot el complex i inhibeix la seva activitat ligasa.
- L'activitat ligasa resideix en GID2 i GID9 que estan situats a la perifèria del complex. Aquesta ubicació facilita la interacció amb l'ubiquitina.
- La unió de GID4 a GID5 indueix un canvi conformacional que produeix un increment de l'activitat ubiquitin-ligasa.

Veiem ara una descripció del que es sap de cadascun dels components.

5.1.1- GID1

GID1 juga un paper important en el complex GID però també és un component necessari de la degradació de la FPBasa per endocitosi (ruta Vid, *vacuole import i degradation*). Per aquesta raó també es conegut com VID30 (Alibhoy *et al.*, 2012). La ruta Vid utilitza les primeres etapes de l'endocitosi per lliurar les proteïnes a la vacuola (Brown *et al.*, 2010). La polimerització de l'actina també és necessària en aquests estadis primerencs (Galletta i Cooper, 2009). VID30 interactua amb algunes proteïnes del complex Vid (Vid24 i Sec28), però no amb la FPBase (Alibhoy *et al.*, 2012). GID1/VID30 també és necessari per a la degradació induïda de la rapamicina té una alta afinitat amb el transportador d'hexosa Hxt7 (Snowdon *et al.*, 2008) i intervé en la regulació transcripcional de diversos gens implicats en el metabolisme del nitrogen (Merwe *et al.*, 2001).

GID1/VID30 s'expressa constitutivament i conté dominis SPRY, LisH, CTLH i CRA. LisH i CTLH són ambdós necessaris per a la degradació FPBase i per a l'unió de VID24 i SEC28 (Alibhoy, 2012). GID1/VID30 està present en nombroses ubicacions de la cèl·lula com vesícules Vid, actina, endosomes i vacuoles (Alibhoy, 2012). Delecions de GID1 condueixen a un bloqueig de la poliubiquitinació de la FPBasa (Pfaffmann, 2006).

5.1.2- GID2

GID2 es va identificar com una proteïna RING-*finger* que proporciona activitat ubiquitina ligasa al complex GID. GID2 conté dominis LisH, CTLH, CRA i RING i interactua amb GID9. La supressió dels dominis LisH o CTLH retarda la degradació de FPBase però no l'unió de GID9 (Braun *et al.*, 2011) (**Figura I5**).

5.1.3- GID4

No conté cap domini de proteïna conegut. Com GID1, també està implicat en l'endocitosi de la degradació de FPBase (VID), de manera que també es diu VID24 (Regelmann *et al.*, 2003).

5.1.4- GID5

Conté repeticions Armadillo. Com GID1, també està implicat en la degradació de FPBase per endocitosi de manera que també es diu VID28 (Regelmann *et al.*, 2003).

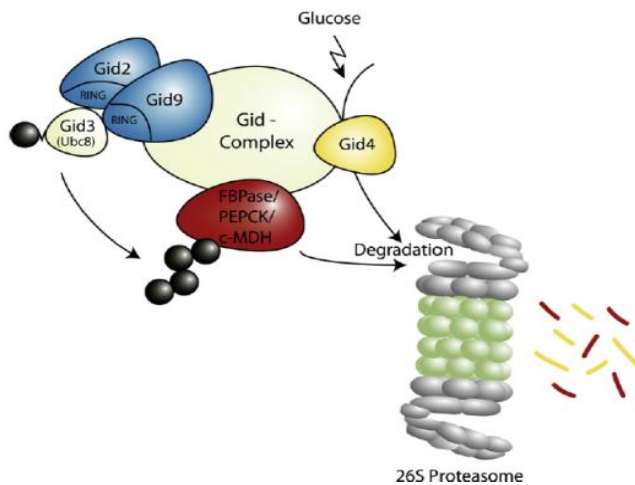


Figura I5. El complex Gid desencadena la poliubiquitinació i en conseqüència, la degradació proteasomal de l'enzim gluconeogenètic FBpase, PEPCK i c-MDH. Després de l'addició de glucosa, Gid4 apareix i activa la ligasa E3. El dímer Gid2 i Gid9 juntament amb Gid3 (enzim conjugat d'ubiquitina Ubq8), la proteïna substrat poliubiquitinil·la i el desencadenant de la degradació pel proteosoma. (Braun *et al.*, 2011)

5.1.5- GID7

GID7 conté un domini LisH i repeticions WD40. La supressió de GID7 condueix a un bloqueig en la poliubiquitinació de la FPBase (Pfirschmann, 2006).

5.1.6- GID8

GID8 conté els dominis LisH, CTLH i CRA. A més del seu paper en la inhibició de la gluconeogènesi, GID8 també ha estat involucrat en la regulació del cycle cel·lular. La sobreexpressió de GID8 accelera la iniciació de la replicació del DNA (Pathak *et al.*, 2004). Les cèl·lules que no tenen GID8 retarden la iniciació de la replicació del DNA i les cèl·lules s'engrieixen. GID8 interactua amb DCR2, una fosfoesterasa implicada en la regulació del cycle cel·lular.

5.1.7- GID9

GID9 conté els dominis LisH, CTLH, CRA i *finger* RING. Quan es muta el domini *finger* RING la ubiquitinació i degradació de FPBase falla (Braun *et al.*, 2011).

5.2- Complex MRCTLH en humans

Molts dels components del complex GID tenen homòlegs amb el genoma humà (**Taula I1**): GID1, GID2, GID4, GID5, GID7, GID8 i GID9 són homòlegs en l'organització dels seus dominis i en la seqüència de les proteïnes humanes RanBPM (RanBP9), Rmnd5a (p44CTLH), c17orf39, ARMC, WDR26, TWA1 (CT11, Bwk1, c20orf11) i MAEA (HLC10, EMLP, EMP, HLC-10, PIG5)

(Kobayashi *et al.*, 2007). En general, els components dels complexos de llevat GID1, GID8 i GID9 són notablement més llargs que els homòlegs d'humans (Francis *et al.*, 2013).

En humans TWA1, Ramd5a, MAEA, RanBPM i Armc8 formen un complex de proteïnes juntament amb Muskelin que no té homologia en llevat, però que sembla reemplaçar GID7 (Kobayashi *et al.*, 2007). c17orf39 (homòleg a GID4) i WDR26 (homòleg a GID7) no han estat identificats com part del complex d'humans (Kobayashi *et al.*, 2007). El complex de proteïnes d'humans va ser anomenat MRCTLH per la presència de Muskelin, RanBPM i cinc proteïnes amb domini CTLH (Francis *et al.*, 2013).

DOMINIS	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
SPRY-LisH-CTLH-CRA	GID1 (VID30)	RanBP9 (RanBPM)
LisH-CTLH-vRING	GID2	RmnD5a (p44CTLH)
Globular	GID4	C17orf39
ARM	GID5	ARMc8
LisH-CTLH-WD40	GID7	WDR26
LisH-CTLH-CRA	GID8	TWA1 (CT11, Bwk1, c20orf11)
LisH-CTLH-CRA-vRING	GID9	MAEA (HLC10,EMLP, EMP, HLC-10,PIG5)
Discoïdin-LisH-CTLH-WD40	-----	Muskelin

Taula 11- Correspondència entre els components dels complexos GID / MRCTLH del llevat *S.cerevisiae* i humans (Francis *et al.*, 2013).

Els gens que codifiquen els components del complex MRCTLH s'expressen en molts teixits (Francis *et al.*, 2013). El complex humà MRCTLH també conté proteïnes amb dominis RING-ligasa, per la qual cosa es suposa que també ha d'estar involucrat en els processos de degradació de proteïnes via proteosoma. La major part de la informació disponible es refereix a possibles funcions dels components individuals i no de tot el complex, però se sap que el complex MRCTLH participa en diverses funcions com:

- Regulació de la morfologia cel·lular (Valiyaveetil *et al.*, 2008.).
- Degradació de la α -catenina pel proteosoma (Suzuki *et al.*, 2008).
- Modulació de l'endosoma i degradació dependent de lisosoma de proteïnes ubiquitinades a través de la interacció amb HRS (factor de creixement de hepatòcits regulats pel substrat tirosina quinasa) (Tomaru *et al.*, 2010).

Veiem el que es sap dels components individualment.

5.2.1- RanBPM

RanBPM (RanBP9) va ser descobert per primera vegada com a proteïna d'unió a Ran i al centre d'organització de microtúbuls (MTOC) que participa en la nucleació de microtúbuls (Nakamura *et al.*, 1998). Més tard, es va demostrar que la proteïna real era més llarga i que la RanBPM completa interacciona de manera feble amb Ran i no es localitza al MTOC (Nishitani *et al.*, 2001).

RanBPM conté diferents dominis que proporcionen potencials localitzacions nuclears i llocs d'interacció proteïna-proteïna (Salemi *et al.*, 2015):

- Domini ric en prolina (PRD) a l'extrem N-terminal que té un efecte dominant en la localització de RanBPM.
- Domini SPRY (Spore lysis A i ryanoine receptor) per a la interacció proteïna-proteïna.
- Domini LisH.
- Domini CTLH.
- Domini CRA.
- Un senyal de localització nuclear (NLS) situat a l'interior del domini CRA.
- Un segon motiu a l'extrem C-terminal que contribueix feblement a la localització nuclear.

Aquests dominis confereixen a RanBPM una elevada capacitat per unir-se a moltes altres proteïnes i, de fet, diversos estudis han demostrat l'associació de RanBPM a un ampli ventall de proteïnes. Una revisió recent inclou prop de cinquanta interaccions amb proteïnes, incloent-hi aquelles que són part del complex MRCTHL (Suresh *et al.*, 2012). Aquesta alta capacitat que té la proteïna per unir-se suggereix que RanBPM pot actuar com *scaffold*. RanBPM pot unir-se a una varietat de receptors de la superfície cel·lular i dianes intracel·lulars.

RanBPM està ben conservada en organismes eucariotes excepte en alguns grups de fongs, la qual cosa suggereix que pot jugar un paper important (Francis *et al.*, 2013).

RanBPM s'expressa en gairebé totes les línies de cèl·lules i teixits, especialment al cervell, cor, ronyó i músculs esquelètics (Hafizi *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). No obstant això, no se sap si els diferents teixits expressen diferents formes de RanBPM que podrien interactuar amb diferents proteïnes donant lloc a funcions diverses.

RanBPM és una proteïna relativament estable, amb una vida mitjana estimada de 99 min (Ideguchi *et al.*, 2002). S'ha descrit que està implicada en la ubiquitinació a través de la UPP (Ideguchi *et al.*, 2002).

La localització subcel·lular de RanBPM varia depenent del tipus de cèl·lula i estat de diferenciació. En les cèl·lules que es divideixen ràpidament RanBPM, estar localitzada principalment al citosol i al nucli, mentre que en les cèl·lules diferenciades es troba prop de la superfície interna de la membrana plasmàtica o associada amb els elements del citosquelet

(Denti *et al.*, 2004; Seebahn *et al.*, 2008; Valiyaveetil *et al.*, 2008). RanBPM colocalitza parcialment amb els microtúbuls i s'associa amb α -tubulina. Al nucli, una fracció significativa de RanBPM s'associa amb la cromatina. La localització subcel·lular de RanBPM depèn de les combinacions amb altres elements. Per exemple, RanBPM es localitza al nucli durant l'apoptosi (Gong *et al.*, 2009).

La fosforilació de RanBPM afecta la seva ubicació a la membrana cel·lular (Denti *et al.*, 2004). La fosforilació de RanBPM està regulada per estímuls com la radiació ultraviolada (UV) o el xoc osmòtic (Denti *et al.*, 2004). L'estat de fosforilació de RanBPM té un paper significatiu en la determinació de la seva localització en les cèl·lules. La major part de la RanBPM no fosforilada es troba soluble en el citoplasma, mentre que les formes fosforilades se situen a la membrana cel·lular (Denti *et al.*, 2004).

La regió N-terminal de RanBPM té una distribució similar a la proteïna completa però la C-terminal es localitza en petites partícules en el citoplasma i és absent en el nucli (Francis *et al.*, 2013).

A continuació es fa un breu resum de les funcions en què RanBPM està involucrada, bé com a part del complex MRCTL o no:

- REGULACIÓ DE L'ESTABILITAT DE PROTEÏNES: el nivell de RanBPM regula l'estabilitat d'altres proteïnes (Francis *et al.*, 2013). RanBPM és part del complex MRCTLH que conté proteïnes amb activitat ubiquitin ligasa, s'uneix a l'enzim deubiquitin (DUB) USP11 (Ideguchi *et al.*, 2002) i també interactua amb l'enzim SUMO E2, Ubc9 i promotors de sumolització del factor de transcripció viral Rta (Chang *et al.*, 2008).
- REGULACIÓ D'EXPRESSIÓ DE GENS: RanBPM interactua amb diversos factors de transcripció i dona lloc a la inducció o repressió de la transcripció d'alguns gens (Atabakhsh *et al.*, 2012b) com el receptor de l'hormona tiroïdal (TR) (Poirier *et al.*, 2006), activador de la proteïna-1 (AP-1) (Denti *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006), etc.
- DIVISIÓ CEL·LULAR: RanBPM interactua amb proteïnes implicades en la regulació de la divisió cel·lular com PBGD, CITK, YPEL5 i inhibeix la proliferació cel·lular mitjançant Mgl-1 i la migració cel·lular (Suresh *et al.*, 2012).
- MORFOLOGIA CEL·LULAR, ADHESIÓ I MIGRACIÓ: RanBPM interactua amb nombrosos receptors de la superfície cel·lular i amb proteïnes d'adhesió cel·lular tenint un paper important en la regulació de la forma cel·lular, la disposició, la polaritat i la proliferació cel·lular. Algunes d'aquestes interaccions són similars a la produïda per Muskelin (Suresh *et al.*, 2012). RanBPM interactua amb MET, una proteïna tirosina quinasa; la sobreexpressió de RanBPM fa augmentar la senyalització de MET que podria ser una causa de càncer (Suresh *et al.*, 2012).
- MOVIMENT DELS MICROTÚBULS: RanBPM interactua amb β 1-tubulines durant la divisió cel·lular (Salemi *et al.*, 2014).

- HOMEOSTASI CEL·LULAR: RanBPM té un paper crucial en la modulació de funcions de proteïnes neuronals per mantenir l'homeòstasi cel·lular. RanBPM té un paper clau en la modulació de la Cav3.1 T-type Ca^{2+} mitjançant rutes de canals de senyalització i s'uneix a STC2 (Stanniocalcin 2) una hormona glicoproteïca implicada en l'homeòstasi de calci i fòsfat (Suresh *et al.*, 2012).
- RESPOSTES A L'ESTRÈS: RanBPM ha estat identificada com una fosfoproteïna i la seva fosforilació s'incrementa en resposta a l'estrès com el xoc osmòtic, la llum ultraviolada (UV) i la radiació ionitzant (IR) (Salemi *et al.*, 2014). La radiació ionitzant (IR) promou la relocalització de RanBPM en la regió perinuclear on colocalitza amb components de l'agresoma, ubiquitina, dineïna i HDAC6. RanBPM es localitza en agresomes després del tractament amb l'inhibidor del proteosoma MG132 i el etopòsid, un agent que danya el DNA.
- MORFOGÈNESI NEURONAL: RanBPM interactua amb la citron quinasa (CITK) i regula la producció de neurones piramidals (Chang *et al.*, 2010). RanBPM interactua amb quinases relacionades amb *minibrain* (Zou *et al.*, 2003) i amb Tip60, una proteïna involucrada en la malaltia d'Alzheimer (Domingues *et al.*, 2014).
- DESENVOLUPAMENT DE L'ESQUELET: RanBPM actua com lligant per al factor d'intercanvi de nucleòtids Rho-guanina (Rho-GEF) que és un domini de la regulació de la miofibril·logènesi (Suresh *et al.*, 2012).
- GAMETOGENÈSI: RanBPM es essencial per al desenvolupament normal de les gònades en ambdós sexes (Suresh *et al.*, 2012).
- APOPTOSI: RanBPM regula diversos aspectes de l'apoptosi (Suresh *et al.*, 2012; Atabakhsh *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2013; Atabakhsh *et al.*, 2012a; Mikolajczyk *et al.*, 2003).

5.2.2- TWA1

TWA1 va ser inicialment identificada com una proteïna que interacciona amb RanBPM, localitza en el nucli, on es troba a prop dels porus nuclear, però que es distribueix en el citoplasma quan s'expressa Muskelin (Umeda *et al.*, 2003). TWA1 es troba a prop dels porus nuclears i aquesta localització no es veu afectada per la supressió del domini LisH (Francis *et al.*, 2013). El gen *twa1* s'expressa en gairebé tots els teixits adults (Umeda *et al.*, 2003). TWA1 és present a tots els Eucariotes (Francis *et al.*, 2013). TWA1 podria funcionar com una proteïna *scaffold* dins del complex MRCTLH.

5.2.3- RMND5A

RMND5A conté dominis LisH, CTLH, CRA i RING-ligasa (Pfaffmann *et al.*, 2015). RMND5A és l'ortòleg humà del GID2 de llevat, però en mamífers ve codificada per dos gens anomenats RMND5A i RMND5B. RMND5A es localitza al citosol i al nucli, mentre que RMND5B és totalment citosòlic (Pfaffmann *et al.*, 2015). Només RMND5A és part del complex MRCTLH.

RMND5B s'associa a diversos enzims de conjugació d'ubiquitina (van Wijk *et al.*, 2009). És probable que les dues proteïnes funcionin com ligases d'ubiquitina. RMND5 es troba a tots els Eucariotes.

5.2.4- MUSKELIN

Muskelin (MKLN1 o TWA2) va ser descrita per primera vegada com a una proteïna intracel·lular que participa en l'adhesió cel·lular al domini C-terminal de la trombospondina-1. Muskelin conté un domini de discoidina N-terminal seguit de LisH, CTLH, un domini Kelch amb sis repeticions i un mòdul C-terminal. Muskelin no conté cap senyal de localització nuclear clàssica (NLS) (Delto *et al.*, 2015). El domini LisH de Muskelin a *Drosophila* té un paper important en el control de la seva localització subcel·lular (Adams, 2002).

Les proteïnes RanBPM i TWA1 son parelles d'unió amb Muskelin, de manera que forma part del complex MRCTLH (Kobayashi *et al.*, 2007; Umeda *et al.*, 2003).

Muskelin es transcriu en molts teixits (Prag *et al.*, 2007; Tagnauti *et al.*, 2007).

Muskelin participa en la regulació del procés de transport i organització del citoesquelet (Heisler *et al.*, 2011).

Una característica destacada de Muskelin és la seva capacitat per formar oligòmers *in vitro* (Kiedziarska *et al.*, 2008). LisH actua com a element de dimerització (Delto *et al.*, 2015). La pèrdua d'aquesta dimerització produeix la redistribució completa de Muskelin des del citoplasma fins al nucli (Delto *et al.*, 2015).

Muskelin interactua amb HO-1 (hemo oxigenasa-1), implicat fortament en la regulació de la morfologia cel·lular. HO-1 contraresta el procés oxidatiu i el dany inflamatori (Gueron *et al.*, 2014), i suprimeix la generació de ROS (Matsumoto *et al.*, 2006).

5.2.5- ARMc8

ARMc8 (homòleg de GID5) actua com a una molècula adaptadora i associada amb el complex MRCTLH com una proteïna perifèrica (Suzuki *et al.* 2008). ARMc8 interactua amb el complex α -catenin i regula la seva degradació pel proteosoma (Suzuki *et al.* 2008). ARMc8 promou la interacció del factor de creixement d'hepatòcits regulada per la tirosina quinasa (HRS) amb proteïnes ubiquitinades (Suzuki *et al.* 2008; Tomaru *et al.*, 2010).

5.2.6- MAEA

MAEA és homòlega a GID9. Va ser identificada com a proteïna d'unió de macròfags als eritoblasts (Soni *et al.*, 2008). En les cèl·lules no eritroides MAEA és una proteïna nuclear situada en partícules petites (Bala *et al.*, 2006). La part N-terminal (22 kDa) és sobretot

nuclear (partícules nuclears) i la C-terminal (23 kDa) forma grans agregats al citoplasma i es localitza també als nucleols (Francis *et al.*, 2013).

5.2.7- WDR26

La proteïna WDR26 conté els dominis LisH, CTLH i repeticions WD40, un patró que es troba en més d'una centena de proteïnes eucariotes. Els membres d'aquesta família estan involucrats en una varietat de processos cel·lulars, incloent la progressió del cicle cel·lular, la transducció de senyals, l'apoptosi i la regulació gènica (Olsen *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). WDR26 s'expressa en la majoria dels teixits humans però l'expressió és especialment alta al múscul esquelètic (Zhu *et al.*, 2005). WDR26 pot actuar com un regulador negatiu de la via de senyalització MAPK i juga un paper important en la transducció de senyal de la cèl·lula (Zhu *et al.*, 2005).

5.3- Complex MRCTLH a plantes

Els gens que codifiquen les proteïnes del complex MRCTLH estan presents en gairebé tots els genomes eucariotes amb petites diferències. Pel contrari, no es troben en les cèl·lules procariotes (Francis *et al.*, 2013) (**Figura I6**).

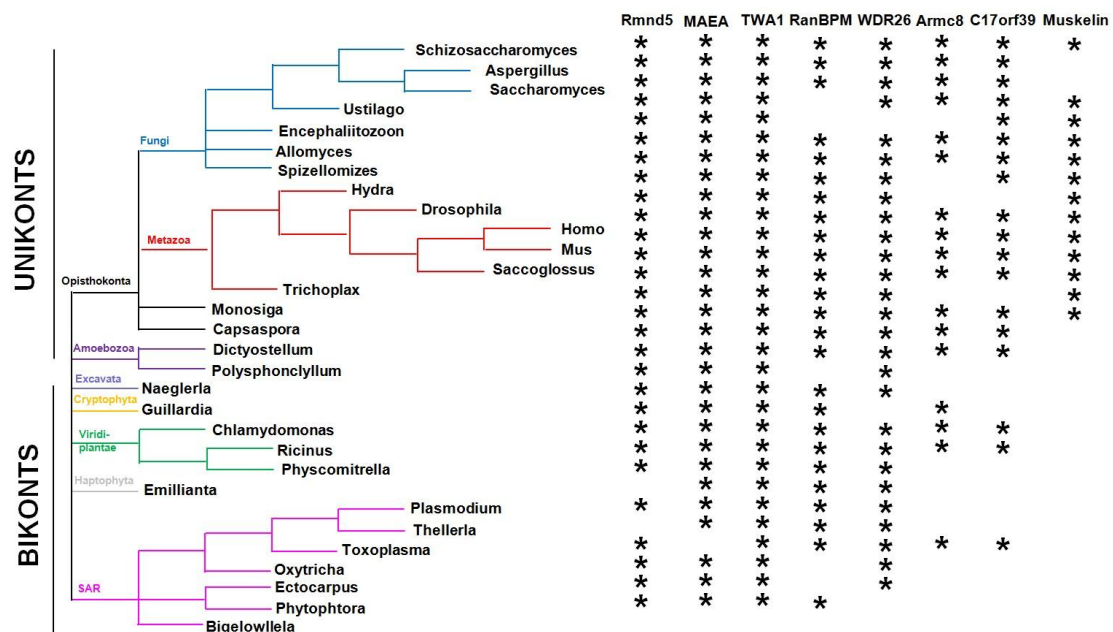


Figura I6. Els components dels complexos MRCTLH estan conservats als Eucariotes. Els asteriscs, *, indiquen les proteïnes del complex MRCTLH que codifiquen per les espècies indicades. Absència de les proteïnes del complex MRCTLH reflecteix l'absència dels homòlegs en altres espècies del mateix llinatge taxonòmic.

Els genomes dels vegetals contenen gens que codifiquen proteïnes homòlogues a les trobades al complex de llevat i humans, però han estat poc estudiades, tot i que algunes interaccions entre possibles components del complex GID/MRCTLH han estat demostrades en *Arabidopsis* (Tomaštková *et al.*, 2012). Els genomes de les espècies de plantes contenen múltiples gens que codifiquen proteïnes similars a les proteïnes del complex MRCTLH (**Taula I2 i I3**). En *Arabidopsis thaliana* el complex inclou homòlegs de RanBPM, TWA1, MAEA, Rmnd5 i WDR26.

Species	TWA1	RANBPM	RMND5	MAEA	WDR26	ARMC8	c17ORF39
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	2	3	3	1	4	1	0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3	5	3	1	3	1	1
<i>Brachypodium distachyon</i>	2	1	2	1	2	1	1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	2	1	1	0	1	0
<i>Glycine max</i>	5	3	4	2	9	3	2
<i>Medicago truncatula</i>	1	3	3	1	2	1	1
<i>Micromonas</i> sp. <i>RCC299</i>	1	1	1	0	1	0	0
<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica</i> Group	2	0	1	1	1	0	2
<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>	5	4	5	2	5	2	1
<i>Populus trichocarpa</i>	4	2	4	1	5	1	1
<i>Ricinus communis</i>	2	1	2	1	2	1	1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	2	2	1	4	3	2	1
<i>Sorghum bicolor</i>	2	1	1	1	1	1	1
<i>Vitis vinifera</i>	2	2	1	1	5	1	1
<i>Volvox carterii</i> f. <i>nagariensis</i>	1	3	1	1	1	0	1

Taula I2. Espècies de plantes amb múltiples gens codificant proteïnes del complex MRCTLH. S'indica el nombre de gens paralogs que codifiquen (font NCBI).

A les plantes només l'homòleg humà de RanBPM a *Arabidopsis thaliana* (AtRanBPM, At1g35470) s'ha estat estudiat amb certa atenció (Tomaštková *et al.*, 2012). La distribució de AtRanBPM es principalment citoplasmàtica amb un senyal feble al nucli. En les cèl·lules que no es divideixen AtRanBPM s'acumula a la regió perinuclear del citoplasma i, en les cèl·lules en divisió, la localització augment lleugerament a la zona del fus mitòtic i del fragmoplast (Tomaštková *et al.*, 2012). No colocalitza amb la γ -tubulina i tampoc es detecta en l'embolcall nuclear o en el fus dels microtúbuls (Tomaštková *et al.*, 2012).

Arabidopsis	Humà	Llevat
At1g35470	RanBPM	GID1/VID30
At3g55070	MAEA	GID9
At4g37880	RMD5	GID2
At1g61150	Twa1	GID8
At5g08560	WDR26	----

Taula I3. Proteïnes d'*Arabidopsis* amb més similitud amb membres del complex MRCTLH.

La proteïna AtRanBPM sedimenta en pèl·lets microsomals, la qual cosa indica que pot estar present en complexos d'alt pes molecular amb una massa entre 230 i 500 kDa (Tomaščíková *et al.*, 2012). Les proteïnes que cosedimenten amb AtRanBPM inclouen proteïnes amb els dominis CTLH, CRA, LisH, Ubox i WD40 (At1g61150, At3g55070, At4g37880, At5g08560, At5g43920), algunes de les quals son homòlogues a proteïnes humanes del complex MRCTLH. S'ha demostrat experimentalment que AtRanBPM interactua físicament amb algunes d'elles (Tomaščíková *et al.*, 2012). Aquestes dades suggereixen que els complexos MRCTLH també són presents a les plantes, al menys a *Arabidopsis*, amb característiques similars però en aquest moment les seves funcions son desconegudes. Es possible que en plantes existeixi més d'un complex MRCTLH ja que contenen un major nombre de còpies dels gens involucrats que en humans o llevat.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'exploració dels mecanismes que governen el desenvolupament de l'embrió als vegetals requereix de la identificació dels gens que s'expressen i les seves funcions. Les tècniques de seqüenciació massiva han permès identificar amb molt detall quins gens es transcriuen i en quines etapes i parts durant el desenvolupament de l'embrió. Estudis genètics han identificat certs gens importants per al govern de l'embriogènesi. No obstant això, la informació sobre el paper de la majoria dels gens expressats durant l'embriogènesi és encara molt limitada.

1- El primer objectiu d'aquesta tesi va ser la identificació d'alguns gens que es transcriuen durant les primeres etapes de desenvolupament de l'embrió de blat de moro (10 dies després de la pol·linització).

2- El segon objectiu va ser la selecció d'un petit nombre dels gens per realitzar un estudi dels seus patrons d'expressió i de les seves relacions filogenètiques que permetés valorar l'interés del seu estudi més profund: *mcy1*, *map65* i *licc1*.

3- El tercer objectiu es va centrar en la caracterització del gen *licc1* i de la proteïna que codifica, prestant una especial atenció a:

3.1- Estudi filogenètic

3.2- Patrons d'expressió del gen i d'acumulació de la proteïna

3.3- Identificació de proteïnes i components cel·lulars que interactuen amb LICC1.

3.4- Localització subcel·lular.

3.5- Efectes fenotípics de la seva sobreexpressió.

RESULTATS

RESULTATS

1-IDENTIFICACIÓ DE GENS D'EXPRESSIONI EN EMBRIÓ JOVE DE BLAT DE MORO

1.1- Una genoteca de cDNA d'embrió de 10 DAP de blat de moro

La primera etapa d'aquest treball va consistir en la construcció i seqüenciació d'una llibreria de cDNA d'embrions de blat de moro de deu dies després de la pol·linització (DAP). La llibreria es va constituir a partir de 1 µg de RNA total mitjançant el sistema "SMART™ cDNA Library Construction kit" (BD Biosciences). Per a la síntesi del cDNA es va usar la PCR de llarga distància (LD PCR) (Barnes 1994). El mètode està explicat en el punt 5 de l'apartat de Materials i Mètodes. Els cDNAs de cadascuna de les colònies per PCR es van amplificar fent servir els oligonucleòtids TOPO-F i TOPO-R que flaquegen els inserts. Els fragments amplificats es van analitzar en gels d'agarosa i es van seleccionar els clons que tingueren un insert amb una mida superior o igual a dos cent cinquanta parells de bases que a continuació es van seqüenciar. Per determinar a quin gen corresponien, les seqüències obtingudes es van comparar amb el genoma de blat de moro (<http://www.phytozome.net/maize.php>) (**Taula R1**).

Taula R1. Resultats de la seqüenciació de la llibreria de cDNAs d'embrió de 10 DAP. En color verd s'indiquen els cDNAs escollits per a estudis posteriors.

Nom del cDNA	pb insert	Gen	Anotació	Categoria funcional
MAA10	593	GRMZM2G315601	ESR2g2 protein	No determinat
MAA12	892	GRMZM2G095348	Vesicle coat complex COPI, beta subunit	Transport
MAA2	434	GRMZM5G881775	40S ribosomal protein S19	Traducció
MAA9	587	GRMZM2G041878	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAB5	354	GRMZM2G168762	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAB7	520	GRMZM2G154595	Malate dehydrogenase2	Metabolisme
MAC1	778	GRMZM2G332562	Amino acid transporter protein	Transport
MAC2	523	AC233901.1_FG004	Lupus LA protein related	No determinat
MAC4	332	GRMZM2G106331	DNase I-like superfamily protein	Divisió cel·lular i desenvolupament
MAC5	753	GRMZM2G136803	4-alpha-glucanotransferase	Metabolisme
MAC8	548	GRMZM2G096115	Serine/threonine-protein kinase PTK1.2/STK1.2	Procesament i degradació de proteïnes
MAC9	376	GRMZM2G049672	E3 Ubiquitin protein ligase UHRF-Related	Procesament i degradació de proteïnes
MAD10	594	GRMZM2G159890	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Metabolisme
MAD2	469	GRMZM2G083642	Small nuclear ribonucleoprotein G	Transcripció i splicing
MAD5	335	GRMZM5G801369	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAD8	604	GRMZM2G168252	Small nuclear ribonucleoprotein F	Transcripció i splicing
MAD9	560	GRMZM2G451314	Pyridoxal-dependent decarboxylase	Procesament i degradació de proteïnes
MAE2	188	AC204763.2_FG001	Leucine-Rich Repeat Receptor-like protein kinase	Divisió cel·lular i desenvolupament
MAE5	881	GRMZM2G132468	Phosphatase with homology to tensin	Procesament i degradació de proteïnes
MAE7	499	GRMZM2G143253	P21-Rho-binding domain	Procesament i degradació de proteïnes
MAE8	731	GRMZM2G424181	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAF2	446	GRMZM2G137959	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAG11	318	AF546188.1_FG006	Zein-alpha A20-like	Reserva de nutrients
MAH10	720	GRMZM2G166658	Serine/threonine protein kinase	Procesament i degradació de proteïnes
MAH12	711	GRMZM5G860137	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 2 isoform 1	Metabolisme
MAH4	379	GRMZM2G034225	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MAH8	419	GRMZM2G143357	Thiamine pyrophosphate	Metabolisme
MBA9	730	GRMZM2G060511	U5 snRNP-specific protein-like factor	Traducció
MBB4	697	GRMZM2G017086	Ubiquitin-specific protease	Procesament i degradació de proteïnes
MBB5	610	GRMZM5G813584	Ribosomal protein L5	Traducció
MBC6	581	GRMZM2G150912	Endoribonuclease L-PSP	Divisió cel·lular i desenvolupament
MBD2	216	GRMZM2G090274	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-1 isoform 1	Traducció
MBD4	595	GRMZM2G052926	Heterogeneous Nucleafr Ribonucleoprotein	Transcripció i splicing
MBE7	567	GRMZM2G425377	WD40 repeat-containing protein	No determinat
MBF10	875	GRMZM2G129987	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	Resposta a estrés
MBF11	270	GRMZM2G053767	30S 40S ribosomal protein	Traducció
MBG1	591	GRMZM2G088880	60S ribosomal protein L37A	Traducció
MBG11	254	GRMZM2G179639	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MBG2	727	GRMZM2G181194	60S ribosomal protein L10a-1	Traducció
MBG7	276	GRMZM5G892124	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MBG9	758	GRMZM2G125527	60S ribosomal protein L44	Traducció
MBH2	299	GRMZM5G857992	Casein kinase II subunit beta-4	Divisió cel·lular i desenvolupament
MBH6	878	GRMZM2G144387	60S ribosomal protein L10a-1	Traducció
MCB2	365	GRMZM2G150688	Gibberellin-regulated protein 1	Divisió cel·lular i desenvolupament
MCB3	814	GRMZM2G131329	Beta-1,3-galactosyltransferase 20-like	Procesament i degradació de proteïnes
MCD1	691	GRMZM2G312712	Probable small nuclear ribonucleoprotein G	Transcripció i splicing
MCD2	436	GRMZM2G061287	Cyclin B	Divisió cel·lular i desenvolupament
MCD6	709	GRMZM2G145758	Histone H3	Divisió cel·lular i desenvolupament
MCD8	117	GRMZM2G546282	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MCF3	351	GRMZM2G156110	40S ribosomal protein S15	Traducció
MCF5	492	GRMZM2G155161	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MCG2	279	GRMZM2G087364	Alanine aminotransferase	Metabolisme
MCG6	394	GRMZM2G066373	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MCH1	834	AC230020.1_FG006	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MDB1	766	GRMZM2G166345	Isoleucyl, Leucyl, Tyrosyl, Valyl i Methionyl tRNA Sintasa	Traducció
MDB4	716	GRMZM2G023748	60S ribosomal protein L10A	Traducció
MDB6	191	GRMZM2G124524	Sequence-specific DNA binding transcription factor activity	Regulació de la transcripció
MDB8	161	GRMZM2G143160	Serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1	Procesament i degradació de proteïnes
MDC1	228	GRMZM2G139675	Translation machinery associated TMA7	Traducció
MDC3	666	GRMZM2G081577	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MDD1	250	GRMZM2G100511	Metalloprotease	Procesament i degradació de proteïnes
MDE1	237	GRMZM2G150190	YbaB/EbfC DNA-binding family	Regulació de la transcripció
MDG6	441	GRMZM2G146115	50S ribosome-binding GTPase	Traducció
MDH12	186	AC177908.3_FG002	Glycosyl transferase family 8	Procesament i degradació de proteïnes
MEA9	557	GRMZM2G027451	60S ribosomal protein L10-3	Traducció
MEC3	387	GRMZM2G073535	Translation initiation factor eIF-1	Traducció
MEC5	414	GRMZM2G052178	Cell adhesion complex protein bystin	Divisió cel·lular i desenvolupament
MEE3	895	GRMZM5G808775	Pre-mRNA Processing protein PRP39-Related	Transcripció i splicing
MEG6	1076	GRMZM2G000622	PhosphoribosylformylglycineMIDine synthase	Metabolisme
MFA3	806	GRMZM2G083253	60s ribosomal protein L23	Traducció
MFA5	560	GRMZM2G418294	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	Metabolisme
MFA8	427	GRMZM2G493903	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MFA9	310	GRMZM2G070931	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MF88	521	GRMZM2G045135	p-Nitrophenyl phosphatase	Metabolisme

MFD2	739	GRMZM2G064145	ATP-utilising chromatin assembly and remodelling N-terminal	Divisió cel.lular i desenvolupament
MFE10	404	GRMZM2G003038	Ribosomal protein L11 methyltransferase (PrmA)	Traducció
MFF2	918	GRMZM2G159032	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MFF4	767	GRMZM2G406674	Myosin	Divisió cel.lular i desenvolupament
MFG1	277	GRMZM2G104025	Ribosomal protein L18e/L15	Traducció
MFG7	910	GRMZM2G049201	Transducin	Divisió cel.lular i desenvolupament
MGA11	873	GRMZM2G068471	Pescadillo - related	Transcripció i splicing
MGA2	763	GRMZM2G025598	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	Processament i degradació de proteïnes
MGB3	728	GRMZM2G101463	Phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	Traducció
MGB4	418	GRMZM2G132623	60S ribosomal protein L31	Traducció
MGC11	175	GRMZM2G109869	GRAS domain family	Divisió cel.lular i desenvolupament
MGC4	528	GRMZM2G081310	Serine/threonine-protein kinase	Processament i degradació de proteïnes
MGC6	447	GRMZM2G427054	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MGD12	246	GRMZM2G000741	Mitochondrial carrier protein	Transport
MGE9	380	GRMZM5G806488	Ribosomal protein S7	Traducció
MGF4	414	GRMZM2G098298	Cysteine proteinase	Processament i degradació de proteïnes
MGF6	878	GRMZM2G108655	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MGF9	529	GRMZM2G010348	Cytochrome c	Metabolisme
MGG10	815	GRMZM2G172512	Ubiquitin-binding WYLD domain	Processament i degradació de proteïnes
MGG4	679	GRMZM2G022269	Elongation factor Tu C-terminal domain	Traducció
MGG6	855	GRMZM5G882986	Chalcone-flavanone isomerase	Metabolisme
MHA1	166	GRMZM2G138727	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Reserva de nutrients
MHA10	276	GRMZM2G140799	60S ribosomal protein 15.5kD	Traducció
MHA3	266	GRMZM2G108416	Aminotransferase class IV	Metabolisme
MHB7	720	GRMZM2G322314	Cysteine desulfurase NFS1	Metabolisme
MHD3	590	GRMZM2G040164	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB4/PRE4	Processament i degradació de proteïnes
MHD4	214	GRMZM2G150302	Glycosyltransferase family 43	Metabolisme
MHD6	883	GRMZM2G024119	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MHD7	240	GRMZM2G305027	Histone H2B	Divisió cel.lular i desenvolupament
MHE3	689	GRMZM5G849989	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MHF7	711	GRMZM2G104918	Inorganic pyrophosphatase	Metabolisme
MHF9	745	GRMZM2G075744	ZCCHC10 protein	Regulació de la transcripció
MHH12	651	GRMZM2G166985	Small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) Sm core protein	Transcripció i splicing
MIB9	465	GRMZM2G019411	Pectinesterase	Divisió cel.lular i desenvolupament
MIC4	967	GRMZM2G132804	COP9 signalosome, subunit CSN2	Divisió cel.lular i desenvolupament
MID11	378	GRMZM2G062476	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MIE11	595	GRMZM2G442658	Alcohol dehydrogenase	Metabolisme de lípids
MIE12	740	GRMZM2G160351	60S ribosomal protein L44	Traducció
MIE5	586	AC206788.3_FG008	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MIF3	771	GRMZM5G898314	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MIG3	669	GRMZM2G066101	DNA replication licensing factor, MCM4 component	Divisió cel.lular i desenvolupament
MIH1	525	GRMZM2G098797	LisH motif-containing protein	Divisió cel.lular i desenvolupament
MIH9	391	GRMZM2G177203	Protein disulfide oxidoreductase	Processament i degradació de proteïnes
MJA2	797	GRMZM2G336875	Ribosomal protein S8e	Traducció
MJA9	621	GRMZM2G139892	MAP kinase phosphatase	Processament i degradació de proteïnes
MJB11	957	GRMZM2G106960	GTPase Rab1/YPT1, small G protein superfamily	Transport
MJB9	665	GRMZM2G056488	Centromere protein C	Divisió cel.lular i desenvolupament
MJC2	516	GRMZM2G361151	Replication factor-A	Divisió cel.lular i desenvolupament
MJC4	650	GRMZM2G081745	SEC24-Related Protein	Transport
MJF1	341	GRMZM2G077208	60s Acidic ribosomal protein	Traducció
MJF12	846	GRMZM2G094497	Vacuolar H+-ATPase V1 sector, subunit B	Metabolisme
MJF2	739	AC190628.4_FG007	AAA ATPase	Metabolisme
MKA2	284	GRMZM2G176576	Glycosyltransferase	Metabolisme
MKA5	537	GRMZM2G132162	Pèptid antimicrobià	Defensa
MKB3	940	GRMZM2G091449	Splicing factor 3b, subunit 3	Transcripció i splicing
MKD1	900	GRMZM2G542847	Iron/ascorbate family oxidoreductases	Metabolisme
MKD11	283	GRMZM2G044301	Jumonji Domain Containing Protein	Regulació de la transcripció
MKD6	697	GRMZM2G102829	Poly-adenylate binding protein	Transcripció i splicing
MKE1	142	AC217560.3_FG001	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MKE10	293	GRMZM2G172427	Histone H3 (Lys9) methyltransferase	Divisió cel.lular i desenvolupament
MKE11	857	GRMZM2G038195	Serine/threonine-protein Phosphatase PP2A	Processament i degradació de proteïnes
MKE12	995	GRMZM5G815606	Ribosomal protein S18	Traducció
MKE8	904	GRMZM2G015361	GTP-binding ADP-ribosylation factor Arf1	Divisió cel.lular i desenvolupament
MLA1	499	GRMZM2G136624	Coilin-like	Processament i degradació de proteïnes
MLA11	974	GRMZM2G113137	Cellulose synthase A	Divisió cel.lular i desenvolupament
MLA9	642	GRMZM2G312110	Ubiquitin-protein ligase	Processament i degradació de proteïnes
MLB4	549	GRMZM2G091445	Gamma-thionin	Defensa
MLD2	585	GRMZM2G154312	Telomerase binding protein P23	Divisió cel.lular i desenvolupament
MLD6	1001	GRMZM2G168166	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MLF10	895	GRMZM2G019673	Glycosyl hydrolase	Metabolisme
MLF9	613	GRMZM5G812298	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MLG12	278	GRMZM2G456570	Structural maintenance of chromosome protein 3	Divisió cel.lular i desenvolupament
MLG5	775	GRMZM2G316635	Auxilin/Cyclin G-Associated kinase	Divisió cel.lular i desenvolupament
MLG7	674	GRMZM2G029552	50S ribosome-binding GTPase	Traducció
MLH3	993	GRMZM2G174619	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MMA2	803	GRMZM2G181453	PolyA binding protein 2	Transcripció i splicing
MMA3	963	GRMZM2G378906	Vesicle coat complex COPI, beta subunit	Transport
MMB1	542	GRMZM2G174147	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MMB9	714	GRMZM5G872204	Putative GTPase activating protein for Arf	Divisió cel.lular i desenvolupament
MMC1	79	GRMZM2G049759	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MMD5	899	GRMZM2G154574	Methyltransferase	Metabolisme
MME12	768	GRMZM2G049687	SNARE protein PEP12/VAM3/Syntaxin 7/Syntaxin 17	Divisió cel.lular i desenvolupament

MME6	217	GRMZM2G008341	Zein	Reserva de nutrients
MMF1	769	GRMZM5G820122	Peptide exporter	Transport
MMF6	913	GRMZM2G012052	Ubiquitin-protein ligase	Processament i degradació de proteïnes
MMG5	827	GRMZM2G093098	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MMH3	351	GRMZM2G030284	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)	Divisió cel·lular i desenvolupament
MMH5	872	GRMZM2G140150	Pyruvate dehydrogenase E1, alpha subunit	Metabolisme
MNA11	753	GRMZM2G115901	60S ribosomal protein L32	Traducció
MNA6	918	GRMZM2G115834	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MNC2	963	GRMZM2G432738	DHHC palmitoyltransferase	Metabolisme
MNC4	877	GRMZM2G142334	Protein phosphatase type 2A regulator activity	Processament i degradació de proteïnes
MND10	557	GRMZM2G124965	Phosphatidylcholine Transfer protein	Metabolisme
MND6	840	GRMZM2G080054	Helix-loop-helix DNA-binding domain	Regulació de la transcripció
MND9	201	GRMZM2G443453	Phosphatidylinositol transfer protein	Metabolisme
MNE2	651	GRMZM5G851929	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MNE4	559	GRMZM2G177659	Amino acid transporter protein	Transport
MNE5	549	GRMZM2G117900	Elongation factor Tu GTP binding domain	Traducció
MNE6	529	GRMZM2G088896	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MNE9	252	GRMZM2G411652	NADH dehydrogenase	Metabolisme
MNF2	392	GRMZM2G583032	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MNF6	471	GRMZM2G165917	Translation initiation factor 5 (eIF-5)	Traducció
MNG4	851	GRMZM5G881996	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	Divisió cel·lular i desenvolupament
MNG5	619	GRMZM2G157061	Translation initiation factor 4E, ribosome/mRNA-bridging	Traducció
MNG6	248	GRMZM2G405385	Proteïna de funció desconeguda	No determinat
MNG7	769	GRMZM2G123537	Translational repressor Pumilio/PUF3 and related RNA-binding	Divisió cel·lular i desenvolupament

Els cent vuitanta gens representats als cDNAs es van agrupar en diferents categories funcionals d'acord amb Gene Ontology (GO) (**Figura R1**). S'han assignat deu categories, les més representades de les quals són "no determinat" (gens de funció desconeguda) amb un 21%, "traducció" amb un 19%, "divisió cel·lular i desenvolupament" amb un 17%, "metabolisme" amb un 16% i "processament i degradació de proteïnes", amb un 13%. D'entre tots els gens identificats es van escollir tres per a la seva anàlisi més profunda d'acord amb el seu potencial interès: *mcy1* (MKA5), *map65* (MMH3) i *licc1* (MIH1).

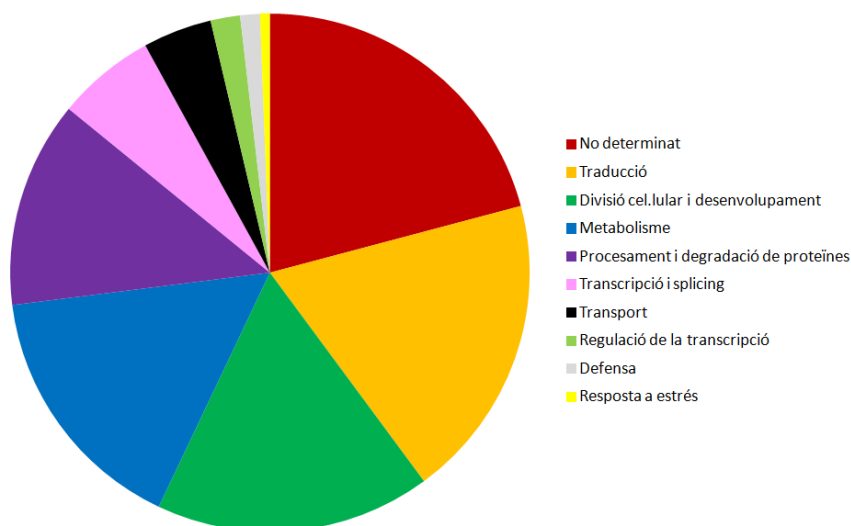


Figura R1: Categories funcionals dels gens seleccionats amb expressió a embrió jove (**Taula R1**).

1.2- MCYL, un nou pèptid antimicrobià

El cDNA MKA5 conté un insert de 537 bases que, en comparar-lo amb la seqüència del genoma de blat de moro, correspon al gen GMRZM2G132162 (LOC100275050, UniGene Zm.14280) situat en el cromosoma 4 entre les posicions 7.172.367 i 7.173.014 en sentit revers. Aquest gen conté un intró de 106 bases, una regió 5' no traduïda de 81 bases i una regió 3' no traduïda de 185 bases. El gen codifica un polipèptid de 91 aminoàcids que conté un pèptid senyal (aminoàcids 1 a 23) i no conté cap altre motiu proteic conegut (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de/smart>). No hi ha d'altres gens similars al genoma del blat de moro. Aquest gen s'ha anomenat *mcyl* (*maize cyclotide-like*).

1.2.1- Patró d'expressió de *mcyl*

El blat de moro és una de les espècies de les que es disposa de més informació de seqüències transcrits. Així es coneixen més de dos milions de seqüències de ESTs i els resultats de nombrosos experiments amb micromatrius i de RNA-seq corresponents a diferents òrgans, estadis de desenvolupament i condicions, la qual cosa permet fer estudis d'expressió *in silico* amb força exactitud. Els bancs de seqüències contenen 12 FLcDNAs i 102 ESTs corresponents a *mcyl*. Aquestes dades indiquen que *mcyl* es transcriu preferentment a l'embrió immadur (48 seqüències), al pedicel (41 seqüències) i en menor grau a l'endosperma (7 seqüències).

Les dades d'hibridacions de micromatrius contingudes a la base de dades PLEXdb (<http://www.plexdb.org>) (Sekhon *et al.*, 2011) mostren un patró d'expressió semblant (**Figura R2**). El màxim d'expressió a la llavor ocorre als catorze dies després de la pol·linització. Curiosament, en aquest cas les dades indiquen una major expressió a l'endosperma que a l'embrió. En teixits vegetatius i florals l'expressió és molt baixa o nul·la excepte a flor masculina immadura. També s'observa certa expressió al pericarpí immadur.

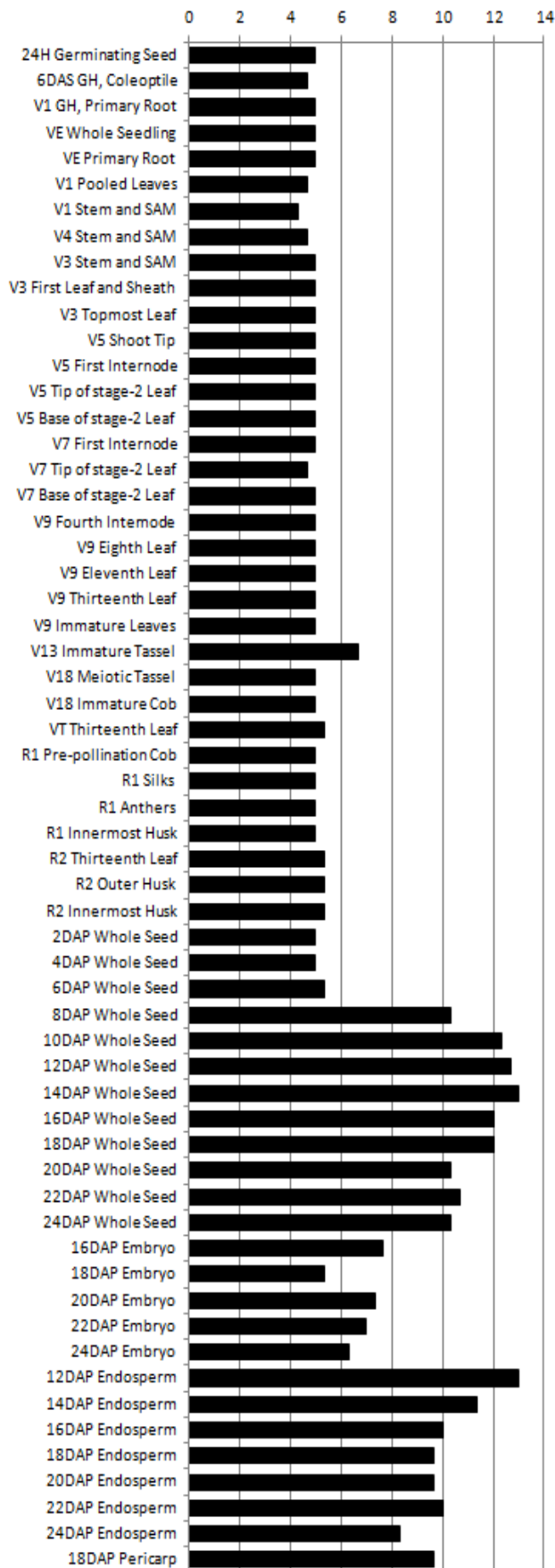


Figura R2. Patró d'expressió de *mycl* basat en les dades d'hibridació de micromatrius contingudes a la base de dades PLEXdb (<http://www.plexdb.org>).

Les dades de RNA-seq disponibles a la base de dades qTELLER (<http://qteller.com>) mostren un patró d'expressió semblant (**Figura R3**). També en aquest cas es mostra una major expressió a l'endosperma que a l'embrió.

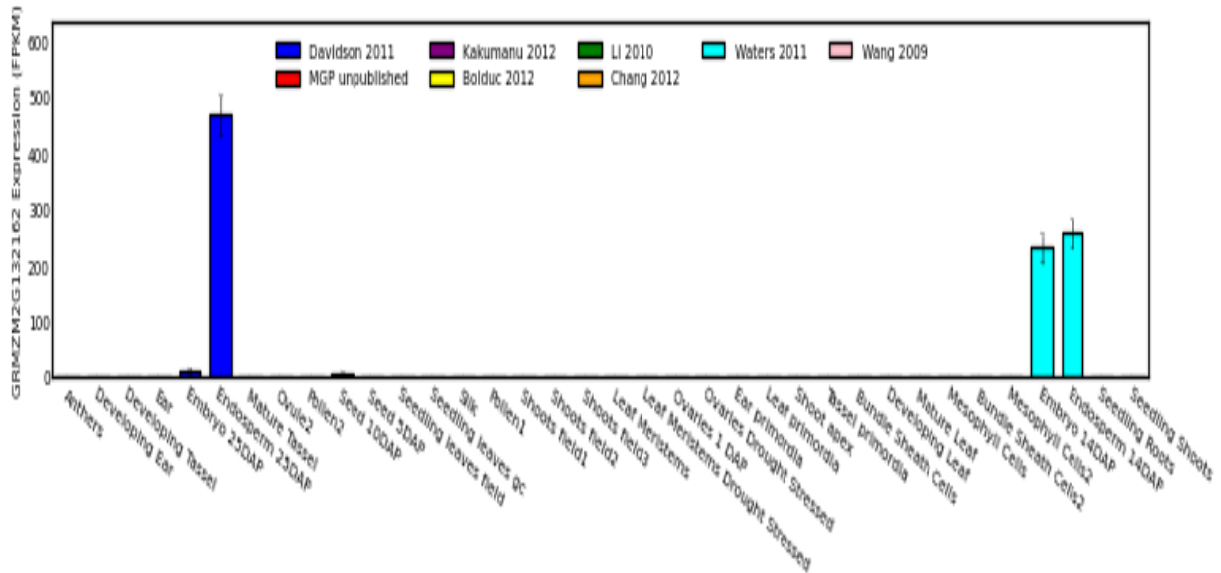


Figura R3. Patró d'expressió de *mycl* basat en dades de RNA-seq (qTELLER, <http://qteller.com>).

Aquestes dades d'expressió basades en dades *in silico* van ser confirmades mitjançant tècniques d'hibridació northern. L'anàlisi northern (**Figura R4A**) mostra un senyal fort exclusivament en llavor i embrió de deu dies després de la pol·linització (K10 i E10), mentre que a l'endosperma del mateix estadi de desenvolupament (ND10) s'observa un senyal feble.

Les anàlisis d'hibridació *in situ* amb llavors de 10 DAP mostren acumulació de mRNA a tot l'embrió però en especial a la zona del suspensor i protoderma (**Figura R4 B**). També s'observa hibridació a la capa de transferència basal de l'endosperma, propera al pedicel.

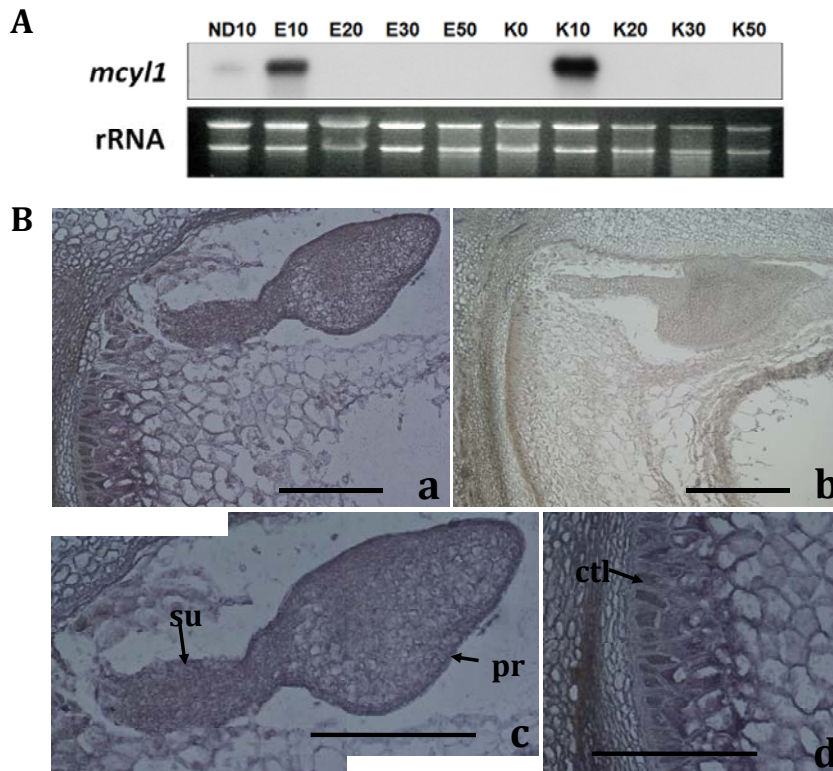


Figura R4. **A**, Anàlisi de l'expressió de *mcy1* durant l'embriogènesi a l'embrió i al gra (kernel). El RNA de l'endosperma es va analitzar als 10 DAP (**ND10**) (DAP = days after pollination). El RNA de l'embrió als 10 DAP (**E10**), 20 DAP (**E20**), 30 DAP (**E30**) i 50 DAP (**E50**). El RNA del gra sencer es va analitzar a llavors no pol·linitzades (**K0**), 10 DAP (**K10**), 20 DAP (**K20**), 30 DAP (**K30**) i 50 DAP (**K50**). A la part de sota es mostren els RNA ribosomals tenyits amb bromidi d'etidi com a controls interns de càrrega. **B**, Acumulació del mRNA de *mcy1* en seccions histològiques de llavors de blat de moro 10 DAP mitjançant hibridacions *in situ*. **a,b** Seccions transversals d'una llavor 10 DAP mostrant l'embrió i la regió basal de l'endosperma. **c** Detall de l'embrió (**su**, suspensor; **pr**, protoderma). **d** Detall de la capa basal de transferència de l'endosperma (**ctb**). **a**, **c** i **d** estan hibridades amb una sonda antisentit, i **b** amb una sonda sentit. Totes les barres representen 50 µm.

1.2.2- Anàlisi filogenètica i possible funció de MCYL

La seqüència de MCYL es va comparar amb les bases de seqüències emprant les eines de BLASTN i BLASTP. Com ja s'ha comentat, al genoma de blat de moro només es troba una còpia d'aquest gen. La recerca de gens homòlegs en altres espècies només ha donat resultats positius en el cas del sorgo. En el genoma d'aquesta espècie (*Sorghum bicolor* genome v2.1) s'han detectat tretze gens que codifiquen proteïnes semblants a MCYL (**Figura R5**). Es desconeix la seva funció però tots codifiquen polipèptids de mida petita (71 a 98 aminoàcids). Les similituds de les seqüències de sorgo i blat de moro oscil·len entre el 67% i el 30%. Tots excepte Sobic005G174400 contenen un domini de pèptid senyal molt conservat en la regió N-terminal d'aproximadament 22 aminoàcids (**Figura R5**) especialment hidrofòbic (**Figura R6**). La resta de les seqüències polipeptídiques és molt més diversa excepte per la presència d'alguns residus de cisteïna dispersos molt conservats al llarg de tota la seqüència, el que suggereix la formació d'alguns tipus d'estructura secundària.

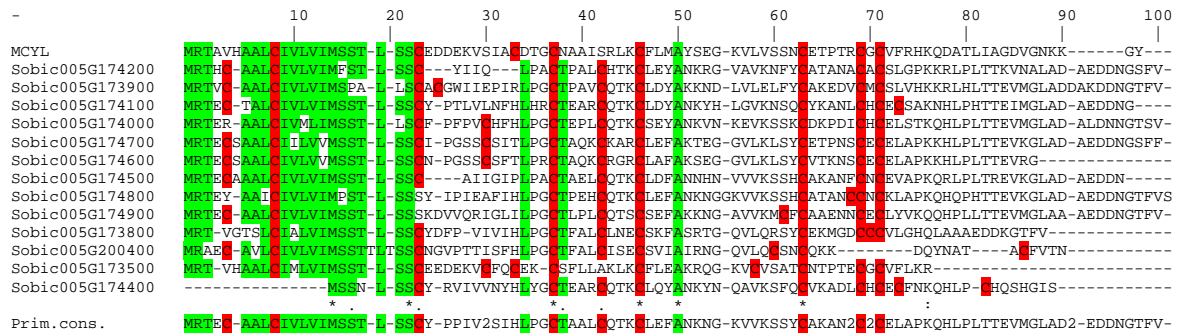


Figura R5. Alineament de les seqüències d'aminoàcids deduïdes a partir del gen *mcyL* i dels gens homòlegs de sorgo. Alineament mitjançant el programa CLUSTALW. En verd es representa el grau de més conservació de seqüència respecte a MCYL, i en vermell les cisteïnes.

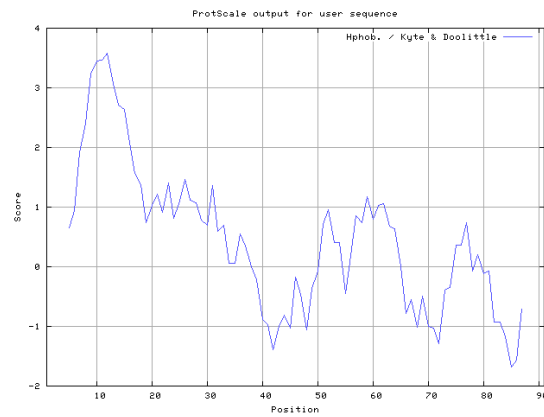


Figura R6. Perfil d'hidrofobicitat de Sobic.005g174200.1. Basat en el mètode Kyte & Doolittle (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale>).

Com ja s'ha dit, la funció dels polipèptids de sorgo no ha estat determinada, però la mida petita, la presència del pèptid senyal i la presència de residus de cisteïna conservats dispersos per tota la seqüència recorda molt a les característiques d'altres famílies de polipèptids petits amb funcions defensives com els ciclotides, defensines o les proteïnes BAP (**Figura R7**) (Serna *et al.*, 2001; Cordts *et al.* 2001; Zhang *et al.*, 2014). Comparant el patró de distribució de cisteïnes, MCYL s'assembla més als ciclotides del grup Möebius (**Figura R7**). MCYL conté sis residus de cisteïnes distribuïdes al llarg del domini i un residu de prolina típic de la família de Möebius, però la separació entre els residus de cisteïnes és diferent. Tot això suggereix que MCYL podria representar una nova família de proteïnes semblants a les ciclotides present només al grup dels *Andropogoneae*.

Resultats

MCYL

<i>Zea mays</i>	MCYL1	ACDTGCAAAISRLKCFMLMAYSEGKVLVSSNDETPTRCGCV
<i>Sorghum bicolor</i>	SCYL1	QCEK-CSFLLAKLKCFLLEAKRQGVVSVSATNTPTECCCV

Cyclotides-Möebius

<i>Oldenlandia affinis</i>	Kalata B1	VGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Oldenlandia affinis</i>	Kalata B2	VGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Oldenlandia affinis</i>	Oak10	VGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Chassalia curviflora</i>	chacur 1	VGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Psychotria braciata</i>	psybra 1	IGGTCTLGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Palicourea tetragona</i>	c022	IGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Palicourea tetragona</i>	vibi B	VGGTGVGGTNTPGTCSY-PVCT
<i>Palicourea tetragona</i>	paltet 1	IGGTGFTGTNTPGTCSY-PVCT
<i>Viola arvensis</i>	Varv A	PGGTGVGGTNTPGTCSW-PVCT
<i>Viola odorata</i>	Cycloviolacin O14	AGGESCFKGKCYTPGSSSKYPLCA

Cyclotides-Bracelet

<i>Psychotria longipes</i>	Cyclopsychotride A	PGESGVVIP-CTVTALLGCSKSRV---CY
<i>Chassalia Parviflora</i>	Circulin A	PGESGVWIP-CI-SAALGCSKKNV---CY
<i>Viola odorata</i>	Cycloviolacin O2	PGESGVWIP-CI-SSAIGCSKSKV---CY
<i>Palicourea condensata</i>	Palicourein	FGGTGRVLPVCTYSAALGCTDDRSGLCK
<i>Hybanthus parviflorus</i>	Hypa A	PGAESGVYIP-CTITALLGCSKKNV---CY
<i>Viola hederacea</i>	Vhr1	PGAESGVWIP-CTVTALLGCSKSNV---CY
<i>Viola hederacea</i>	Vhl-1	SGESGVAMISFQFTEVIIIGCSKKNV---CY
<i>Hybanthus parviflorus</i>	Hyfl A	SGESGVYIP-CTVTALVGCTKDKV---CY
<i>Viola tricolor</i>	Tricyclon A	DGGESVFLGT-CY-T-K-GCSGGEWK--LCY
<i>Viola yedoensis</i>	Cycloviolacin Y1	DGGTGFVLT-CY-T-P-GCSGNYG--FCY
<i>Chassalia discolor</i>	CD-1	FGESGVVIP-CI-SYLVGCSKDTIEK-VCK
<i>Viola biflora</i>	VibiE	PGAESGVWIP-CTVTALIGCSKSNV---CY
<i>Oldenlandia affinis</i>	Kalata B18	PGAESGV-IP-CI-S-L-GCSKSNQV---CY
<i>Oldenlandia affinis</i>	Kalata B8	NGGTGELLGT-CY-T-T-GCTNKYR--VCT
<i>Petunia hybrida</i>	Phyb A	GGESGVWIP-CVSA-AIGCSKSNKI---CY
<i>Carapichea ipecacuanha</i>	caripe 1	PGESGVVIP-CIST-VIGCSKDKV---CY
<i>Carapichea ipecacuanha</i>	caripe 2	PGESGVFIR-CTITALLGCSKSNV---CY
<i>Carapichea ipecacuanha</i>	caripe 6	IGTGTFRNP-GL-S-R-RCTRHYI---CY

Cyclotides-Trypsin Inhibitor

<i>Momocordica cochinchinensis</i>	MCoTI-II	VGPKILQRVRRDSDPGAVIIRGNGYCG
<i>Momocordica cochinchinensis</i>	MCoTI-II	VGPKILKVRRRDSDPGAVIIRGNGYCG

Cyclotides-Acyclic

<i>Petunia hybrida</i>	Phyb K (Ac)	DGGEPGVYIP-CTITALLGCSKLNKVV
<i>Petunia hybrida</i>	Phyb M (Ac)	SGAESGVWIP-CATSLLIGCSVNSRVI

Defensins

<i>Zea mays</i>	ZmES1	DCLTQSTRLPGHLCVRSY-----CAIGRAEGKGYTGG--RRLISPIPLDGILCYVVKP-CP
<i>Zea mays</i>	ZmES2	DCLTQSTRLPGHLCVRSY-----CAIGRAEGKGYTGG--RRLISPIPLDGILCYVVKP-CT
<i>Zea mays</i>	ZmES3	DCLTQSTRLPGHLCVRSY-----CAIGRAEGKGYTGG--RRLISPIPLDGILCYVVKP-CT
<i>Zea mays</i>	ZmES4	DCLTQSTRLPGHLCVRSY-----CAIGRAEGKGYTGG--RRLISPIPLDGILCYVVKP-CT
<i>Zea mays</i>	ZmES6	LCSTTMDLLI---GGAIIPGAVNQACDDTERNKG--YTGCG-FQNMKIQR----CVGRKP-CA
<i>Zea mays</i>	Ec-AMP-D1-like	ECEKDSERFLGA-CMASDN-----CANVDRGEG--FSGG--RSTFRFR---CITKPK-C
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G045378	TCRQFVKVHPF--CFKAM-CKAN--CAIEGKFSDBGSYVKDY--RRESGGFHSV---CVGIL--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G134660	TCRQFVKVHPF--CFKAM-CKAN--CAIEGKFSDBGSYVKDY--RRESGGFHSV---CVGIL--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G164478	TCRQFVKVHPF--CFKAM-CKAN--CAIEGKFSDBGSYVKDY--RRESGGFHSV---CVGIL--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G119475	TCREFAKWHPF--CFSAM-CKAN--CFIEGKSSDGSYAKGY--RDSHGFSM---CIGLL--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G079962	KCFYTTDRVATW--QDWA-CKFG--CLIDAKQYHTKYKNSW--REGSRRGI---CHGF--CD
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G535409	TCKQFPKWSPL--CFSAI-CKAS--CFIEGKFSDBGSYVKGH--RCSSTGYEYV---CNLL--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G137883	ICSYADFRAMF--CKNWM-CKSQ--CWFQSQLITPPNVVKEHR--IKGGIYGL---CHGVF--CK
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G175165	PCPAHGGDDER--GTHMPGENISR--CRSQ--KQWGYANPVIN--QWNTPPNTELDTCGFSNAAR
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G099353	SCAAGNR-----CHAFPGSDSIL--CWAEEDRLGYSNPKPR--GLYPKPNHDGDECC
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G175101	PCPVHGRNDR--CTHMPGCTISR--CLSQ--KQWGYANPVIN--QWNTPPNTELDTCGFSNAAR
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G035049	KCGYTTPIIPF--CKAWM-CKAE--CWTEAKLTGGKVTQYK--QMRGGIKGW---CYDEF--CI
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G154235	KCGYTTPIIPF--CKAWM-CKAE--CWTEAKLTGGKVTQYK--QMRGGIKGW---CYDEF--CI
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G047842	DCWVEDRDYV--CVTRGRRSI--CREHSYVDG-----RQWGFNLLPY--CEGLRSNCT
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G047699	DCWADTRVI---CTKTHNERDDT--CAGRMPDG-----RCHWFEPLNVLPF--CQGLRPNCH
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G004354	SCWKDDHHPI--CLPED-IVAT--CRDHGHADG-----RCSWAWSWRPY--CQGLLADGQ
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G158400	PCFHAGTSQYP--CTTDG--RRL--CEHQHRSRDKAY-----CKSISPGE---CCCP
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G437040	LCSTTMERLI---GGASRGDVNRADETERSKGYTGGGF---QNMKIQR----CVGRKP-CV

Basal transfer layer Antimicrobial Peptides

<i>Zea mays</i>	BAP-1a	LCYLKAL--EYCCARTRQCYDDIKKLEHCH
<i>Zea mays</i>	BAP-1b	LCYLKAL--EYCCERTKQCYDDIKKLEHCH
<i>Zea mays</i>	BAP-2	PCYLDSGLNEYVCRKTNKCYKSLVLCVASCQ
<i>Zea mays</i>	BAP-3b	LCFLDPRTLWYICKITYRLFRTLKDCLEFCH
<i>Zea mays</i>	BAP-3a	LCFEDIKTLWYICRTTYHLRYLTKDCLSH

Figura R7. Comparació de seqüències de pèptids petits rics en cisteïnes de plantes.

1.3- Un membre de la família MAP65 de proteïnes associades a microtúbuls

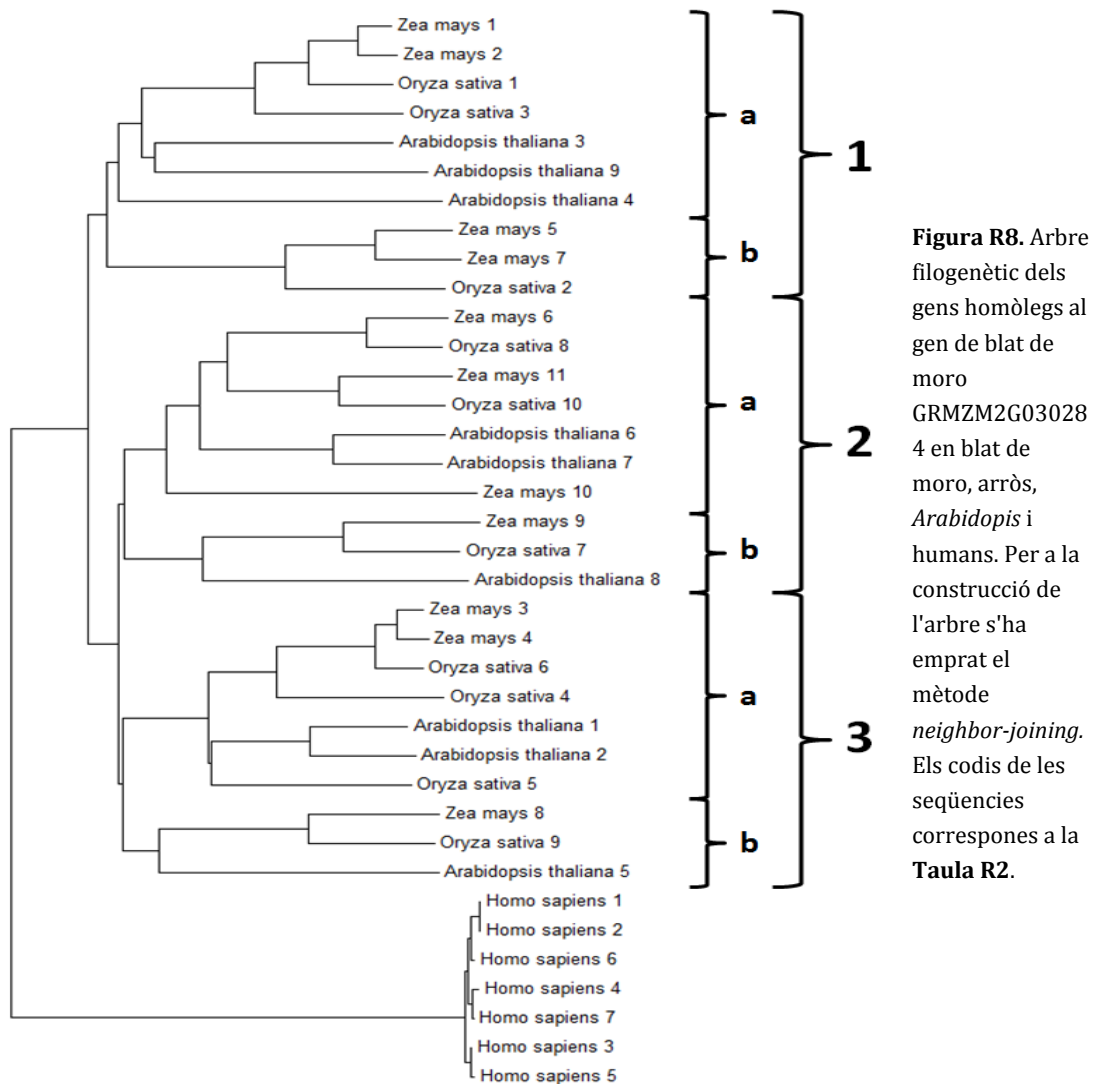
1.3.1- Anàlisi funcional del cDNA MMH3

El cDNA MMH3 conté un insert que correspon al gen GRMZM2G030284 que codifica una proteïna pertanyent a la família de proteïnes de plantes associades a microtúbuls MAP65 que són homòlogues a ASE1 de llevat i PRC1 de mamífers. Hi han onze gens al genoma de blat de moro que codifiquen proteïnes d'aquesta família (**Taula R2**), deu al d'arròs, nou al d'*Arabidopsis* i en el genoma humà n'hi han set gens.

Taula R2. Gens relacionats amb GRMZM2G030284 en blat de moro i d'altres espècies.

Gen	ID	Definició (si és coneguda)
Zea_mays_1	GRMZM2G030284	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_2	GRMZM2G106028	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_3	GRMZM2G101874	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_4	GRMZM2G465169	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_5	GRMZM2G027187	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_6	GRMZM2G100714	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_7	GRMZM2G099827	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_8	GRMZM2G141208	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_9	GRMZM2G114841	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_10	GRMZM2G359929	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Zea_mays_11	GRMZM2G121649	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1 family)
Oryza_sativa_1	LOC_Os01g49200	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_2	LOC_Os02g03400	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_3	LOC_Os05g47970	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_4	LOC_Os02g48830	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_5	LOC_Os06g40840	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_6	LOC_Os06g20370	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_7	LOC_Os08g41890	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_8	LOC_Os03g13460	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_9	LOC_Os05g33890	Microtubule associated protein
Oryza_sativa_10	LOC_Os09g27700	Microtubule associated protein
Arabidopsis_thaliana_1	AT5G55230	MAP65-1
Arabidopsis_thaliana_2	AT4G26760	MAP65-2
Arabidopsis_thaliana_3	AT5G51600	MAP65-3
Arabidopsis_thaliana_4	AT3G60840	MAP65-4
Arabidopsis_thaliana_5	AT2G38720	MAP65-5
Arabidopsis_thaliana_6	AT2G01910	MAP65-6
Arabidopsis_thaliana_7	AT1G14690	MAP65-7
Arabidopsis_thaliana_8	AT1G27920	MAP65-8
Arabidopsis_thaliana_9	AT5G62250	MAP65-9
Homo_sapiens_1	NP_003972.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform 1
Homo_sapiens_2	NP_955445.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform 2
Homo_sapiens_3	NP_001254509.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform 4
Homo_sapiens_4	XP_005255043.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform X1
Homo_sapiens_5	XP_005255044.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform X2
Homo_sapiens_6	XP_006720822.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform X3
Homo_sapiens_7	XP_006720823.1	protein regulator of cytokinesis 1 isoform X4

L'anàlisi filogenètica d'aquestes seqüències mostra que s'agrupen en tres famílies amb dos subgrups cadascuna d'elles (**Figura R8**). Hi han més gens en monocotiledònies que en *Arabidopsis*, de manera que el subgrup 1b està constituït només per blat de moro i arròs.



1.3.2- Patró d'expressió

La anàlisi northern amb la sonda MMH3 va donar un màxim de senyal a l'embrió de 20 DAP i un senyal més feble a l'embrió de 10 DAP i a la llavor sencera no pol·linitzada (**Figura R9**). No es va detectar senyal als embrions de 30 o 50 DAP, a llavors de 10 o més DAP, ni a l'endosperma de 10 DAP.

Els resultats de l'anàlisi per northern-blot es van confirmar amb una RT-PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR) (**Figura R10**). La quantificació de l'expressió gènica es va fer de forma relativa i com a gen *housekeeping* es va triar la ubiquitina. El valor màxim d'expressió es va trobar a embrions de 13 DAP, amb una expressió molt més baixa als embrions de 10 DAP (**Figura R10**). També s'observa expressió baixa a llavors no pol·linitzades, confirmant-se bàsicament els resultats de l'anàlisi per northern-blot.

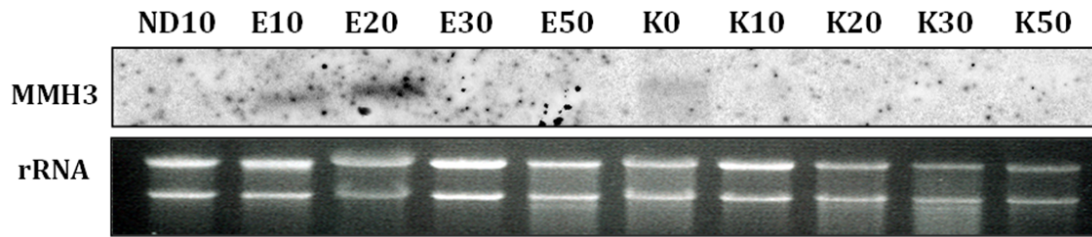


Figura R9. Anàlisi de l'expressió del gen GRMZM2G030284 durant l'embriogènesi a les llavors. El RNA de l'endosperma es va analitzar als 10 DAP (**ND10**). El RNA de l'embrió als 10 DAP (**E10**), 20 DAP (**E20**), 30 DAP (**E30**) i 50 DAP (**E50**). El RNA del gra sencer es va analitzar abans de ser pol·linitzat (**K0**), 10 DAP (**K10**), 20 DAP (**K20**), 30 DAP (**K30**) i 50 DAP (**K50**). A la part de sota es mostren els RNA ribosomals tenyits amb bromidi d'etidi com a controls interns de càrrega.

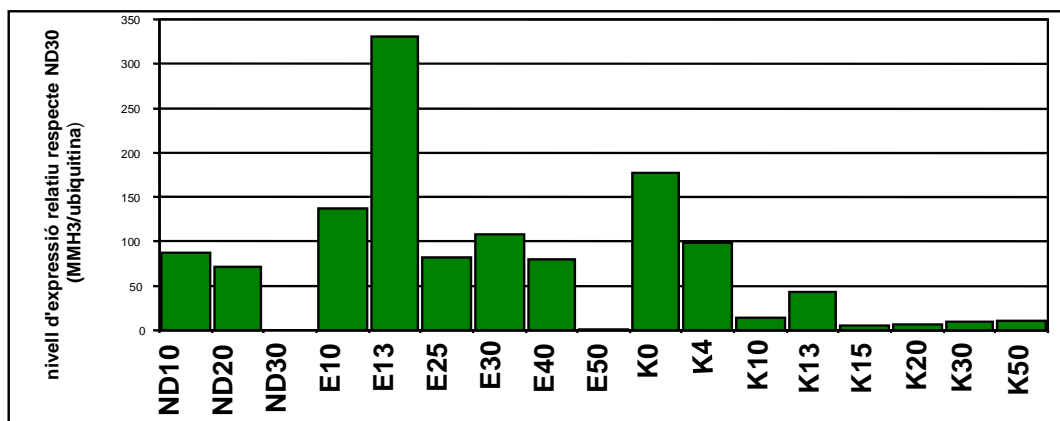


Figura R10. Anàlisi d'expressió del gen GRMZM2G030284 per qRT-PCR. Valors d'expressió de les diferents mostres: ND, endosperma; E, embrió; K, llavor. El número correspon als dies després de la pol·linització (DAP).

Les hibridacions *in situ* (**Figura R11**) van demostrar que l'expressió a les llavors no pol·linitzades es centra al sac embrionari, l'expressió en posteriors estadis de desenvolupament a l'embrió es centra a la plúmula.

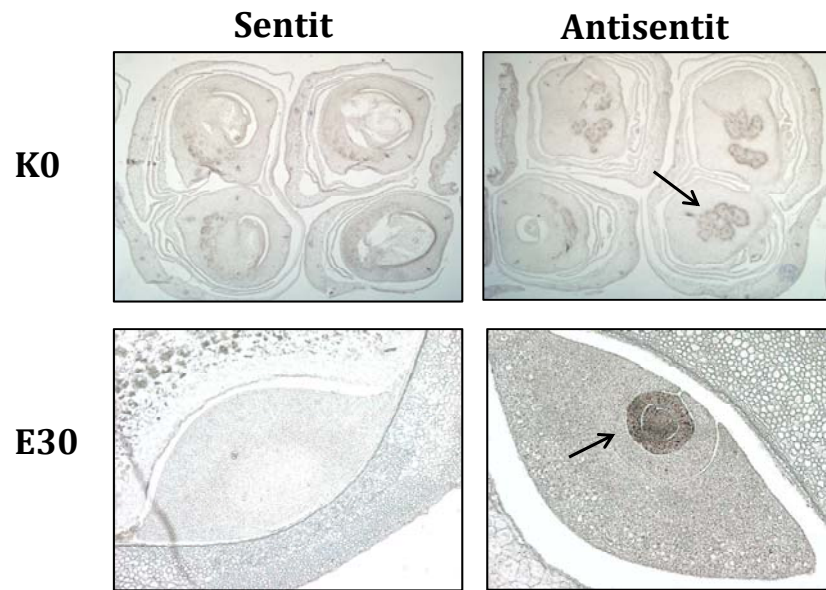


Figura R11. Hibridacions *in situ* de GRMZM2G030284 emprant sondes sentit i antisentit de talls transversals de llavors sense pol·linitzar (**K0**), i embrions de 30 DAP (**E30**). Les fletxes assenyalen el sac embrionari i la plúmula.

2- CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA LICC1

El cDNA MIH1 correspon al gen GRMZM2G098797 que codifica una proteïna de funció desconeguda de 245 aminoàcids que presenta uns dominis proteics conservats i una distribució filogenètica a tots els Eucariotes que la van fer interessant per al seu estudi més detallat.

2.1- Presència dels dominis LisH-CTLH-CRA a les proteïnes de plantes

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de LICC1 va permetre identificar una sèrie de dominis proteics prèviament caracteritzats: LisH, CTLH i CRA. La funció d'aquests tres dominis està relacionada amb interaccions entre proteïnes, particularment microtúbuls (Tomaščíková *et al* 2012, Kobayashi *et al.* 2007). Degut a la presència d'aquests dominis hem anomenat LICC1 (LisH-CTLH-CRA) la proteïna codificada pel gen GRMZM2G098797.

2.1.1.- Gens que contenen dominis LisH-CTLH-CRA en blat de moro

Una recerca exhaustiva de tots els gens continguts en el genoma del blat de moro (<http://www.phytozome.net/maize.php>) que codifiquin proteïnes amb algun d'aquests dominis (LisH, CHTL, CRA) ha permès identificar vint-i-tres gens. D'acord amb els dominis que contenen, les proteïnes es poden classificar en onze grups (**Taula R3**). La majoria de les proteïnes trobades estan classificades com de funció desconeguda tot i que unes poques són descrites com a reguladors de la transcripció o bé s'han anotat en funció de la seva homologia amb proteïnes de llevat o humanes.

En el grup I s'inclouen, junt a LICC1, altres dues proteïnes amb els mateixos dominis: GRMZM2G096877 i GRMZM2G085602. Quatre proteïnes contenen els tres dominis (LisH-CTLH-CRA) i un altre domini addicional. Dues d'elles tenen el domini RING C-terminal (grup II) i altres dues contenen un domini SPRY N-terminal (grup III). Aquestes són totes les proteïnes que contenen el domini CRA. És a dir, aquest domini només es troba en presència de LisH i CTLH. En canvi existeixen proteïnes amb només LisH o bé només CTLH, o ambdós, sols o amb altres dominis addicionals (repeticions WD40, dominis transmembrana o domini REC).

El patró d'expressió dels gens identificats es va obtenir a partir de la base de dades qTELLER d'experiments de RNA-seq per a blat de moro (qTELLER, <http://qteller.com>) (**Figura R12**). Els patrons d'expressió obtinguts són molt variables, sense patrons específics per als gens d'un grup determinat. Els gens del grup I (dominis LisH-CTLH-CRA) mostren, en general, expressió en totes les parts de la planta però mentre LICC1 té una major acumulació de mRNA en anteres, panotxes i llavors immadures de 10 DAP, GRMZM2G085602 presenta una

màxima expressió en pistils i llavors 10 DAP, i GRMZM2G096877 un màxim en embrions d'entre 14 i 25 DAP. A la resta de grups els patrons d'expressió són variables, però en general s'observa expressió en molts teixits, en ocasions amb un màxim en alguns en concret. Per exemple, en el grup II (dominis LisH-CTLH-CRA-RING) la major expressió de GRMZM2G177026 es dona a l'endosperma de 25 DAP, però això no passa amb l'altre gen del grup (GRMZM2G449083). En el grup IV (LisH-CTLH-repeticions WD40) hi ha una màxima expressió a la panotxa per a dos dels gens (GRMZM2G030422 i GRMZM2G042992), però no per a la resta.

Taula R3. Gens de blat de moro que contenen tots o alguns dels dominis LisH-CTLH-CRA. Els dominis s'han identificat mitjançant el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Grup	Dominis	Esquema	ID	Definició
I	LisH-CTLH-CRA		GRMZM2G098797	Hypothetical protein (LIIC1)
			GRMZM2G096877	Glucose-induced degradation protein 8 homolog
			GRMZM2G085602	Uncharacterized protein
II	LisH-CTLH-CRA-RING		GRMZM2G449083	Uncharacterized protein
			GRMZM2G177026	Similar to macrophage erythroblast attacher
III	SPRY-LisH-CTLH-CRA		GRMZM5G886785	Ran binding protein 9 related
			GRMZM2G082642	SPRY-domain family protein isoform 1, ran-binding protein 9
IV	LisH-CTLH-WD40 repeats		GRMZM2G030422	Uncharacterized protein
			GRMZM2G316967	Uncharacterized protein
			GRMZM2G042992	Ramosa 1 enhancer locus 2-like
			GRMZM2G111247	Uncharacterized protein
			GRMZM2G061186	Uncharacterized protein
			GRMZM2G037683	Uncharacterized protein
V	LisH-WD40 repeats		GRMZM2G079013	Transcriptional corepressor LEUNIG
			GRMZM2G361398	Uncharacterized protein
			GRMZM2G097640	Uncharacterized protein
			GRMZM2G036169	Transcriptional corepressor LEUNIG
VI	LisH-CTLH		GRMZM2G116506	Uncharacterized protein
VII	LisH		GRMZM5G869422	Uncharacterized protein
VIII	CTLH		GRMZM2G427790	Uncharacterized protein
IX	CTLH-CTLH		GRMZM2G152853	Uncharacterized protein
X	TM-CTLH		GRMZM2G141725	Uncharacterized protein
XI	CTLH-REC		GRMZM2G418575	Uncharacterized protein

, domini LisH , domini CTLH , domini CRA , domini RING: RING-finger és un tipus de Zn-finger de 40 a 60 residus que s'uneix a dos àtoms de Zn i probablement està involucrat en interaccions proteïna-proteïna com en diversos processos biològics com és el cas de E3 ubiquitin protein d'activitat ligasa on la seva funció és determinar el substrat específic per a l'ubiquitilació. , domini SPRY: és un domini de funció desconeguda que és homòleg distant del domini butyrophilin/marenostrin/pyrin. , repetició WD40: WD40 són motius de quaranta aminoàcids que generalment acaben en el dipèptid tripsina i asparagina (W-D), repetits normalment entre set i vuit vegades, d'estructura en β hèlix. Repeticions de WD40 actuen com interacció de proteïna-proteïna, com *scaffolding* i mediadors de la interacció transitòria entre altres proteïnes. En *Arabidopsis* aquest motiu fa funcions de regulador en alguns processos específics de desenvolupament. , regió transmembrana , domini REC: és un domini receptor de senyal present en bacteris (CheY, OmpR, NtrC i PhoB), i Eucariotes (ETR1, *Arabidopsis thaliana*).

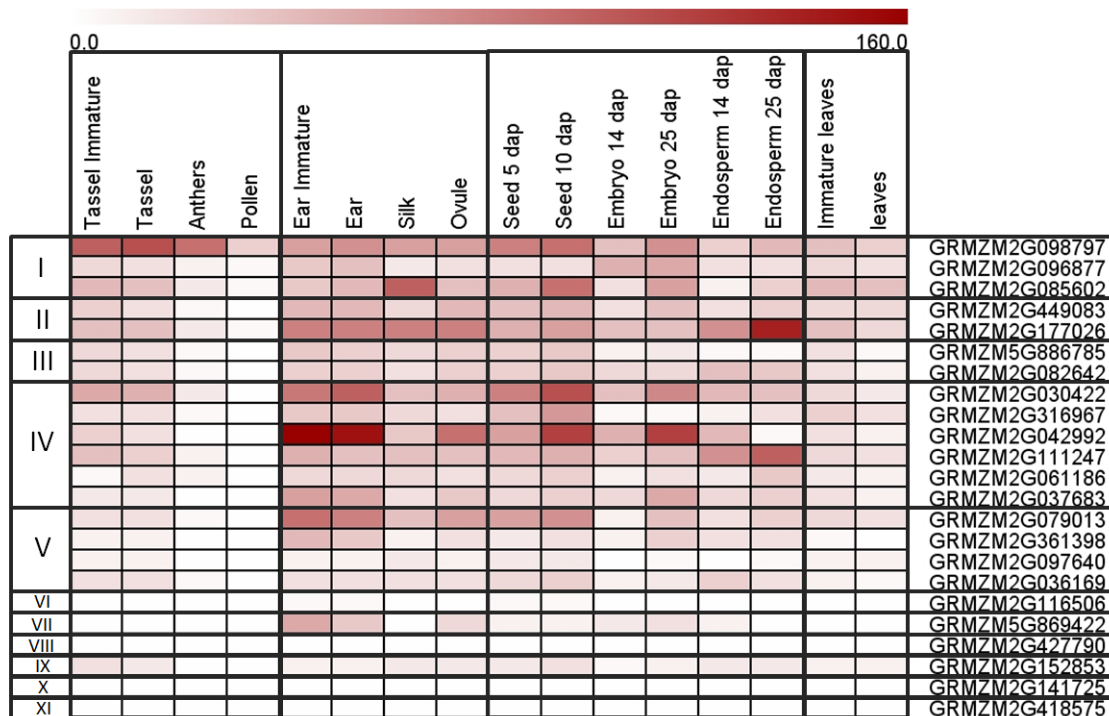




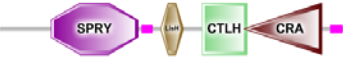



Figura R12- Patró d'expressió dels gens de blat de moro amb dominis LisH, CTLH o CRA segons les dades d'estudis de RNA-seq en la base qTELLER per a blat de moro (<http://qteller.com>). El color intens representa una major acumulació de mRNA. Els grups de gens corresponen als definits a la **Taula R3**.

2.1.2.- Gens que contenen alguns dels dominis LisH-CTLH-CRA en arròs

Es va repetir l'anterior estudi amb el genoma d'arròs (**Taula R4**). En aquest cas s'han identificat divuit gens repartits en només sis grups, segons la combinació dels diferents dominis trobats. També en aquest cas la majoria són proteïnes de funció desconeguda. Com al blat de moro, el grup I (LisH-CTLH-CRA) conté tres gens, mentre que els grups II i III contenen un gen cadascun a arròs en lloc dels dos presents en blat de moro. També en aquest cas el domini CRA només es presenta juntament amb els altres dos dominis LisH i CTLH. Els grups IV i V també estan representats al genoma d'arròs tot i que amb un nombre diferent de gens. No és així amb la resta dels grups de gens que, o estan només al blat de moro o només a l'arròs. Això fa pensar que alguns puguin ser pseudògens, tot i que no es pot descartar que siguin errors d'anotació.

L'expressió dels gens identificats es va estudiar segons dades de RNA-seq a la base de dades qTELLER per a arròs (<http://qteller.com>) (**Figura R13**). A l'igual que passa amb el blat de moro, els patrons d'expressió són molt variables. Destaquen el gen LOC_Os02g35070 del grup III, amb una expressió alta a l'endosperma de 25 DAP i a la llavor de 10 DAP, i el gen LOC_Os03g14980, amb una expressió alta a les plàntules de catorze dies després de la germinació. Els tres gens del grup I tenen una expressió baixa en tots els òrgans estudiats.

Taula R4. Proteïnes d'arròs que contenen tots o alguns dels dominis LisH-CTLH-CRA. Els símbols són els mateixos que en **Taula R3**.

Grup	Dominis	Esquema	ID	Definició
I	LisH-CTLH-CRA		LOC_Os03g13220	Ran binding protein 9-related
			LOC_Os01g56820	Ran binding protein 9-related
			LOC_Os05g06760	Macrophage erythroblast attacher-related
II	LisH-CTLH-CRA-RING		LOC_Os06g38940	Sporulation protein Rmd5-related (Glucose-induced sporulation protein 2)
III	SPRY-LisH-CTLH-CRA		LOC_Os02g35070	SPRY-domain containing protein
IV	LisH-CTLH-WD40		LOC_Os01g21940	WD domain, G-beta repeat domain containing protein
			LOC_Os02g19210	WD domain, repeat domain containing protein
			LOC_Os03g14980	Lisencephaly type-1-like homology motif
			LOC_Os08g06480	Lisencephaly type-1-like homology motif
			LOC_Os01g15020	Lisencephaly type-1-like homology motif
V	LisH-WD40		LOC_Os07g22220	putative WD-40 repeat protein family
			LOC_Os02g56880	transcriptional corepressor LEUNIG
			LOC_Os01g08190	transcriptional corepressor LEUNIG
			LOC_Os01g42260	transcriptional corepressor LEUNIG
			LOC_Os04g43130	transcriptional corepressor LEUNIG
			LOC_Os01g42270	transcriptional corepressor LEUNIG
			LOC_Os03g64300	THION30 - Plant thionin family protein precursor
IX	CTLH-CTLH		LOC_Os10g24070	Ran binding protein 9-related

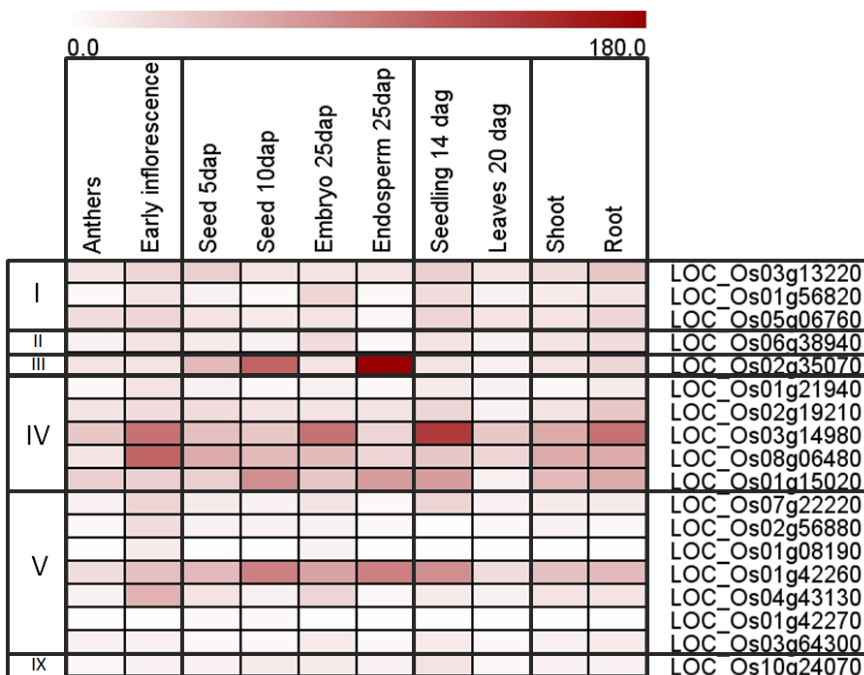


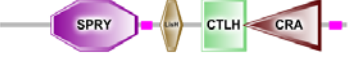
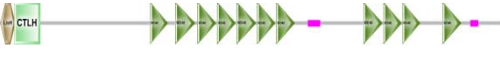

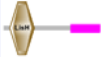







Figura R13.- Patró d'expressió dels gens d'arròs amb els dominis LisH, CTLH i CRA segons les dades dels estudis de RNA-seq en la base qTELLER per a arròs (<http://qteller.com>). El color intens representa una major acumulació de mRNA. Els grups de gens corresponen als definits en la **Taula R4**.

2.1.3.- Gens que contenen alguns dels dominis LisH-CTLH-CRA en *Arabidopsis thaliana*


Finalment es va procedir a la identificació dels gens d'*Arabidopsis thaliana* que codifiquen proteïnes amb al menys un dels dominis LisH, CTLH i CRA (**Taula R5**). S'han trobat trenta-dos gens classificats en onze grups segons els dominis proteics trobats. La majoria tenen una funció no determinada però alguns són reguladors de la transcripció. La majoria dels grups, però no tots, coincideixen amb els observats en blat de moro, però el nombre de gens per grup és variable. El grup I a *Arabidopsis* conté cinc gens dels quals es desconeixen les seves funcions tot i que estan anotats per homologia amb una proteïna humana. També en aquest cas el domini CRA només s'observa en presència de LisH i CTLH.

Taula R5. Gens d'*Arabidopsis thaliana* que contenen tots o alguns dels dominis LisH-CTLH-CRA.

Grup	Dominis	Esquema	ID	Definició
I	LisH-CTLH-CRA		AT4G09300	LisH and RanBPM domain-containing protein
			AT1G11110	LisH and RanBPM domain-containing protein
			AT1G61150	LisH and RanBPM domain-containing protein
			AT1G06060	LisH and RanBPM domain-containing protein
			At3g55070	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
II	LisH-CTLH-CRA-RING		AT2G22690	Glucose-induced degradation protein 2/Predicted E3 ubiquitin ligase
			At4g37880	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
			At5g09630	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
III	SPRY-LisH-CTLH-CRA		AT4G09340	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
			AT1G35470	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
			At4g09200	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
			AT4G09310	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
			At4g09340	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
IV	LisH-CTLH-WD40 repeats		AT3G15880	Topless-related 4, TPR4, WSIP2, WUS-interacting protein 2
			AT1G15750	Topless, TPL, WSIP1, WUS-interacting protein 1
			AT1G80490	Topless-related 1, TPR1
			AT3G16830	Topless-related 2, TPR2
			AT5G27030	Topless-related 3, TPR3
			AT5G08560	Transducin
			AT5G43920	Transducin
			AT1G73720	SMU1, suppressors of MEC-8 and UNC-52 1
V	LisH-WD40 repeats		At2g32700	Leunig homolog LUH, Mucilage-modified 1 MUM1
			At4g32551	LEUNIG, LUG, RON2, ROTUNDA 2
			AT5G67320	Osmotically responsive gene 15, HOS15
			AT4G31160	DCAF1, DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR 1
VII	LisH		AT3G55000	TON1, TON1A, TONNEAU 1, TONNEAU 1A
			AT3G55005	TON1B, TONNEAU 1B
IX	CTLH-CTLH		At5g66810	Uncharacterized protein
XII	LisH-CTLH-LisH-CTLH		AT2G25420	transducin family protein
XIII	SPRY-LisH		AT4G09250	SP1a/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
XIV	LisH-SRP40		AT5G57120	Uncharacterized protein
XV	LisH-LisH-SCOP		AT5G16210	Uncharacterized protein

Els símbols són els mateixos que en la **Taula R3**, amb l'excepció de:



domini SRP40_C: domini trobat a l'extrem C-terminal de la proteïna SRP40 de *S. cerevisiae*, una xaperona involucrada en el transport nucleocitoplasmàtic. , domini SCOP: possible domini de funció desconeguda.

2.1.4.-Anàlisi filogenètica de les proteïnes LICC (LisH-CTLH-CRA)

A continuació es va fer una recerca de proteïnes semblants a LICC1 en altres espècies representatives amb els genomes completament seqüenciats de plantes (Phytozome), fongs (Mycocosm) i altres Eucariotes (GeneBank). No es van trobar gens que codifiquessin proteïnes semblants en Procariotes. La presència dels tres dominis es va confirmar amb l'eina SMART. Es van identificar setenta-dues seqüències corresponents a vint-i-set espècies de *Viridiplantae*, fongs, animals, *Alveolata* i *Amoebozoa* (**Taula R6**). El nombre de gens per espècie varia entre un i set, sent, en general, més gran en plantes que en els altres grups.

Taula R6- Gens que codifiquen proteïnes LICC1 en diferents espècies. N-(aa): nombre d'aminoàcids des de l'inici de la proteïna a l'inici del domini LisH; -C(aa): nombre d'aminoàcids des del final del domini CRA fins al final de la proteïna

Gen	Tipus	aa	N-(aa)	-C (aa)	Codi d'accés	Definició	Grup	Subgrup
Arabidopsis thaliana 1	1a	277	70	21	At1g11110	LisH and RanBPM domain-containing protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Arabidopsis thaliana 2	1a	243	39	16	At1g61150	AtRamBP-binding	Viridiplantae	Eudicotyledons
Arabidopsis thaliana 3	1a	224	22	18	At4g09300	LisH and RanBPM domain-containing protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Arabidopsis thaliana 4	1b	213	11	14	At1g06060	LisH and RanBPM domains containing protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Arabidopsis thaliana 5	2	418	140	89	At3g55070	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 1	1a	226	22	16	XP_003543074.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog isoform X1	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 2	1b	215	13	13	XP_001236297.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 3	1b	215	13	14	XP_003527884.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 4	1b	215	13	13	XP_003544281.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog isoform X1	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 5	1b	215	13	13	XP_001236297.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Glycine max 6	2	436	161	89	XP_003536784.1	Macrophage erythroblast attacher	Viridiplantae	Eudicotyledons
Populus trichocarpa 1	1a	242	38	16	XP_002316637.2	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Populus trichocarpa 2	1a	226	22	16	XP_002305675.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Populus trichocarpa 3	1b	215	13	14	XP_002306895.1	RanBPM-related family protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Populus trichocarpa 4	1b	215	13	14	XP_002302009.1	RanBPM-related family protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Populus trichocarpa 5	2	412	137	89	XP_002311128.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Eudicotyledons
Oryza sativa 1	1a	246	42	16	Os03g13220.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Liliopsida
Oryza sativa 2	1b	216	14	14	Os01g56820.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Liliopsida
Oryza sativa 3	2	406	131	89	Os05g06760	Macrophage erythroblast attacher-related	Viridiplantae	Liliopsida
Zea mays 1	1a	226	22	16	GRMZM2G098797	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Liliopsida
Zea mays 2	1a	245	41	16	GRMZM2G096877	Glucose-induced degradation protein 8 homolog	Viridiplantae	Liliopsida
Zea mays 3	1b	215	13	14	GRMZM2G085602	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Liliopsida
Picea sitchensis 1	1a	261	57	16	ABK23060.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Acrogymnospermae
Picea sitchensis 2	1b	209	7	14	ABK23979.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Acrogymnospermae
Picea sitchensis 3	2	406	131	89	ABR16457.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Acrogymnospermae
Selaginella moellendorffii 1	1a	230	26	16	XP_002962197.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Lycopodiidae
Selaginella moellendorffii 2	1b	210	8	14	XP_002968915.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Lycopodiidae
Selaginella moellendorffii 3	2	410	136	88	XP_002968172.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Lycopodiidae
Selaginella moellendorffii 4	2	398	123	89	XP_002971744.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Lycopodiidae
Physcomitrella patens 1	1a	233	26	16	XP_001758468.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 2	1a	233	26	16	XP_001783856.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 3	1a	230	23	16	XP_001779937.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 4	1a	230	21	16	XP_001758468.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 5	1b	216	13	14	XP_001776447.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 6	1b	216	13	14	XP_001756780.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Physcomitrella patens 7	2	414	139	89	XP_001780731.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Bryophyta
Chlamydomonas reinhardtii 1	1a	232	26	18	XP_001690032.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Chlorophyta
Chlamydomonas reinhardtii 2	2	387	140	56	XP_001695737.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Chlorophyta
Chlorella variabilis 1	1a	244	26	19	XP_005845500.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Chlorophyta
Chlorella variabilis 2	2	381	106	89	XP_005847260.1	Uncharacterized protein	Viridiplantae	Chlorophyta
Magnaporthe oryzae 1	1a	306	81	33	XP_003719692.1	CTLH domain-containing protein	Fungi	Ascomycota
Magnaporthe oryzae 2	2	410	124	97	XP_003714651.1	Uncharacterized protein	Fungi	Ascomycota
Penicillium rubens 1	1a	266	29	42	XP_002564929.1	Uncharacterized protein	Fungi	Ascomycota

Penicillium rubens 2	2	406	125	92	XP_002562638.1	Uncharacterized protein	Fungi	Ascomycota
Saccharomyces cerevisiae 1	1	455	84	128	EGA57300.1	Glucose-induced degradation complex subunit GID8	Fungi	Ascomycota
Schizosaccharomyces pombe 1	1a	240	31	11	XP_594645.1	Uncharacterized protein	Fungi	Ascomycota
Schizosaccharomyces pombe 2	2	404	115	103	XP_595162.1	Ubiquitin ligase complex subunit	Fungi	Ascomycota
Cryptococcus neoformans 1	1a	259	21	24	XP_012048293.1	Uncharacterized protein	Fungi	Ascomycota
Cryptococcus neoformans 2	2	505	164	154	AFR92317.2	Macrophage erythroblast attacher isoform 1	Fungi	Basidiomycota
Puccinia graminis 1	1a	265	21	42	XP_003320385.2	Uncharacterized protein	Fungi	Basidiomycota
Puccinia graminis 2	2	484	136	162	XP_003328144.2	Uncharacterized protein	Fungi	Basidiomycota
Phytophthora infestans 1	1a	241	44	9	XP_002896982.1	Uncharacterized protein	Fungi	Oomycetes
Homo sapiens 1	1a	228	24	16	XP_060366.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog (TWA1)	Metazoa	Mammalia
Homo sapiens 2	2	396	120	90	XP_001284362.1	Macrophage erythroblast attacher isoform 6	Metazoa	Mammalia
Rattus norvegicus 1	1a	228	24	16	XP_942038.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog	Metazoa	Mammalia
Rattus norvegicus 2	2	396	120	90	XP_001008320.2	Macrophage erythroblast attacher	Metazoa	Mammalia
Alligator sinensis 1	1a	228	24	16	XP_006021697.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog	Metazoa	Sauria
Alligator sinensis 2	2	388	74	90	XP_006038729.1	Macrophage erythroblast attacher isoform X2	Metazoa	Sauria
Gallus gallus 1	1a	228	24	16	NP_001007872.1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog	Metazoa	Sauria
Gallus gallus 2	2	396	120	90	NP_001012622.1	Macrophage erythroblast attacher	Metazoa	Sauria
Xenopus laevis 1	1a	228	24	16	NP_001090234.1	Uncharacterized protein	Metazoa	Amphibia
Xenopus laevis 2	2	396	120	90	NP_001085357.2	Macrophage erythroblast attacher	Metazoa	Amphibia
Drosophila melanogaster 1	1a	225	24	15	NP_573315.1	Uncharacterized protein	Metazoa	Arthropoda
Drosophila melanogaster 2	1a	237	19	24	NP_611211.3	Uncharacterized protein	Metazoa	Arthropoda
Drosophila melanogaster 3	2	394	119	89	NP_733044.1	Uncharacterized protein	Metazoa	Arthropoda
Anopheles gambiae 1	1a	228	24	15	XP_309141.2	Uncharacterized protein	Metazoa	Arthropoda
Anopheles gambiae 2	2	394	119	89	XP_313610.2	Uncharacterized protein	Metazoa	Arthropoda
Paramecium tetraurelia 1	1a	220	22	15	XP_001449478.1	Uncharacterized protein	Alveolata	Ciliophora
Paramecium tetraurelia 2	1a	220	22	15	XP_001452374.1	Uncharacterized protein	Alveolata	Ciliophora
Toxoplasma gondii 1	2	468	87	192	XP_002364680.1	Uncharacterized protein	Alveolata	Apicomplexa
Acanthamoeba castellanii 1	1b	229	15	24	XP_004336902.1	RanBPMrelated	Amoebozoa	Discosea
Acanthamoeba castellanii 2	2	423	141	92	XP_004339250.1	Hypothetical protein	Amoebozoa	Discosea
Dictyostelium purpureum 1	1a	220	20	12	XP_003284114.1	Uncharacterized protein	Amoebozoa	Mycetozoa
Dictyostelium purpureum 2	2	391	116	89	XP_003287656.1	Uncharacterized protein	Amoebozoa	Mycetozoa

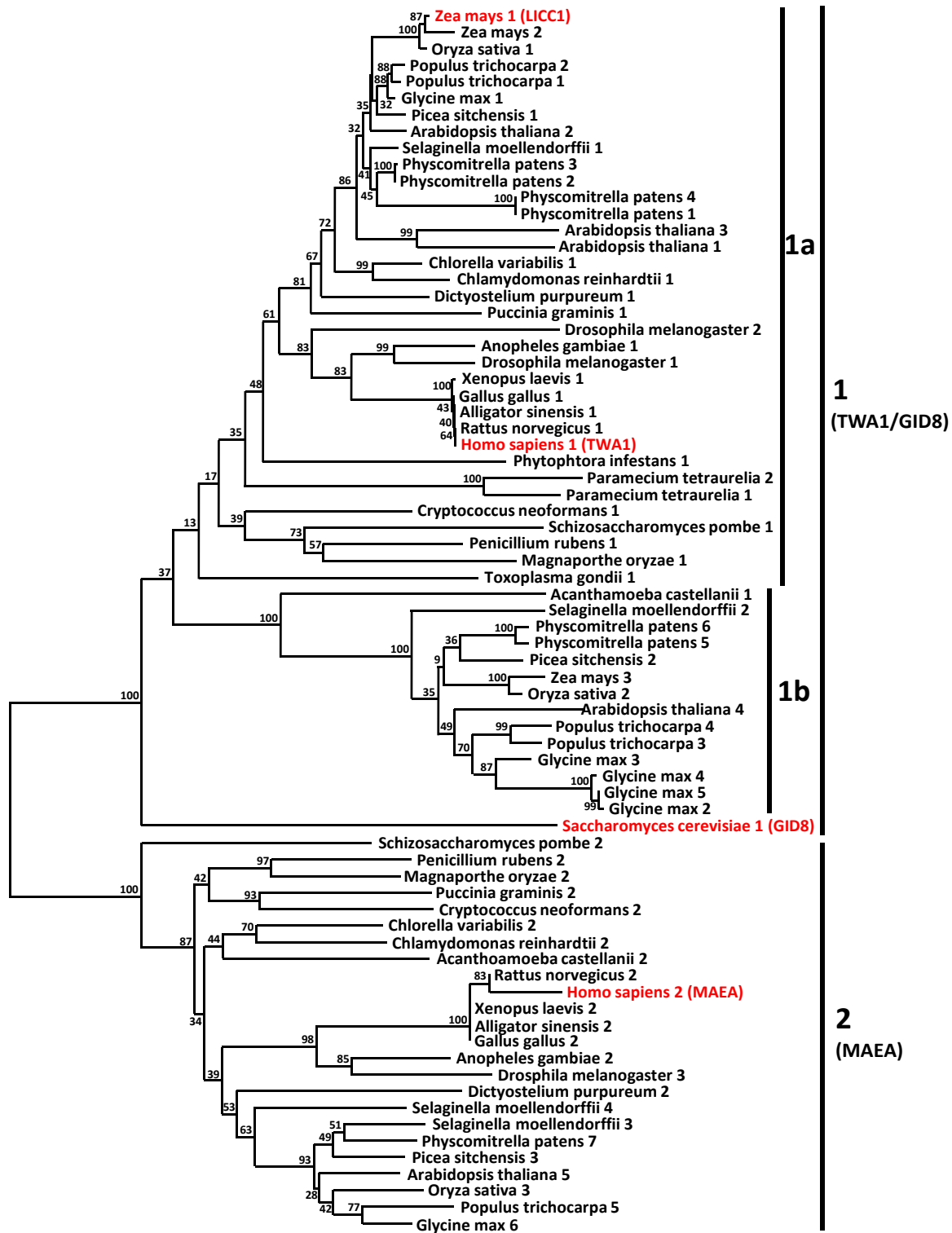


Figura R14. Anàlisi filogenètica de les proteïnes LisH-CTLH-CRA basada en el mètode de *neighbor-joining*. La identificació de les seqüències es troba a la **Taula R6**. S'indiquen els grups principals. S'indica el valor de bootstrap de mil rèpliques.

D'acord amb el nombre d'aminoàcids, les seqüències es poden agrupar en dos grans grups: al voltant de 230 aminoàcids el primer, i de 410 el segon. Les diferències de mida es deuen a les regions N- i C- terminals i no a la regió central dels dominis LisH-CTLH-CRA (**Taula R6**). Com els extrems N- i C-terminal varien en longitud, per obtenir alineaments més fiables únicament es va usar la part central de les seqüències compreses entre l'inici del domini LisH i el final del domini CRA. Aquestes seqüències es van alinear i l'alineament resultant es va fer servir per a la construcció d'un arbre filogenètic (**Figura R14**). Els resultats obtinguts divideixen les seqüències en dos grans grups (1 i 2), el primer grup dividit en dos subgrups (1a i 1b). El grup 1 correspon a les proteïnes de mida petita i el 2 a les de mida gran. El grup 1b només conté seqüències de plantes amb una única excepció de la seqüència procedent de l'ameba *Acanthamoeba castellanii*, tot i que es tracta d'un cas especial ja que s'ha descrit que el genoma d'aquesta espècie conté gran quantitat de gens procedents de genomes de plantes incorporats per transferència horitzontal (Clarke *et al.*, 2013).

L'única seqüència de llevat, GID8, es troba al grup 1 però queda fora dels dos subgrups ja que presenta una sèrie d'insercions entre els dominis que no estan presents a les altres seqüències i que ja havien estat observades prèviament en comparar la seqüència de GID8 amb els seus homòlegs d'humans (Menssen *et al.*, 2012). Al grup 1 també es troben LICC1 i els altres dos gens de blat de moro, el gen d'*Arabidopsis* At1g61150 i la proteïna humana TWA1, entre d'altres. Al grup 2 es troba la proteïna humana MAEA (Macrophage Erythroblast Attacher). Aquestes dades suggereixen que la funció LICC1 podria estar relacionada amb les descrites per als complexos GID/MRCTLH.

2.2- Patró d'expressió del gen *licc1*

El patró d'expressió del gen *licc1* es va estudiar mitjançant hibridació northern utilitzant com a sonda el cDNA MIH1 (**Figura R15**). Es va observar hibridació en totes les mostres analitzades però amb més intensitat en estadis primerencs del desenvolupament de la llavor i en antera. També es va veure hibridació en tija i pistil. Aquestes dades són coherents amb les obtingudes en experiments de RNA-seq (**Figura R13**).

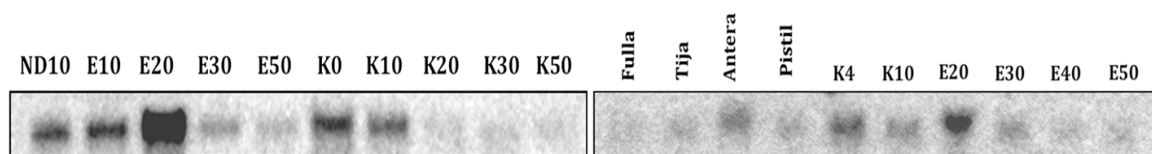


Figura R15. Anàlisi de l'expressió del gen *licc1* per northern en diferents òrgans i estadis de desenvolupament. El numero correspon als dies després de pol·linització. ND, endosperma; E, embrió; K, llavor sencera.

Per determinar amb més exactitud els teixits o tipus cel·lulars amb més expressió en llavor immadura i antera s'emprà la tècnica d'hibridació *in situ* (**Figura R16**) utilitzant la sonda MIH1 en sentit com a control. En les llavors immadures l'expressió es va localitzar principalment en l'embrió encara que es va observar un senyal molt feble en l'endosperma (**Figura R16 B**). En l'antera, l'expressió es va concentrar en els grans de pol·len (**Figura R16 D**).

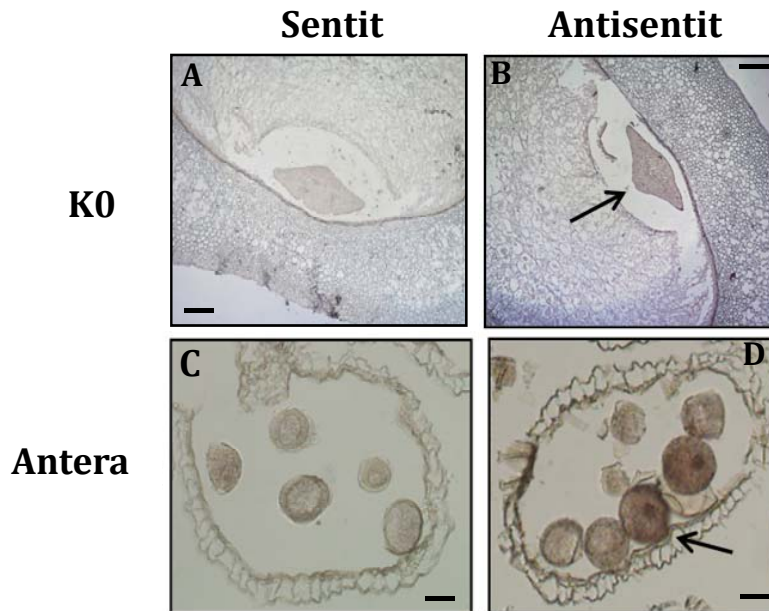


Figura R16. Hibridacions *in situ* corresponents al gen *licc1* amb la sonda MIH1 amb sentit (A, C) i antisentit (B, D) de talls transversals de llavors de 10 DAP (K10) i antereres. Les fletxes indiquen el lloc de l'hibridació. Barra: 200 µm en A i B, i 10 µm en C i D.

2.3- Patró d'acumulació de la proteïna LICC1

Els estudis d'acumulació de la proteïna LICC1 es van fer utilitzant un anticòs produït contra el pèptid MASSKKVVTRDEWE situat a l'extrem N-terminal de LICC1.

El correcte funcionament de l'anticòs es va assajar en una hibridació western-blot amb mostres de llavors no pol·linitzades de blat de moro. Es va obtenir una banda de 29 kDa a partir de 10 µg de proteïna total i dues, l'anterior i una altra de 26 kDa corresponent a la mida esperada (25.8 kDa), en fer servir 20 µg (**Figura R17**). La qual cosa suggereix que prové d'una modificació postraduccional. La petita diferència entre ambdues proteïnes, d'uns 3 kDa, pot ser deguda a desiguals nivells de fosforilació, atès que cada grup fosfat incrementa el pes d'una proteïna en aproximadament 1 kDa. Els programes de predicció de llocs de fosforilació mostren entre cinc i sis possibles llocs, un nombre suficient per explicar les mides observades d'ambdues bandes (**Figura R18**) (NetPhos 2.0 Server, Blom *et al.*, 1999; NetPhosK 1.0 Server, Blom *et al.*, 2004; YinOYang 1.2 Server, Gupta *et al.*, 2002). En qualsevol cas, sense més dades experimentals no es poden descartar altres tipus de modificacions.

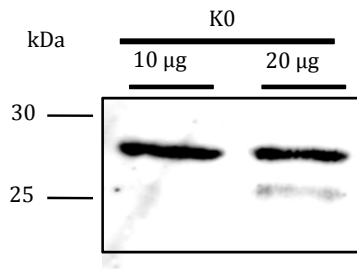


Figura R18. Predicció de llocs de fosforilació de la proteïna LICC1 segons el programa NetPhos 2.0

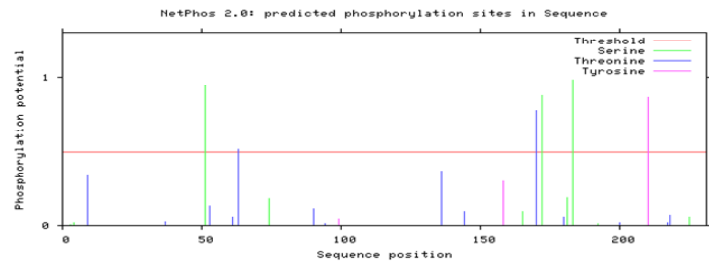


Figura R17- Detecció de la proteïna LICC1 amb l'anticòs anti-LICC1 mitjançant un gel SDS-PAGE (12.5%). Es van carregar dues quantitats de proteïnes totals extretes de llavor no pol·linitzada de blat de moro. El pes molecular s'indica a l'esquerra.

El grau d'acumulació de la proteïna a diferents estadis de desenvolupament de la llavor de blat de moro, tija, antera i fulla es va determinar mitjançant western-blot (Figura R19). Es van observar dues bandes en la majoria de les mostres, però no en totes. La intensitat de la banda de 26 kDa disminuïa al principi del desenvolupament de la llavor, desapareixia als 8 DAP i assolía un màxim als 20 DAP. També està present a l'endosperm, però no a la tija, fulla o anterres. En canvi, la banda de 29 kDa era present en totes les mostres amb una intensitat semblant, excepte a l'antera on el senyal era més feble. El patró d'acumulació de proteïna LICC1 és, doncs, semblant al d'acumulació de mRNA observat per al gen *licc1* (Figura R12). Les diferències d'acumulació entre les dues bandes segons l'òrgan o l'estadi de desenvolupament seria compatible amb la hipòtesi de que la banda de 29 kDa correspon a modificacions post-traduccionals.

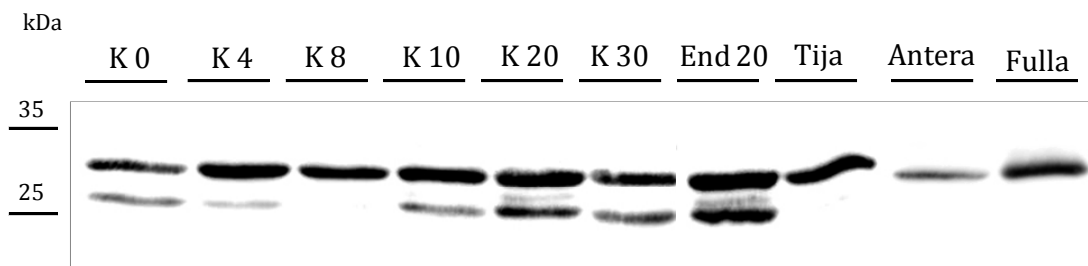


Figura R19. Anàlisi western-blot d'extractes proteics (20 µg) de llavors (K) de blat de moro a diferents estadis de desenvolupament, de tija, antera i fulla emprant l'anticòs anti-LICC1. El número representa els dies després de la pol·linització. A l'esquerra els marcadors de pes molecular.

2.4- Interacció de la proteïna LICC1 amb d'altres proteïnes

Està descrit que els dominis LisH, CTLH i CRA són responsables de la interacció amb altres proteïnes. Resultava molt probable, doncs, que LICC1 interaccionés amb altres proteïnes. També s'ha descrit que proteïnes homòlogues a LICC1 en llevat (GID8) i humans (TWA1) formen part de complexos proteics de gran massa, per la qual cosa es va examinar si LICC1 formava part d'un complex proteic gran.

2.4.1- Inclusió de LICC1 en complexos proteics

La centrifugació diferencial consisteix en la centrifugació dels extractes cel·lulars a velocitats creixents per després analitzar les mostres obtingudes mitjançant hibridació western. Si una proteïna és soluble llavors apareixerà sempre en la fracció soluble, mentre que si forma part d'un complex proteic precipitarà. Quan més gran sigui el complex menor serà la velocitat a la que cal fer la centrifugació per a que precipiti. En el nostre cas les centrifugacions es van fer a 10, 20, 100 i 200 mil g (**Figura R20**). Les bandes de 26 i 29 kDa van aparèixer en totes les mostres tot i que la intensitat de la banda de 26 kDa va ser molt menor a les mostres de 200000 g. Això voldria dir que ambdues formes de LICC1 formen part de diversos complexos de diferent pes, incloent-hi complexos de molt alt pes ja que apareixen al pelet de les centrifugacions més lentes (10P). A més a més, als pelets de 100000 g i, sobre tot, al de 200000 g, apareix una banda d'uns 40 kDa que no apareix a cap altre mostra. Aquesta banda podria correspondre a un altre modificació postraduccional de LICC1 que estaria present en baixa concentració i per això no s'observa als western blot normals, però que es fa evident amb les centrifugacions. Aquesta forma de LICC1 forma part d'un complex proteic d'entre 250 i 600 kDa (Tomaščíková, 2012). Desconeixem quina modificació postraduccional produeix aquesta diferent forma, però la diferència de mida respecte a la massa esperada fa pensar que podria correspondre l'afegiment d'una ubiquitina. De fet, el programa UbPred (*Predictor of protein ubiquitination site*; <http://www.uppred.org>) prediu l'existència de dos llocs possibles d'ubiquitinació a LICC1.

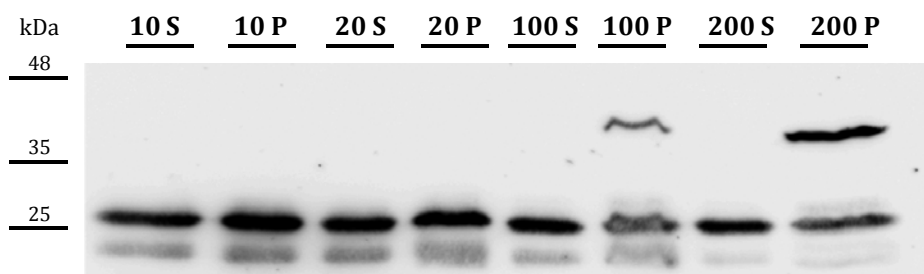


Figura R20. Distribució de LICC1 en fraccions cel·lulars mitjançant centrifugacions a partir de proteïnes de fulla de blat de moro. Les mostres corresponen a les proteïnes que es troben en la part soluble (fraccions 10S, 20S, 100S, 200S) com en els pelets (10P, 20P, 100P, 200P) després de centrifugacions a 10000, 20000, 100000 i 200000 g.

2.4.2- Interacció de la proteïna LICC1 amb microtúbuls

Una de les funcions atribuïdes als dominis LisH-CTLH és la d'interactuar amb els microtúbuls. S'ha demostrat que moltes proteïnes amb aquests dominis interactuen amb microtúbuls, com ocorre amb les proteïnes humanes LIS1 (Reiner i Sapir, 2013), RanBPM (Puverel i Tessarollo, 2013), katanin p60 (Burk i Ye, 2002) o la proteïna d'*Arabidopsis* TONNEAU (Azimzadeh et al., 2008). Per aquesta raó es van plantejar experiments per demostrar aquesta interacció. Concretament es va pensar en assaigs de cosedimentació *in vitro* amb microtúbuls. Aquests assajos es basen en el fet que, degut a la seva massa molecular, els microtúbuls precipiten quan es centrifuguen a 100.000 g i, amb ells, qualsevol proteïna que hi estigui associada.

Inicialment es va procedir a la producció i purificació de proteïna LICC1 recombinant a *E.coli*. Per fer això la regió codificant del gen *licc1* es va clonar al plasmidi pET28a. Un cop introduïda als bacteris, aquesta construcció va induir la producció de proteïna LICC1 recombinant fusionada a un pèptid de polihistidina (6xHis) en N-terminal que va permetre la seva purificació mitjançant columnes d'afinitat. En la **Figura R21** es mostra l'anàlisi per electroforesi de la proteïna pET-LICC1 purificada (carril 6). La proteïna pET-LICC1 purificada es va dialitzar en una solució tampó (Pipes pH 7, Mg²⁺ i EGTA) abans de fer-la servir en els assajos de cosedimentació.

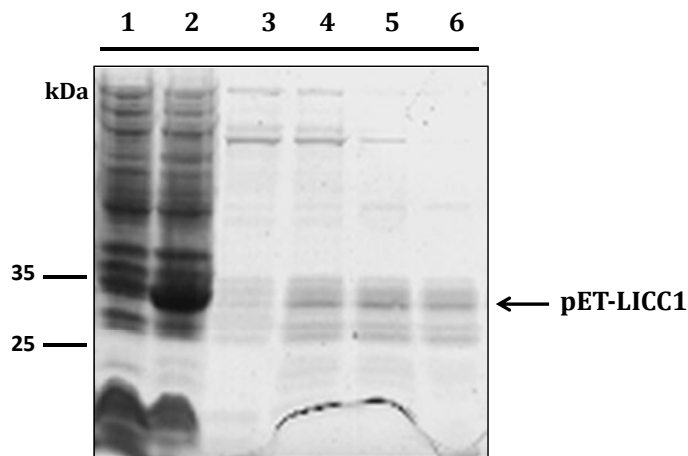


Figura R21. Purificació de la proteïna pET-LICC1 produïda en la soca BL21 d'*E.coli*. Electroforesi en gel 12.5% SDS-PAGE i tinció amb blau de coomassie de les diferents fraccions (20 µl) obtingudes en les diferents etapes de purificació. Carril 1, extracte proteic total de cultiu bacterià abans de la inducció; carril 2, extracte proteic total del cultiu induït durant 5 h a 37 °C; carril 3, 4, 5 i 6, proteïnes purificades i eluïdes a diferents concentracions d'imidazol: 60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM respectivament. El pes molecular esperat de la proteïna pET-LICC1 és de 32 kDa.

En la prova de la cosedimentació, procediment explicat en l'apartat 10 de Materials i Mètodes, (**Figura R22 A**), per a cada mostra es van analitzar les fraccions precipitada (P) i soluble (S) mitjançant electroforesi SDS-PAGE, obtenint els següents resultats:

- Microtúbuls sols (MT). Només van aparèixer a la fracció precipitada amb la mida esperada per a la tubulina (55 kDa), confirmant el fet de que els microtúbuls precipiten en centrifugar-los.
- BSA. Proteïna soluble d'uns 68 kDa. Com era d'esperar només apareix a la fase soluble.
- Microtúbuls i BSA (MT + BSA). El BSA no s'uneix als microtúbuls. En conseqüència, no hauria de aparèixer a la fase precipitada, com així va ser.
- pET-LICC1. La mida esperada de pET-LICC1 és de 32 kDa. Els resultats ens mostren que si bé una majoria de la proteïna apareix en la fase soluble, aproximadament el 30% apareix a la fase precipitada, com ja s'havia observat prèviament amb la proteïna nativa (**Figura R20**).
- pET-LICC1 amb els microtúbuls (pET-LICC1 + MT). En aquest cas es van obtenir dues bandes només a la fracció precipitada: una corresponent a la tubulina i l'altra a pET-LICC1. No es va obtenir cap senyal a la fase soluble. Aquests resultats indiquen que LICC1 es pot associar amb els microtúbuls.

Per confirmar aquestes dades, els experiments de cosedimentació es van repetir però en aquest cas el gel de SDS-PAGE no es va revelar amb tinció de nitrat de plata sinó que es va hibridar amb l'anticòs anti-LICC1 per corroborar que la banda de 32 kDa obtinguda prèviament corresponia a pET-LICC1. Els resultats van mostrar un comportament semblant (**Figura 22 B**). La proteïna pET-LICC1 apareix en ambdues fraccions quan s'incuba sola, però desapareix de la fracció soluble quan la incubació es fa en presència de microtúbuls. Aquests resultats permeten afirmar que LICC1 és una proteïna capaç d'associar-se als microtúbuls com a mínim *in vitro*.

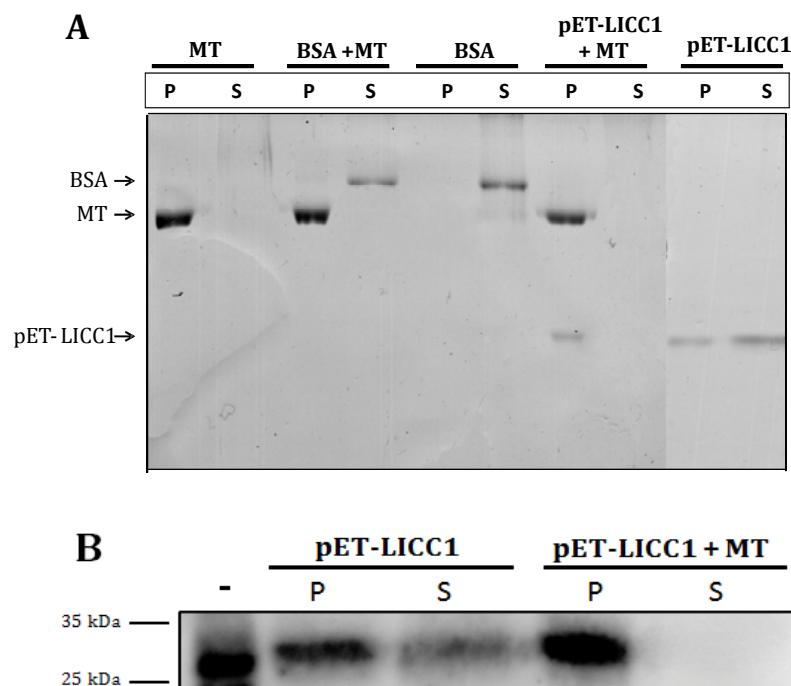


Figura R22: Cosedimentació amb els microtúbuls (MT). **A**, cosedimentació amb i sense els MT (55 kDa) de BSA (68 kDa) i pET-LICC1 (32 kDa). Les proteïnes es mostren en el sobrenedant (S) i en el precipitat (P) separades en un gel del 12.5% SDS-PAGE i tinció amb nitrat de plata. **B**, Cosedimentació de pET-LICC1 amb els MT, detecció per immunodetecció amb l'anticòs anti-LICC1.

2.4.3- Identificació d'altres proteïnes que interactuen amb LICC1

Els nostres resultats anteriors indiquen que LICC1 podria interactuar amb els microtúbuls, però les dades prèvies indiquen que les proteïnes que contenen els dominis LisH-CTLH i CRA poden interactuar amb moltes proteïnes (Gerlitz *et al.*, 2005). No es pot descartar, doncs, que LICC1 pugui interactuar també amb altres proteïnes a més a més de proteïnes que formen els microtúbuls. És per això que es va provar d'identificar altres possibles proteïnes que podrien interactuar amb LICC1 emprant la immunoprecipitació (IP).

Es van emprar les boles magnètiques “*Dynabeads® M-280 Sheep anti rabbit IgG*”. Les mostres van ser extractes proteics totals de fulles de blat de moro. Es va escollir aquest òrgan perquè tot i que l'expressió del gen *licc1* (**Figura R15**) i l'acumulació de la proteïna LICC1 (**Figura R19**) no són tan grans com a embrió immadur, l'elevada presència de substàncies de reserva als embrions fa que sigui molt difícil obtenir mostres de proteïnes d'embrió amb prou puresa per assegurar un bon resultat en aquest tipus d'experiments. La quantitat de proteïna emprada per fer la IP va ser de 27 µg. Les boles magnètiques van ser incubades amb 10 µl de l'anticòs anti-LICC1 (1 mg/ml) durant tota la nit a 4 °C. Posteriorment es va fer un *crosslinking* i, a continuació, es van incubar de nou amb la mostra de proteïna de fulla durant 4 h a 4 °C. Com a control negatiu es van incubar boles magnètiques amb el sèrum pre-immune en les mateixes condicions.

Les proteïnes retingudes per l'anticòs van ser separades mitjançant una electroforesi SDS-PAGE i tenyides amb nitrat de plata (**Figura R23**). En examinar els resultats de l'immunoprecipitació (**Figura R23**), es va observar que una banda corresponent a una proteïna d'uns 68 kDa apareixia molt més clarament al carril corresponent a la immunoprecipitació respecte al control. Aleshores, va procedir a l'identificació de la proteïna de 68 kDa, per la qual cosa la banda es va retallar del gel i es va analitzar per espectrometria de masses.

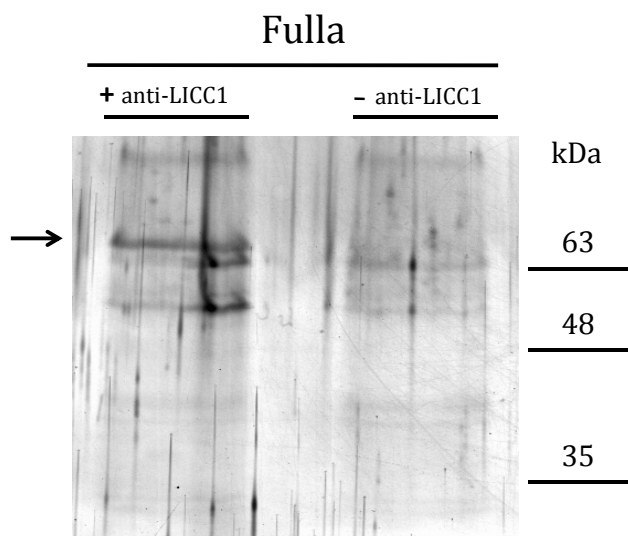


Figura R23. Immunoprecipitació de proteïnes que interactuen amb LICC1 presents a les fulles de blat de moro. LICC1 va ser immunoprecipitada a partir de proteïnes totals de fulla de blat de moro i a continuació les proteïnes eluïdes van ser analitzades per SDS-PAGE i tinció amb plata (+anti-LICC1). Com a control es va seguir el mateix procés però emprant sèrum pre-immune en lloc d'anticòs anti-LICC1 (-anti-LICC1). Gel tenyit amb nitrat de plata. Identificació d'una banda (fletxa) de mida 68 kDa en el carril “+anti-LICC1”.

La banda retallada del gel de la **Figura R23**, d'aproximadament 68 kDa, va ser analitzada i identificada per espectrometria de masses. La majoria dels pèptids identificats corresponien a BSA, keratina humana, tripsina i caseïna, provinents amb tota seguretat de contaminacions o de proteïnes emprades durant el procés experimental (**Taula R7**). En canvi, dos dels pèptids van ser identificats com part d'una mateixa proteïna de blat de moro (LEANPVESCR i VPIVDFTPEAR) (**Figura R24**). La seqüència de la proteïna identificada, inicialment anotada com de funció desconeguda (B6ST03), va ser comparada amb la darrera anotació del genoma de blat de moro (*Zea mays* 6a), observant-ne que corresponia a la proteïna codificada pel gen GRMZM2G319062. Aquest gen està localitzat al cromosoma 4 (28099216...28101623 revers) i codifica una proteïna de 71 kDa (**Figura R24**). La seva seqüència peptídica es va comparar amb les bases phytozome i GeneBank, obtenint múltiples resultats positius amb proteïnes anotades com a polifenol-oxidases cloroplàstiques de diferents espècies (**Taula R8**). Aquesta proteïna conté un domini tirosinasa, un domini PPO1_DWL, un domini PPO_KFDV (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), i conté un possible pèptid de transit a cloroplast (cTP) (CholorP 1.1 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>). Els dominis PPO1_DWL i PPO_KFDV són típics de les polifenol oxidases, enzims que també solen contar amb un pèptid de transit a cloroplast.

Taula R7- Pèptids identificats en l'anàlisi de la banda procedent de la immunoprecipitació.

Acc.	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]	calc. pI
P02769	Serum albumin OS=Bos taurus	1044,95	41,35	22	47	69,2	6,18
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens	638,34	30,75	17	29	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens	603,47	25,20	11	19	65,4	8,00
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens	492,36	12,52	7	11	62,0	5,24
P00761	Trypsin OS=Sus scrofa	485,04	42,86	11	21	24,4	7,18
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens	393,99	12,16	6	10	58,8	5,21
B6ST03	Putative uncharacterized protein OS=Zea mays	89,80	3,26	2	4	70,9	7,30
P02662	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1	48,84	10,28	2	3	24,5	5,02

MATASAASSFLVPATAIAPTSPACSTVPKNNKNAAGRRRRTLQCRASGRRGDDSDSRLWLPRREVLTLGLGGVAASFVGY
PDLASIALLEANPVESCRGKEKVTLEKLVESDPNRDFPCPPASRVPIVDFTPEARVTRVRRPAHLLDPEYQEKYREAVGKMR
ALDGSNPLSFAAQAQAVHQSICDGHYRLDPTEKNRPFVDFHSWIFAPWHRMYIYFYERALGQLIGDDTFALPYWNWDAPAGM
GIPAIKQGVSTADNPLYDPYRNMENMDALLDLDYLLKPRRDTIPFEPPTDPAARAKYDDAVQTNLCTIYLQQVRDGGKGR
AFLGKLCSESSFRVKEINERSKRRQADGQSSKVSQSKSQSGTLERMAHTTVHVWTGRANPATCSAEQGGVVGHDGKPHC
QVDMGFLGTAGRDPLFYSHHANVDRMWHIWSTRLGKGFDDPEWLDTSFVFDYDYSRPLVRMKFRDVLDAATRLGYTYDKE
SEALPWLNSKPTRFSGGGKAKAKAAPKVASEFPLTLTDEAVDVPVAVPARQAGKDLVLLIEGIEYDPQINNKFDVVINV
AREDAARVGPDKSEYAGSFSAVPSSNAAGGTLVGGFTLALDGVLDLGLAGASAVDIVLVPHTTEGEIKIYLPPTIENA

Figura R24. Seqüència de la proteïna codificada pel gen GRMZM2G319062 i els dominis identificats: vermell, pèptids identificats; groc, domini tirosinasa; blau, domini PPO1_DWL; verd, domini PPO1_KFDV.

Taula R8- Proteïnes que mostren similitut amb la proteïna identificada mitjançant IP.

Acc.	Espècie	Definició	% identitat
Sobic.007G068500	<i>Sorghum bicolor</i>	Similar to polyphenol oxydase	84
AAB94293.1	<i>Saccharum sp</i>	Polyphenol oxidase	65
XP_008662712.1	<i>Zea mays</i>	Polyphenol oxidase I, chloroplastic-like	64
XP_004974375.1	<i>Setaria italica</i>	Polyphenol oxidase I, chloroplastic-like	60
XP_010100574.1	<i>Morus notabilis</i>	Polyphenol oxidase	53
BAH36898.1	<i>Triticum aestivum</i>	Polyphenol oxidase	51
XP_003571384.1	<i>Brachypodium distachyon</i>	Polyphenol oxidase I, chloroplastic-like	51

Per confirmar la interacció de LICC1 amb una PPO es va fer servir un anticòs específic de polifenol oxidases de *Spinacia oleracea* (anti-PPO) (agraïment per la donació del grup Dr. Manuel Rodríguez Concepción). Es va repetir l'assaig de la immunoprecipitació emprant l'anticòs anti-LICC1 (**Figura R25**) utilitzant extractes de fulla de blat de moro i també d'embrió immadur de blat de moro (23 DAP). Les condicions emprades per a fulles van ser les mateixes que les anteriors i per a embrió es van usar 8 µg de proteïna total. Les proteïnes retinudes van ser separades mitjançant electroforesi SDS-PAGE, transferides a una membrana i hibridades amb l'anticòs anti-PPO (**Figura R25**). Cap dels controls amb sèrum pre-immune no presentaren senyal contra l'anticòs anti-PPO en canvi, amb l'anticòs, es van obtenir una banda d'hibridació a les fulles. Aquest resultat confirma la interacció de LICC1 amb, com a mínim, una polifenol-oxidasa a les fulles. La immunoprecipitació amb extractes totals d'embrió immadur també va donar positiu amb l'anticòs anti-PPO (**Figura R25**). Els controls de proteïna total de fulla de blat de moro i de fulla d'*Arabidopsis* donaren els resultats esperats. A la fulla de blat de moro apareix una banda de mida semblant a l'obtinguda amb la immunoprecipitació i que deu correspondre a la PPO més abundant en aquest teixit. D'alta banda, no apareix cap senyal a la fulla d'*Arabidopsis*, cosa que concorda amb el fet descrit de que l'*Arabidopsis thaliana* no conté PPOs (Tran *et al.* 2012).

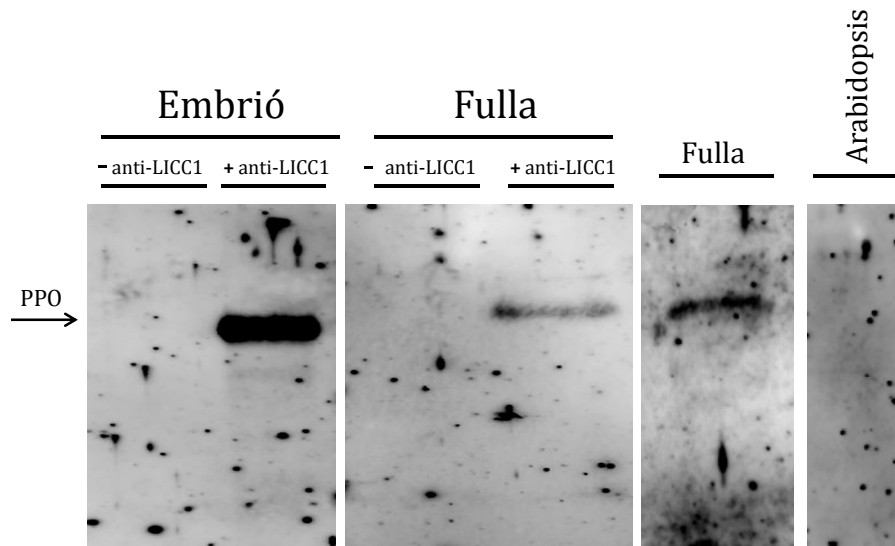


Figura R25. Immunodetecció de PPO sobre proteïnes immunoprecipitades amb anti-LICC1. Extractes de proteïnes totals d'embrió i fulla varen ser sotmeses a immunoprecipitació amb anti-LICC1. Les proteïnes eluïdes es van separar per SDS-PAGE, transferides a membrana i hibridades amb anti-PPO. La immunoprecipitació es va fer en presència de l'anticòs anti-LICC1 (+anti-LICC1) o del serum preimmune (-anti-LICC1. Control sense anticòs. Els controls corresponen a extractes de proteïnes totals de fulla de blat de moro i *Arabidopsis*.

2.5- Transformació transitòria de cèl·lules de fulla de tabac mitjançant agroinfiltració

La cosedimentació amb microtúbuls va revelar que LICC1 interactua amb microtúbuls *in vitro*. Per confirmar aquesta interacció *in vivo* i per delimitar la part de la proteïna responsable, es va procedir a transformar cèl·lules vegetals amb construccions que expressessin LICC1 fusionat a YFP. Primer de tot es va obtenir un cDNA que contingués la regió codificant del gen *licc1* sencera. Es va partir de RNA d'apex de blat de moro que es va convertir en cDNA d'una cadena i posteriorment es va amplificar mitjançant PCR fent servir els oligonucleòtids MiH1-D3 i MiH1-R4 (**Figura R26**). El fragment obtingut es va clonar al plasmidi pCRII-TOPO. A partir d'aquí es van obtenir els fragments que es van fer servir per a les construccions: proteïna sencera anomenada LICC1, fragment LC amb els dominis LisH i CTLH i el fragment CRA amb el domini CRA (CT11-RanBPM) (**Figura R27**). Els tres fragments es van clonar al vector pYL que contenia el promotor 2x35S i el gen informador YFP fusionat en C-terminal:

- **pLICC1**: Tota la regió codificant LisH-CTLH-CRA (oligonucleòtids: MiH1 LisH-CRA fw i MiH1 LisH-CRA rev).
- **pLC**: Els dominis LisH-CTLH (oligonucleòtids: MiH1 LisH-CRA fw i MiH1 LisH rev).
- **pCRA**: El domini CRA (oligonucleòtids: MiH1 CRA fw i MiH1 LisH-CRA rev).

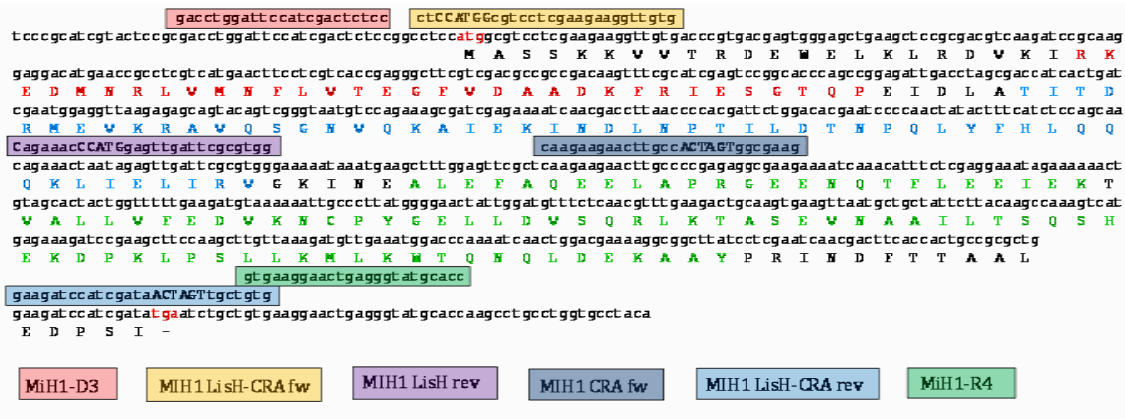


Figura R26. Seqüència nucleotídica i aminoacídica del gen *licc1*. Els oligonucleòtids emprats per la clonació dels fragments en el vector pCRII-TOPO es representa en quadrats de diferents colors. Les lletres majúscules dels oligonucleòtids representen les dianes de restricció dels enzims *NcoI* i *SpeI*. Els aminoàcids de color vermell i blau corresponen al domini LisH-CTLH i en verd el domini CRA de la proteïna.

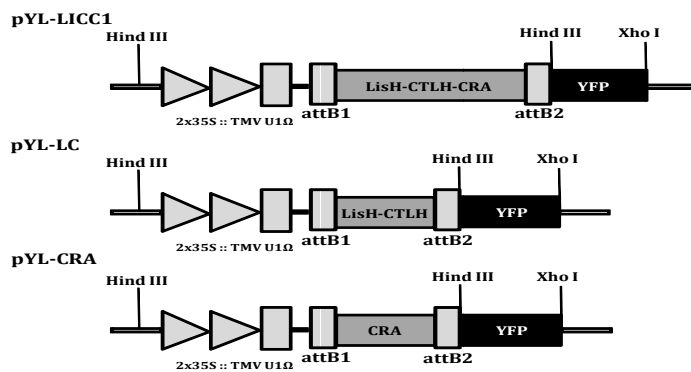


Figura R27: Representació de les construccions emprades per a la transformació de cèl·lules vegetals basades en el vector pYL amb el promotor 2x35S::TMVU1Ω i la regió codificant del gen *yfp*. S'indica la posició dels enzims de restricció *HindIII* i *XhoI*.

2.5.1- Localització subcel·lular de LICC1 i LC

Les tres construccions (**Figura R27**) es van introduir a *Agrobacterium tumefaciens* de manera que més tard es van agrofilitrar en cèl·lules de mesòfil de fulles de *Nicotiana benthamina*. Les observacions al microscopi confocal van mostrar que la proteïna sencera té una distribució citoplasmàtica, no observant-se senyal al nucli (**Figura R28 A**). La construcció LC-YFP també va mostrar una distribució citoplasmàtica encara que s'observaren unes estructures puntuals més intenses i senyal al nucli (**Figura R28 B**). El control amb la YFP sola tenia una distribució semblant a LC-YFP però sense estructures puntuals intenses (**Figura R28 C**). Les cèl·lules transformades amb la construcció pYL-CRA van mostrar una intensitat de senyal molt feble i no es van poder realitzar fotografies.

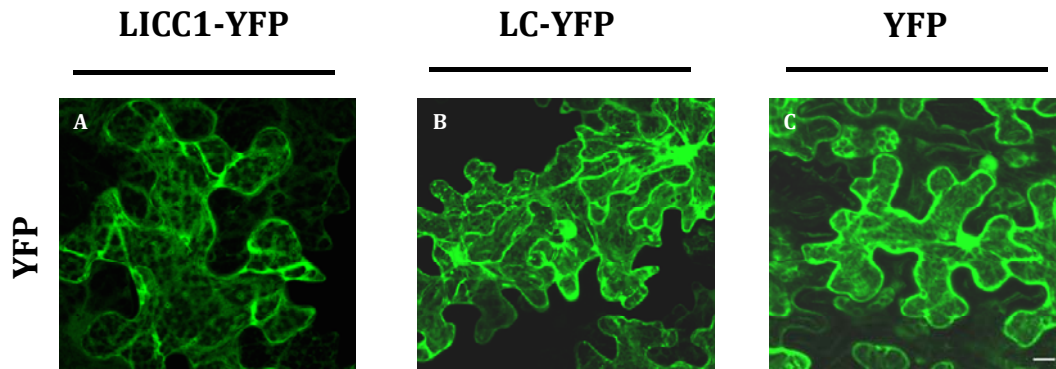


Figura R28. Distribució subcel·lular de la proteïna LICC1-YFP (A), el fragment LC-YFP (B) i control pYL-YFP (C) en cèl·lules de mesòfil de fulles de *N.benthamiana* agroinfiltrades. Barra 10 μ m.

2.5.2.- Colocalització amb microtúbuls

Per comprovar si la distribució observada podria correspondre amb els microtúbuls es va procedir a colocalitzar LICC1-YFP i LC-YFP amb la β -tubulina marcada amb RFP (TUB-RFP) (gentilesa del Dr. Takehide Kato). En la **Figura R29 A-C** es mostren dues cèl·lules, a l'esquerra cotransformada amb LICC1-YFP i TUB-RFP, i a la dreta solament amb LICC1-YFP. En la cèl·lula cotransformada es pot observar un solapament quasi perfecte entre els dos marcatges (**Figura R29 C**). Això suggereix que LICC1-YFP estaria associada als microtúbuls en aquestes cèl·lules. El mateix assaig realitzat amb la construcció LC-YFP mostrarà també un solapament entre els dos marcatges però LC-YFP, i no TUB-RFP, va marcar el nucli i algunes zones del citoplasma (**Figura R29 E-G**). Els punts intensos en el citoplasma són marcats per les dues construccions, tot i que és remarcable que TUB-RFP no forma punts intensos quan es cotransforma amb LICC1-YFP i si quan es cotransforma amb LC-YFP. Això mostra que la presència del fragment LC altera d'alguna manera la distribució de les tubulines.

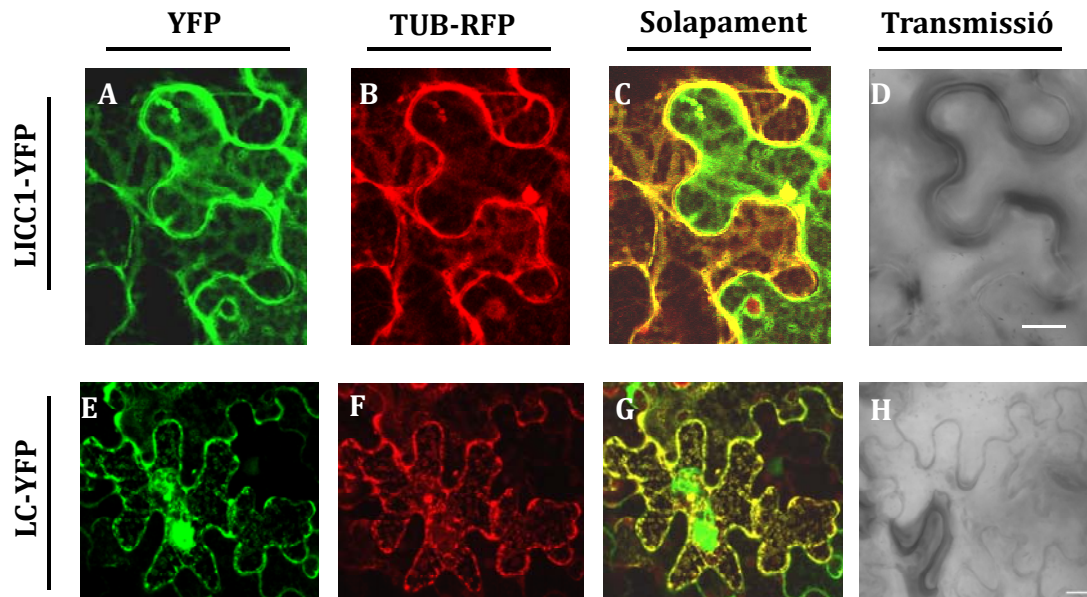
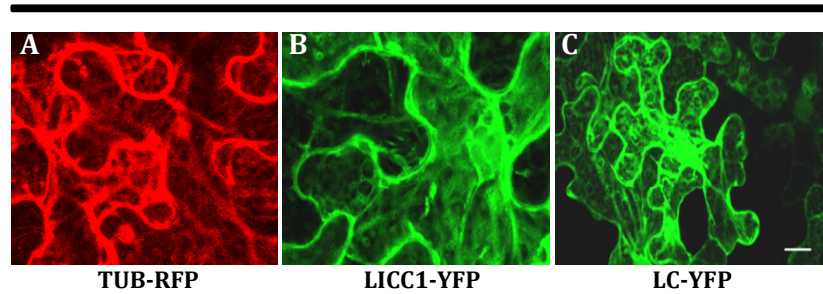


Figura R29. Agroinfiltracions en fulles de *N.benthamiana* de les construccions LICC1-YFP i LC-YFP (macatge verd) conjuntament amb la construcció TUB-RFP (β -tubulina, marcatge vermell). Les figures (A-D) fan referència a la construcció que expressa la proteïna sencera, LICC1-YFP i les figures (E-H) a la construcció que expressa el fragment LC-YFP (LisH-CTLH). YFP, fa referència a les observacions al canal YFP; RFP fa referència a les observacions al canal RFP. Solapament fa referència a les observacions amb tots dos canals al mateix temps. i transmissió a la llum blanca. Barra 10 μ m.

El paclitaxel és una droga antimitòtica que s'uneix a la subunitat β de la tubulina, provocant una disfunció de la unió dels microtúbuls. Per tant, si LICC1 i LC estan associades als microtúbuls la seva distribució subcel·lular hauria de canviar en afegir paclitaxel a les cèl·lules transformades (**Figura R30**). Un cop les cèl·lules van ser agroinfiltrades amb els plasmidis de les diferents construccions es van deixar passar tres dies fins obtenir un senyal de la transformació i posteriorment es va aplicar la droga a la concentració de 20 μ M, es deixà actuar durant 24 h i s'observà en el microscopi. L'aplicació del paclitaxel va produir, com era d'esperar, un profund efecte en la distribució dels microtúbuls (TUB-RFP) en les cèl·lules del mesòfil on la distribució uniforme de la RFP passa a ser majoritàriament puntual (**Figura R30 D i F**). Un efecte semblant es va observar en la distribució de la proteïna sencera LICC1-YFP (**Figura R30 E**) i del fragment LC-YFP (**Figura R30 G**). En afegir paclitaxel LICC1-YFP es localitza en uns punts intensos al citoplasma que majoritàriament colocalitzen amb la TUB-RFP (**Figura R30 D i E**). Un efecte semblant es va observar en la construcció LC-YFP, tot i que en aquest cas la localització nuclear de LC-YFP es va mantenir mentre que TUB-RFP seguia absent al nucli (**Figura R30 F i G**).

Sense tractament



Paclitaxel

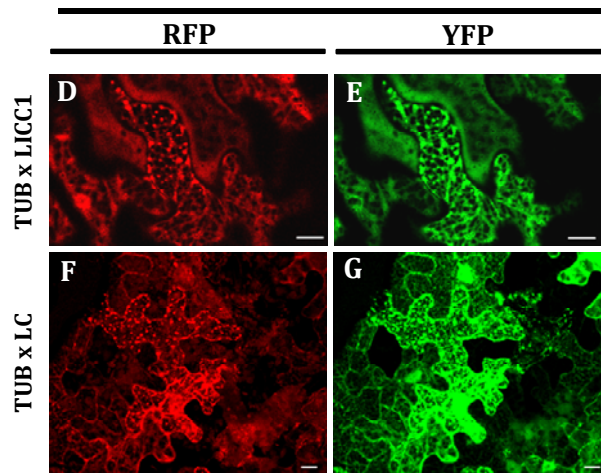
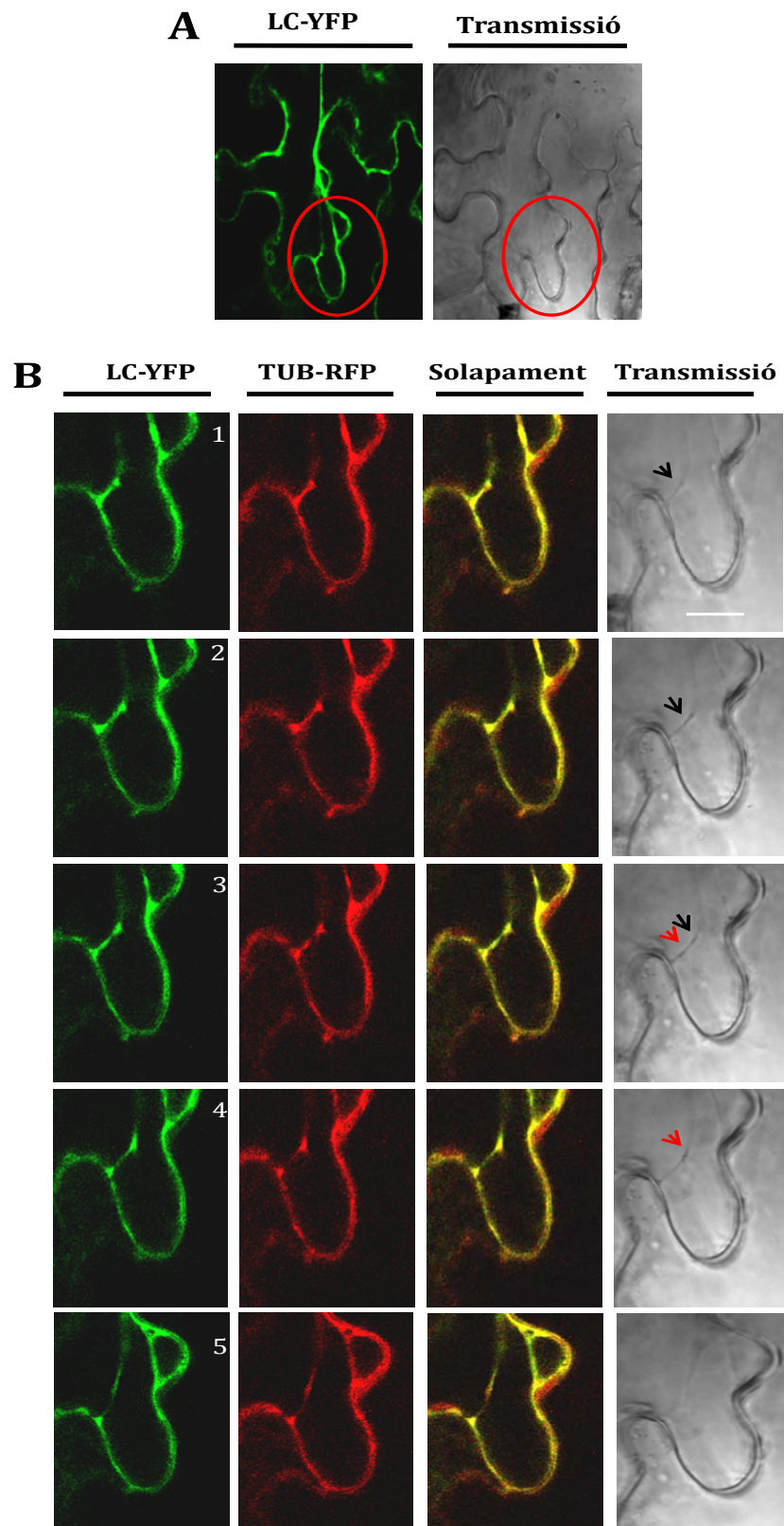


Figura R30. Efecte de la droga paclitaxel en fulles de *N.benthamiana* agroinfiltrades amb TUB-RFP (A, D, G), LICC1-YFP (B, E) o LC-YFP (C,H). A,B,C: no es va fer cap tractament. D-I, tractament amb paclitaxel 20 μ M. D i G, RFP. E i H, YFP. F i H, solapament. Barra 10 μ m.

Aquests resultats confirmen que la proteïna LICC1 interacciona amb els microtúbuls *in vivo* i ens informen de que el fragment LC, que conté els dominis LisH i CTLH, és suficient per produir aquesta interacció o dit d'una altra manera, que el domini CRA no és necessari per aquesta interacció.

Com es mostra a la **Figura R29**, la transformació amb la construcció LC-YFP produeix uns punts intensos en el citoplasma que colocalitzen amb TUB-RFP. Alguns d'aquests punts es desplacen pel citoplasma (**Figura R31**). La **Figura R31 A** mostra una cèl·lula cotransformada amb YFP-LC i amb TUB-RFP. Amb un cercle vermell es delimita la zona d'estudi. En la **Figura R31 B**, els petits desplaçaments d'un dels punts es recullen en cinc fotografies. En les fotografies 1, 2 i 3 es veu com un punt, marcat amb una fletxa negra en la imatge de transmissió, es va desplaçant. En 3 paral·lelament s'observa l'aparició d'uns nous punts, marcats en vermell, en 4 s'han desplaçat una mica i en 5 deixen d'estar a la vista.



LC-YFP i TUB-RFP. **A**, visió general de la cèl·lula encerclant en vermell la zona d'estudi. **B**, representació en cinc fotogrames del moviment de les estructures puntuals, marcades amb fletxes negres i vermelles en les imatges de transmissió. Barra 10 μm .

2.6.-Transformació estable de cèl·lules de *Nicotiana benthamiana*

La localització subcel·lular de LICC1 i dels seus fragments també es va estudiar a cèl·lules cultivades de *Nicotiana tabacum* cv Bright-Yellow-2 (BY2) transformades de manera estable amb les mateixes construccions que a l'anterior punt amb l'objectiu d'avaluar les variacions de la distribució de LICC1 durant el cicle de divisió cel·lular. La transformació estable de les cèl·lules BY2 es va dur a terme mitjançant *A. tumefaciens* emprant la soca LB4404. La selecció dels calls transformats es va fer a partir de subcultius cada vint dies en plaques de medi BY2 amb gentamicina. Paral·lelament, es va confirmar la transformació amb la visualització de la fluorescència de YFP. Si no es diu el contrari, les observacions al microscopi confocal sempre es van fer set dies després dels subcultius per minimitzar la formació de possibles compostos fenòlics autofluorescents que poden donar falsos positius en les observacions al microscopi.

2.6.1- Localització subcel·lular

Un cop obtinguts els cultius cel·lulars BY2 transformats estables amb les construccions LICC-YFP, LC-YFP i CRA-YFP, es va determinar la seva localització subcel·lular mitjançant microscòpia confocal juntament amb un control amb la YFP sola (**Figura R32**). El patró de distribució per a la construcció LC-YFP va ser molt semblant a l'obtingut amb les cèl·lules de mesòfil de fulla de *N.benthamiana* (**Figura R28 B**). Les imatges mostren una tinció al nucli, menor en el nuclèol, i al citoplasma, amb estructures que podrien correspondre a microtúbuls amb alguns punts de major intensitat.

Si els resultats són semblants als anteriors en el cas de LC-YFP, no passa el mateix amb la construcció LICC1-YFP (**Figura 32 A**) ja que només apareixen marcades unes estructures puntuals distribuïdes pel citoplasma a la perifèria de la cèl·lula i al voltant del nucli (**Figura R32 A**). El fragment CRA mostra una distribució similar a la de la proteïna sencera (**Figura R32 C**). La YFP sola té una distribució uniforme al citoplasma (**Figura R32 D**).

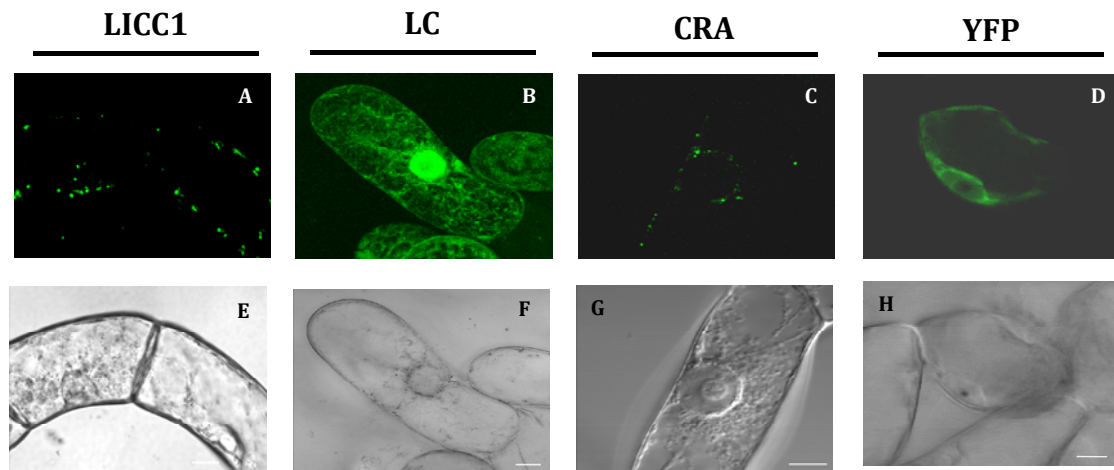


Figura R32. Distribució subcel·lular de LICC1-YFP (A), LC-YFP (B) i CRA-YFP (C) en cèl·lules BY2 de tabac comparades amb la distribució de la proteïna YFP sola (D). També es mostren les imatges de les mateixes cèl·lules il·luminades amb llum de transmissió (E-H). Barra 10 μ m.

2.6.2- Identificació dels corpuscles on es localitzen LICC1-YFP i CRA-YFP

L'observació d'estructures puntuals distribuïdes pel citoplasma podria correspondre a diferents orgànuls i estructures. Per poder-les identificar es va procedir a colocalitzar-les amb tincions fluorescents específiques.

2.6.2.1- Colocalització amb FM4-64

La distribució observada de la proteïna LICC1-YFP i la construcció CRA-YFP podria correspondre a vesícules d'endocitosi o de l'aparell de Golgi. Per provar si aquesta hipòtesi era certa es van colocalitzar les construccions amb FM4-64 (**Figura R33**). FM4-64 és un colorant lipofílic que tenyeix les membranes plasmàtiques i vacuoles, vesícules derivades d'elles i l'aparell de Golgi en cèl·lules vives de plantes (Bolte *et al.*, 2004). Com es pot observar en la **Figura R33**, ni LICC1-YFP, ni CRA-YFP colocalitzen amb FM4-64. Podem concloure, doncs, que LICC1-YFP i CRA-YFP no es localitzen en l'aparell de Golgi ni en vesícules d'endocitosi ni en vacuoles.

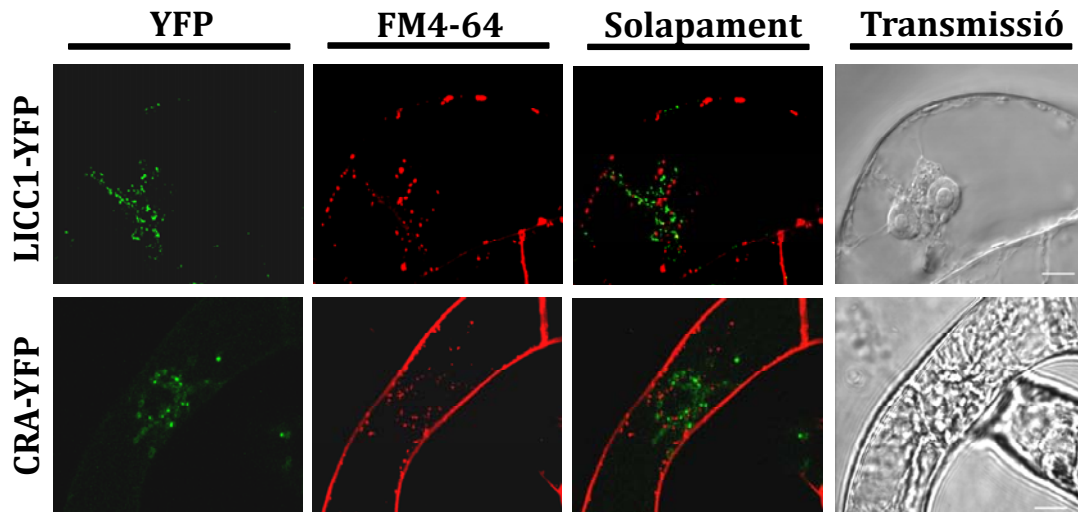


Figura R33. Colocalització de les construccions LICC1-YFP i CRA-YFP amb FM4-64 en cèl·lules BY2 de tabac.

2.6.2.2-Colocalització amb cossos lipídics

La distribució observada de la proteïna LICC1-YFP i la construcció CRA-YFP recorda la dels cossos lipídics (López-Ribera *et al.*, 2014), per la qual cosa es va examinar aquesta possibilitat. El Nile Red és un marcador específic de lípids neutres i que, per tant, marca els cossos lipídics. Com era d'esperar, el patró de distribució observat després de la tinció amb Nile Red en cèl·lules no transformades és de punts dispersos pel citoplasma (**Figura R34A**). A continuació es va procedir a tenyir amb Nile Red cèl·lules transformades amb les construccions LICC1-YFP i CRA-YFP. En ambdós casos, de manera semblant al control, el Nile-Red va mostrar punts dispersos en el citoplasma (**Figura R34 D i H**). La majoria del marcatge amb LICC1-YFP va colocalitzar amb el marcatge amb Nile Red (**Figura R34 E**), si bé alguns punts només presentaven marcatge de YFP. Un resultat similar es va obtenir amb la construcció CRA-YFP (**Figura R34 I**), si bé en aquest cas la colocalització era encara més gran, no observant punts tenyits únicament amb YFP encara que si s'observaren només tenyits amb Nile Red. Es pot concloure, que la distribució de la proteïna LICC1-YFP en cèl·lules BY2 s'associa principalment a cossos lipídics. La mateixa distribució s'observa per al fragment CRA.

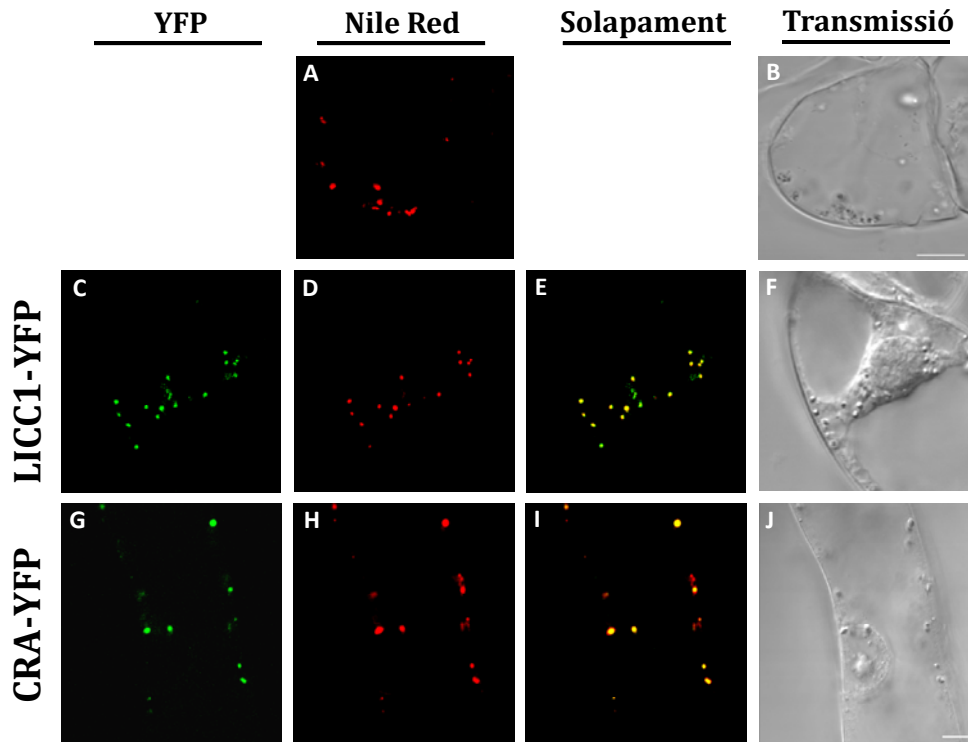


Figura R34. Colocalització de LICC1-YFP i CRA-YFP en suspensions cel·lulars BY2 amb Nile Red. (A,B) cèl·lules BY2 sense transformar. (C-F) cèl·lules transformades amb LICC1-YFP. (G-I) cèl·lules transformades amb CRA-YFP. Barres 10 μm .

Degut a la menor densitat dels cossos lipídics, es poden aïllar fàcilment respecte la resta de components cel·lulars mitjançant la centrifugació diferencial. A partir d'ells es poden aïllar les proteïnes associades, així doncs, es van aïllar cossos lipídics d'embrions de blat de moro, on són molt abundants, i es van extreure les proteïnes associades. Com a control es van extreure proteïnes totals directament de les mostres d'embrions. Aquestes dues mostres es van separar mitjançant una electroforesi, es van transferir a una membrana i es van hibridar amb l'anticòs anti-LICC1 (**Figura R 35 A**). L'anticòs anti-LICC1 detectà la proteïna LICC1 tant en les proteïnes totals com en les proteïnes dels cossos lipídics, confirmant-se que, al menys en part, LICC1 es troba tant en els cossos lipídics.

Aquestes mateixes mostres es van hibridar amb l'anticòs anti-PPO, observant-se la presència d'aquesta proteïna tant en els extractes totals com en els provinents de cossos lipídics (**Figura 35 B**). Aquesta és la primera indicació de que les polifenol oxidases es poden trobar associades als cossos lipídics de les plantes.

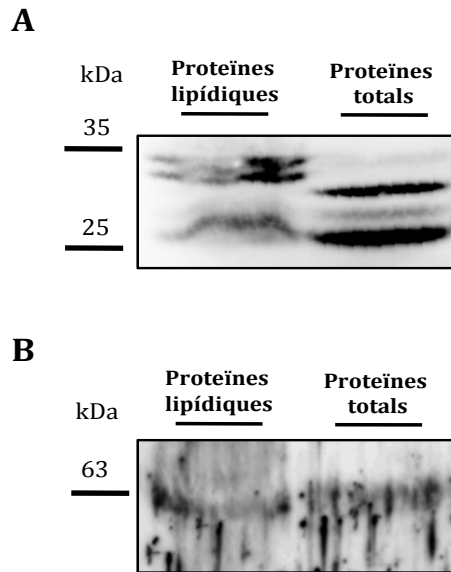


Figura R35. Western blot de proteïnes totals i proteïnes de cossos lipídics d'embrions de llavors de blat de moro. A. Anticòs anti-LICC1. B. Anticòs anti-PPO

2.6.3- Identificació dels orgànuls on es localitza LC-YFP

2.6.3.1- Interaccions amb els microtúbuls

Com s'ha comentat anteriorment la distribució de LC-YFP en cèl·lules BY2 (**Figura R32**) és semblant a l'obtinguda a cèl·lules de mesòfil de fulla *N. benthamiana* (**Figura R29**) i, per tant, hauria de colocalitzar, al menys en part, amb els microtúbuls. Per comprovar aquesta hipòtesi, cèl·lules BY2 transformades es van tractar amb 20 μ M de la droga metil-amiprofos, produint la despolimerització dels microtúbuls. L'aplicació d'aquesta droga va produir canvis molt significatius en la distribució de LC-YFP pel citoplasma (**Figura R36 A** (B, E) i **R36 B** (B, E)). La localització nuclear no es va veure alterada pel metil-amiprofos. Podem concloure que, a l'igual que a les cèl·lules de mesòfil de fulla, LC-YFP s'associa amb els microtúbuls a les cèl·lules BY2.

També es va aplicar aquest tractament a cèl·lules transformades amb LICC1-YFP i CRA-YFP (**Figura R36 A** (A, D, C, F)), però les distribucions subcel·lulars no es van veure alterades ni per LICC1-YFP (**Figura R36 B** (A,D)), ni per CRA-YFP (**Figura R36 B** (C, F)).

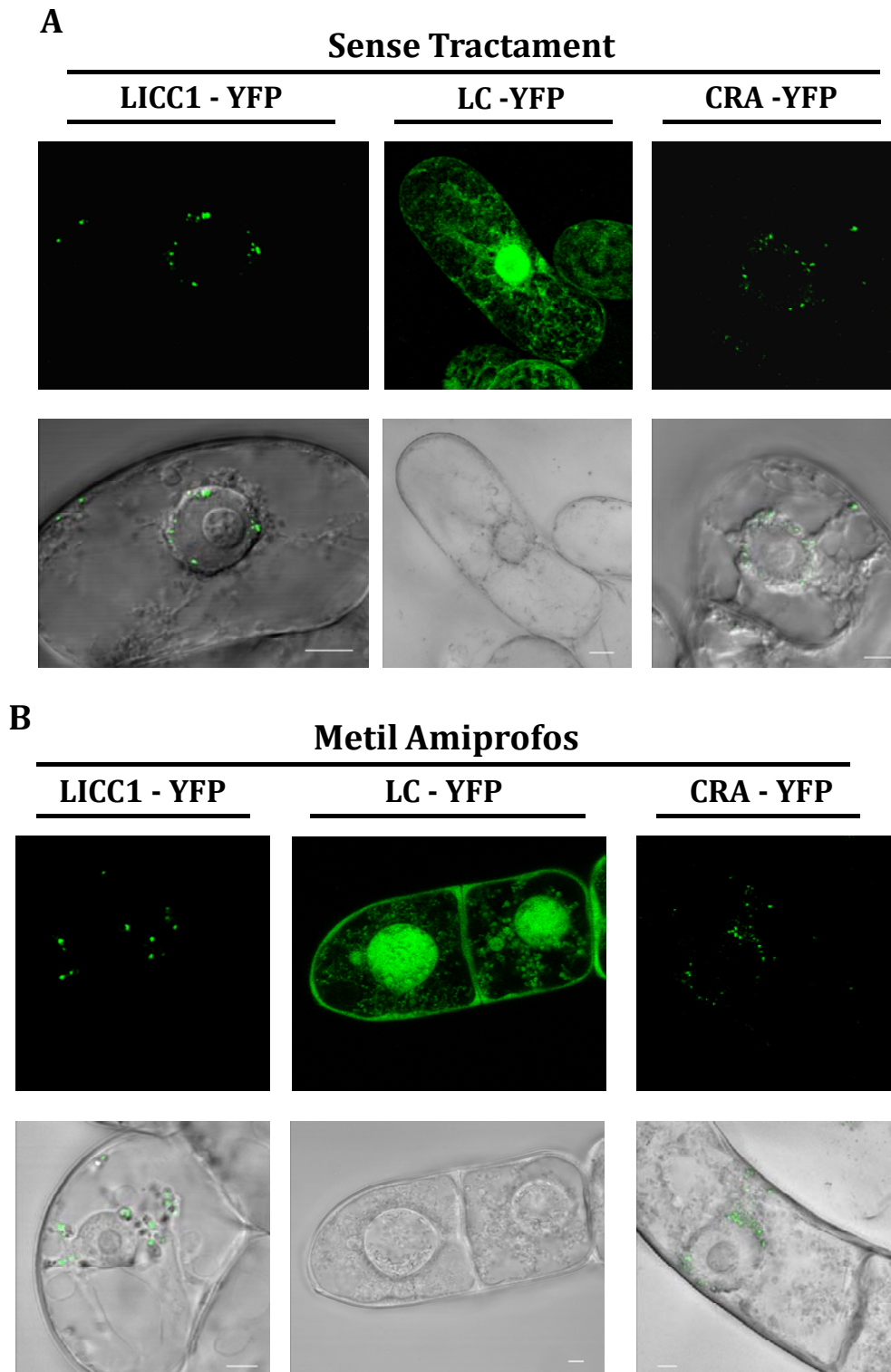


Figura R36. A, Control sense tractament de droga de suspensions cel·lulars de tabac BY2 transformades amb LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP. Barra, 10-10-5 μm respectivament **B**, Suspensions cel·lulars de tabac BY2 transformades amb LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP tractades amb 20 μM de la droga metil-amiprofos. Barra, 5-5-5 μm .

2.6.3.2- Localització de LC-YFP en nucli

La construcció LC-YFP va donar marcatge en el nucli de cèl·lules BY2 (**Figura R37 A**). Per confirmar aquesta distribució es van generar protoplasts (Materials i Mètodes apartat 8) a partir de cèl·lules BY2 transformades amb LC-YFP i de cèl·lules control sense transformar. Posteriorment es van extreure els seus nuclis. Un cop es van aïllar els nuclis, es van estudiar al microscopi confocal (**Figura R37**). Mentre en nuclis de cèl·lules BY2 sense transformar no es va veure cap tipus de marcatge (**Figura R37 B**), els nuclis extrets de protoplasts BY2 transformats si que van mostrar senyal fluorescent (**Figura R37 D**). Aquest senyal era menor en la part que sembla correspondre al nuclèol. Per confirmar-ho, els nuclis es van tenyir amb iodur de propidi, que tenyeix específicament el DNA (**Figura R37 E**). Els marcatges obtinguts amb el iodur de propidi i LC-YFP eren similars, confirmant-se per un costat que les estructures observades són nuclis i, per altra part, que la construcció LC-YFP té una menor representació en el nuclèol.

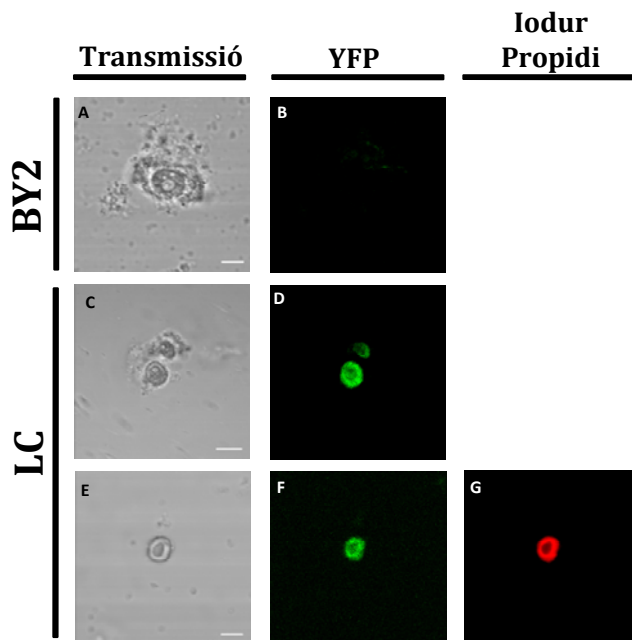


Figura R37. Observació al microscopi confocal dels nuclis extrets de protoplasts de suspensions cel·lulars BY2. (A,B) cèl·lules sense transformar. (C,D) cèl·lules transformades amb LC-YFP. (E-G) cèl·lules transformades amb LC-YFP i tenyides amb iodur de propidi. Barres 5 µm.

Paral·lelament, es van extreure proteïnes de nuclis purificats de cèl·lules BY2 control i de cèl·lules transformades amb LC-YFP. Aquests extractes proteics es van separar per electroforesi mitjançant un gel SDS-PAGE, es van transferir a dues membranes i es van hibridar en paral·lel amb els anticossos anti-LICC1 i anti-gamma tubulina (**Figura R38**). Com era d'esperar, només les cèl·lules transformades *LC-YFP* de mida 42 kDa van donar senyal a l'hibridar amb l'anticòs anti-LICC1 (**Figura R38 A**). D'altra banda, es va observar molt més senyal d'hibridació amb l'anticòs anti-gamma tubulina (48 kDa) en el cas dels nuclis transformats respecte als controls (**Figura R38 B**).

Podem concloure que la construcció LC-YFP es localitza, a més d'altres llocs de la cèl·lula, en el nucli, amb una menor intensitat en el nuclèol, i que aquesta localització indueix la acumulació d'una major quantitat de gamma-tubulina als nuclis. Això suggereix que el fragment LC (LisH-CTLH) podria estar implicat en la nucleació dels microtúbuls.

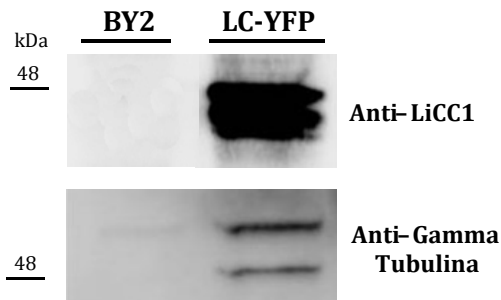
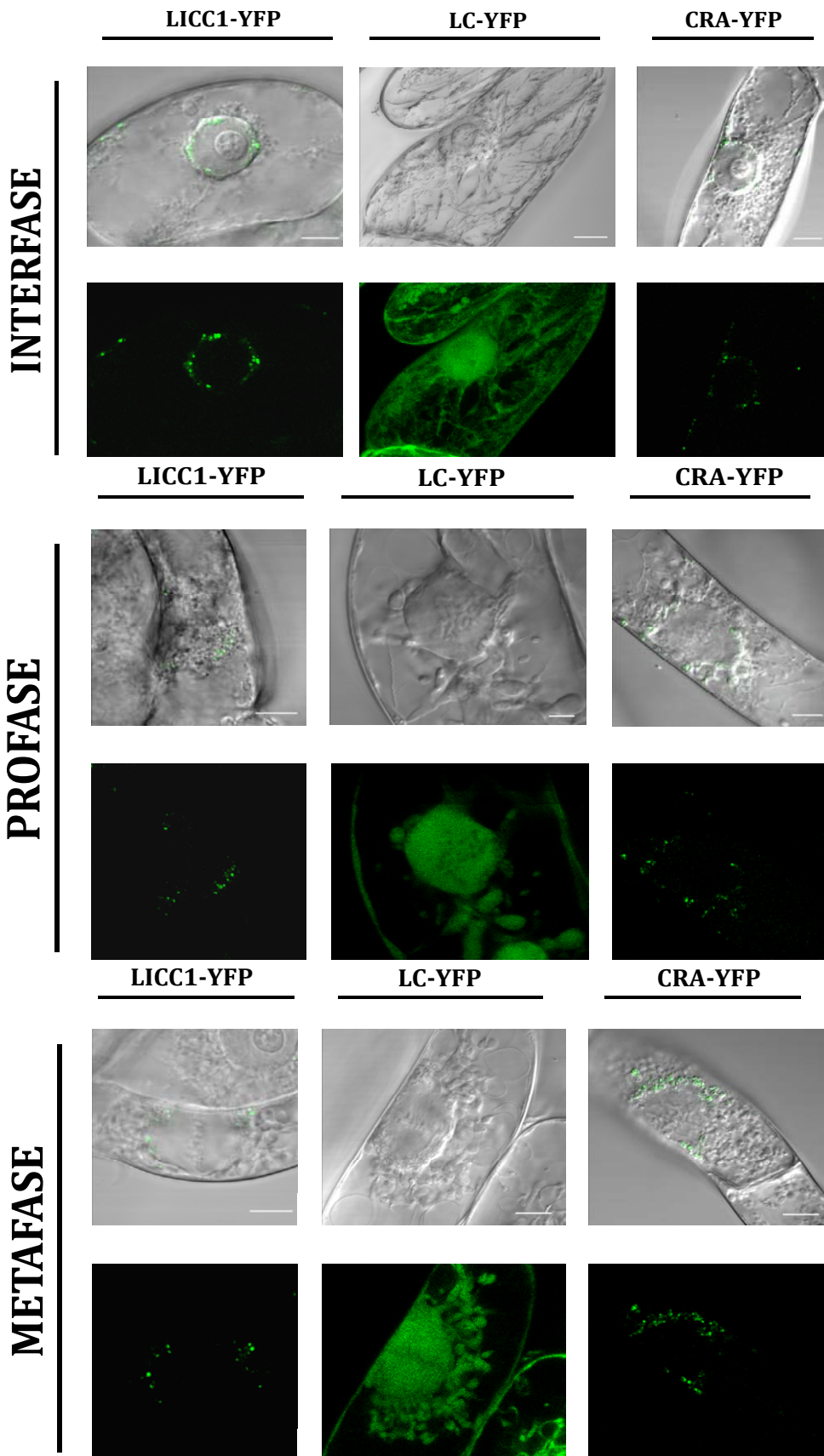


Figura R38. Immunodetecció d'extractes proteics de nuclis procedents de suspensions cel·lulars de tabac BY2 sense transformar (BY2) i transformades amb la construcció LC-YFP. **A**, hibridació amb l'anticòs anti-LICC1. **B**, hibridació amb l'anticòs anti-gamma tubulina.

2.6.4- Localització durant la divisió cel·lular

Se sap que algunes proteïnes amb dominis LisH s'uneixen als microtúbuls. Els nostres resultats suggereixen que LICC1 podria ser una d'elles, almenys en certs tipus cel·lulars, i/o en certes condicions i que el fragment LC seria el responsable d'aquesta interacció. Això, junt amb la localització del fragment LC-YFP en el nucli, ens va confirmar que seria interessant observar la distribució subcel·lular de la proteïna LICC1 i dels seus fragments durant el procés de la divisió cel·lular. Per observar això es van sincronitzar les divisions cel·lulars en cultius transformats amb cadascuna de les construccions aplicant afidicolina, un bloquejador de la síntesi de DNA (**Figura R39**).

La proteïna sencera, LICC1-YFP i el fragment CRA-YFP van mantenir una distribució semblant al llarg de tot el cicle cel·lular, com ja s'ha vist abans, observant punts dispersos en el citoplasma corresponents a cossos lipídics. En canvi, la distribució del fragment LC-YFP canviava al llarg del cicle cel·lular. En la interfase, el senyal es va distribuir pel citoplasma i nucli, com ja hem vist abans (**Figura R32**). Durant la divisió el senyal es va concentrar fonamentalment al nucli i en unes estructures globulars localitzades al seu voltant, observant-se un marcatge feble també al citoplasma en contacte amb la membrana citoplasmàtica. Aquestes estructures globulars ens fan recordar molt a les observades quan s'aplicà metilamipfos (**Figura R36 BB**). En la profase el nuclèol desapareix i els cromosomes es comencen a condensar. La presència comparativa del fragment LC-YFP en el nucli va augmentar respecte al citoplasma. Durant l'anafase el senyal va ser menor en la zona de la placa d'anafase, zona ocupada pels cromosomes, seguint el marcatge en la resta de la zona al voltant del fus mitòtic i en les estructures citoplasmàtiques. En la telofase inicial el procés continuà de manera similar mentre que al final del procés es van observar de nou els nuclèols amb una menor intensitat de senyal. La mida de les estructures globulars arribà a un màxim a la profase i després va anar minvant fins a desaparèixer al final de la telofase.



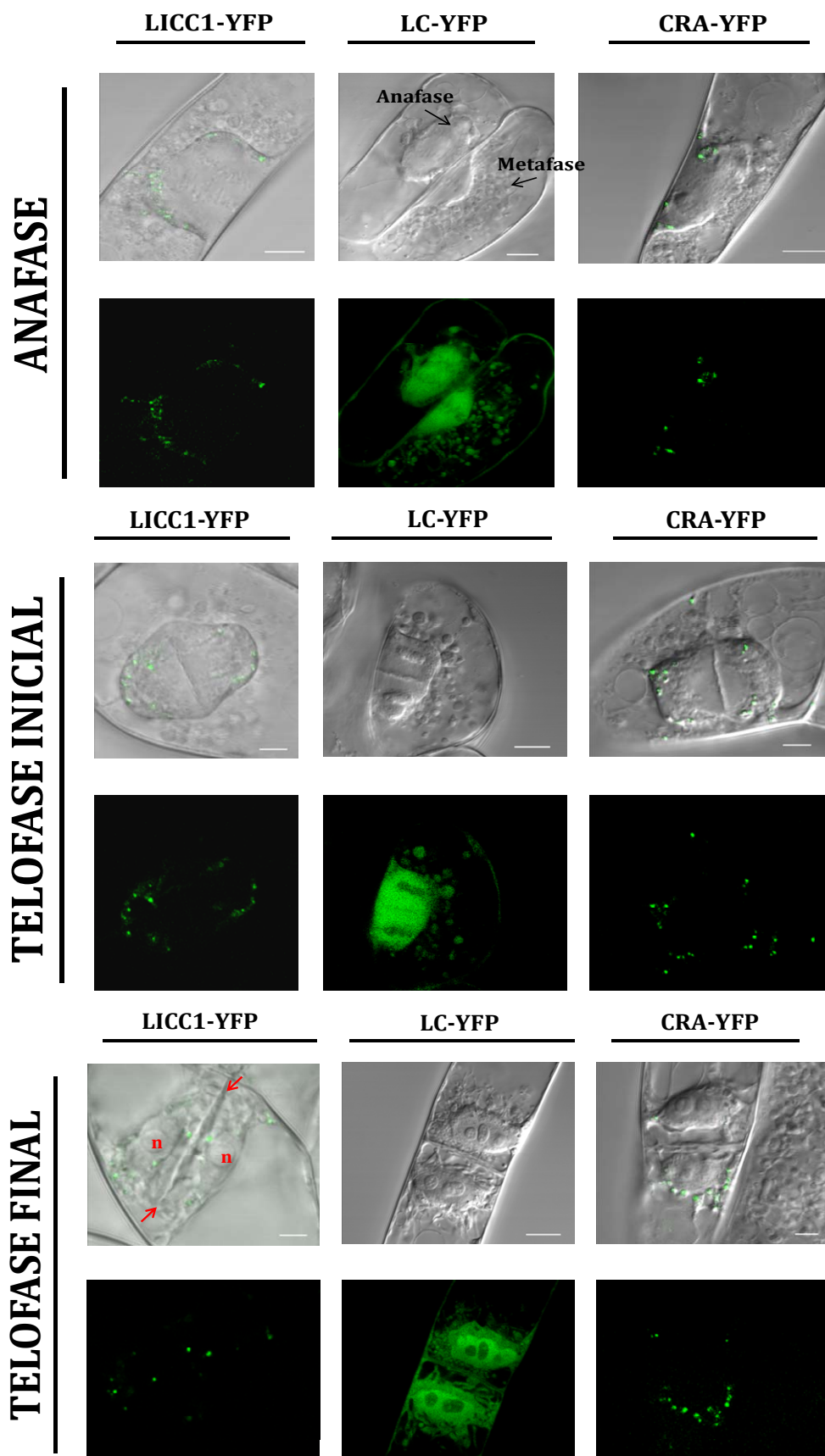


Figura R39. Sincronització de la divisió cel·lular en cèl·lules de tabac BY2 transformades amb la construcció LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP. En la telofase final es representa amb “n” en vermell els nous nuclis i amb una fletxa vermella la formació de la nova paret cel·lular. Barres 10 µm.

2.6.5- Interacció amb PPO en cèl·lules transformades de BY2

Per saber si la interacció de LICC1 amb PPOs (Capítol 2.4.2) es produeix en cèl·lules transformades de tabac BY2 es va fer servir la immunoprecipitació usant aquesta vegada mostres de proteïnes totals de cèl·lules BY2 transformades amb la construcció LICC1-YFP i fent servir en la immunoprecipitació l'anticòs anti-GFP. Com a control, es van agafar cèl·lules BY2 sense transformar. La quantitat de mostra emprada va ser de 2 µg i la incubació de les boles magnètiques amb les mostres va ser de 2 h a 4 °C. Les proteïnes retinudes per l'anticòs van ser analitzades per electroforesi SDS-PAGE. Els resultats van mostrar moltes bandes visualitzades per tinció de nitrat de plata, també en el control sense anticòs (**Figura R40 A**). Les proteïnes eluïdes van ser transferides a una membrana i hibridades amb l'anticòs anti-GFP (**Figura R40 B**). Es van observar dues bandes, una d'uns 53 kDa, que correspondria a l'esperat per LICC1-YFP, i l'altra d'uns 42 kDa que podria ser un processament de l'anterior. En el control amb les cèl·lules BY2 no transformades no es va veure cap banda. Posteriorment es va rehibridar la mateixa membrana emprant l'anticòs anti-PPO (**Figura R41**). Van aparèixer dues bandes noves d'uns 63 kDa, d'una mida semblant a la detectada anteriorment en fulla de blat de moro (**Figura R40**), la qual cosa demostrava que LICC1 també interactua amb una PPO en cèl·lules cultivades de tabac i que la fusió a YFP no impedeix aquesta interacció.

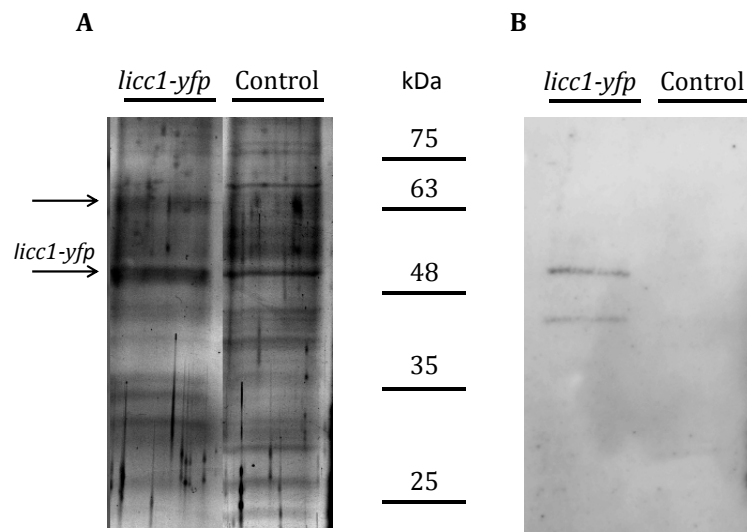


Figura R40. Immunoprecipitació amb l'anticòs anti-GFP de proteïnes de cèl·lules BY2. Les proteïnes eluïdes de les columnes van ser separades per SDS-PAGE (12.5%). El control correspon al mateix procés però partint de cèl·lules BY2 no transformades. **A**, Gel tenyit amb nitrat de plata, corresponent a les segones fraccions dels rentats de les elucions retinudes per l'anticòs anti-GFP durant la IP. Les fletxes indiquen la presència d'una banda de 53 kDa pròpia de *licc1-yfp* i altra d'uns 64 kDa de mida semblant a la detectada anteriorment com a PPO. **B**, Western-blot de les proteïnes anteriors hibridades amb l'anticòs anti-GFP (1:3000), corresponent a les primeres fraccions dels rentats de les elucions de les mostres.

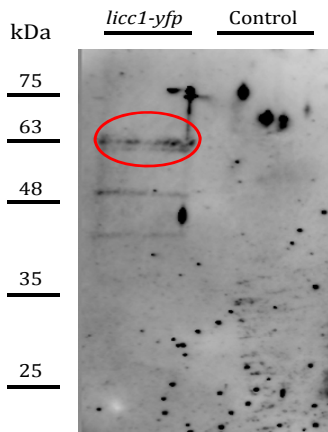


Figura R41. Western-blot de les proteïnes eluïdes durant la IP hibridades primer amb l'anticòs anti-GFP i a continuació amb l'anticòs anti-PPO (1:1000). Rehibridació de la membrana de la Figura R39 B. Aparició de dues noves bandes (encerclades en vermell) d'uns 63 kDa.

2.6.6- Fenotip

Les cèl·lules de tabac BY2 transformades es van mantenir en cultiu en forma de calls en medi selectiu. Després d'un seguit de subcultius es va mesurar la velocitat de creixement dels calls en absència d'antibiòtic, estudiant les variacions en mida del call al llarg del temps (**Figura R42 A**) i el pes als vint-i-un dies del subcultiu (**Figura R42 B**). Es van fer servir cèl·lules sense transformar com a control. Tots els calls transformats tenien una mida i pes significativament menor respecte al control, però la diferència és especialment gran en els transformats amb la construcció LC-YFP (**Figura R42 A i B**).

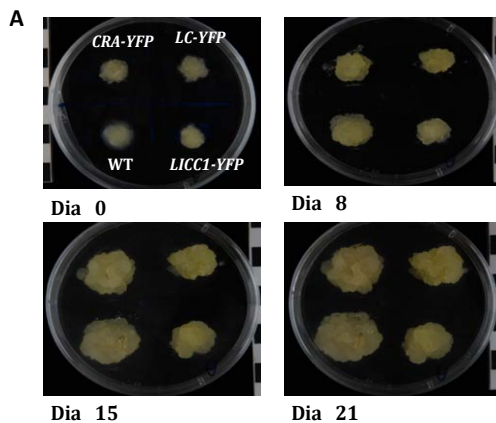
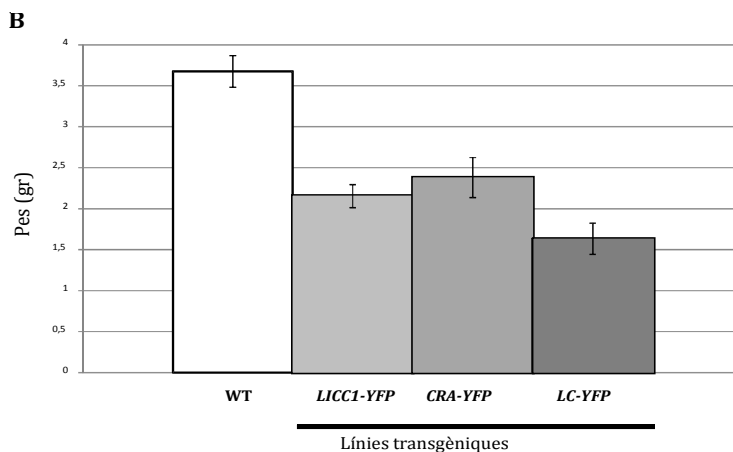


Figura R42. Evolució de la mida i pes de calls transformats amb les construccions LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP, comparats amb calls de control no transformats (wt). **A**, imatges dels calls els dies 0, 8, 15 i 21 després del replicatge. **B**, Pes dels diferents calls el dia 21 després del replicatge. Promig de deu rèpliques.



2.7- Plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*

Per completar la caracterització de la localització subcel·lular de LICC1-YFP i els seus fragments es van obtenir plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* contenint les mateixes construccions utilitzades en els capítols anteriors i, per tant, amb l'expressió controlada pel promotor constitutiu 35S i conjugats amb la proteïna fluorescent YFP.

2.7.1- Distribució subcel·lular de LICC1-YFP i els seus fragments a plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Els estudis es van realitzar amb plantes homozigotes. La localització es va estudiar a quatre parts de la planta: fulla, hipocòtil, arrel i punta d'arrel.

2.7.1.1- Fulles

A les fulles el control amb només YFP va marcar tot el citoplasma (**Figura R43 D**). LICC1-YFP tenia un marcatge general a tot el citoplasma, amb més intensitat a la perifèria, i no es va observar marcatge en el nucli (**Figura R43 A**). LC-YFP tenia una distribució citoplasmàtica semblant encara que, en aquest cas si s'observà marcatge dintre del nucli (**Figura R43 B**). En algunes cèl·lules es van observar buits ovalats sense marcatge que per la seva mida i distribució podrien correspondre als cloroplasts. Per últim, la construcció CRA-YFP va donar un senyal semblant a LICC1-YFP (**Figura R43 C**).

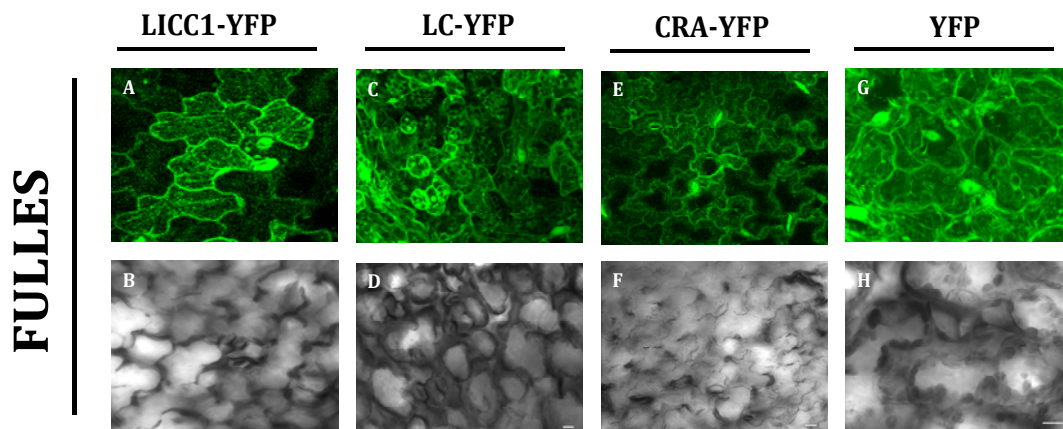


Figura R43. Localització subcel·lular de LICC1-YFP, LC.YFP, CRA-YFP i YFP a cèl·lules del mesòfil de fulles d'*A.thaliana* transgèniques. **A-D** fluorescència YFP ; **E-H** camp clar. Barres 10 µm.

2.7.1.2- Hipocòtil

A l'hipocòtil els patrons de distribució van ser similars als observats a les fulles (**Figura R44**): marcatge dispers al citoplasma, especialment a la perifèria, i al nucli només en el cas de LC-YFP. Hi havia, però, una diferència: mentre les imatges de LICC1-YFP i LC-YFP mostraven els buits possiblement corresponents a cloroplasts, la CRA-YFP no els mostrava i, ben al contrari, marcava especialment els possibles cloroplasts (**Figura R44 C**). S'ha de dir que les imatges corresponen a la part superior de l'hipocòtil que mostra coloració verda.

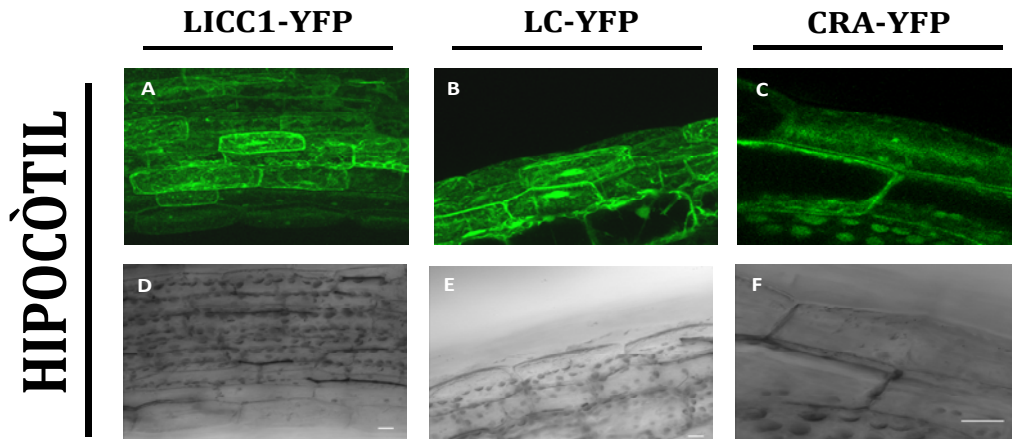


Figura R44. Localització subcel·lular de LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP a cèl·lules de hipocòtils d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques. **A-D** fluorescència YFP ; **E-H** camp clar. Barres 10 µm.

2.7.1.3- Arrel

A les cèl·lules de l'arrel la distribució va resultar similar a l'observada anteriorment (**Figura R45**). L'única diferència fou que CRA-YFP semblava tenir una distribució menys homogènia amb estructures puntuals més marcades. (**Figura R45**).

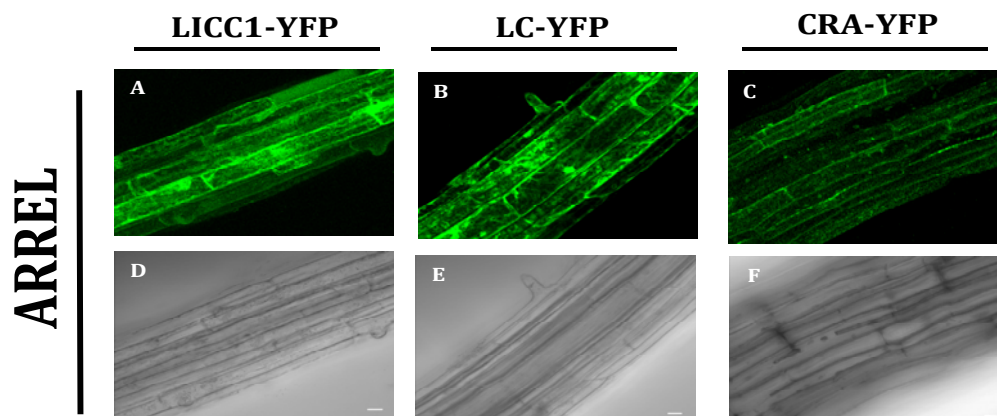


Figura R45. Localització subcel·lular de LICC1-YFP, LC-YFP, CRA-YFP i YFP a cèl·lules d'arrels d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques. **A-D** fluorescència YFP ; **E-H** camp clar. Barres 10 µm.

2.7.1.4- Punta d'arrel

A les cèl·lules de la punta d'arrel es van observar notables diferències en la distribució de la fluorescència respecte als òrgans anteriors (**Figura R46**). La distribució de LICC1-YFP va resultar semblant a l'observat en altres òrgans en algunes cèl·lules, però en d'altres només van aparèixer unes estructures puntuals molt marcades (**Figura R46 A**). La distribució de LC-YFP va ser semblant a la dels altres òrgans excepte que el nucli està comparativament més marcat que el citoplasma (**Figura R46 B**). En canvi, la distribució del senyal corresponent al fragment CRA-YFP va canviar completament (**Figura R46 C**), mostrant unes estructures puntuals semblants a les observades en algunes cèl·lules de la punta de l'arrel amb la proteïna completa, però en aquest cas es va observar en totes les cèl·lules (**Figura R45 C**). Aquestes estructures puntuals recorden les observades en la transformació estable de cèl·lules de tabac (**Figura R35**).

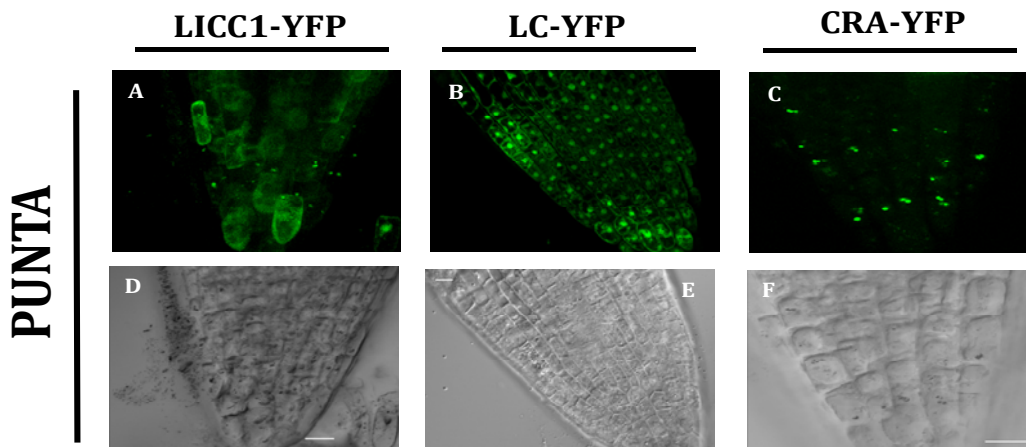


Figura R46. Localització subcel·lular de LICC1-YFP, LC-YFP, CRA-YFP i YFP a cèl·lules de puntes d'arrel d'*Arabidopsis thaliana* transgèniques. **A-D** fluorescència YFP ; **E-H** camp clar. Barres 10 µm.

2.7.2- Colocalització amb orgànuls

2.7.2.1- Cloroplasts

A les cèl·lules del mesòfil de la fulla de plantes LC-YFP es van observar buits ovalats sense marcatge que per la seva mida i distribució podrien correspondre als cloroplasts (**Figura R47**). En canvi, a les cèl·lules de l'hipocòtil es van observar els mateixos buits amb LICC1-YFP i LC-YFP (**Figura R44 A,B**), però la distribució contrària amb CRA-YFP (**Figura R44 C**). Per tal de verificar si aquestes estructures corresponien realment a cloroplasts es va fer una colocalització del senyal d'YFP i de l'autofluorescència de la clorofil·la (**Figura R47**). Els dos senyals colocalitzen pel que efectivament, els buits observats al marcatge LICC1-YFP i LC-YFP corresponien als cloroplasts (**Figura R47 C, G**). Aquestes dades no permeten afirmar

l'existència interacció entre la superfície del cloroplast i les proteïnes LICC1-YFP i LC-YFP, però posen de manifest la seva proximitat. En canvi, per a CRA-YFP es va observar una colocalització, la qual cosa suggereix que es troba a dintre o en la superfície d'aquests orgànuls (**Figura R47 C, K**). Les possibles implicacions funcionals d'aquesta dada són difícils d'imaginar però és interessant tenir en compte que les polifenol oxidases (PPOs) són enzims predominantment localitzats als cloroplasts.

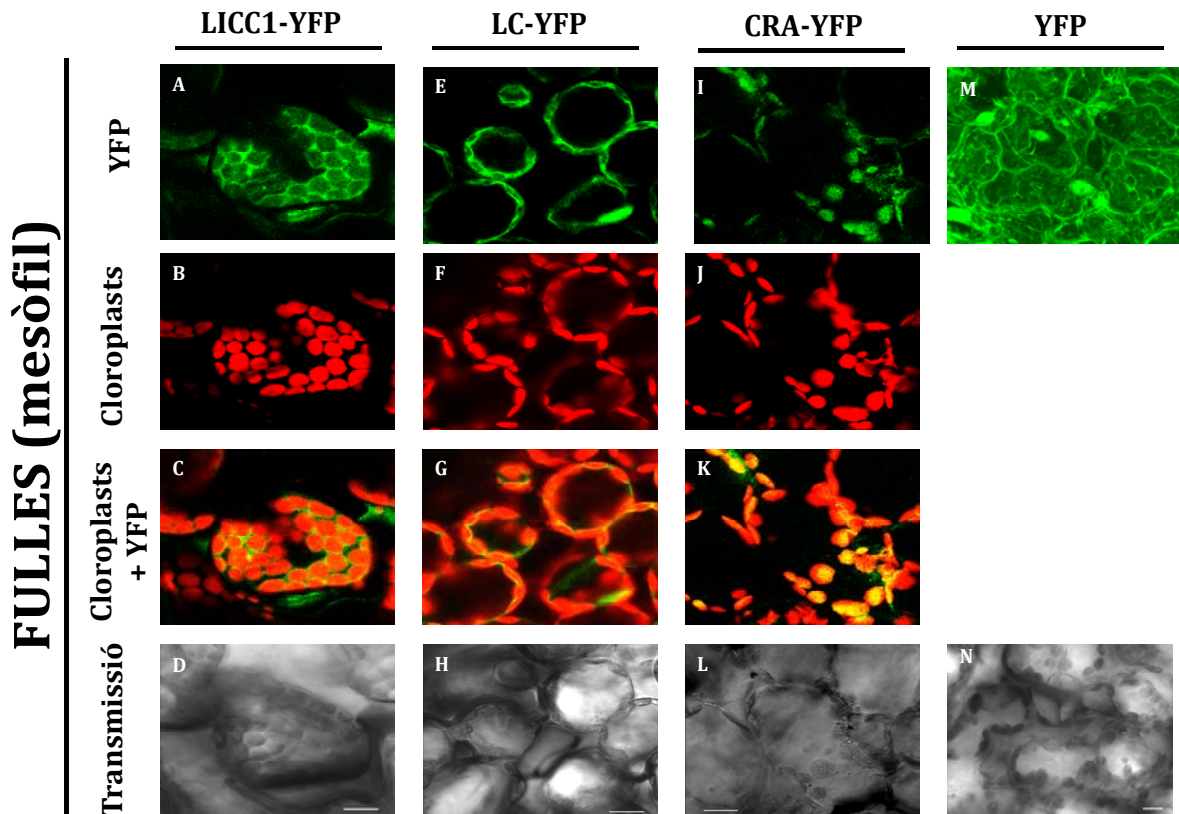


Figura R47. Colocalització en cèl·lules dels hipocòtils de LICC1-YFP, LC-YFP i CRA-YFP (marcats en verd) amb cloroplasts (marcats en vermell). Barres 10 μ m.

2.7.2.2- Paret cel·lular: tractament amb sorbitol

Els resultats anteriors mostren una distribució citoplasmàtica de LICC1-YFP però de vegades el senyal es troba en la regió perifèrica de les cèl·lules i podria correspondre també amb la paret cel·lular. Per discriminar si la localització subcel·lular corresponia a la membrana plasmàtica o a la paret cel·lular, es van sotmetre plàntules d'*Arabidopsis* a plasmòlisi mitjançant *shock* osmòtic amb sorbitol (**Figura R48**). El sorbitol va produir la contracció del citoplasma, separant-lo de la paret, i va permetre discriminar entre ambdues localitzacions, atès que si la localització de la proteïna fos de paret cel·lular el marcatge mantindrà la forma original de la cèl·lula mentre que, si la localització fos de membrana o el citoplasma, el

marcatge tindria una forma diferent per efecte de la plasmòlisi. Com a control es van fer servir plantes transformades amb TUA6-GFP de marcatge al citoplasma. Els resultats van revelar amb claredat que tant TUA6-GFP como LCC1-YFP no es localitzen a la paret cel·lular (**Figura R48**).

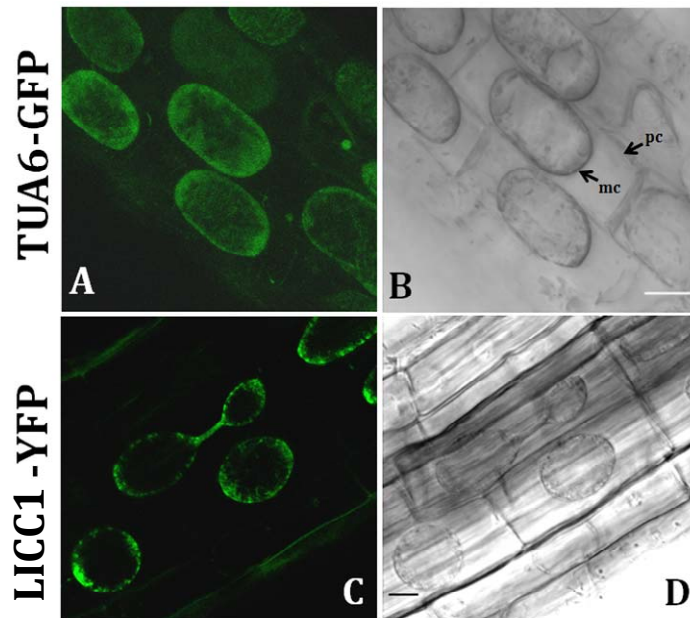


Figura R48. Efecte de la plasmòlisi per sorbitol en la distribució de TUA6-GFP (A,B) o LCC1-YFP (C,D) en arrels d'*Arabidopsis* transformades. En les imatges de microscòpia confocal s'observa el canvi morfològic produït pel citoplasma. **mc**: membrana plasmàtica, **pc**: paret cel·lular. Barres 10 μ m.

2.7.2.3- Microtúbuls

Per comprovar si també en *Arabidopsis* existia colocalització amb els microtúbuls es van fer creuaments entre plantes transgèniques LC-YFP i plantes transgèniques sobreexpressores d' α -tubulina, TUA6-RFP (**Figura R49**). Les imatges van mostrar una certa colocalització entre LC-YFP i TUA6-RFP, sobre tot a la perifèria cel·lular tant en fulla com en hipocòtil, però no es va observar colocalització a la part més interior del citoplasma i a més, LC-YFP marcava el nucli mentre que TUA6-RFP no.

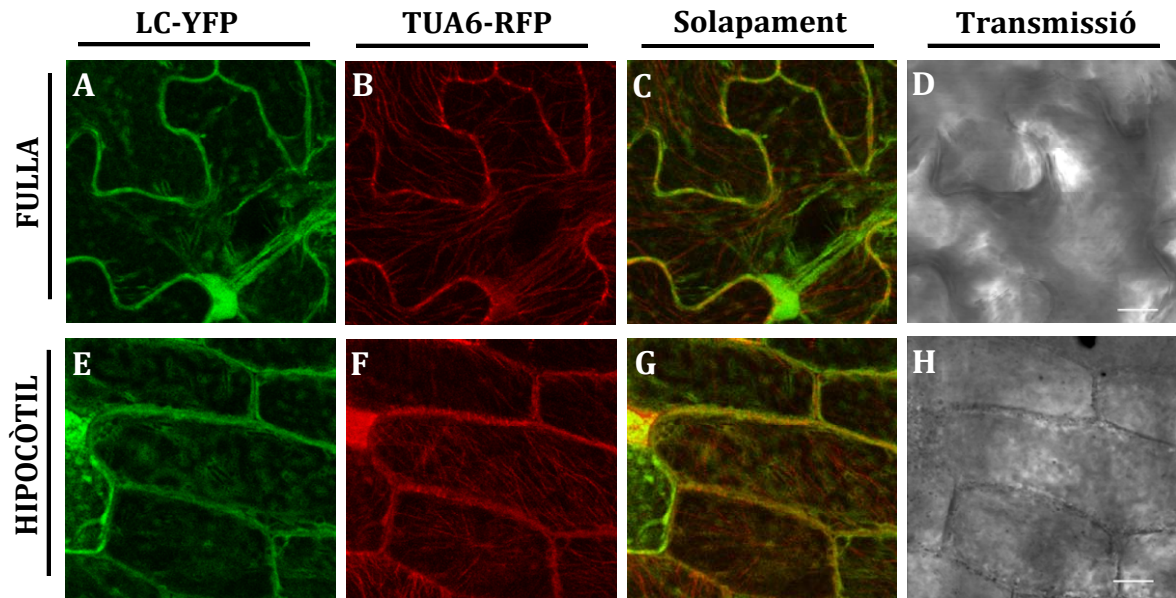


Figura R49. Distribució del marcatge fluorescent a cèl·lules de l'hipocòtil i la fulla de plantes d'*Arabidopsis* obtingudes del creuament entre LC-YFP i TUA6-RFP. Les imatges (A-D) corresponen a cèl·lules de cotiledó i (E-F) a cèl·lules d'hipocòtil. La distribució del fragment LC-YFP es representa en verd i TUA6-RFP en vermell. Barres 10µm.

A continuació per comprovar aquesta colocalització amb el microtúbuls es van tractar a les plantes transgèniques LC-YFP amb la droga antimitòtica metil-amiprofos que indueix la despolimerització dels microtúbuls (**Figura R50**). Com control es van utilitzar plantes TUA6-GFP.

En les plantes que s'expressen TUA6-GFP l'acció de la droga va produir un canvi dràstic del patró de distribució, desapareixent les estructures filamentoses (**Figures R50 A i C**) i apareixent una distribució més dispersa (**Figura R50 B i D**). Això va confirmar que l'acció de la droga és l'esperada.

La distribució dels marcatges també va canviar de manera considerable en aplicar la droga a les plantes transgèniques LC-YFP (**Figura R50 F i H**). En els cotiledons el senyal es va dispersar en forma de punts distribuïts pel citoplasma, mantenint-se cert marcatge en el nucli (**Figura R50 F**). L'efecte en l'hipocòtil va ser menys clar encara que també es va observar l'aparició d'estructures puntuals disperses però mantenint el marcatge en el nucli (**Figura R50 H**).

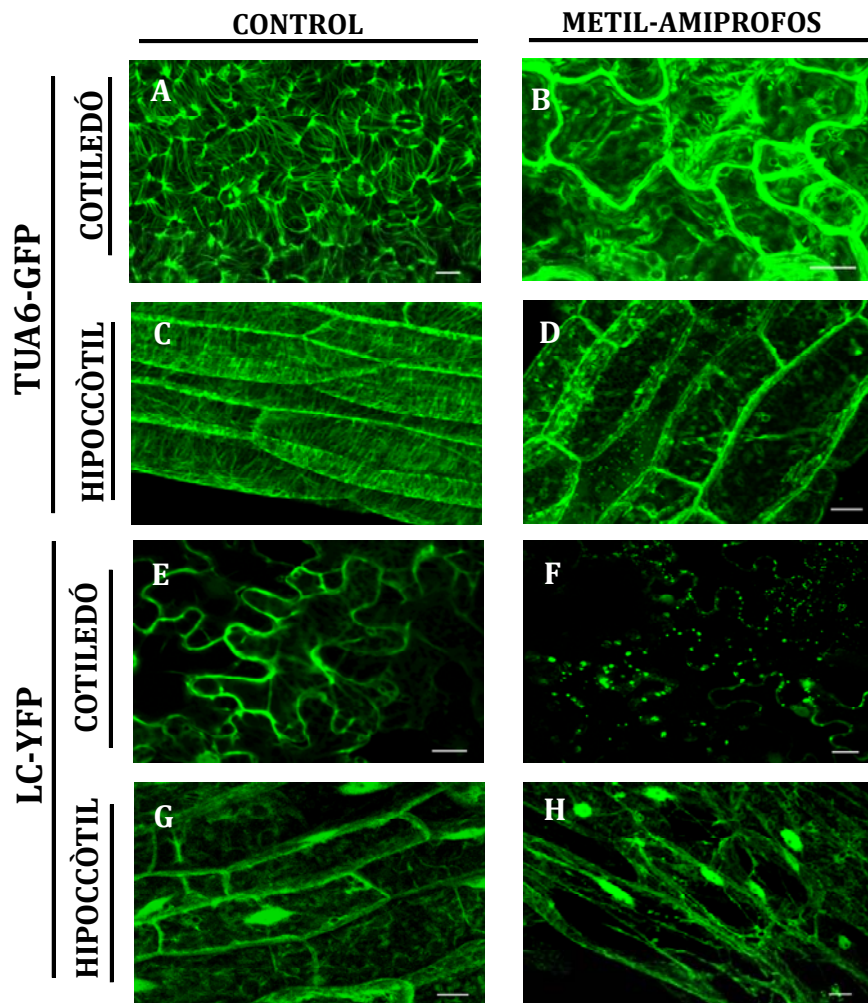


Figura R50. Efecte de la droga metil-amiprofos ($10 \mu\text{M}$ durant 2 dies) en cotiledons i hipocòtils d'*Arabidopsis* TUA6-GFP i LC-YFP. Barres $10 \mu\text{m}$.

El mateix tractament aplicat a les plantes LICC1-YFP i CRA-YFP va produir un efecte molt menys dràstic (**Figura R51**). La droga va provocar certs canvis en la distribució de LICC1-YFP (**Figura R51 I-L**), però l'efecte va ser gairebé nul en la distribució de CRA-YFP (**Figura R51 M-P**).

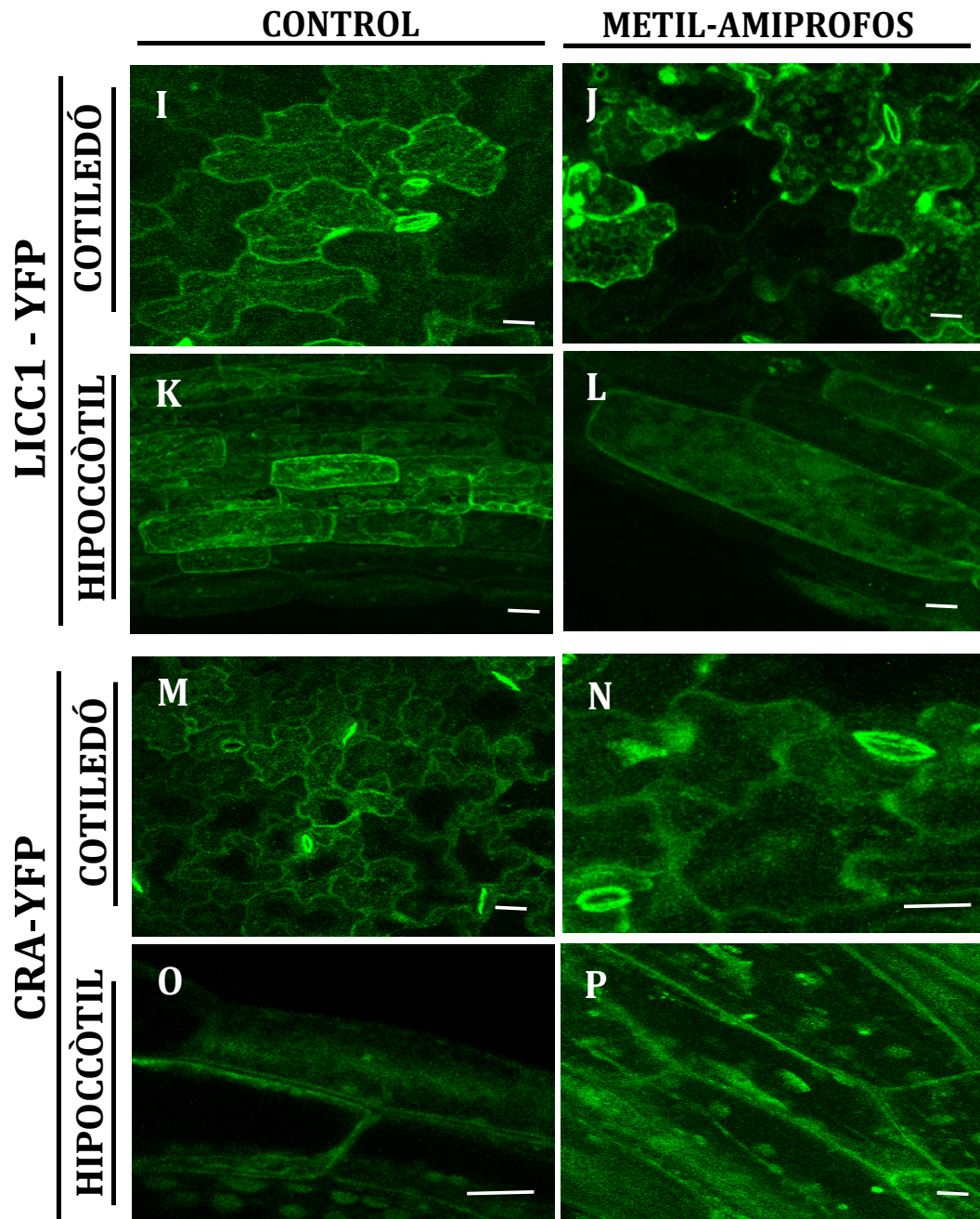


Figura R51. Efecte de la droga metil-amiprofos ($10 \mu\text{M}$ durant 2 dies) en cotiledons i hipocòtils en *Arabidopsis* LICC1-YFP i CRA-YFP. Barres $10 \mu\text{m}$.

2.7.2.4- Cossos lipídics

LICC1-YFP i CRA-YFP a les puntes d'arrel van donar una distribució en punts més o menys dominant (**Figura R46**). Aquestes estructures puntuals poden ser moltes coses però, com ja s'ha vist, a suspensions cel·lulars BY2 apareixen punts semblants que corresponen a cossos lipídics (**Figura R33**). Per això es van teñir amb Nile Red les puntes de les arrels de plantes LICC1-YFP i CRA-YFP i amb la intenció d'observar la possible colocalització. En la **Figura R52** es pot observar com en les plantes transformades amb les construccions LICC1-YFP i CRA-YFP els punts que es formen colocalitzen majoritàriament amb el marcatge amb Nile Red (vermell). En Col 0 es marquen també cossos lipídics. Es pot concloure que, de la mateixa manera que en les cèl·lules BY2, la proteïna LICC1-YFP està en gran mesura associada a cossos lipídics. La mateixa distribució es va observar per al fragment CRA-YFP.

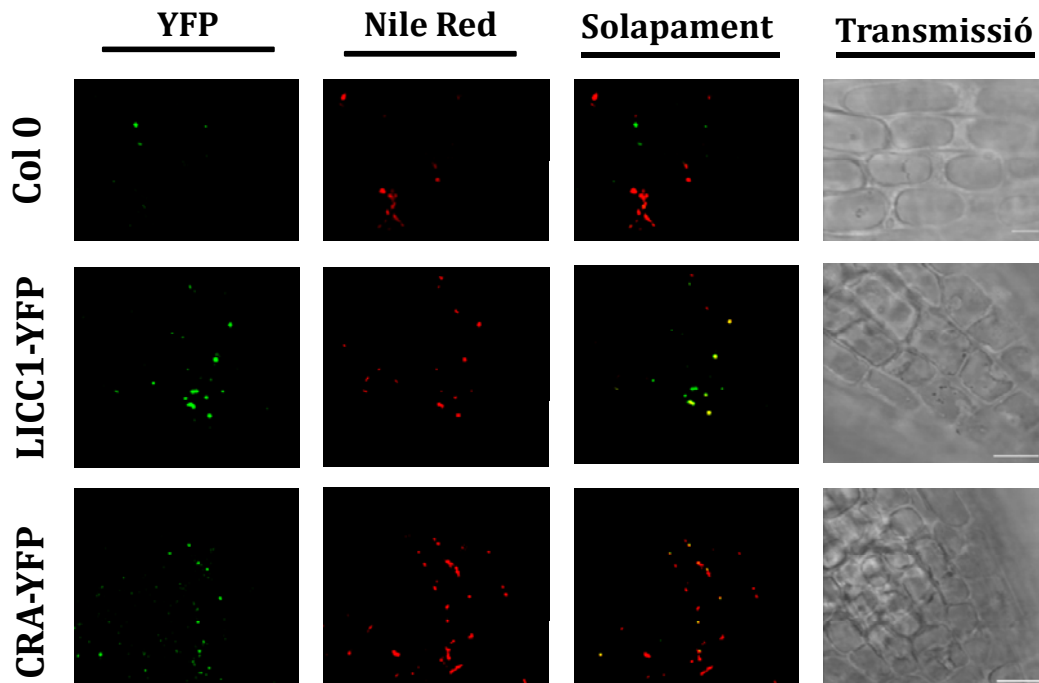


Figura R52. Colocalització de LICC1-YFP i CRA-YFP en arrels d'*Arabidopsis* amb Nile Red. Es van fer servir plantes Col0 com a control. Barres 5 - 10 - 5 μm respectivament.

2.7.3- Fenotip

2.7.3.1- Efectes sobre el creixement de les plantes

Es van estudiar les diferències en la germinació, mida de les fulles de la roseta, mida i forma de l'arrel i la mida i velocitat de aparició i creixement de les tiges per saber si la sobreexpressió de LICC1-YFP o els seus fragments produïen algun efecte sobre el desenvolupament de les plantes d'*Arabidopsis*.

Inicialment es va avaluar la germinació i la mida de les arrels de les plantes transgèniques comparades amb Col0 i 35S-YFP. Totes elles van ser crescudes en medi MS-0.5X amb vitamines i sense antibiòtic. No es va trobar cap tipus de diferència ni en la germinació ni en la llargada de les arrels.

Posteriorment es va estudiar l'aparició i velocitat de creixement de la tija floral. En la **Figura R53** es mostra el dia en què començà a aparèixer la tija a les diferents línies (es van fer servir tres línies transformades independentment per construcció). Totes les dades que es mostren són promitjos de les mesures de trenta plantes. Es va observar que la tija floral apareixia entre dos i vuit dies més tard en totes les línies transgèniques respecte a Col0.

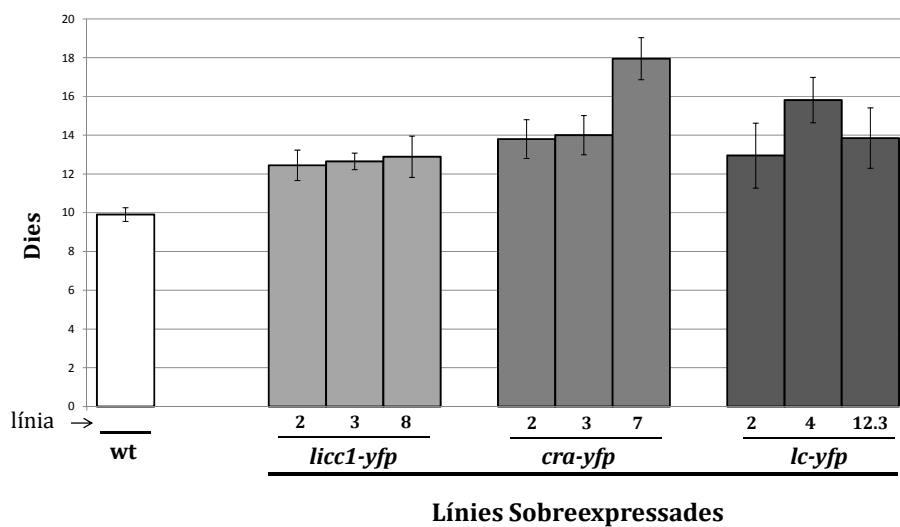


Figura R53. Dia d'aparició de la tija en condicions de LD a plantes d'*Arabidopsis thaliana* salvatges wt (Col0) i a plantes transgèniques licc1-yfp, lc-yfp i cra-yfp. Els números representen el nom de cadascuna de les línies transformades de manera independent.

També es va mesurar la velocitat de creixement de les tiges comptant els dies que trigaven a arribar a l'alçada màxima (**Figura R54**). Es pot observar com les plantes transgèniques van créixer més lentament que el control.

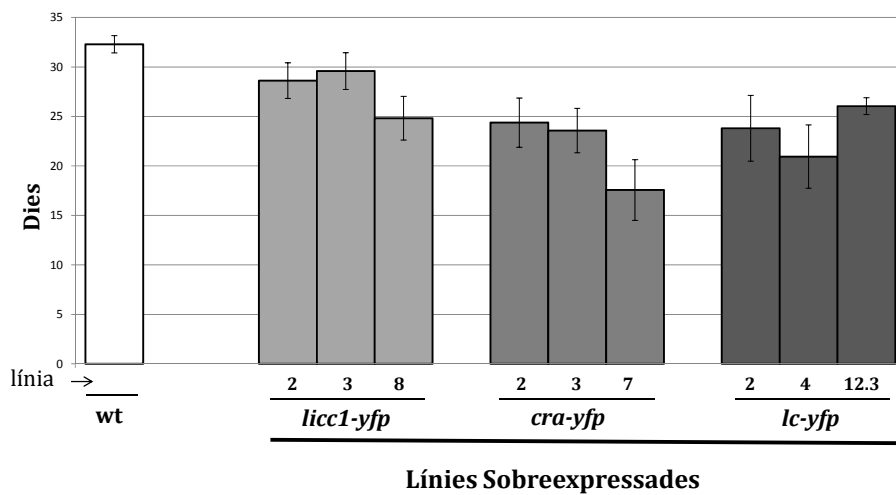


Figura R54. Velocitat de creixement de les tiges en condicions de LD a plantes d'*Arabidopsis thaliana* salvatges wt, (Col0) i a plantes transgèniques *licc1-yfp*, *lc-yfp* i *cra-yfp*. Els números representen el nom de cadascuna de les línies transformades de manera independent.

També es va mesurar la llargada màxima de les tiges (**Figura R55**). En aquest cas les plantes transgèniques van créixer més que el control en quasi tots els casos.

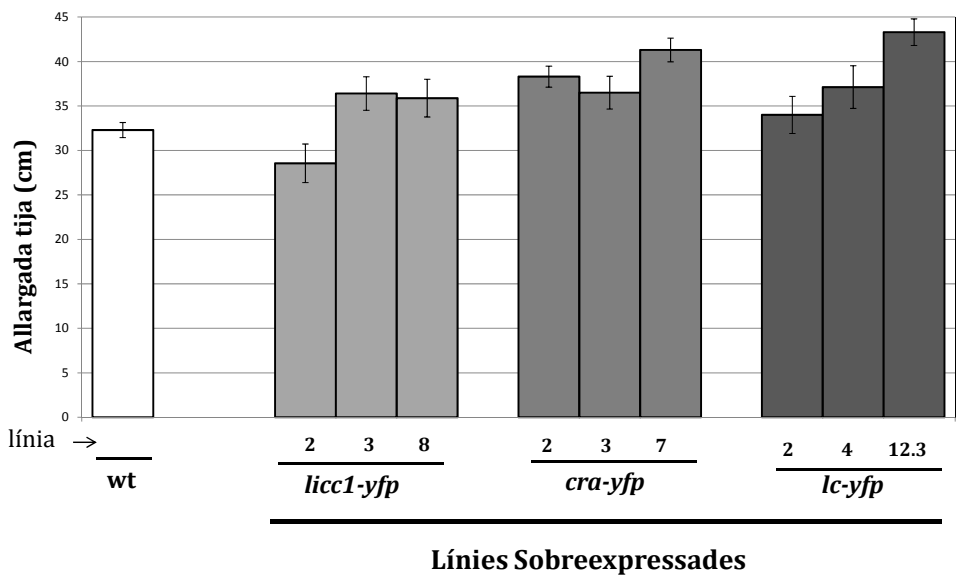


Figura R55. Mida màxima de les tiges en condicions de LD a plantes d'*Arabidopsis thaliana* salvatges wt, (Col0) i a plantes transgèniques *licc1-yfp*, *lc-yfp* i *cra-yfp*. Els números representen el nom de cadascuna de les línies transformades de manera independent.

En la **Figura R56** es representa la mida de la fulla més gran de les diferents plantes a les sis setmanes de creixement en terra. En la majoria de les línies transgèniques la mida de les fulles és significativament superior que el control.

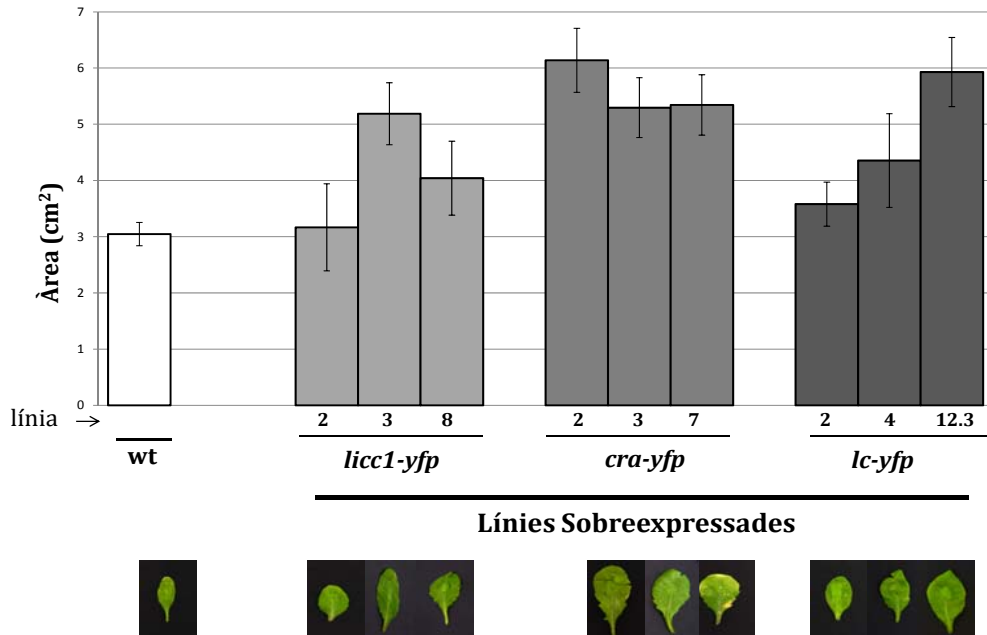


Figura R56. Area en cm² de la fulla més gran de la roseta a les sis setmanes de creixement en terra en condicions de LD a plantes d'*Arabidopsis thaliana* salvatges wt, (Col0) i a plantes transgèniques *licc1-yfp*, *lc-yfp* i *cra-yfp*. Els números representen el nom de cadascuna de les línies transformades de manera independent.

En resum, la sobreexpressió de *licc1-yfp* i dels seus fragment produeix alteracions significatives en el creixement de les plantes: retarda l'aparició de la tija floral, retarda el creixement de la tija, però, augmenta lleugerament la mida màxima de la tija i augmenta la superfície de les fulles de la roseta.

2.7.3.2- Tolerància a l'estrès hídric

En els experiments anteriors es va observar que les plantes *licc1-yfp* semblaven mantenir un estat hídric millor que les de control. Per això es va dissenyar un experiment per tal de confirmar-lo. Concretament, es van fer créixer en paral·lel plantes Col0 i plantes *licc1-yfp* en terra i en condicions ambientals controlades. Les plantes es sembraren en testos individuals. Es va pesar la mateixa quantitat de terra en cada test i es regà amb la mateixa quantitat d'aigua amb la proporció d'adob : aigua de 1:3. Es van regar durant quatre setmanes en condicions de dia llarg i aleshores es van deixar de regar durant tretze dies. Durant aquest tractament les plantes van mostrar símptomes de deshidratació i pèrdua de turgència. En la **Figura R57 A** es mostra l'aspecte d'algunes plantes sotmeses a l'estrès hídric. Passats tretze dies es van tornar a regar. Per quantificar la tolerància a la sequera es va determinar el nombre de plantes que van estar vives després de set dies de tornar-les a regar. Els valors es

van expressar en forma de percentatge de supervivència (**Figura R57 B**). Es van fer dos experiments independents comparant cinquanta plantes de la línia transgènica *licc1-yfp* amb la línia salvatge Col0. Les plantes de la línia transformada *licc1-yfp* van resistir millor la deshidratació que les plantes control (Col0).

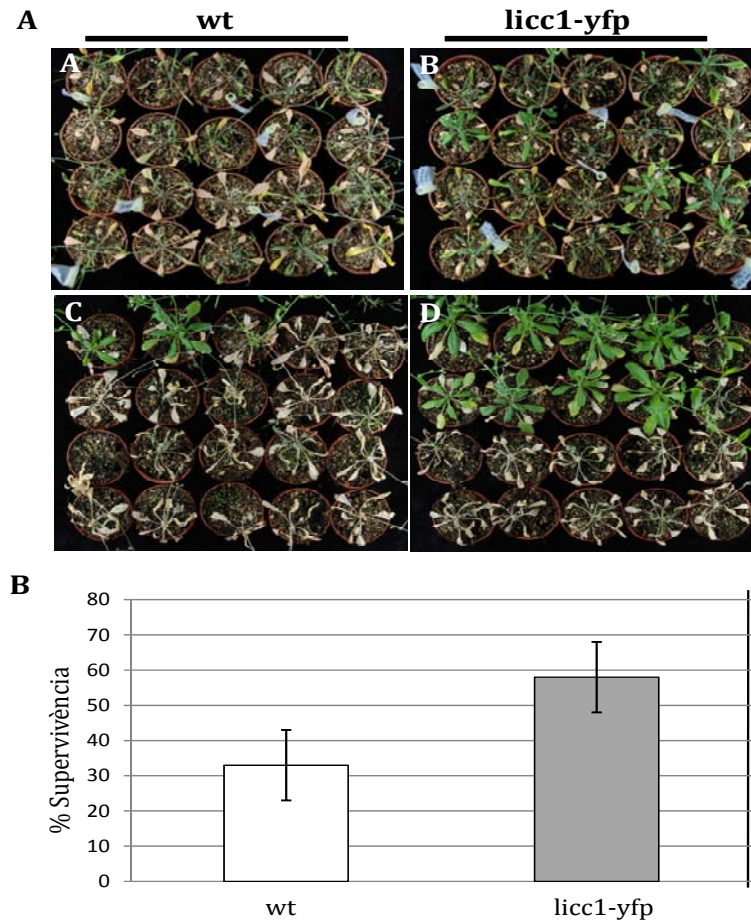


Figura R57. Supervivència a l'estrès hídric de les plantes transgèniques *licc1-yfp*. **A**, aspecte de les plantes de les línies transgènica *licc1-yfp* i wt (Col0) després de tretze dies d'estrès hídric seguit de set dies de reg.. **B**, representació gràfica en percentatge de la supervivència de les plantes a l'estrès hídric.

2.7.4- Canvis en l'acumulació i distribució de la fluorescència en resposta a l'estrès hídric

2.7.4.1- Canvis en l'acumulació de *LICC1-YFP* a les cèl·lules de guarda dels estomes de plantes sotmeses a estrès hídric

Per dur a terme l'estudi es van fer créixer llavors Col0 i *licc1-yfp* en medi MS-0.5X amb vitamines. Després d'una setmana els estomes es van observar al microscopi confocal. Es va muntar un tros de la planta sobre el porta, tapant-la amb el cobreobjectes sense cap tipus de medi de muntatge i deixant-la durant vint minuts. En les plantes control es va observar un

tancament dels estomes i un cert senyal de fluorescència que corresponia a l'autofluorescència de les parets de la part central de les cèl·lules de guarda dels estomes (**Figura R58 A i E**). En les plantes transgèniques, a més de l'autofluorescència, en les parets internes es va observar un senyal al citoplasma i al nucli de les cèl·lules de guarda. La intensitat d'aquest senyal augmentava en condicions d'estrès, tot i que la distribució subcel·lular era semblant (**Figura R58 C i G**). La quantificació de la intensitat de vint estomes de tres fulles va revelar que el promig dels valors era molt més gran en les plantes estressades que en les no estressades (**Figura R59**).

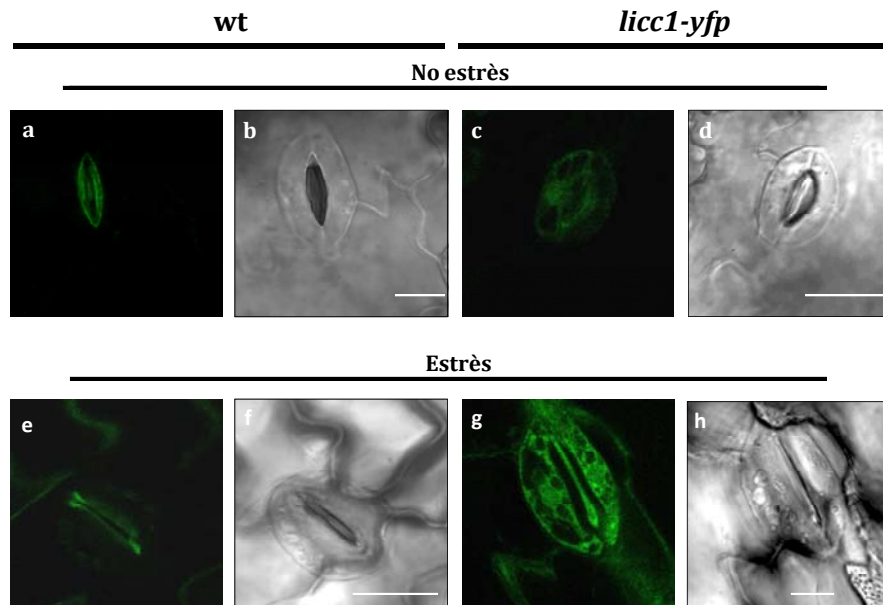


Figura R58. Distribució subcel·lular de LICC1-YFP a les cèl·lules estomàtiques de fulles d'*Arabidopsis thaliana* sotmeses a estrès hídric. wt, correspon a plantes Col0. Barres 10 μm .

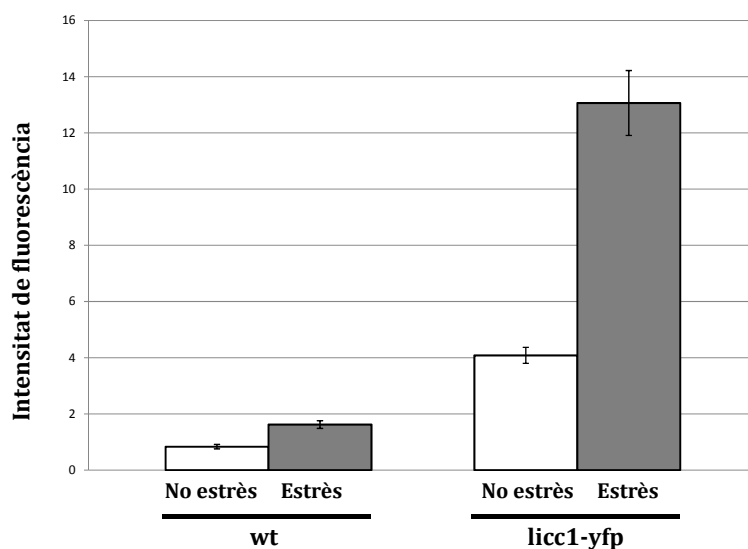


Figura R59. Intensitat de la fluorescència de les cèl·lules de guarda dels estomes de fulles d'*Arabidopsis thaliana* sotmeses o no a estrès hídric. wt correspon a Col0. Les dades són el resultat de la mesura de vint estomes per fulla en un total de tres fulles.

2.7.4.2- Canvis en la localització subcel·lular de LC-YFP a plantes sotmeses a estrès hídric

El fragment LC-YFP va mostrar una distribució citoplasmàtica més o menys uniforme a les fulles d'*Arabidopsis* (**Figura R43**), però es va observar que si les fulles es deixaven en sec uns vint minuts en observació al microscopi començaven a aparèixer uns punts de marcatge intens al citoplasma (**Figura R60**). Aquests punts no apareixien en plantes transformades només amb yfp. Les observacions es van repetir, confirmant que els punts només apareixien en fulles lc-yfp quan són sotmeses a dessecació. Amb fulles yfp no es veia cap tipus de formació de punts durant els vint min. (**Figura R60 G,H**), ni inclús durant una hora (no es mostra cap imatge).

Els punts que apareixen amb la dessecació recorden als cossos lipídics per la qual cosa es va repetir l'experiment de dessecació tenyint les fulles amb Nile Red. Les observacions mostren que una part dels senyals corresponents a LICC1-YFP colocalitzen amb els cossos lipídics. En la **Figura R61** es pot observar com existeix certa colocalització, indicant que al menys part dels punts corresponen a cossos lipídics. L'experiment es va realitzar paral·lelament amb LC-YFP i CRA-YFP, confirmant la colocalització.

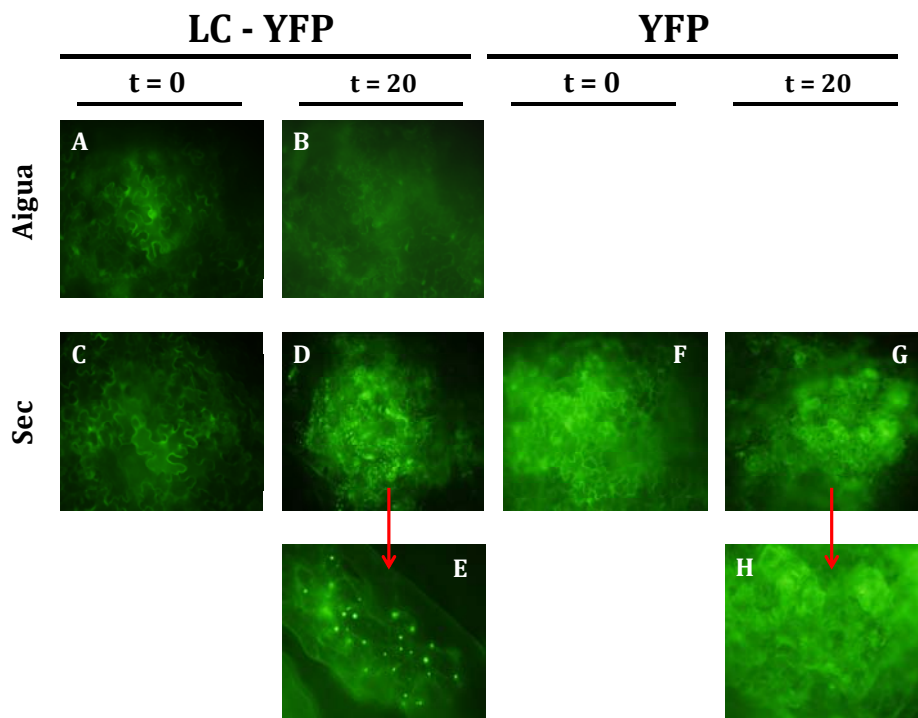


Figura R60. Efecte de l'estrès hídric sobre la localització subcel·lular de LC-YFP en cèl·lules de fulles d'*Arabidopsis thaliana*. Localització subcel·lular de LC-YFP i de YFP sense estrès (t=0) i després de 20 minuts de dessecació (t=20).

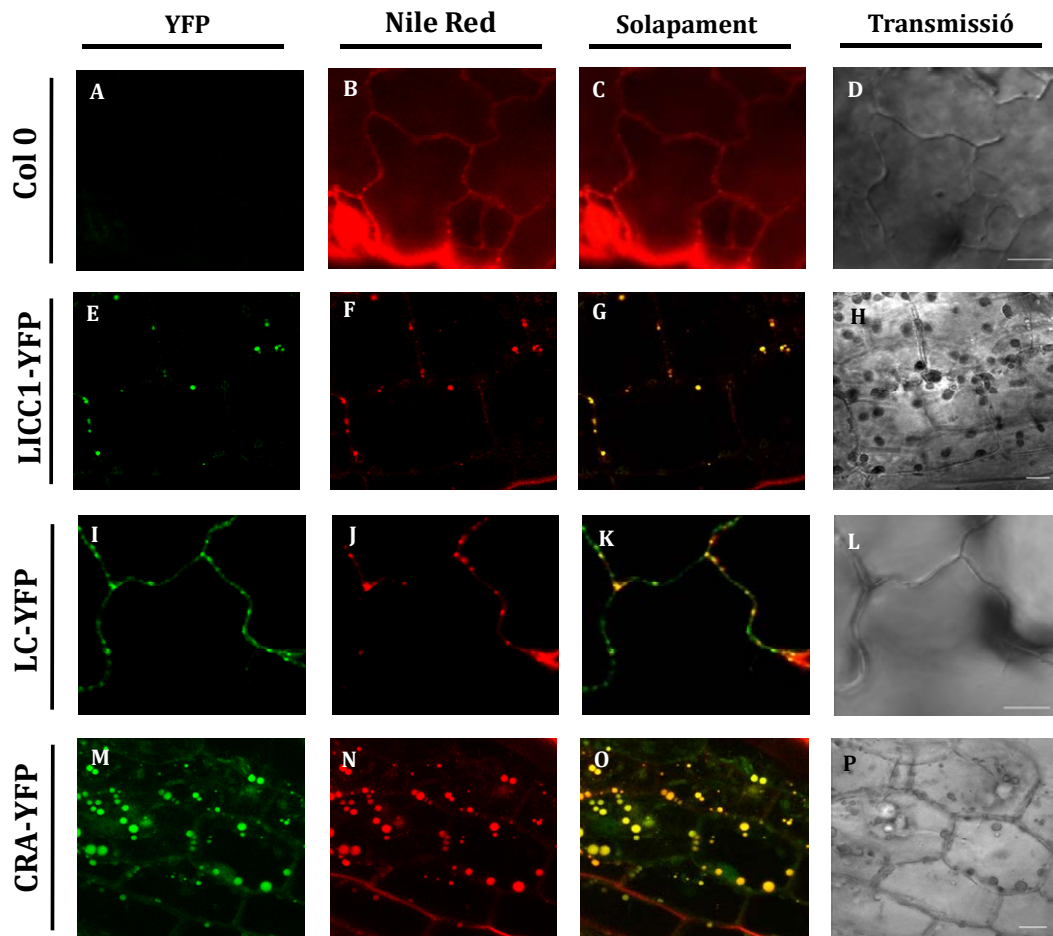


Figura R61. Efecte de l'estrès hídric sobre la localització subcel·lular en cèl·lules de fulles i hipocòtil d'*Arabidopsis thaliana*. Co-localització de LICC1-YFP, LC-YFP, CRA-YFP amb els cossos lipídics tenyits amb Nile Red (vermell). Barra 10 μm .

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1- IDENTIFICACIÓ DE GENS D'EXPRESSIÓ EN EMBRIÓ JOVE DE BLAT DE MORO

El procés del desenvolupament de la llavor i en concret de l'embrió de blat de moro ha estat estudiat sota diferents perspectives des de fa dècades. Per exemple, Kiesselbach va publicar en 1949 un dels primers estudis detallats del desenvolupament del blat de moro a nivell citològic, incloent gàmetes, embrió i llavor completa basant-se en microscòpia òptica (Kiesselbach, 1949). Aquests estudis van mostrar que la fase inicial del desenvolupament embrionari consisteix en la formació de les estructures bàsiques (fins als 15 DAP, aproximadament) i les fases posteriors en el seu creixement i maduració.

El desenvolupament tècnic ha anat afegint noves perspectives i dades a l'estudi del desenvolupament de l'embrió del blat de moro. En 1989, Kriz va demostrar que les globulines són les proteïnes de reserva més abundants a l'embrió (Kriz, 1989) i les anàlisis bioquímiques i de mutants van permetre identificar l'important paper de les hormones vegetals (àcid abscísic i gibberel·lina) durant el desenvolupament, maduració i germinació de l'embrió (McCarty, 1995).

L'aparició de les *òmiques* ha revolucionat els estudis de la biologia molecular ja que generen grans quantitats d'informació sobre gens transcrits, proteïnes acumulades i metabòlits presents en cadascun dels teixits o tipus cel·lulars, en diferents fases del desenvolupament o sota diferents condicions ambientals. L'embriogènesi vegetal i, en particular, el desenvolupament de la llavor del blat de moro no ha estat una excepció. Per exemple, un

estudi basat en micromatrius va descriure el 2002 els patrons d'expressió de 900 gens de blat de moro durant el desenvolupament de l'embrió (Lee *et al.*, 2002). Més recentment, els avenços tècnics i la seqüenciació de genomes complets han permès estudiar els patrons d'expressió de més de 30.000 gens de blat de moro en diferents òrgans i estadis de desenvolupament, inclòs l'embrió (Sekhon *et al.*, 2011). A més, el desenvolupament de les tècniques de seqüenciació massiva de transcrits (RNA-seq) i la reducció dels seus costos han facilitat la generació de grans quantitats d'informació sobre el transcriptoma en moltes espècies i etapes del seu desenvolupament, incloent el de l'embrió del blat de moro, generant atles molt detallats d'expressió basats en bilions de seqüències (Sekhon *et al.*, 2013; Teoh *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2014; Salvo *et al.*, 2014; Seaver *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2015). Gràcies a aquests estudis s'han descobert els gens que s'expressen en les diferents etapes i parts de l'embrió des de les primeres divisions cel·lulars fins a la dessecació, en els que s'han identificat possibles casos de *splicing* diferencial. A més, la seqüenciació massiva de micro RNAs també ha contribuït a mostrar la seva importància en la regulació del desenvolupament de la llavor del blat de moro (Zhang *et al.*, 2009).

En conjunt, tots aquests estudis han permès descriure un atlas d'expressió gènica detallat associat als canvis morfològics i metabòlics que es donen durant el desenvolupament de l'embrió. Malgrat els notables avenços en la comprensió d'aquests processos encara es desconeix la funció d'un gran nombre dels gens identificats en els estudis del transcriptoma del blat de moro. És, per això, clau avançar en el coneixement de les funcions dels gens de blat de moro anotats i interpretar el seu paper en els processos moleculars i cel·lulars relacionats amb el desenvolupament de l'embrió. Aquesta és la raó per la qual, aquest treball s'ha centrat en determinar les possibles funcions de tres gens de funció desconeguda i no tant en els aspectes del transcriptoma, molt millor detallats en altres estudis.

2. DESENVOLUPAMENT DE LA LLAVOR DE BLAT DE MORO I GENS DE DEFENSA: MCYL

Les plantes estan equipades amb nombrosos mecanismes de protecció contra els patògens (bacteris, fongs o virus). Alguns d'ells s'activen com a resposta a l'atac del patògen, però en altres casos s'expressen de manera constitutiva, formant una primera barrera de defensa (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Unes de les molècules responsables d'aquestes respostes són les AMPs (*antimicrobial peptides*). Les AMPs són proteïnes petites i d'estructura diversa que tenen en comú la seva capacitat d'atacar patògens. Algunes d'aquestes proteïnes s'han identificat en els embrions i/o l'endosperma d'algunes llavors (Nawrot *et al.*, 2014).

Dintre dels gens que hem trobat que es transcriuen a l'embrió immadur de blat de moro s'ha identificat un que hem designat com *mcyl1*, de *Maize Cyclotide-Like 1*, que codifica una proteïna estructuralment relacionada amb la família de proteïnes de plantes CYCLOTIDE, pertanyent al grup dels AMPs. S'ha descrit que les proteïnes CYCLOTIDE tenen activitats antimicrobiana i insecticida, entre d'altres.

La característica més remarcable de les proteïnes CYCLOTIDE és la seva capacitat per formar estructures secundàries cícliques basades en la formació de ponts disulfur entre residus de cisteïna. Concretament, presenten sis residus cisteïna completament conservats que permeten la formació de tres ponts disulfur i el manteniment d'una estructura secundària estable (Craik, 2006; **Figura D1**).

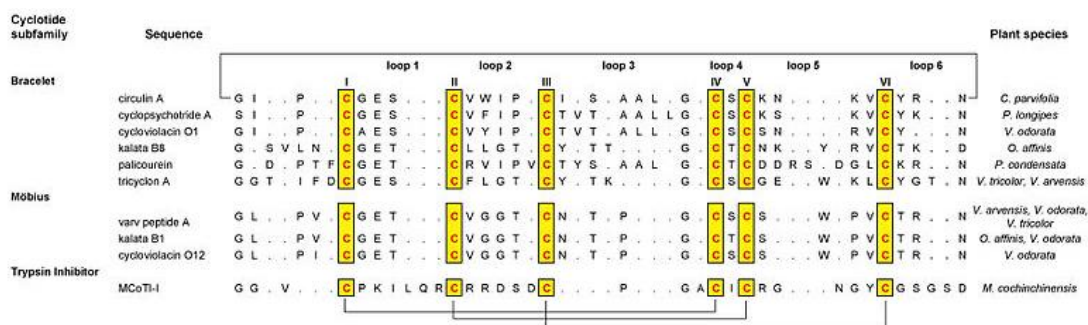


Figura D1. Seqüències de proteïnes CYCLOTIDE de diverses espècies de plantes (<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclotide>). Les línies inferiors indiquen interaccions entre residus cisteïnes.

MCYL1 té una estructura similar a les CYCLOTIDE, amb residus cisteïna ben conservats distribuïts al llarg de la seqüència (**Figura R5**). La distribució dels sis residus cisteïna més conservats és semblant a l'observada a les CYCLOTIDE del grup Möebius però amb certes diferències (**Figura D2**).

Cisteïna	1	2	3	4	5	6
Cyclotides Möebius	C - X ₃ - C - X ₄ - C - X ₄ - C - X ₁ - C - X ₄ - C					
MCYL1	C - X ₄ - C - X ₃ - C - X ₁₅ - C - X ₅ - C - X ₁ - C					

Figura D2- Conservació dels residus cisteïna a les proteïnes CYCLOTIDE de tipus Möebius comparat amb MCYL1.

Les distàncies entre les cisteïnes 1-2-3 i les 4-5-6 semblen estar invertides mentre que la distància entre les cisteïnes 3 i 4 és molt més gran en MCYL que en CYCLOTIDE. Aquesta distribució diferent no impediria, però, que la proteïna formés estructures estables semblants.

Un altre punt en comú és la presència d'un pèptid senyal en l'extrem N-terminal que suggereix que MCYL1 es sintetitza en el reticle endoplasmàtic com una pre-proteïna secretada, com s'ha demostrat per a altres pèptids antimicrobians expressats durant el desenvolupament dels grans de blat de moro (Serna *et al.*, 2001).

MCYL1 no conté, però, el residu Asn C-terminal, present en les CYCLOTIDE, que resulta essencial com a lloc de reconeixement de la tiol-proteasa, enzim responsable de la ciclació de les CYCLOTIDE. Això suggereix que MCYL1 podria correspondre a una variant acíclica de les CYCLOTIDE. S'han identificat prèviament variants acíclics de CYCLOTIDE en plantes dicotiledònies i monocotiledònies, incloent les *Poaceae* (Nguyen *et al.*, 2013).

Una altra característica que acostava MCYL1 a les CYCLOTIDE és que els membres d'aquesta família solen presentar patrons d'expressió molt específics de teixit (Trabi i Craik, 2004). Hem vist com *mcy11* s'expressa específicament en l'embrió i en la capa de transferència de l'endosperma basal (BETL) de llavors de 10 DAP, que és un patró d'expressió força específic que coincidiria amb aquesta característica. A més a més, aquest patró d'expressió és similar a l'observat en altres gens que codifiquen AMPs a blat de moro, com *ZmESR-6* o diversos gens *bap* (Balandín *et al.*, 2005; Serna *et al.*, 2001). Aquest patró d'expressió és interessant ja que el pedicel és un possible punt d'entrada dels patògens a la llavor des del teixit matern. El patògen pot seguir el flux dels nutrients, és a dir, des del pedicel a l'endosperma a través de la BETL i des del ESR (*embryo surrounding endosperm*) al suspensor. En conseqüència, no és estrany que gens implicats en la defensa s'expressin específicament en aquestes zones, com s'ha observat per a *ZmESR6* i *BAP2*, i també per a *mcy11*.

En conjunt, aquestes dades suggereixen que MCYL1 està implicat en la protecció contra patògens en les llavors immadures.

3. MICROTUBULS, CITOESQUELET I DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Els microtúbuls són importants per a moltes funcions cel·lulars en animals i plantes com la determinació de la forma i polaritat de les cèl·lules, la seva organització interna, el transport de i entre orgànuls o la divisió cel·lular (Sedbrook 2004). Estant els microtúbuls implicats en totes aquestes funcions no resulta estrany que quatre dels gens identificats en la llibreria d'embrió immadur codifiquin proteïnes relacionades d'una manera o altra amb els microtúbuls. En aquesta Tesi hem estudiat més en detall dos d'ells: un membre de la família MAP65 i *licc1*.

El cDNA MMH3 correspon a un gen (GRMZM2G030284) que codifica una proteïna de la família de les MAP65 (*microtubule associated protein 65*). Les proteïnes MAP65 codifiquen proteïnes amb un pes molecular de l'ordre d'uns 60-65 kDa que es troben a plantes, fongs i animals, i poden interaccionar amb els microtúbuls on assumeixen diferents tasques (Chang-Jie i Sonobe, 1993). S'ha trobat que en cèl·lules vegetals MAP65 intervé en molts processos com la formació de la paret cel·lular primària, la divisió i allargament cel·lular, en el creixement de l'arrel, en la senescència foliar, l'estabilització dels microtúbuls durant condicions d'estrès ambiental, en el desenvolupament de les cèl·lules gegants durant la infecció de nematodes en l'arrel, etc. (Mao *et al.*, 2006; Keech *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011; Dhonukshe *et al.*, 2012; Smertenko *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005; Caillaud *et*

al., 2008). MAP65 realitza aquestes funcions estabilitzant els microtúbuls mitjançant la formació de ponts creuats (Chang-Jie i Sonobe 1993). Els genomes de plantes contenen múltiples gens de la família MAP65 repartits entre diferents subfamílies que tenen propietats i funcions diferents (Neumann *et al.* 2008).

El gen GRMZM2G030284 es transcriu de manera exclusiva en estadis primerencs del desenvolupament de l'embrió i la llavor. Aquest patró d'expressió fa pensar que la seva funció estaria relacionada amb la divisió cel·lular, la determinació del patró o l'elongació cel·lular. L'anàlisi filogenètica mostra que GRMZM2G030284 pertany al mateix grup que les proteïnes d'*Arabidopsis* AtMAP65-3, AtMAP65-4 i AtMAP65-9. Les dues primeres s'expressen sobretot en el meristem apical, en la llavor i en flors immadures, mentre que, *Atmap65-9* (At5g62250) s'expressa únicament en el pol·len. El gen de blat de moro identificat s'expressa en embrió i en llavor immadura, mentre que en embrions més madurs la seva expressió es concentra en les zones meristèmiques (**Figura R11**), la qual cosa suggereix una major similitud funcional amb *Atmap65-3* (At5g51600) i *Atmap65-4* (At3g60840). Els mutants de AtMAP65-3 (pleiade (ple)) presenten defectes en la morfogènesi de l'arrel i l'embrió, produint cèl·lules multinucleades i amb parets cel·lulars incompletes (Hussey *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004). En la interfase AtMAP65-3 s'associa amb els microtúbuls corticals i amb els microtúbuls propers al nucli, però durant la citocinesi està només present en el centre del fragmoplast (Müller *et al.* 2004; Van Damme *et al.* 2004). La localització subcel·lular i el fenotip dels seus mutants indiquen que AtMAP65-3 és necessari per a la culminació de la citocinesi. AtMAP65-4 no es localitza en els microtúbuls corticals, sinó en els perinuclears i en el fus mitòtic (Van Damme *et al.*, 2004), on sembla que contribueix a les connexions laterals entre els microtúbuls del fus i a la iniciació de la formació del cinetocor (Fache *et al.*, 2010). No existeix cap informació sobre la localització subcel·lular o possibles funcions de AtMAP65-9.

Aquestes dades no permeten aventurar cap possible funció per al gen GRMZM2G030284. Les dades d'expressió podrien relacionar-lo tant amb el procés de divisió com el d'elongació, o ambdós. Estudis de localització subcel·lular i d'inactivació del gen permetran en un futur determinar la seva funció.

4. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LICC1

4.1. Gens *licc1* en plantes

Tots els genomes eucariotes contenen gens que codifiquen proteïnes LICC en un nombre més o menys gran. Per exemple, els genomes del blat de moro i l'arròs contenen tres gens, el genoma d'*Arabidopsis* en conté cinc, el genoma de *Physcomitrella* en conté set i el genoma humà en conté dos. Un estudi filogenètic indica que els gens *licc* estan dividits en dos grans grups. Els dos grups estan representats en tots els grups filogenètics però amb diferent nombre de còpies. Fins ara els únics gens caracteritzats d'aquesta família pertanyen a llevat o humans.

El genoma de llevat conté una sola còpia de gen *licc* anomenat *gid8* que, si bé pertany al grup 1, presenta diferències respecte a la resta dels membres d'aquest grup i es localitza separat de la resta en l'arbre filogenètic. GID8 va ser identificat com part del complex GID que intervé en la degradació de la fructosa-1,6-bisfosfatasa durant l'aturada de la gluconeogènesi (Regelmann *et al.*, 2003), però és probable que aquesta no sigui la seva única funció (Santt *et al.*, 2008). El genoma humà conté dos gens codificant proteïnes LICC anomenats *twa1* i *maea*. Les proteïnes TWA1 i MAEA formen part del complex MRCTLH (anomenat així per la presència de les proteïnes Muskelin, RanBPM i cinc proteïnes amb domini CTLH) que, per la seva composició, es pensa que és homòleg al complex GID de llevat (Francis *et al.*, 2013). En mamífers s'ha demostrat que el complex MRCTLH interactua amb un nombre elevat i divers de proteïnes (Suresh *et al.*, 2012), la qual cosa suggereix que està implicat en múltiples funcions com ara la regulació de la estabilitat d'algunes proteïnes, la del cicle cel·lular o la d'altres processos cel·lulars encara no definits (Suzuki *et al.*, 2008; Tomaru *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2013).

El gen *licc1* ha estat identificat per la seva expressió en embrió immadur del blat de moro però els posteriors anàlisis han demostrat que s'expressa en tots els òrgans i estadis de desenvolupament tot i que l'acumulació de mRNA és més gran a les anteres, llavors immadures i, més específicament, als embrions. L'acumulació de la proteïna també es dona en tots els teixits i condicions analitzades en quantitats més o menys similars, tot i que si que s'observen diferències en la mida de la proteïna. La mida teòrica de la proteïna deduïda a partir de la seva seqüència aminoacídica és de 26 kDa. Tot i que en molts casos s'observa una banda d'aquesta mida, no és la més abundant. En canvi, una altra banda d'una mida aparent d'uns 29 kDa apareix en totes les mostres i en major quantitat. També hem observat en alguns cassos bandes de mida superior. Aquests resultats indiquen que LICC1 podria presentar diferents formes degudes a modificacions postraduccionals. Tot i que no tenim dades experimentals al respecte, les diferències de pes molecular entre les formes observades i la presència de possibles llocs de fosforilació semblen indicar que sigui aquesta la modificació que pateix LICC1. En qualsevol cas, com ja es comentarà més endavant, aquestes modificacions semblen afectar la distribució subcel·lular de LICC i la seva capacitat d'interacció amb altres proteïnes, la seva estabilitat, i, en conseqüència, la seva funció. La natura exacta de les modificacions i el seu control seran objecte d'estudi en futurs treballs.

4.2. Dominis LisH, CTLH i CRA interaccions amb proteïnes

Els dominis proteics LisH, CTLH i CRA han estat descrits com a responsables d'interaccions proteïna-proteïna. Aquest dominis es poden presentar en combinació amb d'altres. S'ha descrit que la funció del domini LisH pot ser tant la d'afavorir la homodimerització com la d'interactuar amb els microtúbuls o altres proteïnes (Emes i Ponting, 2001). No s'ha descrit cap funció concreta pel al domini CTLH tot i estar involucrat en interaccions entre proteïnes (Umeda *et al.*, 2003). Per últim, el domini CRA també és un domini d'interacció proteïna-

proteïna sense unes funcions específiques descrites (Menon *et al.*, 2004). Les nostres dades experimentals estarien d'acord amb aquestes funcions dels dominis.

4.2.1. Formació de complexos

L'experiment de centrifugació diferencial (**Figura R20**) indica que LICC1 forma part de complexos d'alt pes molecular. Probablement LICC1 forma part de més d'un complex ja que apareix en la fracció precipitada tant després de centrifugar a només 10000 g com a 200000 g. S'observa, però, que les formes de LICC1 que precipiten són en part diferents ja que a velocitats de centrifugació altes apareix en el precipitat una banda d'una mida aparent d'uns 40 kDa que no s'observa a la resta de les mostres. Aquesta banda probablement correspon a una modificació postraduccionals de LICC1 que, tot i que no en tenim dades que ho demostrin, podria correspondre a una ubiquitinació. S'ha descrit que el complex GID/MRCTLH té activitat ubiquitin ligasa (Santt *et al.*, 2008). D'altra banda, inclús després de centrifugar a 200000 g una part de la proteïna segueix apareixent al sobrenedant i, per tant, no forma part de complexos proteics de gran massa. Tot plegat indica que LICC1 estaria present en diferents formes i localitzacions: una part seria soluble, una part formaria part d'un complex de molt alt pes molecular, que, com veurem, podria correspondre als microtúbuls, i una altra part podria formar part d'un complex de mida gran, però no tant com els microtúbuls, i que podria correspondre, al menys en part, al complex GID/MRCTLH descrit a humans i llevat. Les modificacions postraduccionals podrien modificar i regular aquestes interaccions.

4.2.2. Interacció amb microtúbuls

Una de les primeres funcions descrites per al domini LisH va ser la de mediar a la interacció amb els microtúbuls. La proteïna RanBPM va ser descoberta per primer cop associada al *microtubule organizing center* (Nakamura *et al.*, 1998), tot i que després es va descobrir que només hi està parcialment localitzada al *microtubule organizing center* (Nishitani *et al.*, 2001). De tota manera, s'han descrit altres proteïnes amb dominis LisH que interaccionen amb microtúbuls com RanBP10 (Salemi *et al.*, 2014), nementin (Atabakhsh *et al.*, 2012), o MKLN1, que participa en el transport a través dels microtúbuls del receptor GABA_A dependent de dineïna (Pfaffman *et al.*, 2015).

Les nostres dades indiquen que LICC1 interacciona amb els microtúbuls *in vitro* i que colocalitza, al menys parcialment, amb els microtúbuls *in vivo*. A més a més, l'aplicació de drogues que desestabilitzen els microtúbuls produeix canvis importants en la distribució subcel·lular de LICC1. Aquesta interacció sembla dependre de les condicions ambientals ja que, per exemple, LICC1 sembla desplaçar-se cap als cossos lipídics sota condicions d'estrès.

La part de la proteïna que conté els dominis LisH-CTLH és la responsable de la colocalització amb els microtúbuls. El fragment LC també mostra una certa localització nuclear però això podria ser degut a que la petita mida del fragment (40 kDa) facilitaria la difusió passiva en el

nucli (Wang i Brattain, 2007). Les possibles funcions derivades d'aquesta interacció ens són desconegudes. Els microtúbuls estan implicats en múltiples funcions cel·lulars incloent la divisió cel·lular, elongació cel·lular o transport intracel·lular, entre d'altres. En llevat, la sobreexpressió de *GID8* (homòleg a *LICC1*) accelera l'inici de la replicació del DNA i la manca de *GID8* retarda el començament de la replicació del DNA produint un allargament de les cèl·lules (Pathak *et al.*, 2004). *GID8* està parcialment localitzat en el nucli (Huh *et al.*, 2003). En humans, *TWA1* també es localitza en el nucli però en presència de Muskelin es distribueix en el citoplasma (Umeda *et al.*, 2003). Nosaltres hem observat que la sobreexpressió de *LICC1-YFP* produeix una reducció en la taxa de creixement dels calls de tabac i del creixement de les tiges d'*Arabidopsis*, la qual cosa sembla indicar que la sobreexpressió de *LICC1* pot interferir amb la divisió o bé l'elongació cel·lular. De fet, durant la divisió cel·lular, el fragment LC es localitza en torn al fus mitòtic. D'altra banda, hem observat moviment de vesícules a través de regions marcades per *LICC1*, la qual cosa pot indicar que *LICC* també podria estar implicada en funcions de transport intracel·lular.

4.2.3. Cossos lipídics

La distribució subcel·lular de *LICC1* pot variar segons les condicions o el sistema experimental emprat. Així, l'agroinfiltració de fulles de *N. benthamiana* i la transformació estable de plantes d'*Arabidopsis* indiquen que *LICC1-YFP* es localitza al citoplasma amb un alt grau de colocalització amb els microtúbuls, en especial els microtúbuls corticals. En canvi, quan es transformen de manera estable cèl·lules de tabac BY2, *LICC1-YFP* està principalment associada a cossos lipídics. Aquesta diferent localització sembla dependre, al menys en part, de l'estat d'estrès de les cèl·lules ja que quan en l'hipocòtil d'*Arabidopsis* que expressen *LICC1-YFP* són sotmeses a deshidratació s'observa que la localització de *LICC1-YFP* passa de citoplasmàtica a associada a cossos lipídics. Aquest no és el primer cas observat de proteïnes que s'associen amb els cossos lipídics en cas d'estrès. Per exemple, la proteïna quinasa dependent de calci *AtCPK1*, la caleosina 3 (*AtCLO3*) i la α -dioxigenasa 1 (α -*DOX1*) es mouen cap als cossos lipídics en resposta a l'atac de patògens (Shimada *et al.*, 2014; Coca i San Segundo, 2010). La funció de *LICC1* en els cossos lipídics en condicions d'estrès és desconeguda, però tenint en compte que probablement *LICC1* forma part del complex *GID/MRCTLH* i que aquest complex està involucrat en la degradació de certes proteïnes via ubiquitinació, és possible que aquesta també sigui la seva funció en plantes i que aquest procés tingui lloc en la superfície dels cossos lipídics. Cada cop hi ha més dades que indiquen que els cossos lipídics tenen altres funcions més enllà de la de ser cúmuls de reserves, una d'aquestes noves funcions en plantes podria ser la de respondre a l'estrès (Shimada *et al.*, 2014; Shimada i Hara-Nishimuda, 2015; Welte, 2015). S'ha proposat que la superfície dels cossos lipídics podria servir com a aglutinador per a certes reaccions o interaccions entre proteïnes. Per exemple, se sap que els virus HCV i Dengue fan servir la superfície dels cossos lipídics per ensamblar les càpsides (Welte, 2015). És a dir, la superfície del cos lipídic podria actuar com una mena de *scaffold* per mediar les interaccions entre proteïnes o altres

components cel·lulars. Curiosament, també s'ha atribuït aquesta mateixa funció de *scaffold* al complex GID/MRCTLH. No resulta agosarat pensar que el complex GID/MRCTLH podria fer servir la superfície dels cossos lipídics com a suport per interaccionar amb certes proteïnes només en certes condicions d'estrès, donant lloc a reaccions que de moment són desconegudes. Una possible funció podria ser, per exemple, la regulació de l'estabilitat de la caleosina 4. La caleosina 4 (AtCLO4) està associada als cossos lipídics, s'expressa en teixits que no siguin la llavor, incloent estomes, i està regulada pel ABA exogen (Kim *et al.*, 2011). Els mutants *atclo4* mostren un augment en la tolerància a l'estrès hídric i les plantes que sobreexpressen AtCLO4 mostren una disminució de la tolerància a l'estrès. Una possible funció de LICC1 podria ser la degradació de AtCLO4 i això podria explicar l'increment de la resistència a l'estrès hídric en plantes transformades d'*Arabidopsis* que sobreexpressen LICC1-YFP.

Un altre punt a resoldre és la forma d'unió de LICC1 als cossos lipídics. Les proteïnes components estructurals d'aquests orgànuls (oleosines, caleosines, estereoleosines) s'uneixen a través d'un domini altament hidrofòbic que s'insereix al nucli lipídic (Murphy, 2001), però LICC1 no conté cap regió amb aquestes característiques. La part responsable de la localització als cossos lipídics és la C-terminal que conté el domini CRA, un domini d'unió a proteïnes. Aquest fet suggereix que LICC1 podria interaccionar amb proteïnes del cos lipídic per localitzar-se, mecanisme que ja ha estat proposat anteriorment, per a exemple, per les proteïnes OBAP (López-Ribera *et al.*, 2014). De tota manera, no es pot descartar que la localització requereix el complex MRCTLH sencer.

4.2.4. Polifenol oxidasa i respostes a estrès

Hem vist que LICC1 pot interaccionar amb una polifenol oxidasa. Les polifenol oxidases (PPOs) són enzims que usen l'oxigen molecular per oxidar *orto*-difenols a *orto*-quinones (Tran *et al.*, 2012). Les PPOs en plantes van ser inicialment considerades com proteïnes de defensa davant d'herbívors, patògens i amb una expressió induïda per ferida (Thipyapong *et al.*, 1995; Constabel i Ryan, 1998), però la diversitat de teixits i condicions on s'expressen suggereix que aquest enzim pot jugar un paper en diferents processos i que també podria estar relacionat amb la resposta a l'estrès hídric (Constabel i Barbehenn, 2008). Moltes PPOs es localitzen en el cloroplast (Constabel *et al.*, 1996), però també n'existeixen PPOs no plastídiques (Tran *et al.*, 2012). En altres casos, com a la patata, quan el teixit no està danyat les PPOs es troben en els grans de midó i el citoplasma, però un cop s'ha produït una ferida les PPOs es traslladen a la vacuola (Tran *et al.*, 2012).

En condicions normals LICC1 està localitzat en el citoplasma, la qual cosa ens diu que probablement LICC1 interactua amb PPOs no cloroplàstiques. D'una banda, el fragment CRA mostra una localització en el cloroplast de certs òrgans com en l'hipocòtil de plantes d'*Arabidopsis*. Això podria voler dir que, sota certes condicions, la proteïna LICC1 també podria localitzar-se als cloroplasts. En qualsevol cas, i donat que no es troben PPO en el genoma d'*Arabidopsis* (Tran *et al.*, 2012), aquesta localització no dependria de la presència de

PPOs. D'altra banda, en condicions d'estrès les membranes del cloroplast poden ser danyades i alliberar el contingut, PPOs incloses, en el citoplasma. Llavors LICC1 podria estar involucrada en la reducció dels nivells de PPO en el citoplasma després de condicions d'estrès. No existeixen gaires dades que relacionin proteïnes LICC amb estrès en animals, però en humans la proteïna Muskelin pot interaccionar amb HO-1 (*heme oxygenase-1*) que, a la vegada, està implicada en la resposta contra l'excés de ROS (Matsumoto *et al.*, 2006). La relació entre LICC1 i les PPOs és un punt a resoldre en futurs treballs.

Potser relacionat amb las PPOs, hem observat que la sobreexpressió de LICC1 produeix una reducció la velocitat del creixement i un increment de la resistència a l'estrès hídric. Les variacions en el contingut cel·lular de ROS juguen un paper molt important en la divisió cel·lular a les plantes (Livanos *et al.*, 2012). Canvis en el ROS afecten, per exemple, a la polimerització dels microtúbuls, a la formació del fragmoplast, a la dinàmica de l'embolcall nuclear, a la segregació cromosòmica, o a la formació de la nova paret cel·lular. Si LICC1 d'alguna manera intervé en la regulació del ROS, la sobreexpressió de LICC1 podria afectar la velocitat de divisió cel·lular i alterar la mida o la velocitat de creixement de les plantes, i, d'altre banda, variar els efectes del estrès hídric.

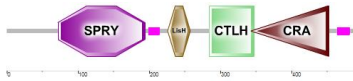






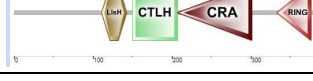



Hem observat un augment en la concentració de LICC1-YFP en les cèl·lules de guarda dels estomes en condicions d'estrès. Donat que en aquestes plantes el gen *licc1-yfp* està sota el control del promotor 35S i que aquest augment no s'observa en les cèl·lules properes del mesòfil de la fulla, hem de deduir que en condicions d'estrès augmenta l'estabilitat de LICC1-YFP a les cèl·lules de guarda de l'estoma, tot i que desconeixem el mecanisme. Tenint en compte que LICC1 probablement pot formar part d'un complex proteic, és possible que l'assemblatge del complex segons les condicions d'estrès pugui explicar aquestes diferències en l'estabilitat de la proteïna i en la seva localització subcel·lular. Se sap que en humans l'estat de fosforilació de RanBPM pot canviar en certes condicions d'estrès com el shock osmòtic i que això pot alterar la seva localització subcel·lular (Denti *et al.*, 2004). Tenint en compte que RanBPM és el component central del complex MRCTLH, un procés semblant podria explicar els canvis de localització i/o d'estabilitat de LICC1-YFP en condicions d'estrès hídric o dependent del tipus cel·lular on ha estat introduïda.

4.3. Complexes MRCTLH de plantes

Els genomes de tots els Eucariotes codifiquen proteïnes homòlogues a la majoria de les proteïnes que formen els complexos GID i MRCTLH en llevats i humans. Els genomes de plantes contenen gens homòlegs a molts dels components del complex GID/MRCTLH. A *Arabidopsis* s'han trobat onze gens (**Taula D1**), però la informació disponible sobre aquestes proteïnes és molt reduïda (Francis *et al.*, 2013). A *Arabidopsis* aquestes proteïnes també formarien un complex ja que s'ha pogut demostrar la interacció entre algunes d'elles, incloent les interaccions que impliquen proteïnes LICC (Tomaščíková *et al.*, 2012). Aquestes dades semblen indicar la existència a les plantes d'un complex proteic semblant al GID/MRCTLH però no hi ha gaire informació sobre les seves funcions. Només se sap que a *Pinus radiata*,

SEPR11, homòleg d'un dels components del complex MRCTLH, està implicat en la reproducció i desenvolupament de la planta (Aquea *et al.*, 2009) i que a l'arròs, OsLIS-L1, també homòleg d'un dels components, és necessari per a l'elongació del primer internode i per a la formació del gametòfit masculí (Gao *et al.*, 2012). Les nostres dades indiquen que LICC1 formaria part d'un complex proteic al blat de moro, tot i que no hem pogut demostrar interaccions amb altres possibles components del complex MRCTLH.

Taula D1- Gens d'*Arabidopsis* que codifiquen proteïnes homòlogues als components del complex GID/MRCTLH

Arabidopsis	Humans	Llevat	Domini
At1g35470	RanBPM	GID1/VID30	
At1g61150	Twa1	GID8	
At3g55070	MAEA	GID9	
At4g09300			
At2g22690			
At4g37880	RMD5	GID2	
At5g09630			
At4g09340			
At5g08560	WDR26	-	
At5g43920	WDR26	-	
At5G67320			

Una de les característiques més remarcables del complex MRCTLH és l'enorme potencial dels seus components interactuar amb d'altres proteïnes (Menssen *et al.*, 2012). Les poques dades disponibles indiquen que a les plantes el complex MRCTLH també podria interactuar amb moltes proteïnes. És més, donat que a les plantes molts dels gens estan presents en un major nombre de còpies és raonable pensar que la capacitat per interaccionar amb altres proteïnes podria ser inclús més gran. A *Arabidopsis thaliana* s'ha fet un esforç per determinar totes les possibles interaccions entre les proteïnes codificades en el seu genoma donant lloc a la base de dades "The Arabidopsis Interactions Viewer" (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi) que conté 70.944 interaccions predites (Geisler-Lee *et al.*, 2007) i 36.329 interaccions confirmades emprant diferents mètodes, com el doble híbrid o mètodes bioquímics (Popescu *et al.*, 2007; Popescu *et al.*, 2009; Braun *et al.*, 2011; (<https://associomics.dpb.carnegiescience.edu/Associomics/Home.html>)). Si es fa una consulta d'aquesta base de dades amb els onze gens d'*Arabidopsis* que codifiquen homòlegs dels components del complex GID/MRCTLH (**Taula D1**) s'obtenen 239 interaccions (**Taula D2**). Si bé no totes han estat demostrades experimentalment, aquest elevat nombre suggereix que també en plantes els components del complex MRCTLH tenen un ampli potencial d'interaccions amb altres proteïnes.

Taula D2.- Proteïnes que interactuen amb les proteïnes homòlogues d'*Arabidopsis* en el llevat i humana del complex GID / MRCTLH basat en The Arabidopsis Interactions Viewer (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi).

Gen 1	Gen 2	Definició gen 2
At1g61150 (Twa1)	At1g16610	ARGININE/SERINE-RICH 45
At1g61150 (Twa1)	At3g55070 (MAEA)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At1g61150 (Twa1)	At4g09340	SPLa/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
At1g61150 (Twa1)	At4g33200	MYOSIN XI 1
At1g61150 (Twa1)	At4g37880 (RMD5)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At1g61150 (Twa1)	At5g08560 (WDR26)	LisH and RanBPM domains / WD-40 repeat containing protein
At1g61150 (Twa1)	At5g43900	MYOSIN 2
At3g55070 (MAEA)	At1g09100	26S PROTEASOME AAA-ATPASE SUBUNIT RPT5B
At3g55070 (MAEA)	At1g59900	PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX E1 ALPHA SUBUNIT
At3g55070 (MAEA)	At1g61150 (TWA1)	LisH and RanBPM domains containing protein
At3g55070 (MAEA)	At2g22690	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At3g55070 (MAEA)	At2g29540	RNApolymerase 14 kDa subunit
At3g55070 (MAEA)	At2g39630	A putative dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase
At3g55070 (MAEA)	At2g40110	Yippee family putative zinc-binding protein
At3g55070 (MAEA)	At3g05530	REGULATORY PARTICLE TRIPLE-A ATPASE 5A, RPT5A
At3g55070 (MAEA)	At3g29800	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
At3g55070 (MAEA)	At4g09300	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At3g55070 (MAEA)	At4g27740	Yippee family putative zinc-binding protein
At3g55070 (MAEA)	At4g32410	CELLULOSE SYNTHASE 1
At3g55070 (MAEA)	At5g08560 (WDR26)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,transducin family protein / WD-40 repeat family protein
At3g55070 (MAEA)	At5g45430	Protein kinase superfamily protein
At4g37880 (RMD5)	At1g10320	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
At4g37880 (RMD5)	At1g30090	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
At4g37880 (RMD5)	At1g61150 (Twa1)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At4g37880 (RMD5)	At1g70290	Trehalose-6-phosphatase synthase S8
At4g37880 (RMD5)	At1g80830	Natural resistance-associated macrophage protein 1
At4g37880 (RMD5)	At3g14120	Undetermined
At4g37880 (RMD5)	At3g62030	Nuclear-encoded chloroplast stromal cyclophilin CYP20-3
At4g37880 (RMD5)	At4g16830	Hyaluronan
At4g37880 (RMD5)	At4g33200	MYOSIN XI 1
At4g37880 (RMD5)	At4g37880 (RMD5)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At4g37880 (RMD5)	At5g48010	Thalianol synthase 1
At1g35470 (RanBPM)	At4g10570	UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 9, UBP9
At1g35470 (RanBPM)	At4g18040	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E1
At1g35470 (RanBPM)	At5g14080	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
At1g35470 (RanBPM)	At5g20020	RAN2, RAS-RELATED GTP-BINDING NUCLEAR PROTEIN 2

At1g35470 (RanBPM)	At5g55190	RAN GTPASE 3, RAN3
At1g35470 (RanBPM)	At5g64320	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
At1g35470 (RanBPM)	At1g61150 (TWA1)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At1g35470 (RanBPM)	At3g55070 (MAEA)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At1g35470 (RanBPM)	At4g37880 (RMD5)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At1g35470 (RanBPM)	At5g08560 (WDR26)	LisH and RanBPM domains / WD-40 repeat containing protein
At1g35470 (RanBPM)	At5g43920 (WDR26)	LisH and RanBPM domains / WD-40 repeat containing protein
At5g08560 (WDR26)	At1g61150 (TWA1)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At5g08560 (WDR26)	At1g78900	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT A, VHA-A
At5g08560 (WDR26)	At2g22690	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At5g08560 (WDR26)	At2g39760	MATH-BTB domain proteins (BPMs)
At5g08560 (WDR26)	At2g40110	Yippee family putative zinc-binding protein
At5g08560 (WDR26)	At3g06720	IMPA1, IMPORTIN ALPHA
At5g08560 (WDR26)	At3g55070 (MAEA)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At5g08560 (WDR26)	At4g02150	IMPORTIN ALPHA 3
At5g08560 (WDR26)	At4g09300	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At5g08560 (WDR26)	At4g16143	IMPORTIN ALPHA ISOFORM 2
At5g08560 (WDR26)	At4g24900	TITAN-LIKE, TTL
At5g08560 (WDR26)	At5g19000	nucleus,transducin family protein / WD-40 repeat family protein, BTB-POZ AND MATH DOMAIN 1, BPM1
At5g08560 (WDR26)	AT1G49450	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At5g08560 (WDR26)	At1g35470 (RanBPM)	RAN-BINDING PROTEIN IN THE MICROTUBULE-ORGANIZING CENTRE, RANBPM, SPRY, LisH, CTLH and CRA domain-containing proteins
At5g43920 (WDR26)	AT1G78070	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At5g43920 (WDR26)	AT5G50120	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At5g43920 (WDR26)	At1g35470 (RanBPM)	RAN-BINDING PROTEIN IN THE MICROTUBULE-ORGANIZING CENTRE, RANBPM, SPRY, LisH, CTLH and CRA domain-containing proteins
At4g09340	At1g61150 (TWA1)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At4g09340	At4g26630	DEK-DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3, DEK3
At2g22690	At1g59900	PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX E1 ALPHA SUBUNIT
At2g22690	At2g40110	Yippee family putative zinc-binding protein
At2g22690	At3g55070 (MAEA)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At2g22690	At4g27740	Yippee family putative zinc-binding protein
At2g22690	At5g08560 (WDR26)	LisH and RanBPM domains / WD-40 repeat containing protein
At2g22690	At2g38880	nucleus,zinc ion binding ,ATHAP3
At2g22690	At5g27970	zinc ion binding ,ARM repeat superfamily protein
At2g22690	At5g65180	zinc ion binding ,ENTH/VHS family protein
At2g22690	At1g06790	zinc ion binding ,RNA polymerase Rpb7 N-terminal domain-containing protein
At2g22690	At4g33100	Mitochondrial distribution/morphology family 35
At2g22690	At5g52640	HEAT SHOCK PROTEIN 83
At2g22690	AT5G67320	HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15, HOS15
At2g22690	At2g13370	CHROMATIN REMODELING 5, DEAD-like helicase
At4g09300	At3g55070 (MAEA)	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At4g09300	At5g08560 (WDR26)	LisH and RanBPM domains / WD-40 repeat containing protein
At4g09300	At4g09300	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At4g09300	At5g20490	MYOSIN XI K
At4g09300	At5g09630	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
AT5G67320	At1g02690	IMPA-6, IMPORTIN ALPHA ISOFORM 6
AT5G67320	At1g03190	ULTRAVIOLET HYPERSENSITIVE 6, UVH6
AT5G67320	At1g08780	ABI3-INTERACTING PROTEIN 3, AIP3, PFD4, PREFOLDIN 4
AT5G67320	At1g09020	ATSNF4, HOMOLOG OF YEAST SUCROSE NONFERMENTING 4, KIN β , SNF4
AT5G67320	At1g11890	ATSEC22, SEC22, SECRETION 22
AT5G67320	At1g17760	ARABIDOPSIS THALIANA CLEAVAGE STIMULATION FACTOR 77, ATCSTF77, CSTF77
AT5G67320	At1g18940	Nodulin-like
AT5G67320	At1g29150	ATS9, NON-ATPASE SUBUNIT 9, REGULATORY PARTICLE NON-ATPASE 6, RPN6
AT5G67320	At1g29990	PFD6, PREFOLDIN 6
AT5G67320	At1g30070	SGS domain-containing protein
AT5G67320	At1g52740	HISTONE H2A PROTEIN 9, HTA9
AT5G67320	At1g59890	SIN3-LIKE 5, SNL5
AT5G67320	At1g64790	ILA, ILITHYIA
AT5G67320	At1g77460	CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 3, CSI3
AT5G67320	At1g78900	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT A, VHA-A
AT5G67320	At1g79350	EMB1135, EMBRYO DEFECTIVE 1135
AT5G67320	At1g80510	Amino acid transporter
AT5G67320	At2g13370	CHROMATIN REMODELING 5, DEAD-like helicase
AT5G67320	At2g13440	Glucose-inhibited division family A protein
AT5G67320	At2g15430	Non-catalytic subunit of nuclear DNA-dependent RNA polymerases II, IV and V
AT5G67320	At2g16600	CYCLOPHILIN 19
AT5G67320	At2g18000	TBP-ASSOCIATED FACTOR 14
AT5G67320	At2g18510	EMB2444, EMBRYO DEFECTIVE 2444
AT5G67320	At2g22690	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
AT5G67320	At2g36740	ATSWC2, sequence-specific DNA binding transcription factor
AT5G67320	At2g43810	SM-LIKE 6B, Small nuclear ribonucleoprotein
AT5G67320	At2g44150	ASHH3, HISTONE-LYSINE N-METHYLTRANSFERASE
AT5G67320	At3g01090	SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 1.1, SNRK1.1
AT5G67320	At3g03600	RIBOSOMAL PROTEIN S2, RPS2
AT5G67320	At3g04710	TETRATRICOPEPTIDE REPEAT 10, TPR10
AT5G67320	At3g06720	IMPA1, IMPORTIN ALPHA
AT5G67320	At3g12810	PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1, PIE1

AT5G67320	At3g21060	RBBP5 LIKE, RBL
AT5G67320	At3g22480	PDF2, PREFOLDIN 2
AT5G67320	At3g22590	PLANT HOMOLOGOUS TO PARAFIBROMIN
AT5G67320	At3g52250	Encodes a protein with a putative role in mRNA splicing
AT5G67320	At3g58040	SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS 2, SINAT2
AT5G67320	At4g01370	TMPK4, MAP KINASE 4
AT5G67320	At4g04940	Transducin
AT5G67320	At4g05190	KINESIN 5
AT5G67320	At4g22140	EARLY BOLTING IN SHORT DAYS, EBS
AT5G67320	At4g27180	KINESIN 2
AT5G67320	At4g38740	ROC1, ROTAMASE CYP 1
AT5G67320	At5g02470	DPA
AT5G67320	At5g02560	HISTONE H2A 12, HTA12
AT5G67320	At5g02570	Histone
AT5G67320	At5g03415	DPB
AT5G67320	At5g09230	SIRTUIN 2
AT5G67320	At5g09740	HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE CBP FAMILY 11
AT5G67320	At5g10260	RAB GTPASE HOMOLOG H1E
AT5G67320	At5g10400	HISTONE 3.1
AT5G67320	At5g10980	HISTONE 3.3
AT5G67320	At5g14120	Major facilitator superfamily protein
AT5G67320	At5g15770	GLUCOSE-6-PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE 1, GNA1
AT5G67320	At5g19330	ARM REPEAT PROTEIN INTERACTING WITH ABF2
AT5G67320	At5g22220	E2F TRANSCRIPTION FACTOR 1, E2F1, E2FB
AT5G67320	At5g22880	HISTONE B2
AT5G67320	At5g23290	PREFOLDIN 5
AT5G67320	At5g41880	POLA3, DNA primase, small subunit
AT5G67320	At5g42190	SKP-LIKE 2
AT5G67320	At5g45600	TBP-ASSOCIATED FACTOR 14B
AT5G67320	At5g48120	HOMOLOG OF YEAST MET18, ARM repeat superfamily protein
AT5G67320	At5g49510	PREFOLDIN 3
AT5G67320	At5g53360	TRAF-like superfamily protein
AT5G67320	At5g53480	HOMOLOG OF HUMAN KPNB1, ARM repeat superfamily protein
AT5G67320	At5g54670	KINESIN 3
AT5G67320	At5g61070	HISTONE DEACETYLASE OF THE RPD3/HDA1 SUPERFAMILY 18
AT5G67320	At5g63110	HISTONE DEACETYLASE 6, RNA-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL SILENCING 1
AT5G67320	At5g66020	IMPAIRED IN BABA-INDUCED STERILITY 2, SACIB, SUPPRESSOR OF ACTIN 1B
AT5G67320	At5g59970	Histone
AT5G67320	At1g07820	Histone
AT5G67320	At5g52310	Low-temperature-induced protein 78
AT5G67320	At3g45930	Histone
AT5G67320	At3g46320	Histone
AT5G67320	At1g07660	Histone
AT5G67320	At5g59690	Histone
AT5G67320	At2G28740	HISTONE H4
AT5G67320	At3g53730	Histone
At5g09630	At1g07930	GTP binding Elongation factor Tu family protein
At5g09630	At1g09640	Translation elongation factor EF1B, gamma chain
At5g09630	At1g10320	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
At5g09630	At1g11530	C-TERMINAL CYSTEINE RESIDUE IS CHANGED TO A SERINE 1
At5g09630	At1g13320	PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A3
At5g09630	At1g15210	ATP-BINDING CASSETTE G35
At5g09630	At1g22780	40S RIBOSOMAL PROTEIN S18
At5g09630	At1g27970	NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2B
At5g09630	At1g33090	MATE efflux family protein
At5g09630	At1g33110	MATE efflux family protein
At5g09630	At1g50310	SUGAR TRANSPORTER 9
At5g09630	At1g51770	Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
At5g09630	At1g53900	Eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF-2B)
At5g09630	At1g62880	Cornichon family protein
At5g09630	At1g64480	CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 8, CBL8
At5g09630	At1g71280	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
At5g09630	At1g72480	Lung seven transmembrane receptor family protein
At5g09630	At1g76720	Eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF-2) family protein
At5g09630	At1g78970	LUPEOL SYNTHASE 1
At5g09630	At2g03667	Asparagine synthase family protein
At5g09630	At2g13650	GOLGI NUCLEOTIDE SUGAR TRANSPORTER 1
At5g09630	At2g14120	DRP3B, DYNAMIN RELATED PROTEIN
At5g09630	At2g19860	HEXOKINASE 2
At5g09630	At2g20280	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
At5g09630	At2g20450	Ribosomal protein L14
At5g09630	At2g24040	Low temperature and salt responsive protein family
At5g09630	At2g29690	ANTHRANILATE SYNTHASE 2
At5g09630	At2g31170	CYSTEINYL T-RNA SYNTHETASE, FIONA
At5g09630	At2g37470	Histone
At5g09630	At2g39290	PHOSPHATIDYLGLYCEROLPHOSPHATE SYNTHASE 1
At5g09630	At2g46860	PYROPHOSPHORYLASE 3
At5g09630	At2g47640	Small nuclear ribonucleoprotein family protein

At5g09630	At3g01280	VDAC1, VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 1
At5g09630	At3g05960	SUGAR TRANSPORTER 6
At5g09630	At3g06470	GNS1/SUR4 membrane protein family
At5g09630	At3g08650	ZIP metal ion transporter family
At5g09630	At3g08950	HOMOLOGUE OF THE COPPER CHAPERONE SCO1
At5g09630	At3g11630	2-Cys peroxiredoxin
At5g09630	At3g12690	Serine/threonine kinase
At5g09630	At3g14120	Undetermined
At5g09630	At3g16050	PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.2
At5g09630	At3g16950	LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 1
At5g09630	At3g19940	Major facilitator superfamily protein
At5g09630	At3g19980	FLOWER-SPECIFIC, PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 3
At5g09630	At3g20390	REACTIVE INTERMEDIATE DEAMINASE A, RIDA
At5g09630	At3g20650	mRNA capping enzyme family protein
At5g09630	At3g23570	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
At5g09630	At3g28710	ATPase, V0/A0 complex, subunit C/D
At5g09630	At3g30842	ATP-BINDING CASSETTE G38
At5g09630	At3g49010	40S RIBOSOMAL PROTEIN
At5g09630	At3g52390	TatD related DNase
At5g09630	At3g52580	Ribosomal protein S11 family protein
At5g09630	At3g53510	ATP-BINDING CASSETTE G20
At5g09630	At3g56190	ALPHA-SOLUBLE NSF ATTACHMENT PROTEIN 2
At5g09630	At3g62770	AUTOPHAGY 18A
At5g09630	At4g02120	CTP synthase family protein
At5g09630	At4g09300	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein ,LisH and RanBPM domains containing protein
At5g09630	At4g17770	TREHALOSE -6-PHOSPHATASE SYNTHASE S5
At5g09630	At4g24400	CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 8
At5g09630	At4g30990	ARM repeat superfamily protein
At5g09630	At4g32470	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit
At5g09630	At4g33070	PYRUVATE DECARBOXYLASE 1
At5g09630	At4g36860	LIM domain-containing protein
At5g09630	At4g39330	CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 9
At5g09630	At5g05420	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein
At5g09630	At5g09630	LisH/CRA/RING-U-box domains-containing protein
At5g09630	At5g12350	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain
At5g09630	At5g13050	5-FCL, 5-FORMYLTETRAHYDROFOLATE CYCLOLIGASE
At5g09630	At5g19150	pfkB-like carbohydrate kinase family protein
At5g09630	At5g19820	EMBRYO DEFECTIVE 2734
At5g09630	At5g23740	RIBOSOMAL PROTEIN S11-BETA
At5g09630	At5g41190	NOB1, cytoplasmic protein with RNA endonuclease activity
At5g09630	At5g41480	EMBRYO DEFECTIVE 9
At5g09630	At5g43370	PHOSPHATE TRANSPORTER 1
At5g09630	At5g44500	Small nuclear ribonucleoprotein family protein
At5g09630	At5g45420	MEMBRANE ANCHORED MYB
At5g09630	At5g47880	EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1-1
At5g09630	At5g59870	HISTONE H2A 6
At5g09630	At5g60390	GTP binding Elongation factor Tu family protein
At5g09630	At5g62300	Ribosomal protein S10p/S20e family protein
At5g09630	At1g76720	Eukaryotic translation initiation factor 2

Si es representen esquemàticament les interaccions predites o confirmades entre els components del complex MRCTLH a *Arabidopsis* es pot veure que el resultat es molt semblant al que es va obtenir per humans o llevat però amb la diferència de que a les plantes podrien existir dos complexos similars (A i B) i no un com a fongs o mamífers, complexos que compartrien la proteïna At1g35470 (GID1-like) però que serien diferents en la resta dels components. Els dos complexos són similars entre ells i similars als de llevat i mamífers, tot i que s'observen diferències en la presència o manca d'alguns dels components. Aquests dos complexos d'*Arabidopsis*, MRCTLH-A i MRCTLH-B, podrien interactuar entre ells a través de les proteïnes codificades per At5g09300 i At5g09630, tot i que això s'hauria de demostrar experimentalment.

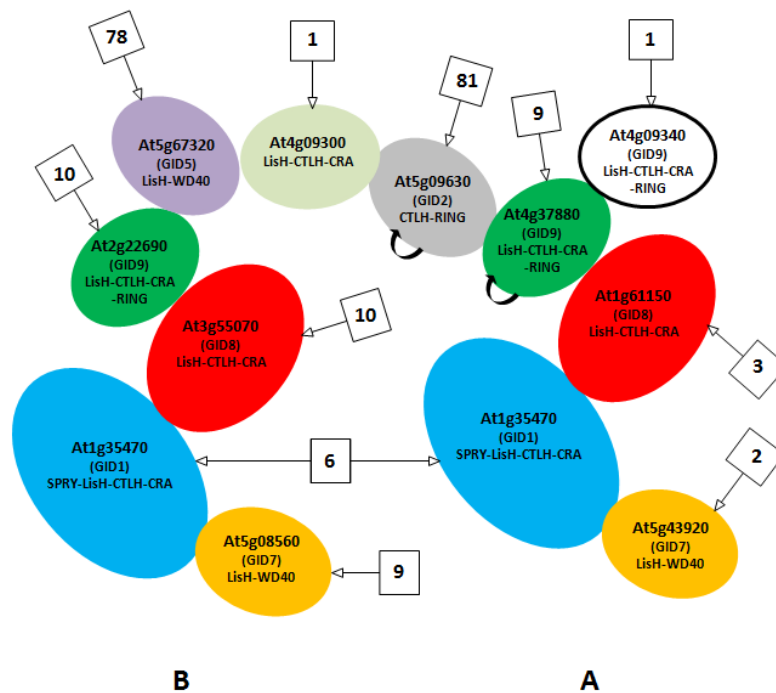


Figura D1- Proteïnes que interactuen amb les proteïnes d'*Arabidopsis* homòlogues a les proteïnes dels complexos GID i MRCTLH de llevat i humans. La proximitat entre ovals indica una possible interacció. Les fletxes indiquen possibles interaccions. Les fletxes corbes indiquen possibles dimeritzacions d'una mateixa proteïna. Els números dintre de quadrats indiquen el nombre de proteïnes que potencialment interactuen (veure taula D2 per a més detalls). Dins dels ovals s'indica el codi del gen d'*Arabidopsis*, l'homòleg de la proteïna de llevat, i els dominis proteics que conté. Dades extretes de "the *Arabidopsis* interactor viewer" (Geisler Lee et al., 2007).

Totes les proteïnes que potencialment formen part dels complexos també poden interactuar amb proteïnes alienes als complexos (**Figura D1 i Taula D2**). Entre elles destaquen dos pel gran nombre de possibles interactors: At5g67320 (78) i At5g09630 (81). Les funcions dels possibles interactors és molt variada però es pot observar una certa tendència si es comparen els possibles interactors del complex A amb els possibles interactors del complex B. Dintre de les proteïnes que semblen interactuar amb el complex A n'existeix un nombre significativament major d'implicades en el transport i el citoesquelet, mentre que entre les proteïnes que semblen interactuar amb el complex B n'existeix un nombre significativament major de implicades en proteosoma, respostes d'estrès, organització nuclear, microtúbuls o del cicle cel·lular. Això indica que podria existir una certa especialització en les funcions dels dos complexos, per exemple, a través de la regulació de l'estabilitat de les proteïnes via ubiquitinació.

LICC1 de blat de moro és homòleg a GID8 de llevat i TWA1 d'humans, components del complex GID/MRCTLH. La proteïna més semblant a *Arabidopsis* és la codificada pel gen At1g61150 que, segons les prediccions anteriors, és un possible component del complex

MRCTLH-A (**Figura D1**). Totes les nostres dades indiquen que al blat de moro també podrien existir complexos similars i que LICC1 podria formar part d'ells. Tot suggereix que, com en el cas dels humans, les funcions dels complexos MRCTLH a plantes poden ser moltes, variades i importants. Aquest perfil estaria d'acord amb els nostres resultat sobre LICC1 ja que aquesta proteïna s'expressa en tots els teixits, presenta diverses formes postraduccionals, té potencial per interaccionar amb altres proteïnes, pot tenir diferents localitzacions subcel·lulars i pot respondre a variacions en el desenvolupament i les condicions ambientals. La determinació de les funcions concretes de la proteïna LICC1 passaran, probablement, per determinar l'existència del complex MRCTLH i de les seves funcions.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1- S'han identificat 180 gens que es transcriuen als embrions de blat de moro de 10 DAP, un 21% dels quals tenen una funció desconeguda, un 21% estan relacionats amb la traducció, un 19% amb la divisió cel·lular i el desenvolupament, un 17% amb el metabolisme, un 13% amb el processament i degradació de les proteïnes, i la resta amb funcions diverses.

2- El gen *mcyl* (cDNA MKA5) codifica un pèptid amb certes semblances amb els pèptids antimicrobians del grup Möebius de la família CYCLOTIDE. El gen *mcyl* s'expressa majoritàriament al suspensor, protoderma i en la capa basal de transferència de l'endosperma en embrions a les etapes inicials del desenvolupament.

3- El gen *map65* (cDNA MMH3) codifica una proteïna associada a microtúbuls de la família MAP65. La seva expressió és màxima en sacs embrionaris no pol·linitzats, en tot l'embrió als 13 DAP, i en la plúmula en estadis posteriors del desenvolupament.

4- El gen *licc1* (cDNA MIH1) codifica una proteïna que conté els dominis LisH, CTLH i CRA. En els genomes de blat de moro i arròs hi ha tres gens que codifiquen proteïnes semblants i cinc en el de *A. thaliana*. Els patrons d'expressió són variables però s'expressen en moltes parts de les plantes.

5- Es troben gens que codifiquen proteïnes semblants a LICC1 a tots el genomes d'espècies eucariotes. Entre ells, els més estudiats son *gid8* de llevat i *twa1* d'humans. Les proteïnes codificades per ambdós gens formen part de complexos proteics anomenats GID/MRCTLH, respectivament, amb múltiples funcions.

6- La proteïna LICC1 pateix modificacions postraduccionals de natura desconeguda ja que es detecta no només a la mida deduïda de 26 kDa sinó també a mides superiors.

7- LICC1 interacciona amb altres proteïnes formant complexos proteics d'alt pes molecular. Les diferents modificacions postraduccionals fan variar la capacitat de LICC1 de formar part d'aquests complexos.

8- LICC1 interacciona amb els microtúbuls *in vitro* i colocalitza amb la tubulina *in vivo*. L'aplicació de drogues antimitòtiques afecta la seva localització subcel·lular.

9- LICC1 interactua amb una polifenol oxidasa.

10- La localització subcel·lular de LICC1 és citoplasmàtica, però pot variar, depenent del tipus cel·lular transformat o de les condicions ambientals, i estar principalment colocalitzada amb els microtúbuls o amb els cossos lipídics.

11- La part de LICC1 responsable de la colocalització amb els microtúbuls és la que conté els dominis LisH i CTLH. La responsable de la colocalització amb els cossos lipídics és la que conté el domini CRA.

12- El fragment LC-YFP també es localitza als nuclis. Durant la mitosi mostra una distribució semblant a la del fus mitòtic.

13- LICC1 està present entre les proteïnes purificades a partir de cossos lipídics. També es troba una PPO.

14- En condicions d'estrès hídric la localització subcel·lular de LICC1, LC i CRA en plantes d'*Arabidopsis* passa d'associada amb microtúbuls a associada amb cossos lipídics.

15- En condicions d'estrès hídric l'acumulació de LICC1-YFP s'incrementa a les cèl·lules de guarda dels estomes.

16- Les plantes transformades *licc1-yfp* són més resistents a la deshidratació.

17- La sobreexpressió de LICC1 afecta el desenvolupament. Les cèl·lules BY2 de tabac que sobreexpressen LICC1 es divideixen més lentament que les dels controls no transformats. A les plantes d'*Arabidopsis* que sobreexpressen LICC1 la tija floral apareix més tard; a més, la llargada final de les tiges i la mida de les fulles és lleugerament superior en les transgèniques respecte el control.

18- LICC1 sembla participar en múltiples funcions que podrien estar relacionades amb els complexos GID/MRCTLH descrits a llevats i mamífers.

MATERIALS I MÈTODES

1- MATERIALS

1.1 Material Vegetal

En aquest treball s'han usat: *Zea mays L.* (Blat de moro de les varietats de W64 i B73), *Arabidopsis thaliana* (Columbia 0 (Col 0)) , *Nicotiana benthamiana L.* (tabac) i *Nicotiana tabacum L.* (tabac de la línia Bright Yellow 2 (BY2)). Totes elles han crescut en els hivernacles del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG).

1.2 Cultiu del material vegetal

1.2.1 Creixement en terra d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*Arabidopsis* s'han cultivat en testos en un barreja de 3:1:1 de turba (Plantaflor tipus 3), perlita i vermiculita amb una composició de la turba: N 180 mg/l, P₂O₅ 120 mg/l i K₂O 180 mg/l, pH 5.5-6.0.

En els diferents experiments es van sembrar llavors sense esterilitzar, es van cobrir amb plàstic transparent per mantenir un major grau d'humitat i es van mantenir a 4 °C a la foscor durant 2-3 dies per estratificar i sincronitzar la germinació. Un cop passat aquest període de temps es van portar a l'hivernacle.

Les condicions de cultiu a l'hivernacle van ser 22±2 °C de temperatura amb fotoperíode de 16 h llum i 8 h de foscor i una humitat del 50%-60%. Les plantes es van regar tres cops per setmana, segons l'experiment. La solució nutritiva usada per a la fertirrigació va ser una solució de Hoagland modificada per Johnson i col. (1957) amb la composició següent: KNO₃ 8.4 mM, NH₄NO₃ 1.2 mM, K₂HPO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 3.6 mM, Ca(NO₃)₂·H₂O 2.5 mM, MgSO₄·7H₂O 0.7 mM, FeSO₄·7H₂O 0.6 mM. Aquesta mateixa solució es va complementar amb un quelant de ferro Kelamix 35 mg/l i microelements 0.4 g/l (microelements: B, Cu, Mn, Fe, Mo, Zn).

1.2.2 Creixement in vitro d'*Arabidopsis thaliana*

Les llavors germinades en placa *in vitro* van requerir una esterilització prèvia per evitar la contaminació de fongs i bacteris. El mètode per l'esterilització va ser en medi líquid.

Protocol

- 1- En un eppendorf de 1.5 ml omplir de llavors fins tenir aprox. una capacitat de 50 µl de llavors.
- 2- Afegir 500 µl d'una barreja de EtOH 70% i Triton X-100 al 0.05%.
- 3- Agitació molt forta durant 5 min.
- 4- Treure el sobrenedant i afegir 500 µl d' EtOH 100%.
- 5- Agitació molt forta durant 5 min.
- 6- Repetir les etapes 4 i 5.
- 7- Treure el sobrenedant i deixar assecar a l'aire.

Les llavors germinades es van sembrar en plaques de petri que contenien el medi de cultiu MS/gelrite i l'antibiòtic adequat per cada cas. Per sincronitzar la germinació es van estratificar a 4 °C a la foscor durant tres dies. Un cop passat aquest període de temps es portaren a les cambres de germinació. Les condicions de la cambra de germinació van ser de 22 °C i fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor.

El medi de cultiu utilitzat va ser el MS (Duchefa, Holanda) a raó de 4.3 g/l, amb la següent composició: sals minerals (Murashige T i Skoog F, 1962), vitamines Gamborg B5 (Gamborg i col., 1968) i 0.5 g/l MES, amb o sense addició de sacarosa depenen de l'ús. El pH es va ajustar a 5.7 amb KOH. Per obtenir medi sòlid es van afegir 8 g/l de gelrite. El medi es va autoclavar durant 30 min a 120 °C i es va deixar refredar a 60 °C abans de l'addició dels antibiòtics.

1.2.3 Creixement en terra de blat de moro i tabac (*Nicotiana Benthiana*)

Les plantes de blat de moro, tant les varietats de W64 i B73, com les plantes de tabac i *N. Benthiana* es van cultivar amb turba de torberes altes de la següent composició: N 280 mg/l, P₂O₅ 320 mg/l, K₂O 360 mg/l, Mg 100 mg/l, S 180 mg/l, pH 5.5-6.5.

Les condicions de l'hivernacle per al blat de moro van ser d'una temperatura de dia de 24-28 °C i durant la nit de 22-24 °C amb una humitat del 50%-60%. En el cas de les plantes de tabac la temperatura de dia va ser de 23-26 °C i durant la nit de 21-22 °C amb una humitat del 50%-60%.

Algunes plantes de blat de moro van ser germinades en safata de manera que calia esterilitzar les llavors. Es va fer de la següent manera.

Protocol

- 1- En un got de precipitats deixar les llavors en EtOH 100% durant 5 min en agitació.
- 2- Treure el solvent i substituir-lo amb lleixiu al 5% durant 10 min en agitació.
- 3- Rentar amb H₂O milli-Q en agitació. Repetir l'operació tres cops.

Un cop esterilitzades les llavors es van disposar en una safata de vidre que contenia a l'interior una capa de 3-4 cm de vermiculita humida d'H₂O milli-Q. A sobre es van col·locar uns papers absorbents de tal manera que l'eix de les llavors estigués en contacte amb el paper

humit. Es van cobrir amb un film de plàstic fent uns petits forats i es van mantenir a la cambra de germinació en les mateixes condicions que l'hivernacle.

1.2.4 Control de creixement de les cèl·lules transformades BY2 en *Nicotiana benthamiana*

Les diferències de creixement de les cèl·lules BY2 es va estudiar en plaques en medi sòlid o líquid de BY2.

L'estudi en medi sòlid es realitzà pesant 0.5 g de cada call, BY2 sense transformar i transformat (construccions LICC1, LC, CRA) en una placa de medi BY2 sense antibiòtic. Un cop passat vint dies (període de canvi de medi) els diferents calls crescuts es van pesar.

1.3 Soques de material bacterià

E.coli DH5a: s'emprà per a la generació de la llibreria en el plasmidi pCRTMII-TOPO^R.

E.coli TOP 10 (Invitrogen Corp.): s'usà per a la replicació de plasmidis i elaboració de construccions. Utilitzat pels vectors pCRTMII-TOPO^R i pENTRY/DTM.

E.coli DB3.1 (Invitrogen Corp.): mutant de la DNA girasa. Es va utilitzar per a la replicació de plasmidis amb el gen letal *ccdB* en cassettes GatewayTM.

E.coli BL21: es va utilitzar per a l'expressió de les proteïnes amb el vector de clonatge pET28a.

A.tumefaciens GV2260: s'emprà per a la transformació estable d'*A.thaliana* i la transformació transitòria en *N. Benthamiana* amb el vector pCambia 1303.

A.tumefaciens LB4404: s'emprà per a la transformació estable en *N.tabacum* amb el vector pYL-YFP.

1.4 Plasmidis

pCRTMII-TOPO^R (Invitrogen): clonatge dels fragments generats per a la construcció de la llibreria com clonatge de productes de PCR mitjançant complementació per a T/A (Carbemicilina^R).

pUC1303: vector binari fusionat a la proteïna verda GFP, usat per al bombardeig en cèl·lules de ceba (Carbemicilina^R).

pCambia 1303: vector binari fusionat a la proteïna verda GFP usat per a la realització de la transformació estable via *Agrobacterium tumefaciens* de plantes *Arabidopsis thaliana* com transformació transitòria per agroinfiltració de plantes *Nicotiana benthamiana* (Kanamicina^R, Carbemicilina^R, Rifampicina^R).

pCambia 2303: vector binari usat per a la construcció del gen que codifica per la proteïna inhibidora del silenciament HC-Pro (Goytia i col. 2006). Usat per l'agroinfiltració (Kanamicina^R, Rifampicina^R).

pENTRY/DTM (Invitrogen): vector usat per clonar seqüències generades de construccions de fusió mitjançant tecnologia GatewayTM. Vector d'elaboració de clons de "donador" (Kanamicina^R).

pYL-YFP: vector de "destinació" a per la fusió de proteïnes a la proteïna fluorescent groga YFP mitjançant tecnologia GatewayTM. Vector binari d'expressió transitòria per agroinfiltració

en plantes de *N.benthamiana* i transformació estable en plantes d'*A.thaliana* i de calls BY2 *N.tabacum* (Carbamicilina^R, Rifampicina^R, Espectinomicina^R per bacteri de la soca GV2260; Rifampicina^R, Espectinomicina^R, Estreptomicina^R per bacteri de la soca LBA4404; Gentamicina^R per plantes).

pET28a (Promega): vector utilitzat per a la producció en *E.coli* de proteïnes de fusió amb un motiu 6xHis (Kanamicina^R).

1.5 Medis de cultiu i solucions generals

1.5.1 Medis bacterians

* LB (Luria-Bertani), (cultiu d' *E.coli*): triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar (medi sòlid) 15 g/l. Ajustar pH 7.5 amb NaOH. Autoclavar.

* SOB (recuperació d' *E.coli* després de transformar): triptona 20 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 0.48 g/l, agar (medi sòlid) 15 g/l. Autoclavar.

* YEB (cultiu d'*Agrobacterium*): extracte de carn 5 g/l, extracte de llevat 1 g/l, peptona 5 g/l, sacarosa 5 g/l, MgSO₄ 0.48 g/l, agar (medi sòlid) 15 g/l. Autoclavar.

*Solució d'inducció d'*Agrobacterium*: MgCl₂ 1 M, MES 1 M, ajustar pH 5.6 amb KOH, acetosiringona 0.2 M.

1.5.2 Medis per a plantes

* MS 0.5X (Murashige-Skoog), (cultiu de llavors i plàntules d'*Arabidopsis*): MS amb vitamines 4.4 g/l, MES 0.5 g/l. Ajustar pH 5.8 amb KOH. Afegir gelrite per medi sòlid 2 g/l, sacarosa (si procedeix) 50 g/l. Autoclavar.

* BY2 (cultiu per a calls de *N.tabacum*): 4.3 g/l MS macro i micro elements (Duchefa), 30 g/l sucre, 200 mg/l KH₂PO₄, 100 mg/l mio-inositol, 0.2 mg/l 2,4 D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic), 1 mg/ml tiamina. Ajustar pH 5.7 amb KOH. Autoclavar. Per medi sòlid afegir 2 g/l gelrite.

1.5.3 Solucions generals

* Acetat de sodi 3 M: 128 g/l AcONa. Ajustar pH 5.2 amb AcOH. Autoclavar.

* Tampó TE 1X: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 5 mM.

* Tampó TAE 50X: Tris-base 2 M pH 8, EDTA 0.1 M, AcOH 1 M. Ajustar pH 8.5 amb HCl.

* Tampó càrrega DNA 10X: glicerol 30%, blau bromofenol 0.25%, xilè de cianol FF 0.25%, EDTA 0.5 M.

* Tampó de càrrega de RNA 2X: glicerol 30%, blau bromofenol 0.25%, xilè de cianol FF 0.25%, EDTA 0.5%, formamida desionitzada 50%, formaldehid 37%, MEN 10X 10%, bromur d'etidi 1%, 200 µg.

* Solució SSC 20X: citrat trisòdic 0.3 M, NaCl 3 M. Ajustar pH 7 amb HCl. Autoclavar.

* Tampó càrrega proteïnes TM2X: Tris-HCl 0.10 M pH 6.8, glicerol 20%, SDS 4%, blau bromofenol 0.25%, β-mercaptoetanol 10%.

1.6 Antibiòtics, reactius i inhibidors de proteases

Els antibiòtics, reactius i inhibidors de proteases més comuns emprats en aquesta tesi foren:

Antibiòtic/ reactiu	Concentració	Inhibidor proteases	Concentració
Carbenicilina (C)	100 µg/ml	Aprotina (A)	10 µg/ml
Kanamicina (K)	25 µg /ml	Leupeptina (L)	0.5 µg/ml
Spectinomicina (Spect)	100 µg /ml	Pepstatina (P)	1 µg/ml
Estreptomicina (Sm)	300 µg/ml	E-64	1 µg/ml
Rifampicina (Rif)	100 µg /ml	PMSF	0.1 mM
Gentamicina (Gent)	50 µg /ml		
IPTG	23.8 µg/ml		
X-Gal	40 µg/ml		

1.7 Anticossos

Es van utilitzar els següents anticossos:

Policlonals

*Anti-GFP/YFP/CFP: obtingut en conill contra la proteïna verd fluorescent GFP i les seves variants mutades YFP/CFP. Acris Antibodies GmbH, R1091F.

*Anti-Rabbit-HRP obtingut en cabra contra conill, porta associada la peroxidasa del rave. Promega, W4011.

Monoclonals

*Anti-LICC1: obtingut a partir de la producció del pèptid en C-terminal MASSKKVVTRDEWEC en conill. Abyntek Biopharma S.L.

*Anti-PPO: obtingut a partir de conill aïllada de l'espècie *Spinacia oleracea*. Agrisera, AS10 1585.

*Anti-Gamma Tubulin DY647 (TU-30): anticòs monoclonal obtingut a partir de ratolí, incorporat el fluorocrom Dyomics 647. Acris Antibodies GmbH, AM03014D6-N.

1.8 Oligonucleòtids i sondes

Els oligonucleòtids i sondes emprades en aquesta tesi es mostren a continuació:

Generació de la llibreria d'embrió 10 DAP. Clonatge en pCRII-TOPO

SMART IV	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3'
CDS III/3'	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-(dT) ₃₀ N ₁ N-3'
5'PCR	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'
TOPO F	5'-GTC ACG ACG TTG TTA AAC GAC GGC-3'
TOPO R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G-3'

Elaboració de sondes Northern

MKA5fw	5'-ACT ATT AGA CAT ACC GGT ATA TAT-3'
MKA5rev	5'-CCG GCG ATA AGG GTT GCA TCT TGT-3'
TOPO F	5'-GTC ACG ACG TTG TTA AAC GAC GGC-3'
TOPO R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G-3'

RT-PCR quantitativa	
Ubiquitina fw	5'-TCG TTT AAG CTG CCG ATG TG-3'
Ubiquitina rev	5'-CAT ATG GAG AGA GGG CAC CAG-3'
MMH3fw	5'-GCG TGA ATT GAA AGT CCA GAG GAT GC-3'
MMH3rev	5'-GGA ACA AGG TCT TTC ATC TTG CTC GC-3'
Elaboració de sondes per hibridacions <i>in situ</i>	
TOPO F	5'-GTC ACG ACG TTG TTA AAC GAC GGC-3'
TOPO R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G-3'
Construcció de MiH1 i els seus dominis. Clonatge en pCRII-TOPO, pUC1303,pCambia1303	
MiH1LisH-CRA fw	5'-CTC CAT GGC GTC CTC GAA GAA GGT TG-3'
MiH1 LisH-CRA rev	5'-CAC AGC AAC TAG TTA TCG ATG GAT CTT C-3'
MiH1 LisH rev	5'-CTT CGC CAC TAG TGG CAA GTT CTT CTT G-3'
MiH1 CRA fw	5'-CAG AAA CCC ATG GAG TTG ATT CGC GTG G-3'
MiH1-D3	5'-GAC CTG GAT TCC ATC GAC TCT CC-3'
MiH1-R4	5'- GGT GCA TAC CCT CAG TTC CTT CAC-3'
Construcció de MiH1 per fusió de pEntry-pYL YFP mitjançant Gateway	
MiH1 gateway LisH-CRA fw	5'-CAC CAT GGC GTC CTC GAA GAA GG-3'
MiH1 gateway LisH-CRA rev	5'-TAT CGA TGG ATC TTC CAG CG-3'
MiH1 gateway LisH rev	5'-GGC AAG TTC TTC TTG AGC GA-3'
MiH1 gateway CRA fw	5'-CAC CAT GGA GTT GAT TCG CGT G-3'
Construcció en pET28a	
pET LisH-CRA BamHI fw	5'-CAC CAT GGG ATC CTC GAA GAA GG-3'
pET LisH-CRA SacI rev	5'-GGT CGG CGA GCT CAC CGT TTA TCG-3'
pET LisH SacI rev	5'-CCC TTG GCG AGC TCT TCT TGA GCG-3'
pET CRA BamHI fw	5'-CAC CAT GGG ATC CAT TCG CGT GGG-3'
Oligonucleòtids emprats per comprovar les construccions per a seqüenciació	
M13 fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTC-3'
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG-3'
AttB1 fw	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA-3'
AttB2 rev	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA-3'
T7	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'
SP6	5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'

2- MÈTODES GENERALS PER A ÀCIDS NUCLÈICS

2.1 Extracció d'àcids nucleics

2.1.1 Extracció de DNA genòmic de teixits vegetals

Prèviament a l'extracció, el teixit vegetal es va moldre en un morter amb N₂ líquid fins obtenir una pols fina. Es va emprar el kit "DNeasy Plant Mini" (Qiagen) per a l'extracció, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.2 Extracció ràpida de DNA genòmic

L'anàlisi per PCR (genotipat) en els casos en què la integritat del DNA genòmic no era un factor crític, es va seguir seguit el protocol adaptat per a l'extracció ràpida de DNA genòmic de planta descrit per Edwards i col. (Edwards K. *et al.* 1991).

Protocol

- 1- Agafar una petita mostra de material i col·locar-la en un eppendorf.
- 2- Afegir 400 µl de tampó d'extracció i triturar la mostra amb l'ajuda d'un èmbol estèril durant 15 s. Agitar amb vòrtex durant 5 s.
- 3- Centrifugar durant 1 min a 14000 rpm.
- 4- Transferir 300 µl del sobrenedant a un nou eppendorf i afegir 1 volum d'isopropanol i incubar durant 2 min.
- 5- Centrifugar durant 5 min a 14000 rpm.
- 6- Descartar el sobrenedant i deixar assecat el precipitat.
- 7- Resuspendre el precipitat en 50-100 µl d'H₂O. (2.5 µl són suficients per a l'anàlisi mitjançant PCR estàndard).

Tampó d'extracció ràpida de DNA: Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250mM, EDTA 25 mM pH 8.0, SDS 0.5% (w/v).

2.1.3 Extracció de DNA plasmídic

Es va emprar el kit "QIAprep spin miniprep" (QIAGEN) per a l'obtenció de DNA plasmídic seguint les instruccions del fabricant. Per a l'obtenció de DNA plasmídic d' *A.tumefaciens* es va partir de 4 ml de cultiu líquid.

Protocol

- 1- Transferir 1.5 ml de cultiu a un eppendorf de 1.5 ml i centrifugar durant 2 min a 13000 rpm.
- 2- Descartar el sobrenedant i repetir el pas anterior.
- 3- Resuspendre les cèl·lules amb 1 ml de tampó STE.
- 4- Centrifugar durant 1 min a 13000 rpm.
- 5- Recuperar el sobrenedant i afegir 0.7 volums d'isopropanol. Centrifugar durant 10 min a 13000 rpm.
- 6- Descartar el sobrenedant i afegir 300 µl d' EtOH 70% per rentar el precipitat.
- 7- Centrifugar duran 5 min a 13000 rpm i descartar de nou el sobrenedant.
- 8- Deixar assecat a temperatura ambient. Resuspendre en 50 µl d'H₂O milli-Q.

Tampó STE: Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM pH 8.

2.1.4 Extracció de RNA total

2.1.4.1 Amb Trizol^R

Es va utilitzar el reactiu Trizol^R d' Invitrogen per l'extracció de RNA total . Per evitar la degradació per RNAses fou necessari treballar amb guants i material estèril. Tot el material, els morters per picar les mostres i les espàtules es van tractar durant 2 h a 200 °C. La centrifugació es va fer a 4 °C.

Protocol

- 1- Picar el material amb un morter, prèviament congelat amb N₂ líquid. Anar afegint contínuament N₂ per evitar descongelació de la mostra.
- 2- Afegir Trizol (1 ml/150-200 mg del material picat), deixar incubant durant 5 min.
- 3- Afegir 200 µl de cloroform i agitar manualment durant 15 s.
- 4- Incubar durant 2-3 min a temperatura ambient.
- 5- Centrifugar durant 15 min a 12000 g a 4 °C.
- 6- Recollir la fase aquosa (part superior) i precipitar el RNA afegint 500 µl d'isopropanol.
- 7- Incubar durant 10 min a temperatura ambient.
- 8- Centrifugar durant 10 min a 12000 g a 4 °C.
- 9- Eliminar el sobrenedant i rentar el precipitat que conté el RNA amb EtOH 75%.
- 10- Barrejar amb un vòrtex i centrifugar durant 5 min a 7500 g a 4 °C.
- 11- Deixar assecar el precipitat, no totalment, dissoldre en 30 µl d' H₂O lliure de RNAsa. Per afavorir la solubilitat pot escalfar-se durant 5 min a 65 °C.

La concentració i qualitat del RNA obtingut es va determinar a partir de les mesures fetes en un nanodrop i en un gel d'agarosa.

2.1.4.2 Amb Fenol

Aquest mètode es va usar per tenir un RNA completament net per a la construcció d'una llibreria de cDNA.

Protocol

Durant tot el procés es treballa en gel.

- 1- Partir de 200 µl de RNA (dissolt en H₂O RNAsa free) i afegir 2 µl MgCl₂ 1 M, 2 µl DTT 0.1M, 1 µl DNAsa I RNAsa free.
- 2- Deixar incubar durant 15 min a 37 °C.
- 3- Afegir en una relació 1:1, fenol : cloroform/isoamfílic. Agitar amb el vòrtex i centrifugar durant 5 min a velocitat màxima a 4 °C.
- 4- Recollir la fase aquosa.
- 5- Repetir les etapes 3 i 4.
- 6- Recollir la fase aquosa. Afegir EtOH 100%, 0.1v de AcONa 3 M i agitar amb vòrtex.
- 7- Centrifugar durant 20 min a velocitat màxima a 4 °C.
- 8- Eliminar l'EtOH, rentar el precipitat amb EtOH 70%, agitar amb vòrtex i centrifugar durant 5 min a velocitat màxima a 4 °C.
- 9- Resuspendre amb H₂O RNAsa free.

2.1.5 Precipitació del DNA i RNA

Per purificar el DNA i RNA extret i alliberar-lo de contaminants i inhibidors es va precipitar de la següent manera.

Protocol

- 1- Afegir 0.1 V AcONa 3 M i 2-2.5 V EtOH 100%. Deixar durant 30 min a -20 °C.
- 2- Centrifugar durant 10 min a màxima velocitat.
- 3- Eliminar el sobrenedant i afegir EtOH 70% fred i agitar.
- 4- Centrifugar durant 5 min a màxima velocitat.
- 5- Eliminar el sobrenedant i deixar assecar a temperatura ambient.
- 6- Resuspendre amb H₂O lliure de RNases o TE 1X pH 8.

2.2 Modificacions del DNA

2.2.1 Digestions amb endonucleases de restricció

El DNA pot ser digerit en fragments de diferents mides per l'acció de les endonucleases de restricció. Aquests enzims reconeixen seqüències curtes de DNA i tallen la doble cadena en aquelles seqüències o llocs adjacents. Les condicions de la digestió varien segons l'enzim i la casa comercial que el subministra però com regla general es van seguir els següents passos:

- 1- La concentració del DNA havia d'estar entre 0.1-0.25 µg/µl.
- 2- El tampó de digestió segons el fabricant no podia ser superior al 1/10 del total.
- 3- La concentració d'enzim havia d'estar 2-3 U/µg amb un volum inferior al 1/10. (1U d'enzim de restricció és la quantitat necessària per digerir 1 µg de DNA durant 1 h).

2.2.2 Lligació de fragments de DNA amplificats per PCR

Els fragments de DNA amplificats per PCR es poden lligar a vectors prèviament linealitzats mitjançant endonucleases de restricció utilitzant ligases de DNA. Les concentracions de plasmidi i insert a lligar es van determinar segons les mides tant de l'insert com del vector utilitzant la fórmula:

$$\text{ng insert} = \text{ng vector} \times \text{mida insert (pb)} / \text{mida vector (pb)}$$

Protocol

- 1- Preparar un mescla de lligació en un volum final que contingui les quantitats de vector linealitzat i producte de PCR calculats.
- 2- Escalfar durant 5 min a 65 °C, refredar en gel i centrifugar durant 10 s a 13000 rpm.
- 3- Afegir 1 µl de tampó de ligasa T4 10X i 1 µl d'enzim ligasa T4 a 5 U/µl (ROCHE)
- 4- Mesclar i incubar des de 2 h fins a tota la nit a 16 °C.

Aquesta igualació determina la relació insert : vector de 1:1. Generalment, les reaccions de lligació necessiten una relació 3:1 (insert : vector) com ha estat el cas d'algunes lligacions produïdes en aquesta tesi pels clonatges en vector pUC1303 i pCambia 1303.

La polimerasa addiciona adenines extres en els extrems 3' del fragment amplificat a la majoria de reaccions de PCR, la qual cosa permeten el clonatge per aparellament T/A. Per al

clonatge de productes de PCR per aparellament T/A es va emprar el vector pCRII-TOPO (Invitrogen).

2.2.3 Addició d'adenines protuberants a extrems 3' de productes de PCR

L'ús de polimerases de DNA amb activitat *proofreading* (reparadora d'errors) és capaç d'eliminar dels productes de PCR les adenines sense aparellar que s'afegeixen a l'extrem 3' al final de la síntesi de les cadenes de DNA. Per solucionar-ho s'usen polimerases de DNA convencionals per addicionar aquestes adenines post-PCR.

Addicionar 0.25 U/reacció de Taq polimerasa a l'ependorf de reacció de PCR i escalfar durant 10 min a 72 °C.

2.2.4 Recombinació *in vitro*

La recombinació *in vitro* és una tècnica que serveix per transferir un fragment de DNA d'un plasmidi "donador" a un altre de "destinació". La manera de dur a terme la recombinació homòloga de dos regions flanquejant al DNA es basa en la transferència del plasmidi donador als seus respectius homòlegs al plasmidi de destinació. Per fer-ho es va emprar la tecnologia Gateway^R (Invitrogen) amb el kit "ClonasaTM" (Invitrogen), que conté una mescla dels enzims necessaris per la recombinació (excisionasa, recombinasa i integrasa).

Protocol

- 1- Afegir en un eppendorf de 1.5 ml, 150 ng de plasmidi donador i 300 ng de plasmidi de destinació.
- 2- Afegir TE 1X a 16 µl finals de volum.
- 3- Afegir 4 µl d'enzim ClonasaTM i deixar tota la nit a 25 °C.
- 4- Aturar la reacció amb 10 µl de proteïnasa K i incubar durant 10 min a 37 °C.
- 5- Transformar en *E.coli* i seleccionar amb l'antibiòtic del plasmidi de destinació.

2.3 Reaccions de PCR, RT-PCR quantitativa

2.3.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR és el mètode usat per a l'amplificació de fragments de DNA d'origen divers, ja sigui DNA genòmic, plasmidi o cDNA. S'usa una polimerasa de DNA depenen d'un motlle de DNA per copiar les dues cadenes una vegada per cycle de reacció, fent una ampliació exponencial del fragment específic desitjat. Les condicions de reacció són variables i depenen de la naturalesa del fragment a amplificar, així com la temperatura de dissociació dels oligonucleòtids/sondes utilitzats en cada reacció. Els paràmetres que s'ajusten en cada reacció són la temperatura i la concentració de l'ió Mg²⁺.

Les mescles i els reactius, generalment en un volum total de 50 µl, es detallen a continuació:

DNA	20-200 ng
Tampó PCR 10X	5 µl (sense Mg ²⁺)
MgCl ₂ 25 mM	2-4 mM
dNTPs 10 mM	4 µl
oligonucleòtid (fw) 25 µM	2 µl

oligonucleòtid (rev) 25 µM 2 µl
 Taq polimerasa 5 U/ µl 0.5 µl

Tampó de PCR: Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM.

Les condicions del termociclador en condicions generals són:

95 °C	10 min (activació polimerasa "hot-start")
30-40 cicles:	
94 °C	30 s
50 °C-70 °C	30 s – 45 s
72 °C	30 s – 1 min
72 °C	10 min

2.3.2 Purificació i clonació dels productes de PCR

La purificació dels productes de PCR es van fer seguint les especificacions del fabricant de dos kits diferents, tant a partir del producte sintetitzat directament com a partir de l'extracció en gels d'agarosa. Els kits emprats foren: QIAquick[®] PCR Purification (QIAGEN) com NucleoSpin[®]Extract II (Macherey-Nagel).

Per a la clonació dels productes de PCR es va utilitzar el kit de TOPO[®] TA Cloning[®] dual promotor (pCR[™]II-TOPO[®] vector) (Invitrogen), la soca emprada TOP10.

2.3.3 RT-PCR a temps real quantitativa (qPCR)

La qPCR es basa en la utilització de fluoròfors en la reacció de PCR que permeten monitoritzar l'ampliació del DNA a través de cicles a temps real, quantificar el producte de PCR generat i la concentració inicial del fragment a amplificar ja que la quantitat de fluorescència recollida en cada cicle d'amplificació és directament proporcional a la quantitat de producte de PCR sintetitzat.

El fluoròfor utilitzat en aquest treball ha estat la molècula intercalant de DNA SYBR-green I. S'uneix a la doble cadena de DNA (etapa d'extensió de la nova cadena en la PCR), fins a mil vegades més fluorescent que en solució.

Les condicions emprades per a la reacció van ser:

cDNA 100 ng, SensiMix (dU) 1X, solució SYBR Green 1X, oligonucleòtids fw i rev 300 mM cadascú, fins a un volum final de 18 µl.

Composició de SensiMix (dU): tampó de polimerasa DNA heat-activated, dNTPs, dUTP, 8 mM MgCl₂, estabilitzadors, referència interna.

Condicions del termociclador:

95 °C	10 min
45 cicles:	
95 °C	15 s
60 °C	30 s
76 °C	30 s

Les condicions de la corba de dissociació van ser: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s.

Les reaccions de qPCR es van dur a terme en l'aparell ABI 7300 (Applied Biosystems) i els productes generats s'analitzaren amb el software 7300 System software (Applied Biosystem). La quantificació es va fer per interpolació en una corba estàndard de regressió lineal dels valors C_t generats a partir de mostres de DNA de concentració coneguda. Aquells valors, amb absència d'amplificació es van considerar negatius.

Per quantificar el producte de PCR tant de manera absoluta com relativa es van construir corbes estàndard de DNA plasmidi construïdes a partir dels fragments diana dels sistemes de PCR a temps real clonats en el vector pCRII-TOPO. Es van preparar dilucions seriadades de concentració coneguda.

El mètode emprat en la quantificació relativa va ser:

- a- Corbes seriadades per al gen diana i gen normalitzador. Com a gen normalitzador es va triar la ubiquitina que es va emprar com a control intern.
- b- $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sempre i quan es comprovi prèviament que tant el gen diana com el normalitzador tenen igual eficiència d'amplificació (mateixa pendent de la corba estàndard).

2.4 Electroforesi d'àcids nucleics en gel d'agarosa

Els fragments de DNA se separen mitjançant electroforesi en gels d'agarosa. Depenent de les mides del DNA, s'usen diferents concentracions d'agarosa. Per regla general en aquesta tesi s'han emprat gels al 1% d'agarosa.

Protocol

- 1- Pesar la quantitat d'agarosa necessària i dissoldre-la en tampó TAE 1X escalfant en un microones.
- 2- Deixar refredar fins a 50 °C.
- 3- Afegir 0.5 µg/ml de bromur d'etidi i barrejar suaument. Deixar solidificar en el suport de motlle.
- 4- Mesclar les mostres de DNA amb un tampó de càrrega amb un volum final de 1X.
- 5- Aplicar un voltatge de 50-100 V a l'electroforesi. El temps depèn de com es vulguin tenir de separades les bandes de DNA.
- 6- Visualitzar i fotografiar sota llum ultraviolada (254 nm).

Tampó de càrrega 10X: blau de bromofenol 0.25%, cianol de xilè FF 0.25 %, glicerol 50%, EDTA 10 mM en TE 1X pH 8

TAE 50X: Tris base 2 M pH 8, AcOH 1 M, EDTA 0.1 M.

L'electroforesi del RNA està explicada en l'apartat 7.3 de transferència Northern

2.4.1 Quantificació de la concentració i puresa

La concentració dels àcids nucleics es van estimar mitjançant l'absorbància a llum UV de 260 nm de longitud d'ona utilitzant un espectrofotòmetre (Nanodrop, Thermo Scientific) . La puresa es determinà mitjançant valors de ràtio d'absorbància 260/280 nm, de forma que una mostra pura d'ADN te un ràtio 260/280 nm de 1.8 i en cas de RNA de 1.8-2. Valors inferiors indiquen la contaminació de mostra amb proteïnes.

2.5 Transformació bacteriana

2.5.1 Transformació d'*E.coli* per xoc tèrmic

En mètode emprat per transformar *E.coli* ha estat el xoc tèrmic.

Protocol

- 1- Afegir 100 ng de vector a un eppendorf de cel·lules competents de *E.coli* (DH5 α , TOP10 (Invitrogen)).
- 2- Incubar durant 30 min en gel.
- 3- Fer un xoc tèrmic incubant durant 30 s a 42 °C, transferir immediatament a gel.
- 4- Recuperar els bacteris incubant-los a 37 °C en medi SOB.
- 5- Plaquejar en un medi selectiu (LB Agar + antibiòtic corresponent) i incubar a 37 °C en posició invertida tota la nit.

2.5.2 Transformació d' *A.tumefaciens*

2.5.2.1 Preparació de cèl·lules competents per *A.tumefaciens*

La preparació de bacteris competents d' *A.tumefaciens* soca LBA4404 es va fer seguint el protocol descrit per An i col. (An *et al.* 1988).

Protocol

- 1- Fer un pre-cultiu en medi YEB (antibiòtics Rif^R, Sm^R) d' *A.tumefaciens* de la soca LBA4404, a partir d'una colònia aïllada crescuda en placa. Deixar créixer a 28 °C durant 48-72 h.
- 2- Inocular 2-3 ml del pre-cultiu en medi YEB (Rif, Sm). Deixar créixer a 28 °C fins que la OD₆₀₀ arribi a 0.5-0.7.
- 3- Incubar en gel durant 15-30 min.
- 4- Centrifugar durant 15 min a 4000 rpm i a 4 °C. Llençar el sobrenedant.
- 5- Resuspendre en 10 ml d'H₂O milli-Q estèril.
- 6- Centrifugar durant 15 min a 4000 rpm i a 4 °C. Llençar el sobrenedant.
- 7- Repetir les etapes 5 i 4 tres cops més.
- 8- Resuspendre el precipitat en 10 ml d'H₂O milli-Q estèril i glicerol 10%.
- 9- Centrifugar durant 15 min a 4000 rpm i a 4 °C.
- 10- Repetir els passos 8 i 9 dues vegades.
- 11- Resuspendre el precipitat en 300 μ l d'H₂O milli-Q estèril i 60 μ l de glicerol 10%.
- 12- Fer alíquotes, congelar-les en N₂ líquid i guardar-les a -80 °C.

2.5.2.2 Transformació d'*A.tumefaciens* per electroporació

El mètode emprat per transformar *A.tumefaciens* va ser l'electroporació. Aquesta tècnica es basa en obrir porus en la membrana del bacteri per a la introducció del vector desitjat mitjançant un pols de corrent elèctric.

Protocol

- 1- Rentar amb EtOH absolut les cubetes d'electroporació, deixar-les assecar totalment en la campana.
- 2- Descongelar en gel les cèl·lules electrocompetents.
- 3- Afegir 1 μ l de la dilució 1:10 de plàsmid i agitar suaument.
- 4- Deixar durant 5 min en gel.
- 5- Passar-ho a una cubeta d'electroporació.

- 6- Electroporar posant el voltatge a 1.8 kV i mirant que la cubeta entri bé. Fer un pols, mesurar el temps (milisegons) que ha durat l'electroporació.
- 7- Afegir 1 ml de medi YEB sense antibiòtics a la cubeta per recuperar el màxim volum que s'havia posat i es passa a un eppendorf. de 1.5 ml.
- 8- Incubar durant 1-2 h a 28 °C.
- 9- Plaquejar en plaques de medi YEB (Rif^R, C^R, antibiòtic de resistència al vector introduït). Deixar créixer durant 2-3 dies a 28 °C (es recomana tancar les plaques amb plàstic per evitar evaporacions i en posició invertida).

Medi YEB (1L): Extracte de bou 5 g, extracte de llevat 1 g, peptona 5 g, sacarosa 5 g, MgSO₄ 0.48 g, MgSO₄ (1) 2 mM 2 ml. Ajustar el pH a 7.2 amb NaOH. Si es vol en medi sòlid afegir 15 g/l d'agar. Autoclavar.

2.6 Seqüenciació de DNA

La seqüenciació de fragments de DNA purificats o clonats en vectors es va fer mitjançant el mètode de la terminació de síntesi de cadena utilitzant un seqüenciador capil·lar ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) i el kit Big Dye^R terminator v1.1 (Applied Biosystem).

Reacció de seqüenciació:

DNA clonat	200-500 ng/μl
fragment de PCR	3-40 ng/μl
Oligonucleòtid (10 μM)	1 μl
DMSO	1 μl
Big Dye	2 μl
Tampó Big Dye	2 μl
H ₂ O milli-Q	fins 10 μl

Condicions del termociclador:

96 °C	5 min
25 cicles:	
96 °C	30 s
50 °C	15 s
60 °C	4 min
4 °C	∞

3-MÈTODES GENERALS PER A L'ANÀLISI DE PROTEÏNES

3.1 Extracció de proteïna total

L'extracció de proteïnes totals tant de fulles de Blat de moro (B73), fulles d'*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* i calls BY2 es va dur a terme seguint el procediment que es detalla. Segons el teixit es va utilitzar un tampó de lisi diferent.

Protocol

- 1- Moldre el teixit en N₂ líquid.
- 2- Resuspendre en un volum, entre 200 µl – 1 ml, de tampó de lisi segons la concentració de proteïna que es desitgi complementat amb 1 mM PMSF, 1 mM DTT i 1 µl d'inhibidors de proteases (leupeptina, pepstatina, aprotinina, E-64).
- 3- Incubar durant 10 min en gel.
- 4- Centrifugar a 15000 rpm durant 15 min a 4 °C.
- 5- Recuperar el sobrenedant i clarificar-lo repetint el procés des del punt 4.
- 6- Conservar l'extracte a -20 °C.

Tampó de lisi per a fulla de blat de moro: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, EDTA 0.5 mM, NP-40 0.5%.
Tampó de lisi per a fulla d'*A. Thaliana*, *N. Benthamiana* i calls BY2: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 200 mM.

3.2 Quantificació d'extractes proteics

Per a la quantificació dels extractes proteics es va emprar el mètode descrit per Bradford (Bradford, 1976), basat en una reacció colorimètrica per la qual la unió d'un colorant, inicialment de color marró en una solució amb àcid fosfòric i metanol, fa un viratge a blau en unir-se a les proteïnes. El colorant ve preparat comercialment en el kit "Bio-Rad Protein Assay" (BIO-RAD). Per dur a terme la quantificació va seguir el protocol del fabricant.

Protocol

- 1- Realitzar la corba de calibratge diluint BSA a les concentracions 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 10 µg/ml.
- 2- En cubetes d'espectrofotometria de 1.5 mm afegir seqüencialment:
 - 800 µl H₂O
 - 1 µl de l'extracte, per duplicat
 - 200 µl del reactiu de Bradford a totes les cubetes
- 3- Barrejar per inversió i esperar durant 20 min a que comenci la reacció.
- 4- Llegir en l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm comparant el resultat de les mostres problema amb el blanc.
- 5- Es calcula la recta de regressió i s'extrapola la concentració de les mostres problema.

Les corbes patró de BSA generades van tenir el requisit d'alta linearitat ($r^2 > 0.98$).

3.3 Precipitació de proteïnes per TCA

Protocol

- 1- Afegir 1 volum de TCA 100% en 4 volums de mostra.
- 2- Incubar durant 10 min a 4 °C.
- 3- Centrifugar durant 5 min a 14000 rpm.

- 4- Treure el sobrenedant evitant el pellet. El pellet ha de ser blanquinós i esponjós.
- 5- Rentar el pellet amb 200 µl d'acetona freda (- 80°C).
- 6- Repetir les etapes 4-6 amb dos rentats d'acetona.
- 7- Deixar assecar el pellet durant 5-10 min a 95 °C, fins no olorar acetona.

3.4 Separació de proteïnes en gels de poliacrilamida desnaturalitzant (SDS-PAGE)

Les proteïnes es van separar en gels de poliacrilamida desnaturalitzats (SDS-PAGE) segons Laemmli, 1970, en equips d'electroforesi vertical Miniprotean III (BIO-RAD). La composició del gel de poliacrilamida usat al 12.5%, es detalla a continuació.

Gel Concentrador (3%) per 4 ml		Gel separador (12.5%) per 10 ml	
H ₂ O	2.25 ml	H ₂ O	3.13 ml
Tampó concentrador	1 ml	Tampó separador	2.5 ml
Acril:Bisacrilamida(30:0.8)	0.5 ml	Acril:Bisacrilamida(30:0.8)	3.75 ml
APS (15%, p/v)	40 µl	APS (1.5%, p/v)	40 µl
TEMED	6 µl	TEMED	5 µl

Tampó concentrador: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4% (p/v).

Tampó separador: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4% (p/v).

APS 15%: APS 15 g, H₂O 100 ml.

Preparació de la mostra

- 1- Afegir un volum del tampó de càrrega (TM2X) igual al volum de la mostra (volum màxim de càrrega és de 40 µl).
- 2- Seguidament afegir β-mercaptonetanol al 10% (v/v).
- 3- Desnaturalitzar les proteïnes abans de carregar durant 5 min a 100 °C.

Tampó TM2X: Tris-HCl 0.10 M pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, Blau de bromofenol 0.25%.

Condicions de l'electroforesi

Es va utilitzar un tampó d'electroforesi 1X, inicialment a 60 V durant 15 min per introduir les mostres en el gel concentrador i posteriorment a 100-120 V fins que el front del bromofenol arriba a l'extrem del gel.

Tampó d'electroforesi 1X: Tris-HCl 0.25 M pH 8.5, glicina 2 M, SDS 1%.

3.5 Tinció de proteïnes en gels SDS-PAGE amb blau de Coomassie

Un cop finalitzada l'electroforesi el gel es pot tenyir per observar les bandes de proteïnes. El límit de detecció és de 0.1-0.2 µg de proteïna. Cal tenir en consideració que un cop el gel està tenyit amb Coomassie ja no serveix per fer una transferència a membrana de nitrocel·lulosa.

Protocol

- 1- Col·locar el gel en un recipient i fixar les proteïnes amb la solució de blau de Coomassie R-250 al 0.05% en MeOH 50% i AcOH 10% durant 15 min.
- 2- Destenyir el gel fent rentats successius amb una solució de MeOH 30% i HOAc 10%. Canviar la solució quan es satura de color blau.
- 3- Repetir el procés tot el temps necessari fins contrastar les bandes amb el fons del gel.
- 4- Rentar amb H₂O dues vegades.

3.6 Tinció de proteïnes amb nitrat de plata

La tinció de proteïnes amb AgNO_3 presenta un límit de detecció inferior al de blau de Coomassie de forma que es pot detectar fins a un límit de 5-10 ng de proteïna. El protocol que es descriu permet poder fer l'anàlisi de les bandes per espectrometria de masses. Per obtenir una tinció nítida és molt important preparar totes les solucions en H_2O milli-Q.

Protocol

- 1- Fixar les proteïnes en una solució d'EtOH 40%, AcOH 10% durant 30 min.
- 2- Sensibilitzar el gel amb EtOH 30%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2% (w/v), AcONa 6.8% (w/v).
- 3- Fer tres rentats amb H_2O milli-Q durant 5 min.
- 4- Tinció amb AgNO_3 0.25% (w/v) durant 20 min.
- 5- Fer dos rentats amb H_2O milli-Q durant 5 min.
- 6- Revelar fins veure les bandes (pot ser des de segons fins a uns quants min) amb la solució de Na_2CO_3 2.5% (w/v), formaldehid 0.6% (v/v).
- 7- Detecció del revelat amb EDTA 1.46% (w/v) durant 10 min.
- 8- Rentar el gel dues vegades amb H_2O milli-Q durant 5 min.
- 9- Guardar el gel en H_2O milli-Q a 4 °C.

3.7 Transferència de proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF

La transferència de proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Hybond C-extra, Amersham) es realitzà mitjançant equips de transferència semi-seca (semy trans-blot, BIO-RAD) segons el protocol del fabricant:

Protocol

- 1- Equilibrar el gel, els papers Whatman i la membrana en tampó de transferència de proteïnes durant 10 min.
- 2- Muntar el "sandwich" de transferència amb el gel, la membrana i els papers Whatman segons les instruccions del fabricant.
- 3- Transferir durant 60 min a 10 V.
- 4- Hi ha l'alternativa de tenyir el gel amb blau de Coomassie i la membrana amb vermell Ponceau-S per comprovar la correcta transferència i quantitat de proteïnes a la membrana.

Tampó de transferència de proteïnes: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, MeOH 20% (v/v), SDS 10%. Ajustar el pH 9-9.4. Guardar a 4 °C.

3.8 Tinció de proteïnes en membranes amb vermell Ponceau-S

Protocol

- 1- Incubar la membrana en un solució de vermell Ponceau 0.1% en AcOH 1% durant 5 min.
- 2- Rentar i fixar les proteïnes a la membrana incubant amb una solució de MeOH 30% i AcOH 10% fins que el fons quedi blanc.
- 3- Un cop feta l'observació de les proteïnes, destenyir la membrana amb PBS.

3.9 Immunodetecció de proteïnes fixades a la membrana de nitrocel·lulosa amb anticossos específics

Un cop transferides les proteïnes a la membrana es va procedir a la immunodetecció amb anticossos específics. La dilució de l'anticòs a utilitzar va ser específica de cada anticòs.

Protocol

- 1- Rentar la membrana amb solució PBS 1X-T durant 5 min en agitació.
- 2- Incubar la membrana en solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient o a 4 °C durant tota la nit, en agitació.
- 3- Rentar amb PBS 1X-T durant 5 min a temperatura ambient, en agitació. Fer tres rentats.
- 4- Incubar amb el primer anticòs en solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient o tota la nit a 4 °C, en agitació.
- 5- Rentar amb PBS 1X-T durant 5 min a temperatura ambient, en agitació. Fer tres rentats.
- 6- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari (dilució 1:5000 a 1:20000) durant 1 h a temperatura ambient, en agitació.
- 7- Rentar amb PBS 1X-T durant 5 min a temperatura ambient, en agitació. Fer tres rentats.
- 8- Últim rentat amb PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient a 4 °C durant més temps, en agitació.
- 9- Revelar la membrana utilitzant el substrat quimioluminiscent del kit "SuperSignal West Femto" (Pierce, Rockford, IL, USA), seguint les indicacions del fabricant.
- 10- Exposar la membrana a un equip de quimioluminescència.

Solució PBS 1X: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14.4 g, KH₂PO₄ 2.4 g, ajustar a pH 7.4.

Solució PBS 1X-T: PBS 1X, 0.1% Tween.

Solució bloqueig: PBS 1X, llet en pols o BSA al 5%.

3.10 Seqüenciació de proteïnes

La proteïna d'interès s'aïllà retallant-la del gel un cop precipitada pel mètode de nitrat de plata i es col·locà en un eppendorf amb H₂O milli-Q de forma que fou seqüenciat per espectrometria de masses (MS) prèviament passades per cromatografia líquida (LC) en la Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de la Universitat de Barcelona.

Protocol

- 1- Netejar la banda amb NH₄HCO₃ 25 mM i ACN.
- 2- Reduir la proteïna a seqüenciar amb DTT durant 30 min a 56 °C.
- 3- Afegir Iodeacetamida 55 mM durant 30 min a 21 °C i fosc.
- 4- Digerir la proteïna amb tripsina (Promega) durant tota la nit a 37 °C.
- 5- La barreja de pèptids van ser extretes amb AcOH 10% i ACN, posteriorment liofilitzats.
- 6- Els pèptids liofilitzats van ser resuspendos amb AcOH 1% i injectats al cromatògraf líquid. La columna capil·lar emprada per a l'elució dels pèptids va ser una C18 de fase reversa (75 µm Ø i, 25 cm, nanoAcquity, 1.7 µm BEH column; Waters) amb un gradient de fase mòbil: inicialment l'elució va ser de 0 a 40% durant 20 min de la mescla ACN 100% i AcOH 0.1%, i posteriorment de 40% a 60% durant 5 min amb AcOH 0.1%. La velocitat de flux va ser de 250 ml/min.
- 7- Un cop eluïts els pèptids es van passar per l'espectròmetre de masses ionitzant prèviament la mostra amb electroesprai (PicoTip™ New Objective) a un voltatge de 2000 V.
- 8- Els pèptids sortits del masses van ser analitzats de manera que els cinc més abundants van ser seleccionats i fragmentats utilitzant CID (dissociació induïda per col·lisió) amb He com a gas.

L'anàlisi MS/MS proporciona un patró de fragments peptídics que es comparen en les bases de dades: SwissProt/TrEMBL plants i cRAP (repositiry of adventitious proteins) i Mascot. Aquests programes permeten la identificació de les proteïnes associades al patrons MS/MS obtinguts.

3.11 Producció en *E.coli* de proteïnes recombinants marcades amb l'epítot d'histidines

En aquest treball es van preparar en *E.coli* proteïnes de fusió a les que s'ha fusionat en C-terminal un epítot de 6xHis que permet la purificació per afinitat a columnes de níquel. Concretament es va usar el plasmidi pET28a.

Les proteïnes de fusió van ser produïdes amb la soca BL21 d' *E.coli*. El protocol general per a la purificació va ser adaptat per a cada una de les proteïnes obtingudes ajustant la concentració del IPTG i el temps per afavorir la solubilitat.

Protocol

- 1- Transformar les cèl·lules competents BL21 amb el plasmidi d'interès.
- 2- Inocular una única colònia transformada en 50 ml en medi LB sense antibiòtic i deixar créixer tota la nit a 37 °C i a 250 rpm.
- 3- Agafar 25 ml del precultiu i posar-lo en 500 ml de medi LB més K^R. Deixar créixer a 37 °C a 250 rpm fins una OD₆₀₀ =0.6-0.8.
- 4- Afegir IPTG 0.5 mM, incubar durant 5 h a 37 °C.
- 5- Centrifugar el cultiu durant 10 min a 8000 rpm i 4 °C.
- 6- Eliminar el sobrenedant i congelar el precipitat a -20 °C.
- 7- Descongelar les cèl·lules i resuspendre amb 25 ml de tampó d'unió 1X complementat amb els inhibidors de proteases més lisozima a una concentració final 1 mg/ml. Si és necessari usar el vòrtex.
- 8- A partir d'ara tot el procediment es realitza a 4 °C.
- 9- Deixar incubar la mostra durant 1 h en gel.
- 10- Afegir Triton X-100 0.1% i incubar durant 5 min en gel.
- 11- Sonicar mantenint la mostra en gel (temps: 30 s; amplitut: 30%; impuls on: 1 s; impuls off: 0.3 s) fer-ho tres cops.
- 12- Centrifugar durant 1 h a 8000 rpm i 4 °C.
- 13- Guardar per separat el sobrenedant i el precipitat i congelar a -20 °C. A partir d'ara es passa a purificar la proteïna per columna.

Preparació prèvia de la columna amb la reïna "Quelating Sepharose Fast-flow".

- 14- Omplir a la columna de separació amb 1 ml de la reïna i rentar-la amb 10 ml H₂O milli-Q.
- 15- Carregar la columna amb 10 ml de tampó de càrrega 1X. Deixar passar els 10 ml, recollir-los i tornar-los a passar per la columna. Si la columna es torna verda és significatiu de que està carregada.
- 16- Passar 10 ml de tampó d'unió 1X per eliminar l'excés de níquel de la columna.
- 17- Passar l'extracte proteic.
- 18- Rentar la columna amb tampó d'unió complementat amb imidazole 20 mM.
- 19- Eluir la proteïna recombinant unida a la columna amb tampó de rentat complementat amb imidazol a concentracions creixents (20 mM-1 M) en fraccions de 1 ml.
- 20- Determinar la concentració de proteïna mitjançant el mètode Bradford i complementat amb un gel de proteïnes tenyit amb Coomassie.

Tampó d'unió 1X: Imidazole 1 mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9

Tampó càrrega 8X: NiSO₄ 400 mM.

Tampó rentat 1: Imidazole 20 mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9

Tampó rentat 2: Imidazole 60 mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9

Tampó rentat 3: Imidazole 100 mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9

Tampó rentat x: Imidazole x mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9

3.12 Dialització de proteïnes

La dialització de les proteïnes és necessària per eliminar l'excés de sals o canviar el tampó que puguin contenir per a la realització de processos posteriors. La dialització es va fer en membranes de baix pes molecular deixant passar ions (sals) o molècules petites. Es van utilitzar solucions salines de diferents concentracions per evitar la precipitació de les proteïnes.

Protocol

- 1- Posar la solució de proteïna a una membrana de dialització, tancar pels extrems i deixar en suspensió amb agitació durant 2 h a 4 °C en 500 ml de la solució que es vol dialitzar amb una concentració alta de sals (per exemple NaCl 250 mM).
- 2- Canviar i afegir altres 500 ml de solució de dialització amb una concentració menor de sals (NaCl 100 mM), deixar en agitació durant 2 h a 4 °C.
- 3- Treure i posar 1000 ml de nova solució de dialització sense cap sal, deixar en agitació tota la nit a 4 °C.

3.13 Extracció de proteïnes de cossos lipídics

L'extracció d'aquestes proteïnes es va fer seguint els protocols de Jason *et al.* (1992) i Jay J. Thelen *et al.* (2006).

Protocol

- 1- Moldre el teixit en N₂ líquid.
- 2- Resuspendre, 15 g del teixit molt, en 35 ml de medi GMI fred.
- 3- Filtrar mitjançant dues capes de membrana Miracloth.
- 4- Afegir a la solució filtrada amb molta cura perquè quedi per sobre de GMI, 35 ml del medi FMI fred.
- 5- Centrifugar a 10000 g durant 30 min a 4 °C.
- 6- Recollir la part oliosa del sobrenedant i afegir 20 ml de medi GMII. Homogeneïtzar.
- 7- A Miracloth.
- 8- Centrifugar a 10000 g durant 30 min a 4 °C.
- 9- Recuperar el sobrenedant (fase oliosa) i afegir 15 ml del medi GMI, homogeneïtzar.
- 10- Afegir 15 ml de FMI per sobre de GMI i evitar que els medis s'ajuntin.
- 11- Centrifugar a 10000 g durant 30 min a 4 °C.
- 12- Repetir les etapes 9, 10 i 11.
- 13- Recuperar el sobrenedant i resuspendre en 2 ml de GMI. Conté els cossos lipídics purificats.

Per a l'obtenció de les proteïnes dels cossos lipídics es va seguir el protocol que es descriu a continuació.

- 1- Agafar la solució on hi ha els cossos lipídics purificats i resuspendre amb dietil eter, relació 1:2 (v/v). Barrejar.
- 2- Centrifugar a 13000 g durant 4 min a 4 °C.
- 3- Recuperar el sobrenedant (lípid neutres) i guardar.
- 4- Agafar la interfase i la fase aquosa i fer el mateix que les etapes 1,2 i 3.
- 5- Recuperar la interfase i la solució aquosa i posar-ho sota N₂ gas durant 1 h per evaporar tot el dietil eter.
- 6- Afegir 750 µl de cloroform/metanol (2:1, v/v). Barrejar.
- 7- Centrifugar a 13000 g durant 4 min a 4 °C.
- 8- Treure la interfase (proteïnes lipídiques) i la fase de cloroform (fosfolípids).
- 9- Tractar tres vegades la fase de cloroform amb H₂O/metanol 1:1. Centrifugar. Posar sota N₂ gas per evaporar el cloroform. Resuspendre en PBS 1x.

10- Tractar dues vegades la interfase amb 250 µl H₂O i 750 µl cloroform/metanol (2:1), es fa un vòrtex i es centrifuga a 13000 g durant 5 min. Deixar assecar bé i dissoldre les proteïnes en PBS 1x. Sonicar durant 5 min.

Medi GMI: EDTA 1 mM, KCL 10 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, sacarosa 0.6 M, tricina-KOH 0.15 M, pH 7.5.

Medi FMI: la mateixa composició que GMI però amb sacarosa 0.4 M.

Medi GMII: la mateixa composició que GMI però amb NaCl 2 M.

Medi FMII: la mateixa composició que FMI però amb NaCl 2 M.

4-MÈTODES DE TRANSFORMACIÓ VEGETAL

4.1 Transformació estable

4.1.1 Transformació de plantes per *Agrobacterium tumefaciens*.

Es van transformar plantes d'*Arabidopsis thaliana* de l'ecotip Col 0 mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*. El mètode emprat va ser el descrit per Clough y Bent (1998), basat en l'infiltració de flors en un estadi de preantesi (abans de l'autopolinització) amb un cultiu d'*A.tumefaciens*. Part de les llavors (T1) produïdes per les plantes transformades (T0) van incorporar el T-DNA transferit per *Agrobacterium* per avaluar la resistència a l'antibiòtic que porta el gen de selectiu del T-DNA. Posteriorment, es va deixar que les plantes de la generació T1 (heterozigotes) s'autopolinitzessin. Les plantes de la generació T2 homozigotes es van caracteritzar per la segregació de la resistència a l'antibiòtic en la generació T3. Així doncs, el cultiu i la segregació en medi selectiu de les plantes resistents a l'antibiòtic va permetre obtenir, després de dues o tres generacions, línies transgèniques estables i homozigotes pel transgen.

4.1.1.1 Preparació material vegetal

Protocol

- 1- Sembrar llavors d'*Arabidopsis* en testos recoberts amb una reixeta . Sembrar unes quantes llavors per test i deixar-les hivernar a 4 °C durant 2-3 dies.
- 2- Portar els testos a l' hivernacle i una setmana després de la germinació es deixar 8-10 plantes per test, (densitat bona per a un bon creixement).
- 3- En el moment que les plantes han desenvolupat inflorescències de 5-7 cm (aproximadament sis setmanes després de la sembra), tallar les inflorescències a nivell de la roseta.
- 4- Després dels 9-10 dies les plantes estan en un estadi òptim per transformar. Evitar les flors obertes i eliminar les sil·fques formades abans de la transformació.

4.1.1.2 Electroporació en *Agrobacterium tumefaciens*.

Protocol

- 1- Rentar amb EtOH absolut les cubetes d'electroporació. Deixar-les assecat totalment en la campana.
- 2- Descongelar en gel les cèl·lules electrocompetents.
- 3- Afegir 1 µl de la dilució 1:10 de plàsmidi i agitar suaument.
- 4- Deixar durant 5 min en gel.
- 5- Passar-ho a una cubeta d'electroporació.
- 6- Electroporar a un voltatge de 1.8 kV i mirant que la cubeta entri bé. Fer un pols, mesurar el temps (milisegons) que dura l'electroporació.
- 7- Afegir 1 ml de medi YEB sense antibiòtics a la cubeta per recuperar el màxim volum. Passar a un eppendorf de 1.5 ml.
- 8- Incubar durant 1-2 h a 28 °C.
- 9- Plaquejar en plaques de medi YEB més els antibiòtics adequats. Deixar créixer durant 2-3 dies a 28 °C (es recomana tapar les plaques amb plàstic per evitar evaporacions).

Medi YEB (1L): Extracte de bou 5 g, extracte de llevat 1 g, peptona 5 g, sacarosa 5 g, MgSO_{4(s)} 0.48 g, MgSO_{4 (l)} 2 mM 2 ml. Ajustar a pH 7.2 amb NaOH. Si es vol, en medi sòlid afegir 15 g/l d'agar. Autoclavar.

4.1.1.3 Transformació de les plantes

Protocol

- 1- Preparar medi YEB.
- 2- Fer una sembra prèvia a partir de les construccions glicerínades en medi LB sòlid més antibiòtics. Deixar créixer a 24 °C durant tota la nit.
- 3- Un cop crescudes les colònies correctament, fer un preinòcul de 2-3 ml en medi líquid LB més antibiòtics. Deixar créixer en agitació a 24 °C tota la nit.
- 4- Inocular 2 ml de la construcció en 400 ml de medi YEB més els antibiòtics adequats per la soca d' *Agrobacterium* portadora de la construcció a transformar en un erlenmeyer 1l. Deixar créixer en agitació a 28 °C tota la nit.
- 5- Transvasar en dos pots de plàstic 200 ml de medi a cadascun i equilibrar el pes. Centrifugar amb un rotor JLA 16250 a 3500 rpm durant 20 min a 20 °C.
- 6- Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat de cèl·lules amb 400 ml de sacarosa 5% (p/v).
- 7- Abans de transformar les plantes, afegir Silwet 0.01%. Silwet és un detergent que ajuda a que la transformació penetri millor a la planta.
- 8- Submergir les inflorescències de les plantes durant 5 min en el cultiu bacterià. Es convenient haver regat les plantes abans de la transformació ja que interessa que el substrat estigui saturat d'aigua i no absorbeixi el cultiu, evitant possibles contaminacions.
- 9- Deixar les plantes en posició horitzontal en una safata sobre un paper de filtre, tapar amb un plàstic i per sobre col·locar uns papers per evitar la llum directa.
- 10- Deixar la safata durant 2-4 dies a l'hivernacle de dia curt a 20-22 °C.
- 11- Retirar el plàstic. Posar les plantes en posició vertical i deixar créixer en condicions estàndards.

4.1.2 Transformació de calls BY2 per *Agrobacterium tumefaciens*

4.1.2.1 Suspensió cel·lular a partir de calls abans de la transformació

Protocol

Es treballà en un medi completament estèril. Sota campana de flux i material autoclavat o estèril.

- 1- Mantenir els calls en medi BY2 sòlid a la foscor i a 24 °C. Subcultivar cada 2-3 setmanes.
- 2- Agafar 2- 3 calls (una mida al voltant de 0.5 cm de diàmetre) i disgregar-los en un erlenmeyer de 250 ml amb 50 ml de medi BY2 líquid.
- 3- Incubar durant 1-2 setmanes a la foscor i a 130 rpm en agitació horitzontal a 24 °C.
- 4- Un cop passades dues setmanes observar el creixement de la massa cel·lular. Afegir 50 ml de medi BY2 líquid i incubar altres 1-2 setmanes en les mateixes condicions.
- 5- Observar la densitat cel·lular de la manera següent: Traspasar la suspensió a un falcon de 50 ml, deixar sedimentar durant 30 min i veure si el volum cel·lular és del 60-70% del total.
- 6- Subcultivar cada setmana agafant 2-4 ml de la suspensió cel·lular en 100 ml de medi BY2 líquid.

Medi BY2 líquid: 4.3 g/l medi MS amb macro i micro elements (Duchefa), 30 g/l sucre, 200 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l mio-inositol, 0.2 mg/l 2,4 D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic), 1 mg/ml tiamina. Ajustar a pH 5.7 amb KOH 1 M. Autoclavar.

Medi BY2 sòlid: és el medi BY2 líquid amb 2 g/l de Gelrite.

4.1.2.2 Transformació de calls

Protocol

La transformació es va fer amb la soca LBA4404 d' *A. tumefaciens*.

- 1- Tres dies després de subcultivar les cèl·lules BY2, traspasar el cultiu a un falcon de 50 ml i deixar sedimentar. El volum de cèl·lules ha de ser d' 1/3 del volum total.
- 2- Descartar la meitat de la suspensió i afegir a 4 ml del cultiu BY2, 100 µl d' *A. tumefaciens* (0.8 O.D. a 595 nm) en plaques de petri petites (5 cm de diàmetre). Barrejar amb cura. Fer dues vegades: un control (sense la construcció) i l'altre amb la construcció de vector binari d'interès.
- 3- Incubar durant dos dies a la foscor sense agitació a 24 °C.
- 4- Fer tres rentats de la següent manera: agafar totes les cèl·lules de les diferents plaques i posar en un falcon de 50 ml. Afegir medi líquid BY2 fins a 50 ml, centrifugar durant 10 min a 800 rpm sense fre, decantar eliminant el sobrenedant.
- 5- Fer l'últim rentat amb 50 ml de BY2 líquid i amb 100 µg/ml de timentina. Centrifugar durant 10 min a 800 rpm sense fre. Si el sobrenedant queda tèrbol deixar sedimentar durant 30 min. Decantar i afegir 10 ml de medi líquid BY2 amb 100 µg/ml de timentina.
- 6- Plaquejar 2 ml del cultiu en plaques amb medi BY2 sòlid contenint timentina i l'antibiòtic selectiu del vector binari. Segellar amb plàstic.
- 7- Incubar durant 3-4 setmanes a la foscor i a 24 °C fins a la formació de calls de 1-2 mm.
- 8- Si hi ha micro calls (mirant a la lupa), traspasar-los a noves plaques de medi BY2 sòlid amb timentina i l'antibiòtic selectiu. Segellar amb plàstic.
- 9- Deixar incubar durant dues setmanes a la foscor i a 24 °C. Repetir el procés tres cops. Cada vegada que es subcultiva cal mirar al microscopi confocal per seleccionar els calls transformats.
- 10- Després del tercer subcultiu les plaques de medi BY2 sòlid només contenen l'antibiòtic selectiu.
- 11- Anar subcultivant en períodes de 20 dies els calls en plaques de medi BY2 sòlid més l'antibiòtic selectiu. És important conservar els calls per a posteriors treballs.

4.1.2.3 Suspensió cel·lular a partir de calls un cop transformats

Les cèl·lules dels calls es troben agregades, fent difícil la seva observació al microscopi altrament, les cèl·lules a les suspensions estan més individualitzades o formant tires, una darrera de d'altra, fent la seva observació molt més efectiva.

Protocol

Es treballà en medi completament estèril, sota campana de flux i material autoclavat o estèril.

- 1- Un cop es tenen els calls ben establerts, agafar-ne 3-4 calls, posar-los en una placa de Petri i aixafar-los amb una espàtula fins formar una papilla.
- 2- Barrejar 25 ml de medi BY2 líquid i 12.5 µl de l'antibiòtic selectiu en un erlenmeyer de 100 ml afegir i anant afegint part de la papilla. Agitar manualment per ajudar a disgregar . Cal fer-ho en dos o tres erlenmeyers més per possibles contaminacions.
- 3- Deixar les suspensions durant una setmana en agitació horitzontal a 130 rpm, a la foscor i a 24 °C.

Tranvasar el medi a un falcon de 50 ml, deixar reposar durant 30 min. Si el sobrenedant és transparent-groguenc és un indicador del bon creixement, si el sobrenedant és fosc, cal llençar-lo perquè s'ha contaminat. També cal observar la compactació de les cèl·lules, un gran volum (12-15 ml) indica un bon creixement. Si hi ha poc volum, decantar mig volum del medi, posar-ne mig més de fresc i deixar una setmana més creixent en les mateixes condicions.

- 4- Si hi ha un gran volum de cèl·lules, diluir-les en dos erlenmeyers. En un erlenmeyer de 100 ml posar 20 ml de medi BY2 líquid, 12.5 µl de l'antibiòtic selectiu i 5 ml de la suspensió. En un erlenmeyer de 250 ml, posar fins a 50 ml de medi BY2 líquid, 25 µl de l'antibiòtic selectiu i la resta de la suspensió.
- 5- Mantenir les suspensions durant una setmana en agitació horitzontal a 130 rpm, a la foscor i a 24 °C.
- 6- Un cop establertes les suspensions mantenir-les cada setmana.

4.2 Transformació transitòria

L'expressió transitòria és l'expressió de proteïnes en un sistema biològic que no integra el transgèn en el seu genoma nuclear. De la mateixa manera, és un sistema que permet resoldre el problema del possible silenciament gènic cotransformant el transgèn emprat amb una proteïna vírica supressora del silenciament , HC-Pro (Goytia *et al.* 2006). Hi ha tres vies diferents per aconseguir una expressió transitòria: 1) per bombardeig de partícules cobertes del DNA, 2) infecció vírica de la planta (el virus està modificat genèticament amb la proteïna d'interès), 3) infecció bacteriana, el plasmidi que conté el transgen d'interès s'introdueix en *Agrobacterium tumefaciens* de forma que s'introduirà dins les cèl·lules vegetals per sistemes a pressió emprant una xeringa (Kapila *et al.* 1997). En aquesta tesi s'ha emprat aquest darrer mètode agroinfiltrant fulles de *Nicotiana benthamiana*.

Protocol

- 1- Aïllar colònies transformades d'*A. tumefaciens* en plaques contenint medi YEB amb antibiòtic selectiu.
- 2- Agafar una colònia i inocular un precultiu de 5 ml de medi YEB amb antibiòtics selectius per a la soca d'*A. tumefaciens* i plasmidi emprat en la construcció. Deixar créixer durant 24-48 h en agitació a 200 rpm i 28 °C.
- 3- Agafar 3 ml del precultiu i inocular en 30 ml de medi YEB amb els antibiòtics selectius. Deixar créixer durant tota la nit en agitació i a 28 °C.
- 4- Esperar fins a una OD_{600nm} de ≤ 1. Centrifugar durant 10 min a 3000 rpm i temperatura ambient.

- 5- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb tampó d'inducció durant 2 h o fins a una OD_{600nm} 1.5-2 a temperatura ambient.
- 6- Paral·lelament fer el mateix amb la construcció del cultiu d'*A. tumefaciens* de la proteïna inhibidora del silenciament HC-Pro.
- 7- Agroinfiltrar amb la relació 1:1 d' *A. tumefaciens* transformat de la construcció d'interès i d' *A. tumefaciens* portador de HC-Pro amb una xeringa de plàstic sense agulla presionant suament l'envers de les fulles. Segons la mida de les fulles es poden fer fins a quatre punxades per fulla. Abans d'agroinfiltrar es recomana regar les plantes de *N.benthamiana* (de 2-4 setmanes) per tenir els estomes oberts, ja que són les cèl·lules per on entren els líquids. Per a cada construcció que es faci es recomana canviar de xeringues i de guants.
- 8- Deixar les plantes agroinfiltrades a l'hivernacle durant 2-3 dies. Observar al microscopi l'expressió. En cas de no observar senyal deixar algun dia més.
- 9- Per fer les observacions al microscopi cal retallar les zones agroinfiltrades.

Tampó d'inducció (200 ml): 2 ml MgCl₂ 1M, 2 ml MES 1M (3.9 g MES en 20 ml H₂O), 200 µl acetosiringona 0.2 M, 196 ml H₂O. Ajustar a pH 5.7 amb KOH .

5- CONSTRUCCIÓ D'UNA GENOTECA DE cDNA

La construcció de la genoteca es va fer seguint el protocol "SMART™ cDNA Library Construction kit" (BD Biosciences). Per a la síntesi del cDNA es va usar la PCR de llarga distància (LD PCR) (Barnes 1994) per generar cDNA llargs. Partint de RNA i amb un encebador modificat (dT)(CDS III/3'PCR primer) va generar de la primera cadena de cDNA. En la part final de l'extrem 5' del mRNA es va disposar un encebador SMART IV que conté la seqüència (G). En la finalització de la retrotranscriptasa (RT) l'enzim transferasa terminal va afegir uns pocs nucleòtids, principalment desoxicitidina a l'extrem 3' del cDNA. L'encebador SMART IV, contenia la seqüència (G) híbrida amb desoxicitidina acabant l'extensió de la nova cadena. El resultat final del ss cDNA contenien la seqüència completa del mRNA amb la seqüència complementària de l'encebador SMART IV, el qual també contenia uns nucleòtids d'unió (adaptadors) per a les següents amplificacions de la LD PCR (Chenchik *et al.* 1998). Únicament els ss cDNA amb l'adaptador de SMART IV en l'extrem 5' van servir com a motllo per a l'amplificació de la PCR. Els cDNA incomplets, sense l'adaptador SMART IV, no es van amplificar. D'aquesta manera es va assolir una amplificació selectiva i tenir una llibreria de cDNA amb un percentatge de seqüències senceres.

En aquesta tesi les lligacions dels diferents amplicons es van fer en el vector pTOPO-TA II (Invitrogen).

5.1 Síntesi de la primera cadena de cDNA

Protocol

- 1- En un eppendorf afegir:
 - 1-3 µl de RNA (0.05-1 µg RNA total).
 - 1 µl encebador SMART IV
 - 1 µl encebador CDS III/3' PCR
 - X µl H₂O milliQ fins a 5 µl
- 2- Barrejar, fer un spin i incubar durant 2 min a 72 °C.
- 3- Refredar durant 2 min en gel.
- 4- Fer un spin i afegir:
 - 2 µl tampó 5X First-Strand
 - 1 µl DTT (20 mM)
 - 1 µl barreja de dNTP (10 mM)
 - 1 µl PowerScript transcriptasa reversa
- 5- Barrejar amb cura i fer un spin.
- 6- Incubar durant 1 h en un bany d'aigua a 42 °C. Posar 20 µl d'oli mineral per evitar evaporacions.
- 7- Refredar en gel per acabar la síntesi de la primera cadena.
- 8- Guardar a -20 °C.

5.2 Síntesi de la segona cadena de cDNA

Protocol

- 1- Preescalfar el termociclador a 95 °C.
 - 2- En un eppendorf per a PCR afegir:
 - 2 µl cDNA primera cadena
 - 80 µl H₂O milliQ
 - 10 µl tampó 10X Advantage 2 PCR
 - 2 µl barreja 50X dNTP
 - 2 µl encebador 5' PCR
 - 2 µl encebador CDS III/3' PCRç
 - 2 µl polimerasa 50X Advantage 2 polymerase Mix
 - 3- Barrejar i fer un spin. Afegir oli mineral.
 - 4- Col·locar l'eppendorf en el termociclador amb el programa:
 - 95 °C 1 min
 - 20 cicles:
 - 95 °C 15 s
 - 68 °C 6 min
 - 4 °C ∞
 - 5- Comprovar l'eficiència agafant 5 µl de mostra de la PCR i carregar-lo en un gel d'agarosa/bromur d'etidi del 1.1% . El ds cDNA s'haurien de veure fent un smear entre 0.1-4 kb.
- Guardar a -20 °C.

5.3 Digestió amb proteïnasa K

El tractament de la proteïnasa K inactiva l'activitat de la polimerasa DNA.

Protocol

- 1- En un eppendorf, barrejar 50 µl del ds cDNA amplificat (2-3 µg), sense oli mineral, amb 2 µl de proteïnasa K (20 µg/ µl), fer un spin.
- 2- Incubar durant 20 min a 45 °C.
- 3- Fer un spin i afegir 50 µl d'H₂O milliQ.
- 4- Afegir 100 µl de la barreja fenol:cloroform:alcohol isoamílic. Barrejar contínuament amb cura i per inversió durant 1-2 min.
- 5- Barrejar contínuament amb cura i per inversió durant 1-2 min.
- 6- Agafar la fase superior (l'aquosa) sense agafar l'interfase i passar-la a un nou eppendorf.
- 7- Afegir 100 µl de la barreja fenol:cloroform:alcohol isoamílic. Barrejar contínuament amb cura i per inversió durant 1-2 min.
- 8- Agafar la fase superior (l'aquosa) sense agafar la interfase i passar-la a un nou eppendorf.
- 9- Afegir:
 - 10 µl AcONa 3M
 - 1.3 µl glicogen 20 µg/µl
 - 260 µl EtOH 95 °C a temperatura ambient
- 10- Ràpidament centrifugar a 14000 rpm durant 20 min a temperatura ambient.
- 11- Agafar el sobrenedant i descartar.
- 12- Rentar el precipitat amb 100 µl EtOH 80%.
- 13- Deixar assecar fins l'evaporació de l'EtOH.
- 14- Resuspendre el precipitat amb H₂O (RNAsa free).

5.4 Lligació en TOPO-TA

Protocol

- 1- En un tub eppendorf afegir:
 - 0.5-4 µl PCR (cDNA total)
 - 1 µl solució salina
 - 1 µl vector TOPO® (pCR®II-TOPO®)
 - X µl H₂O fins a 6 µl
 - 2- Barrejar i incubar durant 25 min a temperatura ambient.
 - 3- Posar en gel.
 - 4- Afegir a un vial de cèl·lules competents DH5α 3 µl de la lligació. Barrejar amb cura donant petits cops, no pipetejar.
 - 5- Posar en gel durant 30 min.
 - 6- Fer la transformació per xoc tèrmic, posant el vial durant 30 s a 42 °C.
 - 7- Col·locar en gel durant 2 min.
 - 8- Afegir 250 µl de medi SOC.
 - 9- Agitar en horitzontal a 200 rpm durant 1 h a 37 °C.
 - 10- Plaquejar 20 µl de la transformació en plaques de LB més antibiòtic selectiu (carbenicilina), X-gal, IPTG.
 - 11- Incubar les plaques en posició invertida durant tota la nit a 37 °C.
 - 12- Seleccionar les colònies blanques per a l'anàlisi de la presència del DNA d'interès mitjançant la PCR i oligonucleòtids del vector flanquejants de l'insert.
- Medi LB (1l): 1% (w/v) bacto-triptona, 0.5% (w/v) extracte de llevat, 1% (w/v) NaCl. Ajustar a pH 7.5 amb NaOH. Si es vol en medi sòlid afegir 15 g/l d'agar. Autoclavar.
- Solució salina: 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂.

5.5 Amplificació dels inserts a partir dels bacteris

L'anàlisi de la presència i mida dels inserts per posterior elaboració de macromatrius es realitzà mitjançant la tècnica de la PCR sobre colònies bacterianes.

Mescla de la PCR:

Tampó 10X (Tris-HCl pH 8.4 amb KCL)

25 mM MgCl₂

10 mM dNTPs

10 mg/ml BSA

25 pmol/μl de cada oligonucleòtid (flanquejant l'insert)

0.5 μM Taq polimerasa

fins a 50 μl H₂O

A cada colònia bacteriana es va afegir aquesta mescla.

Condicions del termociclador:

95 °C 5 min

35 cicles:

94 °C 30 s

68 °C 45 s

72 °C 3 min 30 s

72 °C 5 min

4 °C ∞

Els resultats obtinguts van ser analitzats mitjançant un gel d'agarosa TAE al 1%. Aquells fragments superiors de 250 pb van ser escollits per a la seva seqüenciació.

6-TRANSFERÈNCIA NORTHERN

Amb aquesta tècnica es poden transferir fragments de mRNA des d'un gel d'electroforesi a una membrana de niló (Hybon-N, Amersham). La mobilització dels àcids nucleics des del gel fins a la membrana s'aconsegueix per capil·laritat, a través d'una pila de paper absorbent lleugerament compactada per pressió. La membrana és tractada per tal d'immobilitzar el RNA, de tal manera que aquesta representa una còpia exacta del patró de bandes present en el gel (Brown, 1993).

Els reactius com el material han d'estar lliures de RNAses per evitar que es degradi el RNA. Per tal, es va treballar amb guants durant tot el procés i amb material escalfant al forn a 200 °C.

6.1 Preparació de la sonda

6.1.1 Marcatge de la sonda per *Random Priming*

Aquest mètode, desenvolupat per Feinberg i Vogelstein (1983), permet l'obtenció de fragments de DNA marcats uniformement i amb una elevada activitat específica. El DNA es

desnaturalitza i s'incuba amb una barreja d'hexanucleòtids que contenen un gran nombre de seqüències. Aquests hexanucleòtids fan d'encebadors per a l'enzim Klenow polimerasa, el qual sintetitza la cadena complementària en presència d'un dels desoxinucleòtids marcat radioactivament.

El protocol descrit a continuació segueix el marcatge utilitzat per "Random Primer DNA Labeling kit" (Roche) amb algunes variacions introduïdes en aquest treball.

Protocol

- 1- Partir d'un DNA linealitzat de massa 75 ng, afegir H₂O fins obtenir un volum de 10 µl.
- 2- Desnaturalitzar el DNA durant 10 min mitjançant un bany d'aigua calenta a 95 °C.
- 3- Refredar en gel.
- 4- Afegir:
 - 3 µl dNTP stock mix (1 µl dATP, 1 µl dGTP, 1 µl dTTP).
 - 2 µl de la barreja d'hexanucleòtids 10x.
 - 1 µl enzim Klenow 2 U/µl.
 - 4 µl [α -³²P]dCTP 50 µCi.
- 5- Centrifugar 30 s'482 i incubar durant 1 h a 37 °C.
- 6- Donar un cop de centrifuga
- 7- Parar la reacció afegint 2 µl EDTA 0.2 M.
- 8- Afegir 21 µl TE.
- 9- Guardar 1 µl de la sonda marcada per mesurar la radioactivitat incorporada en un comptador de centelleig abans de la purificació.

6.1.2 Purificació de la sonda marcada

Es va purificar la sonda eliminant els desoxibonucleòtids trifosfats no incorporats mitjançant columnes de la casa comercial "ProbeQuant™ G-50 MicroColumns" (Amershan Biosciences).

Protocol

- 1- Fer un pretractament a la columna: barrejar la reïna, destapar una mica el tap i centrifugar a 3000 rpm durant 1 min.
- 2- Passar la mostra per la columna.
- 3- Centrifugar a 3000 rpm durant 2 min.
- 4- Llençar la columna de color rosa (indicatiu que ha passat correctament la mostra).
- 5- Guardar 1 µl de la sonda marcada per mesurar la radioactivitat incorporada en un comptador de centelleig després de la purificació.
- 6- Guardar la sonda.

Per saber el percentatge de marcatge incorporat a la sonda cal mesurar-la en un comptador de centelleig seguint la relació: radioactivitat mesurada després de la purificació / radioactivitat mesurada abans de la purificació. Si el percentatge és de 30 % o superior es pot dir que hi hagut un bon marcatge.

6.2 Preparació de la mostra de RNA

La massa de les mostres poden estar entre 10-15 µg, una concentració suficient per detectar els mRNAs mitjanament abundants. Segons la concentració d'algunes mostres, si estan prou concentrades, es dilueixen amb H₂O fins aconseguir la concentració desitjada. Un cop totes les mostres tenen la mateixa concentració es dissolen amb el tampó de càrrega.

Protocol

- 1- Afegir els diferents reactius del tampó de càrrega: 10 µl RNA, 4 µl tampó MEN 10X, 6.6 µl formaldehid 37%, 20 µl formamida desionitzada, 0.5 µl de bromur d'etidi 0.1 µg/ml.
- 2- Desnaturalitzar la mostra durant 15 min a 55 °C.
- 3- Afegir 4 µl de tampó de càrrega.
- 4- Guardar a - 20°C.

Tampó MEN 10X: MOPS 200 mM, AcONa 50 mM, EDTA 10 mM. Ajustar a pH 7 amb NaOH, autoclavar. Emmagatzemar a 4 °C. Tampó de càrrega: glicerol 30%, blau de bromofenol 0.25%, xilè de cianol FF 0.25%, EDTA 0.5 M.

6.3 Electroforesi i transferència del RNA

Protocol

Es va treballar sota campana ja que el formaldehid és molt tòxic.

- 1- Preparar el gel barrejant 2 g d'agarosa en 170 ml H₂O.
- 2- Deixar atemperar a 55 °C.
- 3- Afegir: 1 µl de bromur d'etidi, 20 ml tampó MEN 10x a temperatura ambient, 11 ml formaldehid 37%.
- 4- Deixar polimeritzar.
- 5- Col·locar el gel en una cuveta d'electroforesi i submergir-lo amb MEN 1x. Ha de quedar cobert uns 1-2 mm.
- 6- Carregar la mostra.
- 7- Com tampó d'electroforesi usar MEN 1x. Mantenir l'electroforesi a 75 V/cm fins que el bromofenol hagi migrat un 80% de la longitud del gel.
- 8- Parar l'electroforesi i fotografiar el gel.
- 9- Es procedeix a la transferència del RNA per capil·laritat ascendent mitjançant un corrent de sals de la següent manera:

Protocol

- 1- Col·locar una placa de vidre sobre una safata que contingui la solució de transferència SSC 20x.
- 2- Estendre sobre la placa una tira de paper Whatman 3 MM. La tira ha d'estar tota l'estona en contacte amb la solució de transferència. És molt important que no hi hagi bombolles ni arrugues entre el gel i la resta de les capes.
- 3- Col·locar el gel sobre el paper Whatman 3MM eliminant les bombolles d'aire. Per evitar evaporacions i possibles contactes amb la resta de papers Whatman 3 MM que hagin en el muntatge es col·loca un film de plàstic cobrint la primera capa de paper i la safata.
- 4- Mullar la membrana de niló, a la mida del gel, primer amb aigua destil·lada i després amb la solució de transferència. Posar-la sobre el gel, també vigilat que no quedin bombolles.
- 5- Posar tres papers Whatman 3MM de la mida del gel, mullat amb la solució de transferència, sobre la membrana.
- 6- Posar papers absorbents de 5-10 cm sobre els papers Whatman 3MM.

- 7- Una placa de vidre i pes de 0.5-1 kg.
- 8- Deixar la transferència unes 12 h.

Solució de transferència SSC: citrat trisòdic 2H₂O 0.3 M, NaCl 3 M. Ajustar a pH 7 amb HCl i autoclavar.

6.4 Prehibridacions i hibridacions

Els volums de les prehibridacions i hibridacions depenen de la mida de la membrana. En aquesta tesi les hibridacions es realitzaren amb un volum de 150-300 µl/cm² i per les prehibridacions un 50% més. Totes les manipulacions es van fer en tubs de vidre i estufes rotatòries.

Protocol

- 1- Preparar les solucions de prehibridació i hibridació afegint DNA d'esperma de salmó 0.25 mg/ml previament sonicat i desnaturalitzat durant 5 min a 95 °C.
- 2- Posar els filtres en el tub.
- 3- Mullar els filtres amb Na₂HPO₄ 0.25 M. Llençar la solució.
- 4- Prehibridar uns 30-45 min amb solució de prehibridació/hibridació.
- 5- Desnaturalitzar la sonda 5 min a 100 °C i afegir-la al tub.
- 6- Deixar hibridar la sonda a 65 °C durant un mínim de 5 h i un màxim de 16 h.
- 7- Treure la sonda i guardar-la en la nevera en un tub Falcon.
- 8- Fer rentats de les solucions següents:
 - SSC 2x/SDS 0.1%, dos rentats de 30 min 65 °C.
 - SSC 0.5x/SDS 0.1%, dos rentats de 30 min 65 °C.
 - SSC 0.1x/SDS 0.1%, dos rentats de 30 min 65 °C.
 - SSC 0.05%/SDS 0.1% dos rentats de 30 min 65 °C.
 - Pirofosfat 0.1%, un rentat de 5 min 65 °C.

El nombre de rentats depèn de les condicions d'astringència necessàries.

- 9- Deixar assecar els filtres a l'aire fins que no estiguin mullats. Es protegeixen amb un plàstic segellant-lo. Passar un Geiger per veure si mesura radioactivitat. Segons la mesura, ens podem fer la idea de la quantitat de sonda hibridada en la membrana.
- 10- Revelar la imatge en PhosphorImager de Kodack.

Solució de prehibridació/hibridació: Na₂HPO₄ 0.25 M, SDS 7%, EDTA 1 mM pH 8.0.

6.5 Deshibridacions de membranes

Les membranes que han estat hibridades poden ser reutilitzades per hibridar-les amb una altra sonda. Prèviament la membrana ha de ser deshibridada. No és convenient reutilitzar-la més de 3-4 vegades.

Protocol

- 1- Bullir la membrana amb H₂O durant 10 min.

7- HIBRIDACIONS *IN SITU*

La hibridació *in situ* és una tècnica que detecta seqüències d'àcids nucleics en cèl·lules, cromosomes o teixits preservats. La detecció *in situ* dona una visualització directa de la localització de seqüències específiques, punt crucial per dilucidar l'organització i funció gènica. A continuació es descriu el protocol de la tècnica.

7.1 Preparació del teixit

7.1.1 Fixació del teixit

La fixació de les mostres evita la degradació del teixit ja que atura ràpidament l'activitat enzimàtica i l'aparició d'artefactes per difusió de pèptids i proteïnes dins i fora de les cèl·lules. Per últim, també enforteix el teixit envers els efectes de les posteriors manipulacions.

El material biològic emprat ha estat el més fresc possible i, per tal de facilitar la penetració del fixador, les dimensions de la mostra no van ser molt grans (Langdale, 1994). Es realitzà en recipients de vidre de 10 ml.

Protocol

- 1- Submergir el teixit en solució fixadora (EtOH/formaldehid/AcOH glacial, 80:3.5:5.5) durant 1 h a temperatura ambient. Si el teixit flota, fer el buit per tal de facilitar la penetració de la solució.
- 2- Canviar la solució per solució fixadora fresca i mantenir durant una setmana a 4 °C.
- 3- Decantar la solució fixadora i submergir durant 1 h en EtOH 70%.
- 4- Canviar per EtOH 70% fresc i guardar a 4 °C. D'aquesta manera les mostres es poden mantenir indefinidament, vigilants que no s'assequin.

7.1.2 Inclusió

La inclusió consisteix en la substitució de tota l'aigua que contenen les mostres per una matriu inert.

Es va utilitzar parafina en recipients de vidre de 10 ml.

Protocol

- 1- Canviar l'EtOH 70% en què es troben les mostres per una nova solució d'EtOH 70% i mantenir-les durant 1 h a temperatura ambient.
- 2- Deshidratar les mostres en sèries de 30 min a 1 h en cada solució i a temperatura ambient, mitjançant la seqüència: EtOH 80%, Fast Green 0.5% en EtOH 90%, 2 x (EtOH 100%), EtOH 100%/ Histo Clear (75%: 25%), EtOH 100%/Histo Clear (50%:50%), 2 x (Histo Clear 100%).

El Fast Green s'utilitza per tenyir les mostres i fer-les visibles. La tinció del teixit es pot fer durant la incubació en EtOH 90%, però es pot dur a terme en qualsevol dels passos amb EtOH. Es recomana fer-ho durant els primers EtOHs per tal de poder tornar a tenyir si no queda bé el primer cop.

- 3- Canviar la solució d'Histo Clear i afegir el mateix volum amb perles de parafina. Deixar la barreja a 60 °C fins que es fongui la parafina, barrejar fins tenir una barreja homogènia i deixar-ho durant 12 h a 60 °C.
- 4- Canviar la barreja per parafina fosa. Agitar i mantenir-la durant 12 h a 60 °C.
- 5- Canviar la barreja per parafina fosa. Agitar i mantenir-la durant 2 h a 60 °C.
- 6- Agitar per facilitar que les mostres es desenganxin del fons del recipient i traspasar les mostres a una placa de Petri per separar-les i orientar-les amb l'ajut d'unes pinces.

- 7- Deixar solidificar la parafina.
- 8- Guardar a 4 °C.

7.1.3 Preparació dels blocs de parafina

Per tal de tallar les mostres, aquestes es van disposar sobre un suport de parafina de dimensions adients per ser col·locades al micròtom.

Protocol

- 1- Col·locar la mostra en el suport de plàstic i en la posició desitjada de manera que, a poc a poc es va afegint parafina calenta fins formar el bloc. Deixar refredar per solidificar el bloc.
- 2- Extreure l'excés de parafina amb l'ajuda d'un bisturí i donar forma de trapezi al bloc de parafina de tal manera que la cara petita serà per on començarà a seccionar amb el micròtom.
- 3- Assegurar que la cara que ha d'entrar en contacte amb la ganiveta del micròtom està ben llisa.

7.1.4 Preparació de les seccions

Tots els talls es van fer de 8 µm. El bloc de parafina es va col·locar al micròtom en l'orientació desitjada i les tires de parafina que es van anar formant es van posar als portaobjectes tractats amb poli-D-lisina.

Protocol

- 1- Orientar el bloc en el micròtom i seccionar la mostra en una mida de 8 µm.
- 2- Col·locar les tires de parafina que es van formant en una placa termostàtica de 42 °C plena d'aigua, d'aquesta manera s'aconsegueix que els talls estiguin estirats. És important mantenir l'orientació dels talls que es fan al micròtom ja que la cara que es veu és hidrofòbica i la cara posterior és hidrofílica. Si la cara hidrofílica està en contacte amb l'aigua permet que el teixit s'estiri. Si es fa a l'inrevés, en posar la cara hidrofòbica en contacte amb l'aigua s'observa com s'arruga tot el teixit.
- 3- Amb l'ajuda de pinces o agulles, es van col·locant els diferents talls de manera ordenada en els portaobjectes.
- 4- Deixar els portaobjectes sobre un placa a 42 °C durant tota la nit per assecar completament les mostres.
- 5- Guardar les seccions amb sílica gel en un lloc sec i tapat de la pols. Tot i que les mostres es poden conservar setmanes, no es convenient fer-ho durant molt de temps perquè, es podrien dependre en els tractaments posteriors.

7.2 Síntesi de la sonda

7.2.1 Marcatge de la sonda

L'hibridació *in situ* presentada en aquesta tesi va ser realitzada mitjançant la utilització de sondes no radioactives marcades amb digoxigenina seguint el protocol "DIG RNA labeling kit (SP6/T7)" (Roche).

El mètode es basa en la incorporació d'un nucleòtid modificat, en comptes de timines (dTTP) utilitza uracil (dUTP) el qual te ancorada la digoxigenina, de manera que tots els fragments de PCR tindran una molècula de digoxigenina associada als uracils.

EL fragment de DNA que s'ha de transcriure incorporant digoxigenina no pot ser més gran de 500 pb, ja que un insert massa gran té dificultats per hibridar i un insert massa petit pot donar problemes d'inespecificitat. Les sondes tenen mides entre 300 i 400 pb.

Les sondes provenen de fragments de PCRs específics de cDNAs clonats en el vector pPCRII-Topo flanquejant els promotors T7 i SP6, posterior precipitació amb NaOAc.

Protocol

- 1- Afegir en dos tubs independents de centrífuga els següents reactius:
 - 13 µl DNA de la PCR
 - 2 µl 10x NTP labelling mixture
 - 2 µl 10x tampó de transcripció
 - 1 µl inhibidor de RNase
- 2 µl (40 U) DNA dependent de RNA polimerasa T7 en un tub i 2 µl (40 U) de DNA dependent RNA polimerasa SP6 en l'altre tub dependent de l'orientació del cDNA.

La sonda *sense* s'usa per la posició 5' del promotor de la seqüència que es vol transcriure i la sonda *antisense* s'usa per la posició 3'. La sonda *antisense* detectarà transcripts i la sonda *sense* s'usa com a control d'hibridació no específica.

- 2- Incubar a 37 °C durant 1 h.
- 3- Afegir 2 µl (20 U) de RNase lliure de DNase I i incubar durant 15 min a 37 °C.
- 4- Afegir 2 µl de EDTA 0.2 M (pH 8.0). D'aquesta manera s'atura la reacció.
- 5- Afegir 1 µl de tRNA 10 µg/µl, 37.5 µl de AcONH₄ 5 M, 24 µl H₂O, 220 µl EtOH 100% fred (-20 °C).
- 6- Mantenir la mescla durant 30 min a -80 °C. D'aquesta manera precipita més fàcilment.
- 7- Centrifugar a 13000 rpm durant 10 min.
- 8- Treure el sobrenedant i rentar amb EtOH 70% fred.
- 9- Centrifugar a 13000 rpm durant 10 min.
- 10- Treure el sobrenedant, deixar assecar.
- 11- Resuspendre en 10 µl d'H₂O. Guardar a -20 °C.

7.2.2 Anàlisi de la sonda marcada. Dot-blot

El Dot-blot és una tècnica emprada per esbrinar l'eficiència de la sonda marcada. Per dur-lo a terme es fan diferents dilucions de les sondes *sense* i *antisense* de manera que, posteriorment es col·loca una gota de la sonda en una membrana de niló i es detecta amb anti-digoxigenina.

Protocol

- 1- A partir d'1 µl de sonda fer les següents dilucions: 1/25, 1/250 i 1/2500 en H₂O.
- 2- En una membrana de niló fer un *spot* d'1 µl de cada dilució de la sonda, fer un cross-link amb llum UV. durant 5 min.
- 3- Humitejar la membrana amb tampó TBS. Fer el mateix tractament amb una tira control "DIG-labelled test trip".
- 4- Incubar durant 30 min amb una agitació suau contenint tampó TBS i 0.5% (w/v) de reactiu de bloqueig, (BSA). El reactiu de bloqueig, BSA s'ha de preparar al moment, dissolent-se a 60 °C durant 30 min; la solució queda tèrbola.
- 5- Rentar amb tampó TBS.
- 6- Centrifugar l'anti DIG-AP durant 2 min a 13000 rpm abans del seu ús.

- 7- Incubar durant 15 min i amb una agitació suau 9 ml de tampó TBS contenint 1 µl d'anti-digoxigenina-fosfat alcalin conjugat (Roche).
- 8- Rentar durant 15 min amb tampó de detecció 1.
- 9- Incubar en 10 ml de tampó de detecció 1 contenint 200 µl de solució NBT/BCIP (Roche).
- 10- Detectar el senyal en pocs minuts. Tot just es veu senyal en l'*spot* de menor concentració de la tira control es para l'agitació.
- 11- Rentar la membrana amb tampó TBS.
- 12- La dilució de treball de la sonda ha de ser la més diluïda possible comparant-la amb la tira control.

Tampó TBS: NaCl 400 mM, Tris-HCl pH 7.5 100 mM

Tampó detecció 1: NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 9.5 100 mM

7.3 Tractaments de la mostra

7.3.1 Prehibridacions

Cal fer una prehibridació dels teixits per facilitar la penetració del RNA. Depenent del tipus de teixit cal variar els tractaments de desproteïnitació i calibrar-los en el temps.

Protocol

- 1- Incubar els portaobjectes durant 2 min seguint la sèrie:
 - Histo-Clear II
 - Histo-Clear II
 - 100% EtOH
 - 100% EtOH
 - 95% EtOH (v/v en H₂O destil·lada)
 - 80% EtOH
 - 70% EtOH
 - 50% EtOH
 - 30% EtOH
 - H₂O destil·lada
 - H₂O destil·lada
- 2- Incubar amb HCl 0.2 M durant 20 min.
- 3- Rentar amb H₂O destil·lada durant 5 min.
- 4- Incubar dues vegades seguides amb tampó SSC durant 5 min.
- 5- Rentar amb H₂O destil·lada durant 5 min.
- 6- Incubar amb proteïnasa-K. Segons el teixit s'han fet incubacions de 45 s a 750 W de potencia en el microones a una concentració de proteïnasa-K de 1 µg/ml, augmentant la concentració de la proteïnasa-K a 10 µg/ml o en condicions estàndards de 30 min a 37 °C i 1 µg/ml de concentració.
- 7- Rentar amb una mescla de glicina 2 mg/ml en tampó PBS durant 2 min.
- 8- Rentar amb tampó PBS durant 2 min.
- 9- Incubar amb una mescla de formaldehid 4% (v/v) en tampó PBS durant 10 min
- 10- Rentar dues vegades amb tampó PBS durant 5 min.
- 11- Fer incubacions de 2 min la sèrie:
 - H₂O destil·lada.
 - 50% EtOH.
 - 70% EtOH.
 - 95% EtOH.
 - 100% EtOH.
 - 100% EtOH.
- 12- Assecar durant 20 min en un dessecador.

Tampó SSC: NaCl 150 mM, citrat trisòdic 15 mM

Tampó PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ pH 7.2 1.8 mM

Solució de proteïnasa-K: EDTA 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, Proteïnasa-K 1-10 µg/ml

7.3.2 Hibridacions i rentats

Les hibridacions es van fer a 50 °C en un tampó que contenia formamida al 50%. La formamida permet que els rentats siguin suficientment astringents per no haver de pujar la temperatura de la hibridació ja que podria malmetre els teixits. Per eliminar el possible soroll de fons es va fer digestions amb RNAsa, de forma que la digestió només actua amb ssRNA eliminant la sonda no hibridada sense perdre el senyal.

Protocol

- 1- Escalfar els portaobjectes a 50 °C.
- 2- Preparar per a cada par de portaobjectes, 400 µl de sonda a la concentració apropiada en tampó d'hibridació.
- 3- Desnaturalitzar la sonda durant 2 min a 80 °C. Fer un spin i guardar en gel.
- 4- Aplicar la sonda sobre els teixits i cobrir-los en parells de portaobjectes.
- 5- Incubar els portaobjectes en una caixa humidificada a 50 °C durant tota la nit.
- 6- Rentar dues vegades amb tampó de rentat durant 90 min cadascuna d'elles a 50 °C.
- 7- Incubar amb tampó NTE durant 5 min a 37 °C.
- 8- Incubar amb tampó NTE contenint 20 µg/ml de RNAsa durant 30 min a 37 °C.
- 9- Rentar cinc vegades amb tampó NTE durant 10 min cadascuna a 37 °C.
- 10- Incubar amb tampó de rentat durant 1 h a 50 °C.
- 11- Rentar amb tampó PBS durant 5 min.
- 12- Rentar de nou amb tampó PBS.

Tampó d'hibridació: solució tampó de citrat de sodi i NaCl 6X, SDS 3%, formamida 50%, tRNA 100 µg/ml.

Tampó de rentat: SSC 2X, formamida 50%.

Tampó NTE: NaCl 0.5 M, Tris-HCl pH 7.5 10mM, EDTA 1 mM.

7.3.3 Detecció amb digoxigenina (DIG)

Protocol

- 1- Rentar els portaobjectes amb tampó TBS durant 5 min.
- 2- Incubar durant 1 h amb una agitació suau contenint tampó TBS i 0.5% (w/v) de reactiu de bloqueig, (BSA). El reactiu de bloqueig BSA s'ha de preparar al moment dissolent-se durant 30 min a 60 °C; la solució queda tèrbola.
- 3- Rentar amb BSA 1%, Triton X-100 0.3% en tampó TBS durant 30 min.
- 4- Incubar els portaobjectes amb BSA 1%, Triton X-100 0.3% (v/v) en tampó TBS contenint la dilució 1:3000 d'anti-DIG anticòs conjugat amb fosfatasa alcalina durant 90 min tapat del llum.
- 5- Desmuntar els portaobjectes i rentar-los tres vegades amb BSA 1%, Triton X-100 0.3% en tampó TBS durant 20 min cadascuna.
- 6- Rentar amb tampó de detecció 2 durant 5 min.
- 7- Per a cada porta objecte barrejar 0.3 ml de tampó de detecció 2 amb 5 µl de la solució NBT/BCIP.
- 8- Ajuntar els portaobjectes en parelles i deixar-los durant 12 h a la foscor. Comprovar si la reacció ha finalitzat, en cas contrari deixar la incubació 12 h més.
- 9- Es para la reacció en sèries de rentats de 5 min cadascuna d'elles. En el cas que el senyal no sigui massa alt, fer rentats de 30 s.
H₂O destil·lada.
70% EtOH.

100% EtOH
 70% EtOH
 H₂O destil·lada.

10- Deixar assecar i guardar el portaobjectes en una caixa amb gel de sílice. Evitar la pols i la llum.

Tampó TBS: NaCl 400mM, Tris-HCl pH 7.5 100 mM.

Tampó detecció 2: MgCl₂

8-PROTOPLASTS

Els protoplasts (pps) són cèl·lules tractades sense paret cel·lular. D'aquesta manera els tractaments posteriors que es vulguin realitzar seran més fàcils. Malauradament, els protoplasts conserven una elevada capacitat per regenerar les parets, la qual cosa fa que els tractaments s'hagin de fer amb relativa rapidesa.

8.1 Formació de protoplasts a partir de suspensions cel·lulars BY2

Protocol

- 1- A partir de calls BY2 fer suspensions cel·lulars.
- 2- De 2 a 4 dies després de diluir el cultiu centrifugar les cèl·lules a 800 rpm. Rentar amb una solució de manitol 0.4 M, resuspendre-les en una solució enzimàtica (la quantitat mínima de cèl·lules que s'ha de tenir segueix la relació 10 ml / 50 ml de solució enzimàtica) i incubar-les en un erlenmeyer de 250 ml durant 3 h a la foscor amb una agitació de 50 rpm a 28-30 °C.
- 3- Filtrar la solució enzimàtica (formats els pps) en filtres metàl·lics de 100 µm. Rentar el filtre amb 15 ml de solució de rentat W5.
- 4- Distribuir la solució filtrada en tubs de falcon de 15 ml i centrifugar durant 5 min a 800 rpm.
- 5- Eliminar el sobrenedant i afegir 2 ml de solució W5 al pelet format. Ajuntar els pelets de tots els falcons.
- 6- En un falcon nou afegir 8 ml de solució de manitol 0.4 M i afegir amb cura els pelets dels pps formats.
- 7- Centrifugar durant 5 min a 800 rpm. Eliminar el sobrenedant i continuar fent rentats amb la solució W5. Fer aquest procés fins tenir un sobrenedant net, resuspendre el pelet en el medi de cultiu de pps.
- 8- Agafar una alíquota i fer un recompte de cèl·lules. (cambra de recompte = cambra Nageotte). La fórmula a seguir és: El valor mig obtingut de varies àrees multiplicat per 1000 i dividit per 1.25. El valor obtingut es multiplica per la dilució efectuada per comptar (potser 1.10 o 1:100) pel nombre total de falcons (sol ser 1) i pel volum total dels falcons dels pps. Si dividim el nombre total de pps pel volum final es té n° de pps / ml.

Quan es cultiven els pps s'hi posen tots a la concentració desitjada en una placa Corning de 60 mm de diàmetre i 10 ml de medi de cultiu, sense agitació, foscor, tota la nit a 28 °C.

Un cop es tenen els pps cal treballar al moment o conservar-los fins l'endemà a temperatura ambient o a 4 °C.

Solució de manitol: 72.90 g / l.

Solució enzimàtica 100 ml: Pectolyasa Y-23 100 mg, driselasa 1 g, celulasa R-10 2 g, manitol 0.4 M 7.29 g, pH 5.5, s'esterilitza per filtració amb un porus de 0.22 µm.

Solució de rentat W5: NaCl 9 g/l, CaCl₂·2 H₂O 18.3 g/l, KCl 0.37 g/l, glucosa·H₂O 0.99 g/l. pH 6. Autoclavar.

Medi cultiu pels pps: Sals MS, inositol 100 mg/l, sacarosa 10 g/l, 2,4 D 0.2 mg/l, tiamina 1 mg/l, manitol 0.4 M 72.9 g/l. pH 5.8.

8.2 Aïllament de nuclis de protoplasts

El procés d'aïllament de nuclis es realitza a 4 °C.

Protocol

- 1- Centrifugar els pps purificats a 300 rpm durant 5 min.
- 2- Resuspendre el pelet de la centrifugació i els pps en medi NIB (Nuclei Isolation Buffer) fred durant 7 min per produir deplasmólisi.
- 3- Trencament dels pps amb una xeringa que tingui una agulla 25G. Es va passant la solució, unes tres vegades, per l'agulla amb molta cura, d'aquesta manera s'aïllen els nuclis.
- 4- Filtrar amb una capa de Miracloth.
- 5- Fer una altra filtració amb dues capes de Miracloth.
- 6- Recollir els nuclis, centrifugar a 500 rpm durant 8 min.
- 7- Resuspendre en medi NIB sense Triton X-100.
- 8- Conservar els nuclis en glicerol 50 % (v/v) a -80 °C.

Medi NIB: MES 10 mM, sacarosa 0.2 M, Triton X-100 0.05 %, EDTA 2.5 mM, DTT 2.5 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, espermidina 0.1 mM.

9-SINCRONITZACIÓ DE LA DIVISIÓ CEL·LULAR

Els cultius en suspensió de cèl·lules del gènere *Nicotiana* són àmpliament utilitzats en la investigació de la biologia cel·lular vegetal. El coneixement que es té dels processos citològics i moleculars del cicle cel·lular en plantes es coneixen gràcies a les tècniques de sincronització. La sincronització consisteix en el bloqueig i posterior alliberament de cèl·lules en una fase específica del cicle cel·lular. Un model útil per a l'anàlisi detallada dels aspectes moleculars de la divisió cel·lular són els cultius de cèl·lules vegetals en suspensió sincronitzades. En un cultiu sincronitzat ideal, totes les cèl·lules del cicle cel·lular avancen a la mateixa velocitat a partir del mateix punt d'inici (Nagata, 2004). En un cultiu cel·lular real es donen situacions en les quals no totes les cèl·lules creixen a la mateixa velocitat tot i que la sincronització es faci correctament i les cèl·lules parteixin de la mateixa fase, hi ha condicions intrínseques com la massa cel·lular, l'energia disponible, l'estrès ... que poden alterar l'eficiència de la sincronització.

Hi ha reactius químics que bloquegen el cicle cel·lular vegetal actuant sobre la maquinària estructural del fus mitòtic. Un dels bloquejadors específics de la fase S de la divisió és l'afidicolina. L'afidicolina és una molècula extreta del fong *Cephalosporium aphidicola* que inhibeix l'activitat de la DNA polimerasa α i β a l'hora de competir amb els dCTPs pel punt d'unió a l'enzim. (Oguro *et al.*, 1979).

Les sincronitzacions fetes en aquesta tesi segueixen el protocol de Nagata, T. *et al* (1992) amb algunes petites variacions. Es pot arribar a tenir un 70% de cèl·lules sincronitzades.

Protocol

Es treballà en medi completament estèril. Sota campana de flux i material autoclavat o estèril.

- 1- A partir de les suspensions del cultiu cel·lular BY2 agafar 10 ml i subcultivar en medi BY2 líquid fresc amb l'antibiòtic selectiu, deixar incubar durant una setmana a la foscor i a 24 °C.
- 2- Transferir 10 ml del cultiu en 90 ml de medi BY2 líquid. Fer-ho en dos erlenmeyers per possibles contaminacions.
- 3- Afegir 5 mg/ml d'afidicolina. Deixar durant 24 h en agitació a 130 rpm, a la foscor i a 24 °C.
- 4- En aquest moment la majoria de les cèl·lules estan aturades en la fase G1.
- 5- Fer diferents rentats gastant en total 1 l de medi BY2 líquid. Els rentats es poden fer mitjançant sedimentació o filtració. En aquesta tesi s'ha realitzat mitjançant sedimentació.
- 6- Traspasar la solució a un falcon de 50 ml, deixar sedimentar, centrifugar a 500 rpm durant 1 min.
- 7- Eliminar el sobrenedant, afegir més medi BY2, barrejar la solució amb cura pujant i baixant el falcon.
- 8- Repetir les etapes 6 i 7 fins acabar el litre de medi BY2.
- 9- Un cop fet els diferents rentats resuspendre el cultiu amb 100 ml de medi BY2 fresc i traspasar-lo a un erlenmeyer.
- 10- Deixar en agitació horitzontal a 130 rpm, foscor i a 24 °C. El cicle es comença en la fase S.
- 11- Anar controlant les diferents fases de la divisió al microscopi confocal a mida que van passant les hores tenint en compte les durades de les diferents fases:
 - Fase G1 dura 5-10 h
 - Fase S dura 4-7 h
 - Fase G2 dura 3-5 h
 - Mitosi 1-2 h

10- COSEDIMENTACIÓ AMB MICROTÚBULS

La cosedimentació permet identificar proteïnes que poden unir-se als microtúbuls (MT) *in vitro*. Es basa en el fet que els MT poden precipitar quan es centrifuga a 100000 x g. Per tant, qualsevol proteïna que estigui associada a MT precipitarà durant la centrifugació, amb què es pot esbrinar una proteïna provinent d'un gel de proteïnes SDS-PAGE és capaç d'associar-se amb el MT mitjançant l'anàlisi de la fracció precipitada vs sobrenedant.

El gel de proteïnes es tenyeix amb Coomassie o amb nitrat de plata. Si es donés el cas que la proteïna estudiada quedés emmascarada amb la tubulina (50 -60 KDa) es recomana fer un western utilitzant un anticòs específic. També es recomana precipitar el sobrenedant amb TCA abans de carregar en un gel.

La realització d'aquest assaig de cosedimentació s'ha realitzat seguint el protocol "Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Biochem kit" (Cytoskeleton) amb algunes variacions.

10.1 Preparació dels microtúbuls (MT)

Cal polimeritzar els MT que s'utilitzaran com a substrat al moment a temperatura ambient. Com a MT es van utilitzar proteïnes de tubulina purificada de cervell boví (Cytoskeleton INC, TL238).

Protocol

- 1- Mantenir el Taxol a temperatura ambient durant tot el procés. El Taxol estabilitza els MT un cop reconstituïts.
- 2- Fer aliquotes 200 µl de tampó GTB en un tub eppendorf i escalfar a 35 °C.
- 3- Descongelar 20 µl de proteïna de tubulina durant uns minuts a temperatura ambient. Un cop descongelat immediatament mantenir-la en gel.
- 4- Afegir 2 µl de tampó CB a la tubulina, incubar durant 20 min a 35 °C. En aquest punt les tubulines es polimeritzen i formen els MT.
- 5- Afegir al tampó GTB, 2 µl de Taxol 2 mM. Barrejar bé.
- 6- Treure els MT de la incubació i afegir els 200 µl del tampó GTB + Taxol. Barrejar suaument i deixar els MT a temperatura ambient. S'obtenen 5 µM dímer de tubulina o 0.4 nM de MT.

10.2 Assaig d'unió

La mostra ha d'estar en un tampó adequat que permeti unir-se als MT. No són favorables concentracions altes de NaCl ni de Ca²⁺ (despolimeritza els MT), ni pH inferiors a 5 o superiors a 9. Es recomana incloure Mg²⁺ 5 mM en el tampó GTB. Els tampons recomanats són: HEPES, PIPES i MES a 80 mM. Com a control es fa servir BSA ja que no precipita amb els MT.

En aquesta tesi s'han hagut d'introduir certes modificacions respecte al protocol recomanat pel fabricant.

Protocol

- 1- Centrifugar la mostra a 14000 rpm durant 10 min a 4 °C. D'aquesta manera s'eviten agregacions i desnaturalitzacions de les proteïnes.
- 2- Preparar la solució tampó de GTB amb Taxol (v/v) 100:1.
- 3- Muntar les reaccions d'unió a MT segons la taula:

Proteïna (µl)	MT (µl)	GTB + Taxol (µl)
BSA 1,5 (5mg/ml)	0	48,5
BSA 1,5 (5mg/ml)	20	28,5
proteïna (5,0 µg)	0	fins 50 µl
proteïna (5,0 µg)	20	fins 50 µl

- 4- Incubar durant 30 min a temperatura ambient.

- 5- Fer la solució tampó CB seguint la proporció CB:Taxol (v/v)1:0.01. Evitar la formació de bombolles en la solució tampó de CB; en cas de bombolles centrifugar a màxima velocitat durant 1 min.
- 6- Etiquetar els tubs d'ultracentrífuga. Afegir a cada tub el volum permès amb la solució de CB + Taxol tot i considerant que s'hauran d'afegir els 50 µl. Posar un extra de 100 µl de taxol.
- 7- Col·locar amb molta cura la mostra a la part superior de cada tub.
- 8- Centrifugar cada tub a 100000 x g durant 40 min a temperatura ambient.
- 9- Un cop acabada la centrifugació treure els tubs amb molta cura i marcar amb un retolador la posició on s'hauria de trobar el precipitat.
- 10- Treure 50 µl de la part superior del sobrenedant de cada tub i afegir 10 µl de tampó Laemmli 5X.
- 11- Treure la resta de sobrenedant evitant l'àrea marcada on es suposa que està el precipitat.
- 12- Resuspendre el precipitat amb 50 µl de tampó Laemmli 1X.
- 13- Carregar en un gel de SDS -PAGE 20 µl del sobrenedant i del precipitat. Visualitzar el gel segons la detecció d'interès.

Tampó GTB (General Tubulin Buffer): PIPES 80 mM pH 7.0, MgCl₂ 2 mM, EGTA 0.5 mM.

Tampó CB (Cushion Buffer): PIPES 80 mM pH 7.0, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 60%.

Tampó Laemmli: 1X, (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, blau de bromofenol 0.001% i β mercaptoetanol 5% (v/v). 5X, (Tris-HCl 300 mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol 50%, blau de bromofenol 0.005% i β mercaptoetanol 25% (v/v).

10.3 Precipitació amb TCA

Es recomana precipitar la proteïna que es trobi en el sobrenedant abans de carregar en un gel SDS-PAGE amb TCA.

El procediment està descrit en l'apartat 3.3.

11-IMMUNOPRECIPITACIÓ

La immunoprecipitació (IP) utilitza una reacció específica d'antigen-anticòs principalment per identificar proteïnes de manera que un anticòs específic reacciona amb una mescla de proteïnes. Generalment la seqüència experimental d'una IP és la següent: 1) Un extracte homogeni de proteïnes, de teixits o de cèl·lules, es precipita en l'apropiat tampó de lisi de manera que tinguin el complex immune (antigen) i un anticòs primari, el qual s'unirà amb l'antigen. 2) L'anticòs primari (monoclonal o policlonal) és immobilitzat en un suport insoluble, com agarosa o boles magnètiques, i posteriorment es fan incubacions amb el lisat de l'extracte de proteïnes. Les proteïnes que s'uneixen a l'anticòs primari es recuperen i les que no, es llencen. 3) Els components que s'uneixen (antigen i anticòs) s'elueixen del suport. 4) Les proteïnes immunoprecipitades s'analitzen per SDS-PAGE. Es pot fer una transferència western per determinar el pesos moleculars de les proteïnes, estudiar les interaccions amb altres proteïnes, determinar l'activitat enzimàtica, estudiar modificacions post-traduccionalis o determinar la presència o quantificar les proteïnes.

Aquest assaig es va fer seguint les indicacions del kit "Dynabeads®M-280 Sheep anti-Rabbit IgG" (DYNAL Biotech). Aquest kit té com suport sòlid boles magnètiques (Dynabeads, DB) la

superfície de les quals està recoberta d'immunoglobulines (IgG) anti conill unides covalentment de forma que qualssevol anticòs primari anti-conill s'adherirà. Les boles magnètiques s'afegeixen directament a la mostra que conté l'antigen. Les separacions, rentats, concentracions i purificacions es realitzen amb l'ajuda d'un imant.

11.1 Preparació de les boles magnètiques (DB) amb l'anticòs

Protocol

- 1- Barrejar les partícules (DB) en vòrtex i agafar 100 µl de DB en un tub eppendorf de 2 ml, (100 µl de DB per 25 µg de proteïna total ($6-7 \times 10^8$ part/ml)). Fer-ho en dos eppendorfs ja que un serà la mostra i l'altre el control.
- 2- Posar els eppendorfs en l'imant, esperar durant 2 min i eliminar el sobrenedant.
- 3- Treure els eppendorfs de l'imant i fer tres rentats amb 1 ml PBS 1X de la següent manera: treure el sobrenedant, afegir el PBS 1X, agitar en vortex, posar l'eppendorf a l'imant, esperar 2 min i treure el sobrenedant.
- 4- Resuspendre amb menys volum de PBS 1X i afegir l'anticòs primari/preimmune. La quantitat estàndard és de 0.1-1 µg Ig/10⁷ boles.
- 5- Incubar agitant suaument en òrbita durant 30 min fins 24 h a 2-8 °C.
- 6- Posar els eppendorfs en l'imant durant 2 min i amb una pipeta treure el sobrenedant.
- 7- Treure els eppendorfs de l'imant i rentar dues vegades rentats amb el tampó PBS 1X. A partir d'aquí no utilitzar el vòrtex per barrejar, les barreges es fan suaument amb la pipeta pujant i baixant la solució. Es pot centrifugar a una velocitat màxima de 500 g.

11.2 Crosslinking de les DB amb l'anticòs

El crosslink és un pas opcional. Quan es volen aïllar antígens (proteïnes) d'una mostra que s'han unit a l'anticòs primari i la detecció es fa mitjançant un gel de proteïnes SDS-PAGE seguit amb un western blot o autoradiografia la presència de l'anticòs primari no molesta i no es necessita recórrer al procés de crosslink. Tanmateix si es vol purificar l'antigen o antígens (proteïna) per seqüenciar o fer una co-elució i posteriorment fer un gel de proteïnes de nitrat de plata o Comassie, cal fer el crosslink entre les DB i l'anticòs ja que l'anticòs primari pot interferir.

Protocol

- 1- Afegir 1 ml de trietanolamina (TEA) 0.2 M pH 8.2 a les DB amb l'anticòs primari immobilitzat.
- 8- Fer dos rentats amb 1 ml TEA 0.2 M pH 8.2 de la següent manera: treure el sobrenedant, afegir el TEA, barrejar suaument amb la pipeta pujant i baixant la solució, posar els eppendorfs a l'imant, esperar 2 min i treure el sobrenedant.
- 2- Resuspendre les DB en 1 ml de (dimethyl pimelimidate dihydrochloride) DMP 20 mM en TEA 0.2 M pH 8.2 (5.4 mg DMP/ml tampó TEA). Aquesta solució s'ha de preparar al moment.
- 3- Incubar agitant suaument en òrbita durant 30 min a 20 °C.
- 4- Centrifugar a 500 g com a màxima velocitat i col·locar els eppendorfs en l'imant. Treure el sobrenedant.
- 5- Treure els eppendorfs de l'imant i parar la reacció resuspenent les DB amb 1 ml de Tris 50 mM pH 7.5 durant 15 min amb agitació orbital.
- 6- Posar els eppendorfs en l'imant i treure el sobrenedant.

- 9- Fer tres rentats amb 1 ml de PBS 1X/BSA 0.1% de la següent manera: treure el sobrenedant, afegir PBS/BSA, barrejar suaument amb la pipeta pujant i baixant la solució, posar els eppendorfs a l'imant, esperar 2 min i treure el sobrenedant. En l'últim rentat, fer una centrifugació a 500 g i treure el sobrenedant.
- 7- Ja es tenen les DB i l'anticòs primari en crosslink. A partir d'ara es pot afegir l'antigen (la mostra) per dur a terme la IP.

11.3 Immunoprecipitació

L'interacció d'un segon anticòs (Co-IP) o un antigen a la unió DB-anticòs primari depèn de la concentració de les DB, concentració de l'antigen i de l'afinitat que pot tenir l'anticòs primari amb l'antigen.

Protocol

- 1- Afegir l'antigen (mostra) a les DB-anticòs. Per a proteïnes de 100 kDa es posa una relació de 25 µg antigen diana/ml de boles. D'aquesta manera hi ha un excés d'antigen. Si és necessari diluir l'antigen amb tampó PBS.
- 2- Incubar agitant suaument en òrbita durant 1 h a 4 °C. Si es deixa més temps pot ser beneficiós perquè es una manera d'assegurar les unions de proteïnes de poca representació o concentracions molt baixes. Pot resultar, però contraproductiu ja que es poden unir artefactes no desitjats. Cal arribar a l'equilibri.
- 3- Posar els eppendorfs en l'imant durant 2 min. Si la solució és viscosa deixar més temps. Treure el sobrenedant.
- 4- Fer tres rentats amb 1 ml de PBS de la següent manera: treure el sobrenedant, afegir PBS, barrejar suaument amb la pipeta pujant i baixant la solució, posar els eppendorfs a l'imant, esperar 2 min i treure el sobrenedant. En l'últim rentat, centrifugar a 500 g i treure el sobrenedant.
- 5- Eluir amb 30 µl de glicina 0.2 M pH 2.8, fer un vòrtex durant 15 s. Posar els eppendorfs en l'imant durant 2 min, recuperar el sobrenedant, afegir 1-2 µl Tris 2 M pH 10.4 per neutralitzar la solució.
- 6- Rentar dues vegades les DB-anticòs amb PBS 1X/BSA 0.1%. Guardar a 4 °C.
- 7- Les mostres ja estan preparades per carregar-les en un gel de proteïnes SDS-PAGE.

Tampó PBS 1X, (1l): 0.16 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.98 g Na₂HPO₄·2 H₂O, 8.10 g NaCl, H₂O fins 1 l. Ajustar a pH 7.2-7.6.

Tampó PBS 1X/BSA 0.1%: Afegir 0.1% de BSA a la solució de PBS 1X.

12- MICROSCÒPIA

12.1 Microscopi SZX16. Microscopi estereoscòpic

El microscopi SZX16 és un microscopi estereoscòpic usat per visualitzar imatges de gran mida que no requereixen gran profunditat i detall.

Els objectius emprats foren: 1x – SDF PLAPO 1xPF, 1.6x – SDF PLAPO 1.6xPF

Els filtres foren: GFP (BP460-495 BA510IF); GFPA (BP460-495 BA510-550); RFP (BP530-550 BA575IF); UV (BP330-385 BA420)

12.2 Axiophot Zeiss. Microscòpia de fluorescència

S'ha fet servir llum fluorescent per a la visualització de les mostres. S'ha usat un microscopi equipat amb dues càmeres per documentació fotogràfica, una làmpada UV. i filtres de diferents longituds d'ona:

DAPI: 395-440/FT 460/LP 470

Green 450-490/FT 510/LP 520

GFP: Excitation filter P 460-495 / Emission filter bA 510-550

Els objectius foren:

10X - Plan-NEOFLUAR 10X/0.30

20x - NEOFLUAR 20x/0,50 Ph2

40x - Plan-NEOFLUAR 40X/0,75 Ph 2

40x - Plan-NEOFLUAR 40x/1,30 (oli)

60x - Plan-NEOFLUAR 60x/1,25 (oli)

100x - Plan - NEOFLUAR 100x/1,30 oli Ph3

12.3 Microscòpia làser confocal

L'obtenció d'imatges confocals i projeccions x-y es van obtenir amb un microscopi confocal de fluorescència Olympus FV 1000 (Japan). Per estudiar la zona d'interès es va començar amb un objectiu 10X fins captar la imatge amb un objectiu de màxima resolució de 60X tant d'aigua com d'oli.

El tipus d'objectius emprats són:

10X-UPlanSApo 10X/0.4

20X-UPlanSApo 20X/0.75

60X-UPlanSApo 60X/1.35 (oli)

60X-UPlanSApo 60x/1.2 (aigua)

Els làsers emprats per a cada fluoròfor van ser d'argó multilínia. La longitud l'ona d'excitació i la finestra de longitud d'emissió es mostren en la següent taula.

	λ excitació (nm)	Finestra λ emissió (nm)
GFP	488	500-600
YFP	515	530-630
RFP (ds Red)	diode 559	570-670
CFP	diode 405	420-500
Clorofil·la	488	640-700
DAPI	Diode 405	410-500

13- BIOINFORMÀTICA

* Alineament múltiple de seqüències nucleotídiques (BLAST)

- National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* Alineament en base de dades específiques de blat de moro

- Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB) <http://www.maizegdb.org/>

* Alineament en base de dades específiques d'*Arabidopsis thaliana*

- Tair <http://www.arabidopsis.org>

* Descripció de les característiques dels gens

<http://www.geneontology.org>

* Identificació de gens homòlegs a licc1 a partir de dades genòmiques

<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

* Construcció d'arbres filogenètics

Trecon software package: Van de Peer Y., De Wachter R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Appl. Biosci. 10:569–570.

* Alineament múltiple de pèptids i proteïnes

<http://www.uniprot.org>

https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html

<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

* Identificació de motius de proteïnes

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

* Predicció de localització subcel·lular de proteïnes

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

* Predicció del pes i pI de proteïnes

http://web.expasy.org/compute_pi/

* Patrons d'expressió de gens basats en dades *in silico*

<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi

* Predicció d'interacció de proteïnes en *Arabidopsis thaliana*

<http://genemania.org/>

http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi

* Predicció del lloc de fosforilació

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>

BIBLIOGRAFIA

- Adams J.** (2002) Characterization of a *Drosophila melanogaster* orthologue of muskelin. *Gene* **297(1-2)**: 69–78.
- Adams JC., Seed B., Lawler J.** (1998). *EMBO J.* **17**: 4964–4974.
- Alexandrov N., Brover V., Freidin S., Troukhan M., Tatarinova T., Zhang H., Swaller T., Lu Y-P., Bouck J., Flavell R.** (2009) Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol.* **69(1)**:179–194.
- Alibhoy AA., Giardina BJ., Dunton DD., Chiang HL.** (2012).Vid30 is required for the association of Vid vesicles and actin patches in the vacuole import and degradation pathway. *Autophagy.* **8(1)**:29-46.
- An G., Ebert PR., Mitra A., Ha S.B. Gelvin SB., Schilperoort RA.** (1988). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. (eds) pp.A3: 1-19.
- Aquea F., Matte JP., Gutiérrez F., Rico S., Lamprecht M., Sánchez C., Arce-Johnson P.** (2009) Molecular characterization of a Trithorax-group homologue gene from *Pinus radiata*. *Plant Cell Rep.* **28(10)**:1531-8.
- Arnaud Capron, Steven Chatfield, Nicholas Provart, Thomas Berletha.** (2009) Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *Arabidopsis Book*; **7**: e0126.
- Atabakhsh E., Bryce DM., Lefebvre KJ., Schild-Poulter C.** (2009) RanBPM has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to DNA damage. *Mol Cancer Res.* **7(12)**:1962-72.
- Atabakhsh E., Wang JH., Wang X., Carter DE., Schild-Poulter C.** (2012a) RanBPM expression regulates transcriptional pathways involved in development and tumorigenesis. *Am J Cancer Res.* **2(5)**:549-65.
- Atabakhsh E, Schild-Poulter C.** (2012b) RanBPM is an inhibitor of ERK signaling. *PLoS One.* **7(10)**:e47803.
- Azimzadeh J., Nacry P., Christodoulidou A., Drevensek S., Camilleri C., Amiour N., Parcy F., Pastuglia M., Bouchez D.** (2008). *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell.* **20(8)**:2146-59.
- Bala S., Kumar A., Soni S., Sinha S., Hanspal M.** (2006) Emp is a component of the nuclear matrix of mammalian cells and undergoes dynamic rearrangements during cell division. *Biochem Biophys Res Commun* **342(4)**: 1040–1048.
- Balandín M., Royo J., Gómez E., Muniz LM., Molina A., Hueros G.** (2005) A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterization of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol Biol.* **58(2)**:269-82.
- Barnes, WM.** (1994). PCR amplification of up 35 kb DNA with high fidelity yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91(6)**: 2216-2220.
- Becker MG., Hsu SW., Harada JJ., Belmonte MF.** (2014). Genomic dissection of the seed. *Front Plant Sci.* **5**:464.
- Berger F.** (1999). Endosperm development. *Curr.Op.Plant Biol.* **2(1)**: 28-32.
- Bertrucci F., Bernard K., Loriod B., Chang YC., Granjeaud S., Birnbaum D., Nguyen C., Peck K.** (1999). Sensitivity Issues in DNA Array-Based Expression Measurements and Performance of Nylon Microarrays for Small Samples. *Hum Mol Genet.* **9(11)**: 1715-1722.
- Bhattacharyya RP., Reményi A., Yeh BJ., Lim WA.** (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem.*; **75**:655-80.
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S.** (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*; **294(5)**: 1351-1362.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S.** (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* **4(6)**:1633-49.
- Bowman VB, Huang V., Huang AH** (1988). Expression of lipids body protein gene during maize seed development. Spatial, temporal, and hormonal regulation. *J.Biol Chem*, **263(3)**:1476-1481.
- Bradford MM.,** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ana. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandizzi F., Wasteney GO.** (2013) Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant J.* **75(2)**:339-49.
- Braun B., Pfirrmann T., Menssen R., Hofmann K., Scheel H., Wolf DH.** (2011) Gid9, a second RING finger protein contributes to the ubiquitin ligase activity of the Gid complex required for catabolite degradation. *FEBS Lett.* **585(24)**:3856-61.
- Braun et al.** (2011) Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science.* **333(6042)**:601-7.
- Brown CR., Dunton D., Chiang HL.** (2010). The vacuole import and degradation pathway utilizes early steps of endocytosis and actin polymerization to deliver cargo proteins to the vacuole for degradation. *J Biol Chem.* **285(2)**:1516-28.

- Brown T.** (1993). Analysis of DNA sequences by blotting and hybridization. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Volume 1 (U.S. Wiley Interscience), pp. 2.9.1-2.9.15.
- Burk DH., Ye ZH.** (2002). Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell*. **14(9)**:2145-60.
- Caillaud MC., Lecomte P., Jammes F., et al.** (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20(2)**: 423-437.
- Carlson M.** (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol*. **2(2)**:202-7.
- Carvalho Ade O., Gomes VM.** (2011). Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*.**17(38)**:4270-93.
- Cerna D., Wilson DK.** (2005). The structure of Sif2p, a WD repeat protein functioning in the SET3 corepressor complex. *J Mol Biol* **351 (4)**: 923-35.
- Chan MG., Smertenko A., Hussey PJ., Naldrett M., Bottrill A., Lloyd CW.** (2003). Identification of a MAP65 isoform involved in directional expansion of plant cells. *FEBS Lett* **534**:161-163.
- Chang LK., Liu ST., Kuo CW., Wang WH., Chuang JY., Bianchi E., Hong YR.** (2008) Enhancement of transactivation activity of Rta of Epstein-Barr virus by RanBPM. *J Mol Biol*. May **379(2)**:231-42.
- Chang Y., Paramasivam M., Girgenti MJ., Walikonis RS., Bianchi E., LoTurco JJ.** (2010) RanBPM regulates the progression of neuronal precursors through M-phase at the surface of the neocortical ventricular zone. *Dev Neurobiol*. **70(1)**:1-15.
- Chang-Jie J., Sonobe S.** (1993) Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* **105(Pt 4)**:891-901.
- Chen J., Zeng B., Zhang M., Xie S., Wang G., Hauck A., Lai J.** (2014). Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development. *Plant Physiol*. **166(1)**:252-64.
- Chenchik A., Zhu YY., Diatchenko L., Li R., Hil J., Siebert PD.** (1998). Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *Bio Techniques Books, Natick, MA*. 305-319.
- Choi HK., Choi KC., Kang HB., Kim HC., Lee YH., Haam S., Park HG., Yoon HG.** (2008). Function of multiple Lis-Homology domain/WD-40 repeat-containing proteins in feed-forward transcriptional repression by silencing mediator for retinoic and thyroid receptor/nuclear receptor corepressor complexes. *Mol Endocrinol* **22(5)**:1093-104.
- Choi KY., Satterberg B., Lyons DM., Elion EA.** (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*. **78(3)**:499-512.
- Clark SE.** (2001a). Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2(4)**:276-84.
- Clark, J.K. Sheridan, W.F.** (1991). Isolation and characterization of 51 embryo-specific mutations of maize. *Plant Cell* **3(9)**: 935-951.
- Clarke M., Lohan AJ., Liu B., Lagkouvardos I., Roy S., Zafar N., Bertelli C., Schilde C., Kianianmomeni A., Bürglin TR., Frech C., Turcotte B., Kopec KO., Synnott JM., Choo C., Paponov I., Finkler A., Heng Tan CS., Hutchins AP., Weinmeier T., Rattei T., Chu JS., Gimenez G., Irimia M., Rigden DJ., Fitzpatrick DA., Lorenzo-Morales J., Bateman A., Chiu CH., Tang P., Hegemann P., Fromm H., Raoult D., Greub G., Miranda-Saavedra D., Chen N., Nash P., Ginger ML., Horn M., Schaap P., Caler L., Loftus BJ.** (2013). Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* **14(2)**:R11.
- Clough S., Bent A.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **16(6)**: 735-743.
- Coca M., San Segundo B.** (2010). AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant J*. **63(3)**:526-40.
- Conner J., Liu Z.** (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97(23)**:12902-7.
- Constabel CP., Barbehenn RV.** (2008). Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Edited by Schaller A. Springer, New York; 253-269.
- Constabel CP., Bergey DR., Ryan CA.** (1996). Polyphenol oxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. In *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Edited by Romeo JT., Saunders JA., Barbosa P. Plenum Press, New York; 231-252.
- Constabel CP., Ryan CA.** (1998). A survey of wound and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry*, **47(4)**:507-511.
- Cordts S., Bantin J., Wittich PE., Kranz E., Lörz H., Dresselhaus T.** (2001). ZmES genes encode peptides with structural homology to defensins and are specifically expressed in the female gametophyte of maize. *Plant J*. **25(1)**:103-14.

- Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F, Rouhier N. (2013). The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front Plant Sci.* **4**:259.
- Craik DJ, Daly NL, Bond T, Waive C. (1999). Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.* **294**(5): 1327-36 doi:10.1006/jmbi.1999.3383. PMID 10600388.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Bio Rep.* **1**(4):19-21.
- Delto CF, Heisler FF, Kuper J, Sander B, Kneussel M, Schindelin H. (2015). The LisH motif of muskelin is crucial for oligomerization and governs intracellular localization. *Structure.* **23**(2):364-73.
- Delto *et al.*, (2015). The LisH of Muskelin is crucial for oligomerization and governs intracellular localization. *Structure* **23**(2): 364-373.
- Denti S, Sirri A, Cheli A, Rogge L, Innamorati G, Putignano S, Fabbri M, Pardi R, Bianchi E. (2004). RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem.* **279**(13):13027-34.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**(5338): 680-686.
- Dhonukshe P, Weits DA, Cruz-Ramirez A, *et al.* (2012). A PLETHORA-auxin transcription module controls cell division plane rotation through MAP65 and CLASP. *Cell* **149**(2): 383-396.
- Domingues SC, Konietzko U, Henriques AG, Rebelo S, Fardilha M, Nishitani H, Nitsch RM, da Cruz E Silva EF, da Cruz E Silva OA. (2014). RanBP9 modulates AICD localization and transcriptional activity via direct interaction with Tip60. *J Alzheimers Dis.* **42**(4):1415-33.
- Dostál V, Libusová L. (2014). Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma.* **251**(5): 991-1005.
- Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, Moon TS, Petzold CJ, Ullal AV, Prather KL, Keasling JD. (2009). Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol.* **27**(8):753-9.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19** (6): 1349.
- Elster R, Bommert P, Sheridan WF, Werr W. (2000). Analysis of four *embryo-specific* mutants in *Zea mays* reveals that incomplete radial organization of the proembryo interferes with subsequent development. *Dev.Genes.Evol.* **210**(6): 300-310.
- Emes RD, Ponting CP. (2001). A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet.* Nov **10**(24): 2813-20.
- Fache V, Gaillard J, Van Damme D, Geelen D, Neumann E, Stoppin-Mellet V, Vantard M. (2010). *Arabidopsis* kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell.* **22**(11): 3804-15.
- Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**(1): 6-13.
- Fontanet P, Vicent CM. (2008). Maize embryogenesis. *Plant Embryogenesis. Methods In Molecular Biology*, **427**, pp. 17-29.
- Francis O, Han F, Adams JC. (2013). Molecular phylogeny of a RING E3 ubiquitin ligase, conserved in eukaryotic cells and dominated by homologous components, the muskelin/RanBPM/CTLH complex. *PLoS One.* **8**(10): e75217.
- Fraser HB, Plotkin JB. (2007). Using protein complexes to predict phenotypic effects of gene mutation. *Genome Biol.* **8** (11): R252.
- Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, *et al.* (2010) The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. *Cell* **140**(5): 631-642.
- Funke L, Dakoji S, Bredt DS. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem.* **74**: 219-45.
- Galletta BJ, Cooper JA. (2009) Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol.* **21**(1): 20-7.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**(1): 151-158.
- Gao X, Chen Z, Zhang J, Li X, Chen G, Li X, Wu C. (2012). OsLIS-L1 encoding a lissencephaly type-1-like protein with WD40 repeats is required for plant height and male gametophyte formation in rice. *Planta.* **235**(4): 713-27.

- García-Olmedo F., Molina A., Alamillo JM., Rodríguez-Palenzuela P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*. **47(6)**: 479-91.
- Gehl B., Sweetlove LJ. (2014). Mitochondrial Band-7 family proteins: scaffolds for respiratory chain assembly? *Front Plant Sci* **5**: 141.
- Geisler-Lee J., O'Toole N., Ammar R., Provart NJ., Millar AH., Geisler M. (2007). A predicted interactome for *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **145(2)**: 317-29.
- Gerlitz G., Darhin E., Giorgio G., Franco B., Reiner O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle*. **4(11)**: 1632-40.
- Goldberg RB., Barker SJ., Perez-Grau L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*. **56(2)**:149-60.
- Goldberg RB., de Paiva G., Yadegari R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*. **266(5185)**: 605-14.
- Gong X., Ye W., Zhou H., Ren X., Li Z., Zhou W., Wu J., Gong Y., Ouyang Q., Zhao X., Zhang X. (2009). RanBPM is an acetylcholinesterase-interacting protein that translocates into the nucleus during apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). **41(11)**: 883-91.
- Good MC., Zalatan JG., Lim WA. (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*. **332(6030)**: 680-6.
- Goytia E., Fernandez-Calvino L., Martinez-Garcia B., Lopez-Abella D., Lopez-Moya JJ. (2006). Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *J Gen Virol*. **87**: 3413-3423.
- Gueron G., Giudice J., Valacco P., Paez A., Elguero B., Toscani M., Jaworski F., Leskow FC., Cotignola J., Marti M., Binaghi M., Navone N., Vazquez E. (2014). Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget*. **5(12)**: 4087-102.
- Gupta R., Brunak S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing*, **7**:310-322.
- Hafizi S., Gustafsson A., Stenhoff J., Dahlbäck B. (2005). The Ran binding protein RanBPM interacts with Axl and Sky receptor tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. **37(11)**: 2344-56.
- Hamada T. (2014a). Lessons from in vitro reconstitution analyses of plant microtubule-associated proteins. *Front Plant Sci*. **5**: 409.
- Hamada T. (2014b). Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. **312**:1-52.
- Hämmerle M., Bauer J., Rose M., Szallies A., Thumm M., Düsterhus S., Mecke D., Entian KD., Wolf DH. (1998). Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **273(39)**: 25000-5.
- Hanspal M., Smockova Y., Uong Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*. **92(8)**: 2940-50.
- Hao Y., Wang X., Li X., Bassa C., Mila I., Audran C., Maza E. Li Z., Bouzayen M., van der Rest B., Zouine M. (2014). Genome-wide identification, phylogenetic analysis, expression profiling, and protein-protein interaction properties of TOPLESS gene family members in tomato. *J Exp Bot*. **65(4)**: 1013-23.
- Harada N., Yokoyama T., Yamaji R., Nakano Y., Inui H. (2008). RanBP10 acts as a novel coactivator for the androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. **368(1)**: 121-5.
- Harada JJ. (1999) Signaling in plant embryogenesis. *Curr.Op.Plant Biol*. **2**: 23-27.
- Hart GT., Lee I., Marcotte ER. (2007). A high-accuracy consensus map of yeast protein complexes reveals modular nature of gene essentiality. *BMC Bioinformatics* **8**: 236.
- Hartwell LH., Hopfield JJ., Leibler S., Murray AW. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature* **402(6761 Suppl)**: C47-52.
- He F., DiMario P. (2011). Structure and Function of Nopp140 and Treacle. In: The Nucleolus. *Protein Reviews* **15**: 253-278.
- Heckel T., Werner K., Sheridan WF., Dumas C., Rogowsky PM. (1999). Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific mutants of maize. *Planta* **210(1)**: 1-8.
- Heisler FF., Loebrich S., Pechmann Y., Maier N., Zivkovic AR., Tokito M., Hausrat TJ., Schweizer M., Bähring R., Holzbaur EL., Schmitz D., Kneussel M. (2011). Muskelein regulates actin filament- and microtubule-based GABA(A) receptor transport in neurons. *Neuron*. **70(1)**: 66-81.

- Hemerly AS., de Almeida J., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inzé D., Ferreira, P.** (1995). Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* **14(16)**: 3925-3936.
- Hemerly AS., Ferreira PCG., Van Montagu M., Inzé, D.** (1999). Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link?. *BioEssays* **21(1)**: 29-37.
- Horio T., Murata T.** (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci.* **5**: 511.
- Huang PH., Chiang HL.** (1997). Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J Cell Biol.* **136(4)**: 803-10.
- Huh WK., Falvo JV., Gerke LC., Carroll AS., Howson RW., Weissman JS., O'Shea EK.** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* **425(6959)**: 686-91.
- Hussey PJ., Hawkins TJ., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A.** (2002). The plant cytoskeleton: Recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* **50(6)**: 915-924.
- Ideguchi H., Ueda A., Tanaka M., Yang J., Tsuji T., Ohno S., Hagiwara E., Aoki A., Ishigatsubo Y.** (2002). Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J.* **367(Pt 1)**: 87-95.
- Ireland DC., Colgrave ML., Nguyencong P., Daly NL., Craik DJ.** (2006). Discovery and characterization of linear cyclotide from *Viola odorata*: implications for the processing of circular proteins. *J. Mol Biol.* **357(5)**: 1522-35.
- Jarsch IK., Ott T.** (2011). Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* **24(1)**:7-12.
- Iason TC., Tzen HC., Huang.** (1992). Surface Structure and Properties of Plant Seed Oil Bodies. *J Cell Biol.* **117(2)**: 327-335.
- Johnson CM., Stout PR., Broye, TC., Carlton AB.** (1957). Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil* **8(4)**: 337-353.
- Jordan MA., L Wilson.** (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews.* **4(4)**: 253-265.
- Jürgens G.,** (1992). Genes to greens: embryonic pattern formation in plants. *Science* **256**: 487-488.
- Jürgens G.,** (1995). Axis formation in plant embryogenesis: Cues and clues. *Cell* **81**: 467-470.
- Jürgens G., Mayer U., Torres Ruiz RA., Berleth T., Miséra S.** (1991). Genetic analysis of patterns formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev.Supp.* **1**: 27-38.
- Jürgens G., Torres Ruiz R.A., Berleth T.** (1994). Embryonic pattern formation in flowering plants. *Annu.Rev.Genet.* **28**: 351-371.
- Kapila J., Rycke RDe., Montagu MVan, Angenon G.,** (1997). An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* **122(1)**: 101-108.
- Kato K., Matsumoto T., Koiwai S., Mizusaki S., Nishida K., Nogushi M., Tamaki E.** (1972). Liquid suspension culture of tobacco cells. *Ferment Technology Today*. Ed Terui G (Society of Fermentation Technology, Osaka), pp. 689-695.
- Keech O., Pesquet E., Gutierrez ., Ahad A., Bellini C., Smith SM., Gardeström P.** (2010). Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 1710-1720.
- Kiedzińska A., Czepczynska H., Smietana K., Otlewski J.** (2008). Expression, purification and crystallization of cysteine-rich human protein muskelin in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **60(1)**: 82-88.
- Kiesselbac T.A.** (1949). The structure and reproduction of corn. (Lincoln, NE: University of Nebraska Press).
- Kim et al.,** (2014). Structure of mouse muskelin discoidin domain and biochemical characterization of its self-association. *Acta Crystallographica Section D* **70**: 2863-2874.
- Kim MH., Cooper DR., Oleksy A., Devedjiev Y., Derewenda U., et al.** (2004). The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene Lis1 and its functional implications. *Structure* **12(6)**: 987-998.
- Kim YY., Jung KW., Yoo KS., Jeung JU., Shin JS.** (2011). A stress-responsive caleosin-like protein, AtCLO4, acts as a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **52(5)**: 874-84.
- Klein TM., Arentzen R., Lewis P.A. Fitzpatrick-McElligott S.** (1992). Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology* **10(3)**: 286-291.
- Kobayashi N., Yang J. Ueda A., Suzuki T., Tomaru K., Takeno M., Okuda K., Ishigatsubo Y.** (2007). RanBPM, Muskelin, p48EMLP, p44CTLH, and the armadillo-repeat proteins ARMC8alpha and ARMC8beta are components of the CTLH complex. *Gene.* **396(2)**:236-47.

- Kozielski F., Riaz T., DeBonis S., Koehler C.J., Kroening M., Panse I., Strozynski M., Donaldson IM, Thiede B.** (2011). Proteome analysis of microtubule-associated proteins and their interacting partners from mammalian brain. *Amino Acids*, **41(2)**: 363-385.
- Kriz AR.** (1989). Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. *Biochem Genetics*, **27(3-4)**: 239-251.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227(5259)**: 680-685.
- Lakshmana MK., Chung JY., Wickramarachchi S., Tak E., Bianchi E., Koo EH., Kang DE.** (2010). A fragment of the scaffolding protein RanBP9 is increased in Alzheimer's disease brains and strongly potentiates amyloid-beta peptide generation. *FASEB J.* **24(1)**: 119-27.
- Lalit M Srivastava.** (2002). Plant Growth and Development. Elsevier.
- Langdale, J.A.** (1994). *In situ* Hybridization. In The maize Handbook (New York, Springer-Verlag), pp. 165-180.
- Laux T., Jürgens G.** (1997). Embryogenesis: A new start in life. *Plant Cell* **9(7)**: 989-1000.
- Ledee DR., Gao CY., Seth R., Fariss RN., Tripathi BK., Zelenka PS.** (2005). A Specific Interaction between Muskelin and the Cyclin-dependent Kinase 5 Activator p39 Promotes Peripheral Localization of Muskelin. *J. Biol. Chem.* **280(22)**: 21376-21383.
- Lee JM., Williams M., Tingey S., Rafalski A.** (2002). DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. *Funct Integr Genomics*, **2(1)**:13-27.
- Lenhard M., Laux T.** (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Curr Opin Plant Biol.* **2(1)**:44-50.
- Li J., Chen Y., Qin X., Wen J., Ding H., Xia W., et al.** (2014). MiR-138 downregulates miRNA processing in HeLa cells by targeting RMND5A and decreasing Exportin-5 stability. *Nucleic acids research.* **42(1)**: 458-74.
- Livanos P., Apostolakos P., Galatis B.** (2012). Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signal Behav.* **7(7)**:771-8.
- Loewus FA., Murthy PPN.** (2000). Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* **150(1)**: 1-19.
- Lopes MA., Larkins BA.** (1993). Endosperm origin, development and function. *Plant Cell* **5(10)**: 1383-1399.
- López-Ribera I., La Paz JL., Repiso C., García N., Miquel M., Hernández ML., Martínez-Rivas JM., Vicent CM.** (2014). The evolutionary conserved oil body associated protein OBAP1 participates in the regulation of oil body size. *Plant Physiol.* **164(3)**: 1237-49.
- Lucas JR., Courtney S., Hassfurder M., Dhingra S., Bryant A., Shaw SL.** (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* **23**: 1889-1903.
- Mao G., Buschmann H., Doonan JH., Lloyd CW.** (2006). The role of MAP65-1 in microtubule bundling during *Zinnia* tracheary element formation. *Journal of Cell Science* **119(pt4)**: 753-758.
- Mao T., Jin L., Li H., Liu B., Yuan M.** (2005). Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiology* **138(2)**: 654-662.
- Marja Timmermans.** (2010). Plant Development. Elsevier.
- Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M.** (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res.* **22**: 1184-1195.
- Martin JA., Johnson NV., Gross SM., Schnable J., Meng X., Wang M., Coleman-Derr D., Lindquist E., Wei CL., Kaeppler S., Chen F., Wang Z.** (2014). A near complete snapshot of the *Zea mays* seedling transcriptome revealed from ultra-deep sequencing. *Sci Rep.* **4**: 4519.
- Mateja A., Cierpicki T., Paduch M., Derewenda ZS., Otlewski J.** (2006). The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif. *J Mol Biol.* **357(2)**: 621-31.
- Matsumoto H., Ishikawa K., Itabe H., Maruyama Y.** (2006). Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Molecular and cellular biochemistry* **291(1-2)**: 21-8.
- Maye, U., Torres Ruiz RA., Berleth T., Miséra S., Jürgens G.** (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* **353**: 402-407.
- McCarty DR.** (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**:71-93.
- McKay MM., Ritt DA., Morrison DK.** (2009). Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proc Natl Acad Sci.* **106(27)**: 11022-7.

- Meinke DW.** (1991). Perspectives on genetic analysis of plant embryogenesis. *Plant Cell* **3(9)**: 857-866.
- Meinke DW.** (1995). Molecular genetics of plants embryogenesis. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 369-394.
- Menon RP., Gibson TJ., Pastore A.** (2004). The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol.* **343**: 43-53.
- Menssen R., Schweiggert J., Schreiner J., Kusevic D., Reuther J., Braun B., Wolf DH.** (2012). Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem.* **87(30)**: 25602-14.
- Merwe GK., Cooper TG., Van Vuuren HJ.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* is grown in low concentrations of ammonia. *J Biol Chem.* **276(31)**: 28659-66.
- Miernyk JA., Hajduch M.** (2011). Seed proteomics. *J Proteomics.* **74(4)**: 89-400.
- Mikolajczyk M., Shi J., Vaillancourt RR., Sachs NA., Nelson M.** (2003). The cyclin-dependent kinase 11(p46) isoform interacts with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun.* **310(1)**:14-8.
- Miquel M, López-Ribera I, Ràmia M, Casillas S, Barbadilla A, Vicent C.**(2011). *MASISH:a database for gene expression in maize sedes.* *Bioinformatics,* **27**:435-436.
- Müller S., Smertenko A., Wagner V., Heinrich M., Hussey P.J., Hauser MT.** (2004). The plant microtubule associated protein, AtMAP65-3/PLE, is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol.* **14(5)**: 412-417.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15(3)**: 473-497.
- Murphy DJ** (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40(5)**: 325-438.
- Nagata, T.** (2004). When I encountered tobacco BY-22 cells!. In *Tobacco BY-2 cells, Biotechnology in agriculture and forestry* by T. Nagata, S. Hasezawa and D. Inzé, vol **53(347)**, pp. 1-5. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.** (1992). Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**: 1-30.
- Nakamura M.** (2015). Microtubule nucleating and severing enzymes for modifying microtubule array organization and cell morphogenesis in response to environmental cues. *New Phytol.* **205(3)**:1022-7.
- Nakamura M., Masuda H., Horii J., Kuma Ki., Yokoyama N., Ohba T., Nishitani H., Miyata T., Tanaka M., Nishimoto T.** (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol.* **143(4)**:1041-52.
- Nakashima K., Fujita Y., Katsura K., Maruyama K., Narusaka Y., Seki, Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2006). Transcriptional Regulation of ABI3-and ABA- responsive Genes including RD298 and D29A in Seeds, Germinating Embryos, and Seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **60(1)**: 51-68.
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A.** (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol* **59(3)**: 181-96.
- Neuffer MG., Sheridan WF.** (1980). Defective kernel mutants of maize. I. Genetic and lethality studies. *Genetics* **95(4)**: 929-944.
- Neumann E., Damme DV., Stoppin-mellet V., Ebel C., Barbier E., Geelen D., Vantard M., Fourier J., Biologie ID., Ebel SJ.** (2008). Two microtubule-associated proteins of *Arabidopsis* MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell* **19(10)**: 4534-4544.
- Newbiggin E. Smyth DR., Clarke AE.** (1995). Understanding and controlling plant development. *TIB* **13(9)**: 338-343.
- Nguyen GKT., Zhang S., Nguyen NTK., Nguyen PQT., Chiu MS., Hardjojo A., Tam JP.** (2011). Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the *fabaceae* family. *J Biol Chem.* **286(27)**: 24275-24287.
- Nguyen GK., Lian Y., Pang EW., Nguyen PQ., Tran TD., Tam JP.** (2013). Discovery of linear cyclotides in monocot plant *Panicum laxum* of *Poaceae* family provides new insights into evolution and distribution of cyclotides in plants. *J Biol Chem.* **288(5)**: 3370-80.
- Nishimoto T.** (1999). A new role of ran GTPase. *Biochem Biophys Res Commun.* **62(3)**: 571-4.
- Nishitani H., Hirose E., Uchimura Y., Nakamura M., Umeda M., Nishii K., Mori N., Nishimoto T.** (2001). Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene.* **272(1-2)**: 25-33.
- Oda Y.** (2015). Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front Plant Sci.* **6**:236.

- Oguro M., Suzuki-Hori C., Nagano H., Mano Y., Ikegami S.** (1979). The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase α . *Eur. J. Biochem.* **97(2)**: 603-607.
- Olsen JV., Blagoev B., Gnad F. et al.** (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127(3)**: 635-48.
- Ottoline Leyser, SD.** (2002). Mechanisms in Plant Development. *Wiley-Blackwell*.
- Page N., et al.** (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* **163(3)**: 875-94.
- Pathak R., Bogomolnaya LM., Guo J., Polymenis M.** (2004). Gid8p (Dcr1p) and Dcr2p function in a common pathway to promote START completion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* **3(6)**:1627-38.
- Pfirrmann T., Villavicencio-Lorini P., Subudhi AK., Menssen R., Wolf DH., Hollemann T.** (2015). RMND5 from *Xenopus laevis* Is an E3 Ubiquitin-Ligase and Functions in Early Embryonic Forebrain Development. *PLoS One.* **10(3)**: e0120342.
- Pfirrmann T.** (2006). Characterization of Novel proteins involved in Catabolite Degradation of Fructose-1,6-biphosphatase in *saccharomyces cerevisiae*. *PhD Thesis*, Stuttgart University.
- Poirier MB., Laflamme L., Langlois MF.** (2006). Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol.* **36(2)**: 313-25.
- Popescu SC., Snyder M., Dinesh-Kumar S.** (2007). Arabidopsis protein microarrays for the high-throughput identification of protein-protein interactions. *Plant Signal Behav.* **2(5)**:416-20.
- Popescu SC., Popescu GV., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar SP.** (2009). MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23(1)**:80-92.
- Poth AG., Colgrave ML., Lyons RE., Daly NL., Craik DJ.** (2011). Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108(25)**: 10127-10132.
- Prag S., De Arcangelis A., Georges-Labouesse E. Adams JC.** (2007). Regulation of post-translational modifications of muskelin by protein kinase C. *Int J Biochem Cell Biol.* **39(2)**: 366-78.
- Price NC., Stevens L.** (1999). Fundamentals of enzymology: The cell and molecular biology of catalytic protein. *Oxford ; New York: Oxford University Press*.
- Puverel S., Tassarollo L.** (2013). RanBPM, a scaffolding protein for gametogenesis. *Curr Top Dev Biol.* **102**: 357-84.
- Randolph L.F.** (1936). Development morphology of the caryopsis in maize. *J.Agric.Res.* **51**: 881-916.
- Rao MA., Cheng H., Quayle AN., Nishitani H., Nelson CC., Rennie PS.** (2002). RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **277(50)**: 48020-7.
- Regelmann J., Schüle T., Josupeit FS., Horak J., Rose M., Entian KD., Thumm M., Wolf DH.** (2003). Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol Biol Cell.* **14(4)**: 1652-63.
- Reiner O., Sapir T.** (2013). LIS1 functions in normal development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* **23**: 951-6.
- Río, A.** (1999). Caracterización de un receptor quinasa atípico expresado durante la embriogénesis del maíz (*Zea mays*). *Tesi doctoral*. Universitat de Barcelona.
- Roh SE., Woo JA., Lakshmana MK., Uhlar C., Ankala V., Boggess T., Liu T., Hong YH., Mook-Jung I., Kim SJ., Kang DE.** (2013). Mitochondrial dysfunction and calcium deregulation by the RanBP9-cofilin pathway. *FASEB J.* **27(12)**: 4776-89.
- Salemi LM., Almawi AW., Lefebvre KJ., Schild-Poulter C.** (2014). Aggresome formation is regulated by RanBPM through an interaction with HDAC6. *Biol Open.* **3(6)**:418-30.
- Salvo SA., Hirsch CN., Buell CR., Kaeppler SM., Kaeppler HF.** (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PLoS One.* **9(10)**: e111407.
- Santt O., Pfirrmann T., Braun B., Juretschke J., Kimmig P., Scheel H., Hofmann K., Thumm M., Wolf DH.** (2008). The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell.* **19(8)**: 3323-33.
- Sawano M., Shimmen T., Sonobe S.** (2000). Possible involvement of 65 kDa MAP in elongation growth of azubi bean epicotyls. *Plant Cell Physiol* **41(8)**: 968-976.
- Schmidt EDL., de Jong AJ., de Vries SC.** (1994). Signal molecules involved in plant embryogenesis. *Plant Mol.Biol.* **26(5)**: 1305-1313.

- Seaver SM., Bradbury LM., Frelin O., Zarecki R., Ruppin E., Hanson AD., Henry CS. (2015). Improved evidence-based genome-scale metabolic models for maize leaf, embryo, and endosperm. *Front Plant Sci.* **6**: 142.
- Sedbrook JC. (2004). MAP in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Current Op. in Plant Biol.* **7**(6):632-640
- Seebahn A., Rose M., Enz R. (2008). RanBPM is expressed in synaptic layers of the mammalian retina and binds to metabotropic glutamate receptors. *FEBS Lett.* **582**(16): 2453-7.
- Sekhon RS., Briskine R., Hirsch CN., Myers CL., Springer NM., Buell CR., de Leon N., Kaeppler SM. (2013). Maize gene atlas developed by RNA sequencing and comparative evaluation of transcriptomes based on RNA sequencing and microarrays. *PLoS One.* **8**(4): e61005.
- Sekhon RS., Lin H., Childs KL., Hansey CN., Robin Buell C., de Leon N., Kaeppler SM. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* **66**(4): 553-63.
- Serna A., Maitz M., O'Connell T., Santandrea G., Thevissen K., Tienens K., Hueros G., Faleri C., Cai G., Lottspeich F., Thompson RD. (2001). Maize endosperm secretes a novel antifungal protein into adjacent maternal issue. *Plant J.* **25**(6):687-98.
- Sheridan WF. (1988). Maize developmental genetics: genes of morphogenesis. *Annu Rev Genet.* **22**: 353-85
- Sheridan WF., Clark JK. (1987). Maize embryogeny: a promising experimental systems. *TIG* **3**, 3-6.
- Shimada TL., Takano Y., Shimada T., Fujiwara M., Fukao Y., Mori M., Okazaki Y., Saito K., Sasaki R., Aoki K., Hara-Nishimura I. (2014). Leaf oil body functions as a subcellular factory for the production of a phytoalexin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **164**(1): 105-18.
- Shimada TL., Hara-Nishimura I. (2015). Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins. *Curr Opin Plant Biol.* **25**:145-50.
- Shin J., Sohn YC. (2014). Identification of Ran-binding protein M as a stanniocalcin 2 interacting protein and implications for androgen receptor activity. *BMB Rep.* **47**(11): 643-8.
- Smertenko AP., Chang HY., Wagner V., Kaloriti D., Fenyk S., Sonobe S., Lloyd C., Hauser MT., Hussey PJ. (2004). The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* **16**: 2035-2047.
- Smertenko AP., Kaloriti D., Chang HY., Fiserova J., Opatrny Z., Hussey PJ. (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* **20**(12): 3346-3358.
- Snowdon C., Hlynialuk C., Van der Merwe G. (2008). Components of the Vid30c are needed for the rapamycin-induced degradation of the high-affinity hexose transporter Hxt7p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**(2):204-16.
- Soares VLF., Rodrigues SM., de Oliveira TM., et al. (2011). Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. *Molecular Biology Reports* **38**(2): 1329-1340.
- Soni S., Bala S., Hanspal M. (2008). Requirement for erythroblast-macrophage protein (Emp) in definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis* **41**(2): 141-147.
- Soomin Park, John J. Harada. (2008). *Arabidopsis* Embryogenesis. *Plant Embryogenesis. Methods In Molecular Biology*, **427**, pp. 3-16.
- Sreenivasulu N., Wobus U. (2013). Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu Rev Plant Biol.* **64**:189-217.
- Steeves TA., Sussex IM. (1989). Patterns in plant Development. Second Edition (Cambridge: Cambridge University Press).
- Strickfaden SC., Winters MJ., Ben-Ari G., Lamson RE., Tyers M., Pryciak PM. (2007). A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell.* **128**(3): 519-31.
- Struk S., Dhonukshe P. (2014). MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **33**: 1-21.
- Suárez MF., Bozhkov P. (2008). Plant Embryogenesis. *Methods In Molecular Biology*, **427**. Springer.
- Suresh B., Ramakrishna S., Baek KH. (2012). Diverse roles of the scaffolding protein RanBPM. *Drug Discov Today.* **17**(7-8): 379-87.
- Suzuki T., Ueda A., Kobayashi N., Yang J., Tomaru K., Yamamoto M., Takeno M., Ishigatsubo Y. (2008). Proteasome-dependent degradation of alpha-catenin is regulated by interaction with ARMC8alpha. *Biochem J.* **411**(3): 581-91.

- Tagnaouti N., Loebrich S., Heisler F., Pechmann Y., Fehr S., De Arcangelis A., Georges-Labouesse E., Adams JC., Kneussel M.** (2007). Neuronal expression of muskelin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci.* **8**: 28.
- Teoh K., Requesens D., Devaiah S., Johson D., Huang X., Howard J., Hood E.** (2013). Transcriptome analysis of embryo maturation in maize. *BMC Plant Biology*, **13**:19.
- Thipyapong P., Hunt MD., Steffens JC.** (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **40**(3): 673-676.
- Tomaru K., Ueda A., Suzuki T., Kobayashi N., Yang J, et al.** (2010). Armadillo Repeat Containing 8a Binds to HRS and Promotes HRS Interaction with Ubiquitinated Proteins. *Open Biochem J* **4**: 1-8.
- Tomašítková E., Cenková V., Kohoutová L., Petrovská B., Váchová L., Halada P., Kočárová G., Binarová P.** (2012). Interactions of an Arabidopsis RanBPM homologue with LisH-CTLH domain proteins revealed high conservation of CTLH complexes in eukaryotes. *BMC Plant Biol.* **7**: 12:83.
- Topping JF., Lindsey K.** (1997). Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**(10): 1713-1725.
- Trabi M., Craik DJ.** (2004). Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized miniproteins in *Violaceae* and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide1. *Plant Cell.* **16**(8): 2204-16.
- Tran LT., Taylor JS., Constabel CP.** (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* **13**: 395.
- Umeda M., Nishitani H., Nishimoto T.** (2003). A novel nuclear protein, Twa1, and Muskelin comprise a complex with RanBPM. *Gene.* **303**: 47-54.
- Valiyaveetil M., Bentley AA., Gursahaney P., Hussien R., Chakravarti R. Kureishy N. Prag S. Adams JC.** (2008). Novel role of the muskelin-RanBP9 complex as a nucleocytoplasmic mediator of cell morphology regulation. *J Cell Biol.* **182**(4): 727-39.
- Van Aken O., Whelan J., Van Breusegem F.** (2010). Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response. *Trends Plant Sci.* **15**(5): 275-82.
- Van Damme D., Van Poucke K., Boutant E., Ritzenthaler C. Inzé D. Geelen D.** (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* **136**(4): 3956-67.
- Van der Merwe GK., Cooper TG., Van Vuuren HJ.** (2001). Ammonia regulates VID30 expression and Vid30p function shifts nitrogen metabolism toward glutamate formation especially when *Saccharomyces cerevisiae* is grown in low concentrations of ammonia. *J Biol Chem.* **276**(31): 28659-66.
- Van lammeren AAM.** (1986). Development morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays L.*). *Acta Bot.Neerl.* **35**(3): 169-188.
- Van Wijk SJ., de Vries SJ., Kemmeren P., Huang A., Boelens R., Bonvin AM., et al.** (2009). A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol.* **5**: 295.
- Vesna Katavic, Ganesh Kumar Agrawal, Martin Hajduch, Stefan L., Harris, Jay J., Thelen.** (2006). Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars. *Proteomics*, **6**(16): 4586-4598.
- Wang D., Li Z., Messing EM., Wu G.** (2002). Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem.* **277**(39): 36216-22.
- Wang R., Brattain MG.** (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett.* **581**(17): 3164-70.
- Wang H., Kakaradov B., Collins SR., Karotki L., Fiedler D., Shales M., Shokat KM., Walther TC., Krogan NJ., Koller D.** (2009). A complex-based reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* interactome. *Molecular & Cellular Proteomics* **8** (6): 1361-81.
- Wang Y., Wang J., Gao L., Stamm S., Andreadis A.** (2011). An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia. *Gene*, **485**: 130-138.
- Weisenberg RC.** (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**(4054): 1104-5.
- Welte MA.** (2015). Expanding roles for lipids droplets. *Curr Biol.* **25**(11):R470-81.
- West M., Harada JJ.** (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell.* **5**(10):1361-1369.
- Wu Y., Sun X., Kaczmarek E., Dwyer KM., Bianchi E., Usheva A., Robson SC.** (2006). RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J.* **396**(1): 23-30.
- Young, TE., Gallie DR,** (2000). Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol.Bio.* **44**(3): 283-301.

- Young TE., Gallie DR., DeMason DA.** (1997). Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunk2* genotypes. *Plant Physiol.* **115**(2): 737-751.
- Yubuki N., Leander BS.** (2013). Evolution of microtubule organizing centers across the tree of eukaryotes. *Plant J.* **75**(2): 230-44.
- Zhan J., Thakare D., Ma C., Lloyd A., Nixon NM., Arakaki AM., Burnett WJ., Logan KO., Wang D., Wang X., Drews GN., Yadegari R.** (2015). RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell.* **27**(3): 513-31.
- Zhang J., Ma W., Tian S., Fan Z., Ma X., Yang X., Zhao Q., Tan K., Chen H., Chen D., Huang BR.** (2014). RanBPM interacts with T β RI, TRAF6 and curbs TGF induced nuclear accumulation of T β RI. *Cell Signal.* **26**(1): 162-72.
- Zhang J., Hua Z., Huang Z., Chen Q., Long Q., Craik DJ., Baker AJ., Shu W., Liao B.** (2015). Two Blast-independent tools, CyPerl and CyExcel, for harvesting hundreds of novel cyclotides and analogues from plant genomes and protein databases. *Planta.* **241**(4): 929-40.
- Zhang L., Chia J-M., Kumari S., Stein JC., Liu Z., Narechania A., Maher CA., Guill K., McMullen MD., Ware D.** (2009). A Genome-Wide Characterization of MicroRNA Genes in Maize. *PLoS Genet.* **5**(11): e1000716.
- Zhu Y., Wang Y., Xia C. et al.** (2005). WDR26: a novel Gbeta-like protein, suppresses MAPK signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **93** (3): 579-87.
- Zou Y., Lim S., Lee K., Deng X., Friedman E.** (2003). Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem.* **278**(49): 49573-81.

